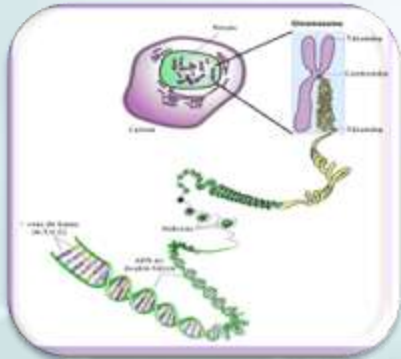




TÉCNICA DO DNA RECOMBINANTE

Prof. IVAnéa

CONCEITOS BÁSICOS



A Tecnologia do DNA recombinante, como se convencionou denominar este conjunto de técnicas, tem uma ampla aplicação.



Ela pode ser usada para estudar mecanismos de:

1. Replicação e expressão gênica,
2. Na determinação da seqüência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica,
3. No desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis tais como a insulina humana, hormônio de crescimento, vacinas e enzimas industriais em grandes quantidades.



Sua aplicação comercial ou biotecnológica. Tem um potencial inesgotável.

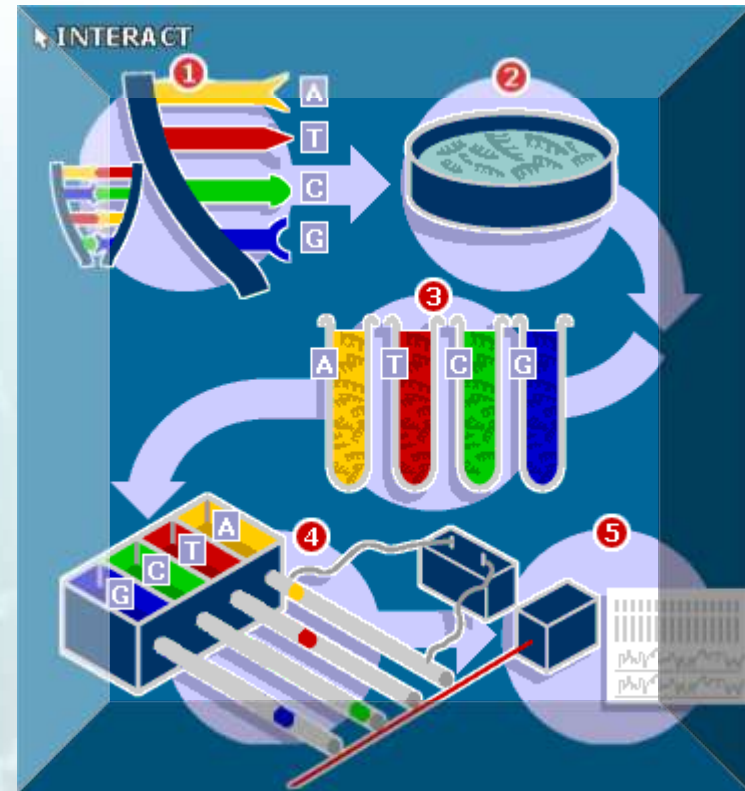
CONCEITO DE CLONAGEM MOLECULAR



A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem molecular compreende pelo menos dois estágios importantes. Primeiro, o fragmento do DNA de interesse chamado de *inserto* é ligado a uma outra molécula de DNA chamada de *vetor* para formar o que se chama de **DNA recombinante**. Segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado de **transformação**. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de **transformante** ou **célula transformada**.

Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA recombinante.

EXTRAÇÃO DO DNA E ELETROFORESE



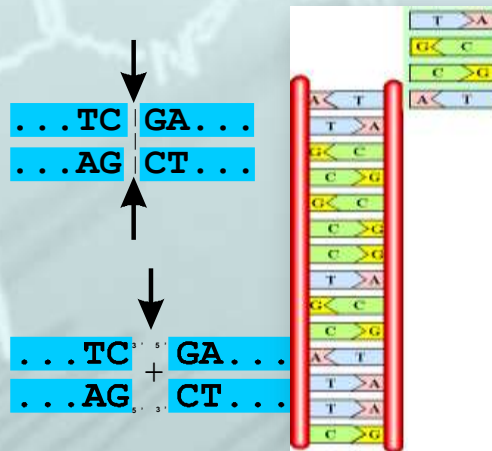
ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As enzimas de restrição ou endonucleases de restrição são divididas em várias classes, dependendo da estrutura, da atividade e dos sítios de reconhecimento e clivagem.

O sítio de reconhecimento deste tipo de enzima é normalmente uma seqüência *palindrômica*, isto é, ela tem um eixo de simetria e a seqüência de bases de uma fita é a mesma da fita complementar, quando lida na direção oposta.

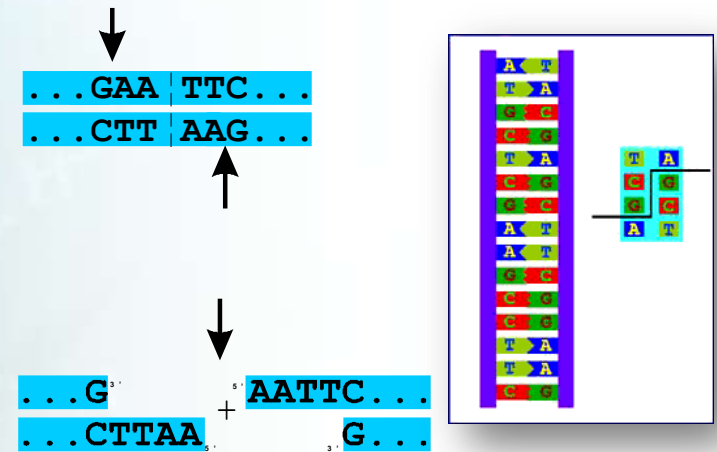
Atualmente, mais de 1000 enzimas de restrição já foram identificadas.

a) Clivagem no eixo de simetria



Moléculas com extremidades abruptas

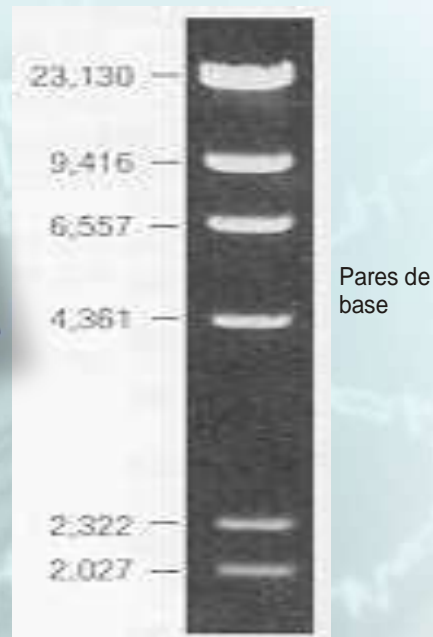
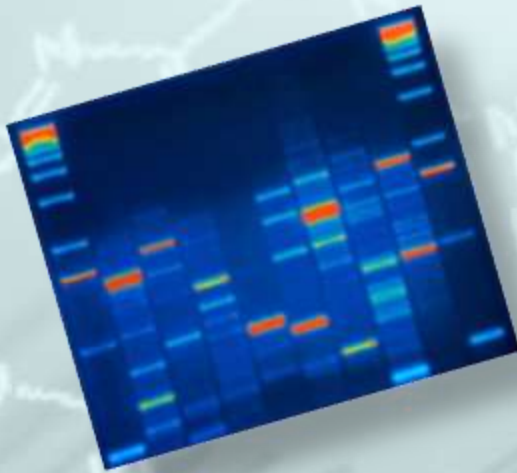
b) Clivagem simetricamente situada ao redor do eixo de simetria



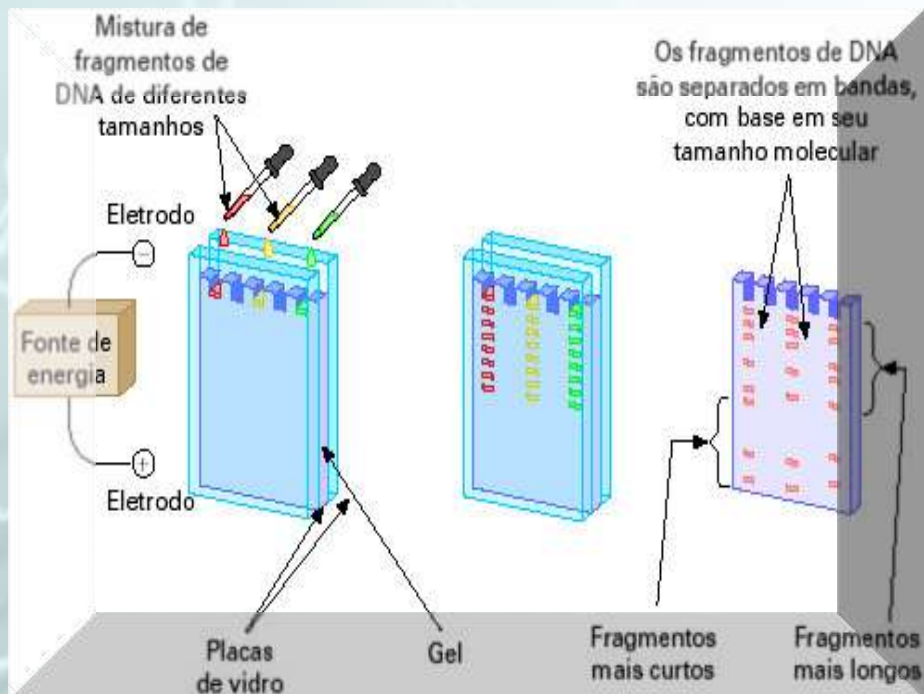
Moléculas com extremidades coesivas

O ISOLAMENTO DE FRAGMENTOS DESTE DNA

A família de fragmentos gerados por digestão com enzima de restrição é geralmente detectada pela separação destes fragmentos por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos migram em função de seus pesos moleculares sendo que os menores migram mais rapidamente



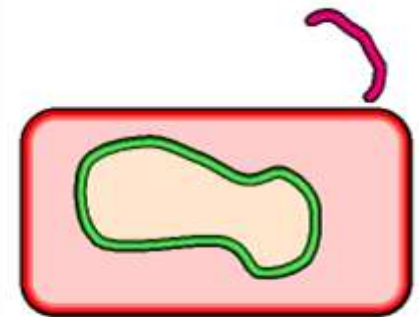
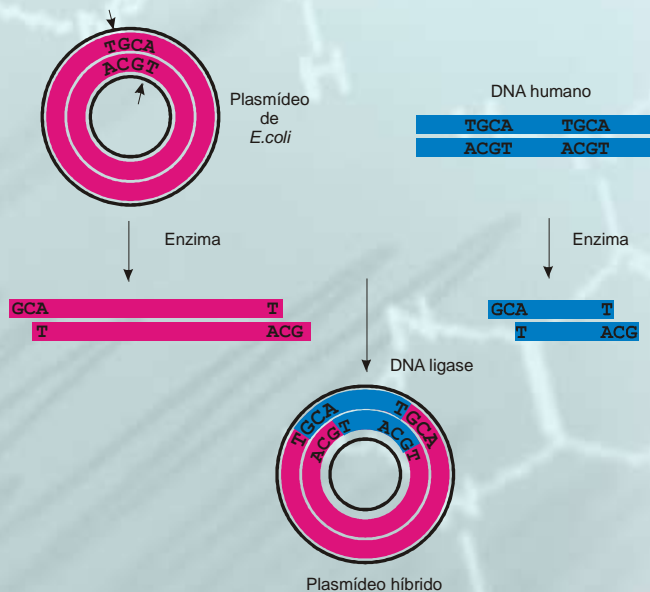
ELETROFORESE



CONSTRUÇÃO DO DNA RECOMBINANTE

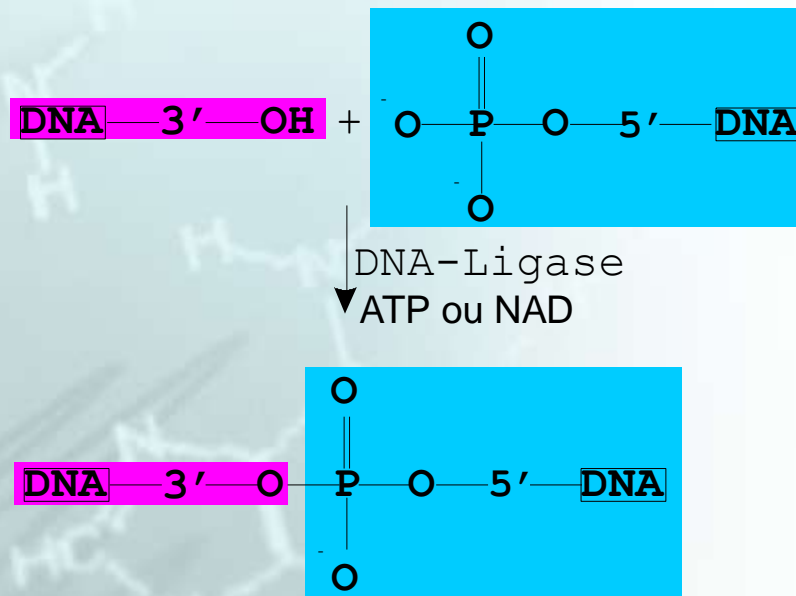
Uma enzima de restrição particular reconhece somente uma seqüência única de bases. DNAs de origens diferentes sob a ação da mesma enzima de restrição produzem fragmentos com o mesmo conjunto de extremidades fitas simples.

O fragmentos de dois diferentes organismos (por exemplo, bactéria e homem) podem ser ligados por renaturação das regiões de fita simples. Além disto, se a ligação for "selada" com a enzima DNA ligase, depois do pareamento de bases, os fragmentos serão ligados permanentemente.



DNA LIGASE

Conforme mencionado anteriormente, esta enzima promove a ligação dos fragmentos de DNA em vetores previamente clivados por endonucleases de restrição. A DNA ligase requer um grupo OH livre na extremidade 3' de uma das cadeias de DNA e um grupo fosfato na extremidade 5' da outra cadeia.



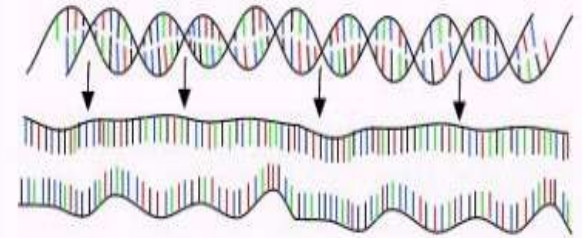
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Permite que pequenas amostras de DNA sejam rapidamente amplificadas.

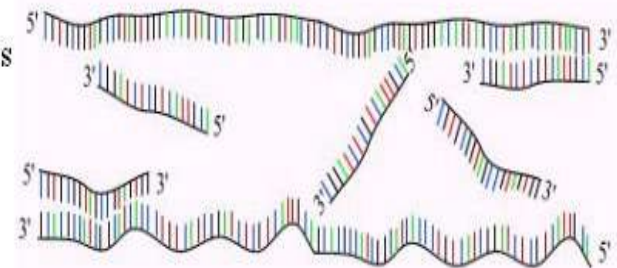
A reação é incubada para atividade da DNA polimerase, produzindo novas fitas de DNAs a partir dos iniciadores e utilizando o quatro desoxirribonucleotídios (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), são primers.

30 a 40 de ciclos de 3 etapas:

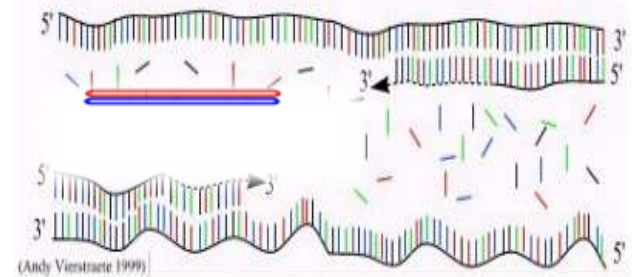
1) Desnaturação
1 minuto 94 °C



2) Hibridização dos iniciadores
45 segundos 54 °C



3) Extensão
2 minutos 72 °C



(Andy Veenstra 1999)