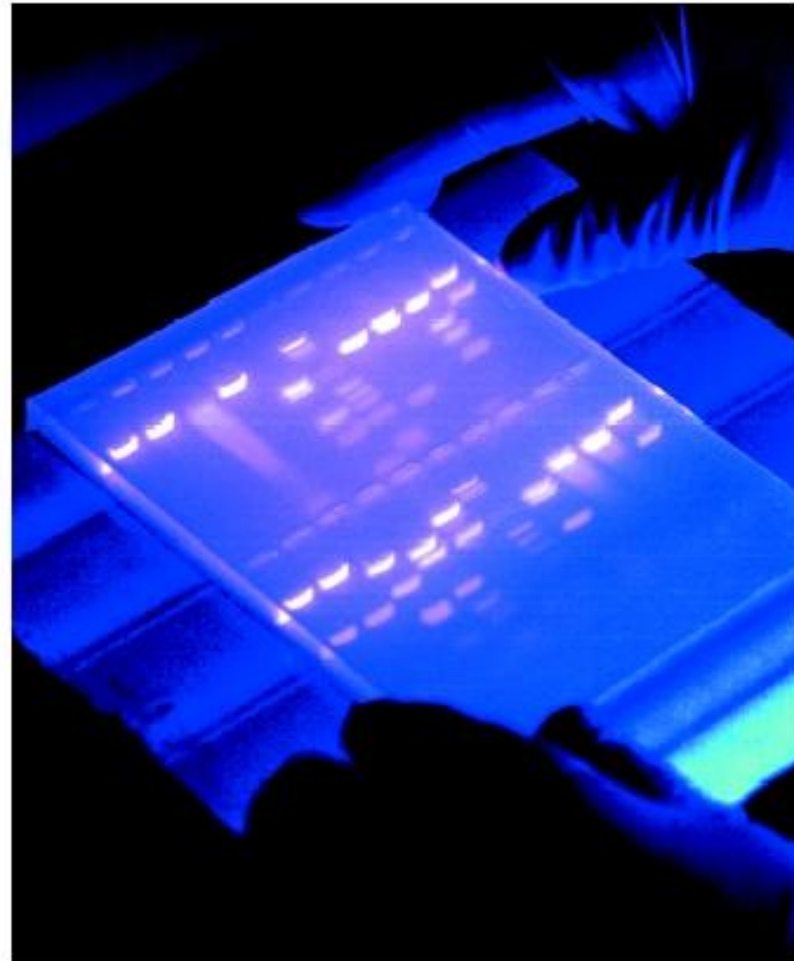
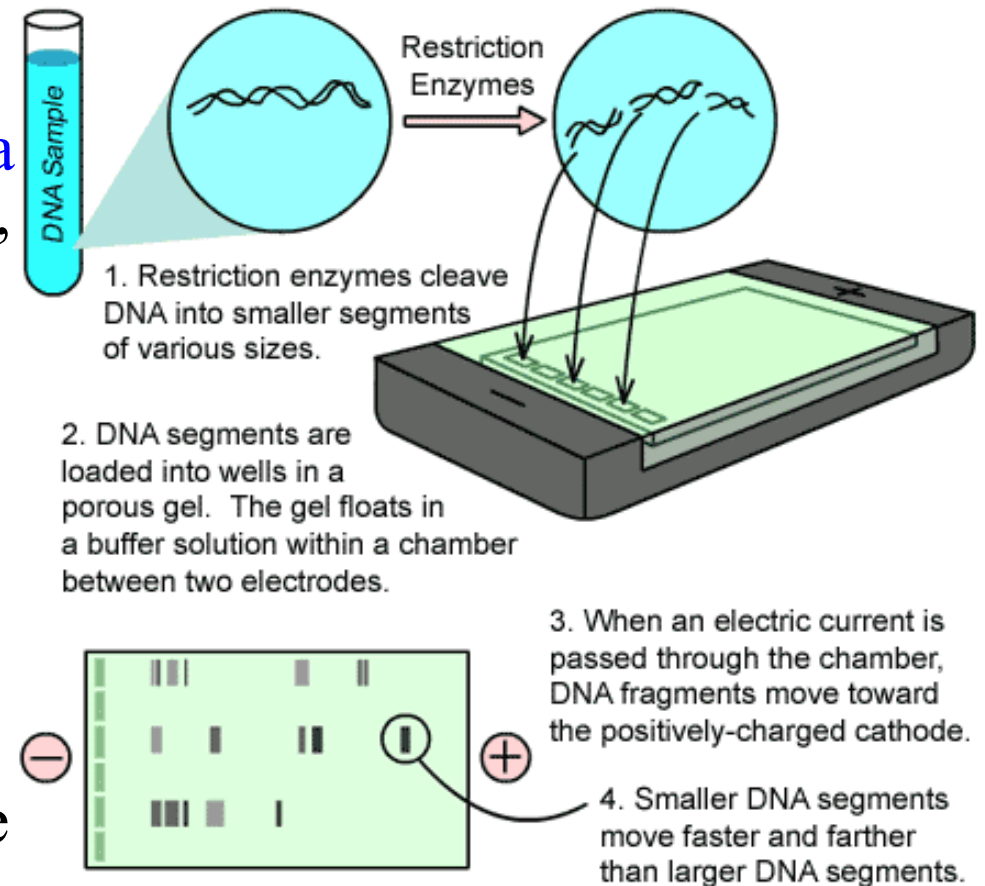


Electroforesis de ácidos nucleicos

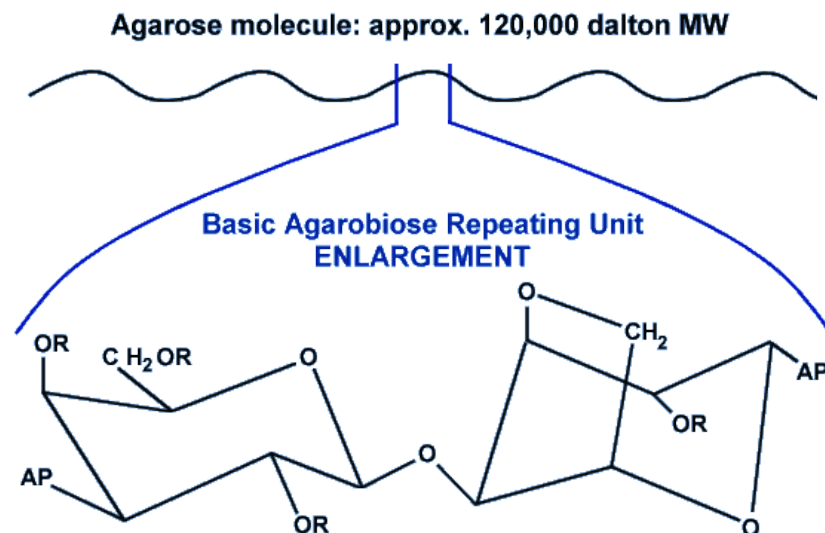


- A electroforese consiste em **fazer migrar biomoléculas por uma matriz**, sob a **influência de um campo eléctrico**, permitindo separá-las segundo as suas **propriedades fisico-químicas** (tamanho e carga)

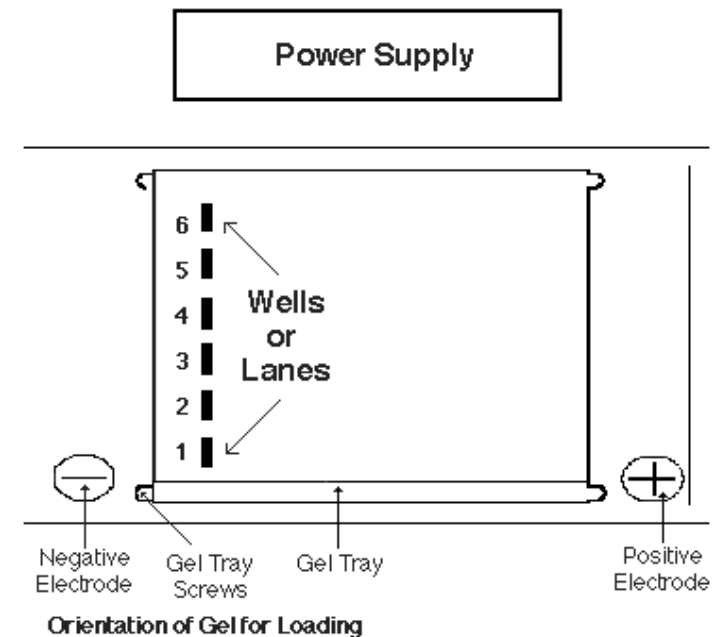
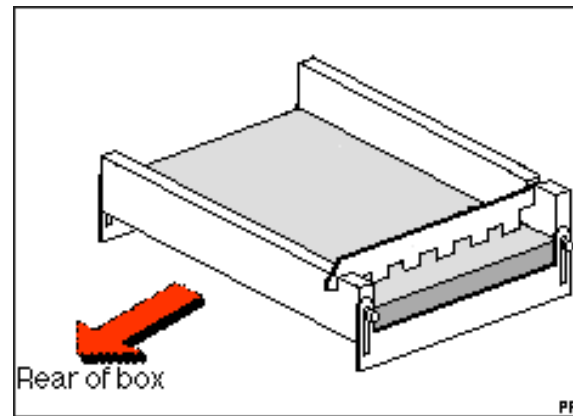
- Podem realizar-se electroforeses de **proteínas**, de **RNA** e de **DNA**



- a electroforese em **gel de agarose** é um procedimento utilizado em várias áreas da biotecnologia, em laboratórios de investigação, medicina e de biologia forense
- permite **analisar fragmentos de DNA** e determinar o seu **tamanho**
- o suporte de separação é a **agarose** – um polissacarídeo derivado do **agar**, **altamente purificado e livre de cargas e impurezas**

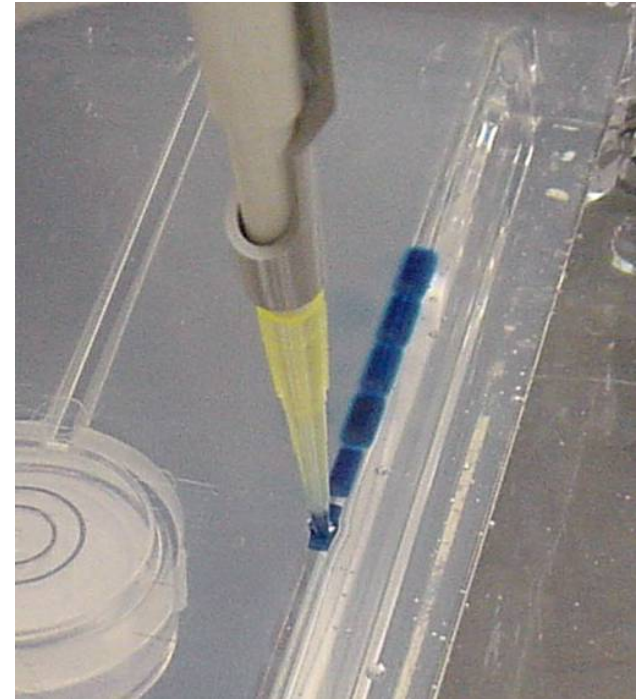


- o gel é preparado dissolvendo a agarose numa **solução tamponada**, recorrendo à **fervura**
- após arrefecimento ($\approx 55\text{ }^{\circ}\text{C}$), a solução é vertida para um molde, na extremidade do qual é colocado um **pente** para **originar os poços onde as amostras (de DNA) serão aplicadas**

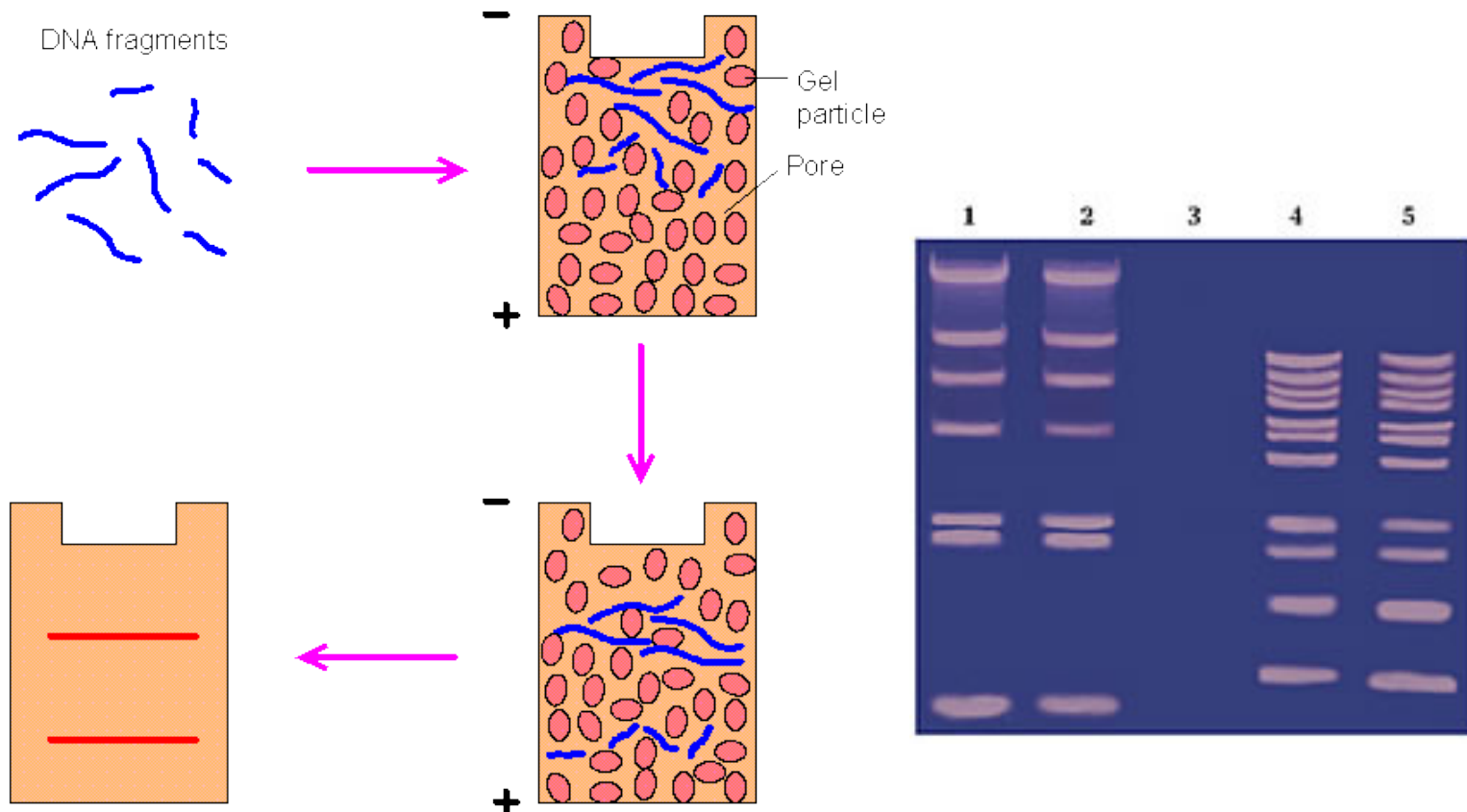


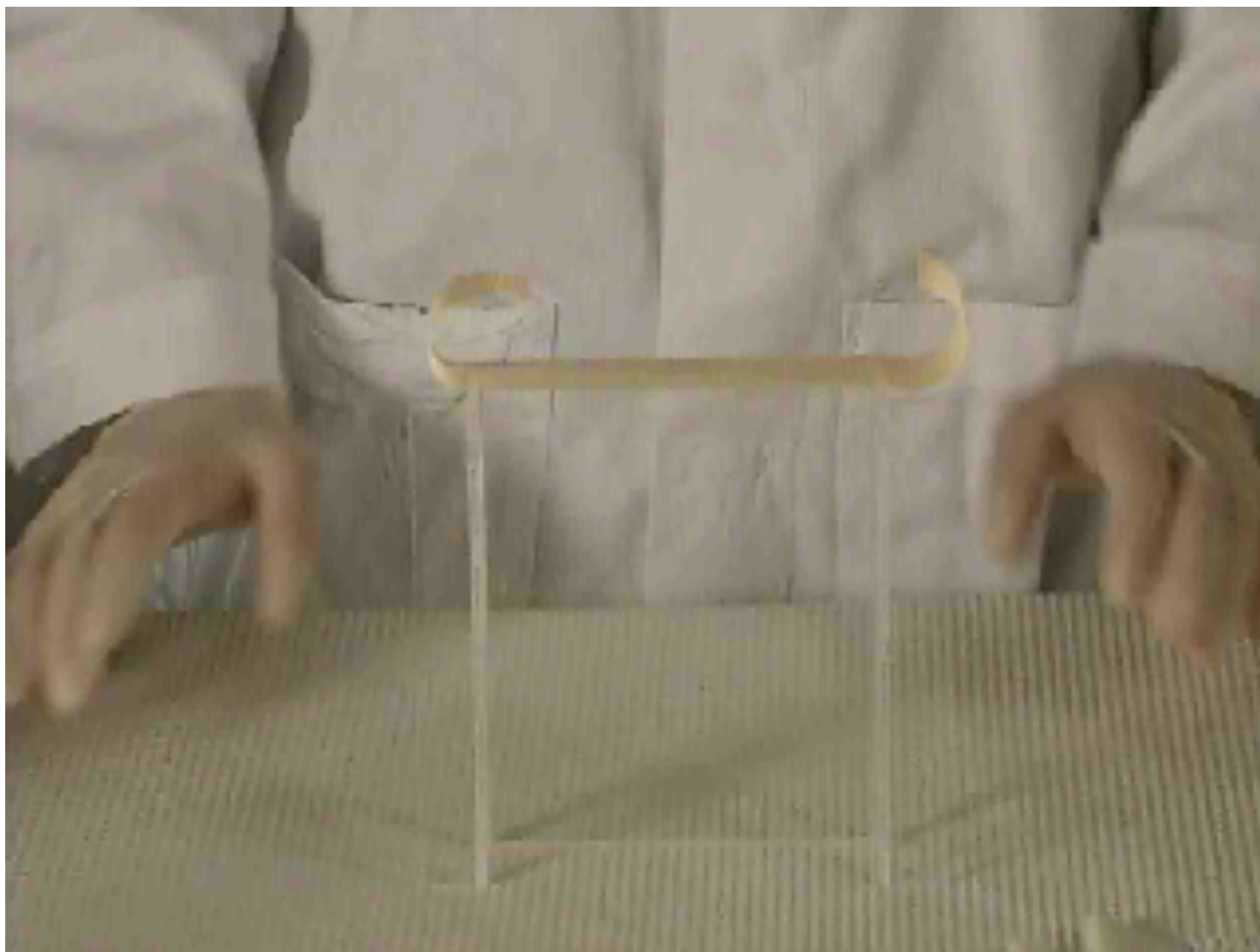
- **após solidificação** do gel, este é submergido numa tina, cheia de tampão de electroforese, que possui um **eléctrodo positivo** (cátodo) numa das extremidades e um **eléctrodo negativo** (ânodo) na **extremidade dos poços**

- as amostras são preparadas adicionando:
 - uma substância que lhes confira densidade (glicerol, sacarose...), permitindo que elas afundem directamente nos poços aquando da sua aplicação;
 - cor, facilitando este processo
- liga-se uma fonte de alimentação à tina de electroforese e aplica-se corrente:
 - as moléculas com carga negativa (DNA) irão migrar para o polo positivo
 - as moléculas com carga positiva migrarão em direcção ao polo negativo



- a **porosidade da agarose** irá oferecer **resistência à migração das moléculas** – as moléculas maiores irão ficar **retardadas** em relação às de menores dimensões
- o **tampão de electroforese** fornece **condutibilidade eléctrica** e **mantém o pH** – necessário para a manutenção da carga e estabilidade das moléculas







Técnicas de coloração para visualizar o DNA no gel

- Brometo de etídeo (EtBr)
 - é o composto mais utilizado em laboratórios para visualizar os ácidos nucleicos após electroforese
 - em contacto com os ácidos nucleicos, aloja-se entre duas bases azotadas adjacentes
 - é visualizado por radiação UV de baixo comprimento de onda, o que aumenta o risco para a saúde
 - usado na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de gel, podendo ser adicionado no acto da preparação do gel

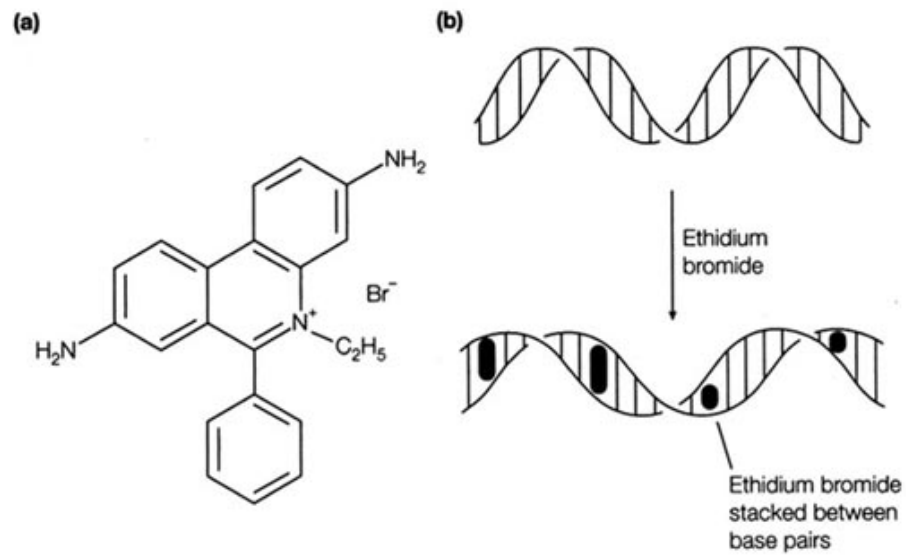
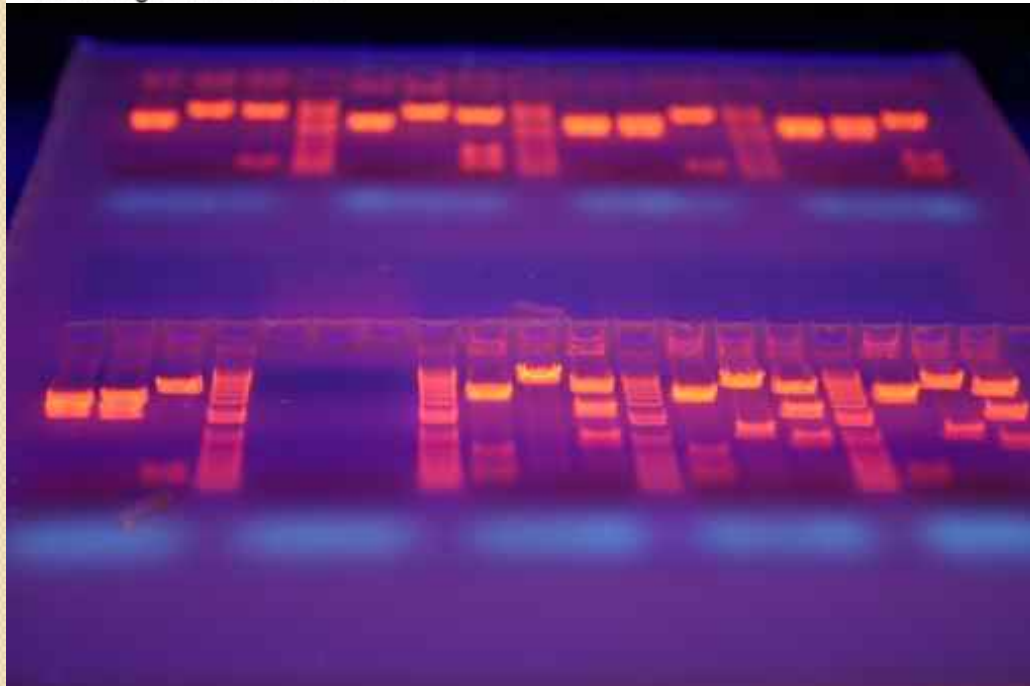
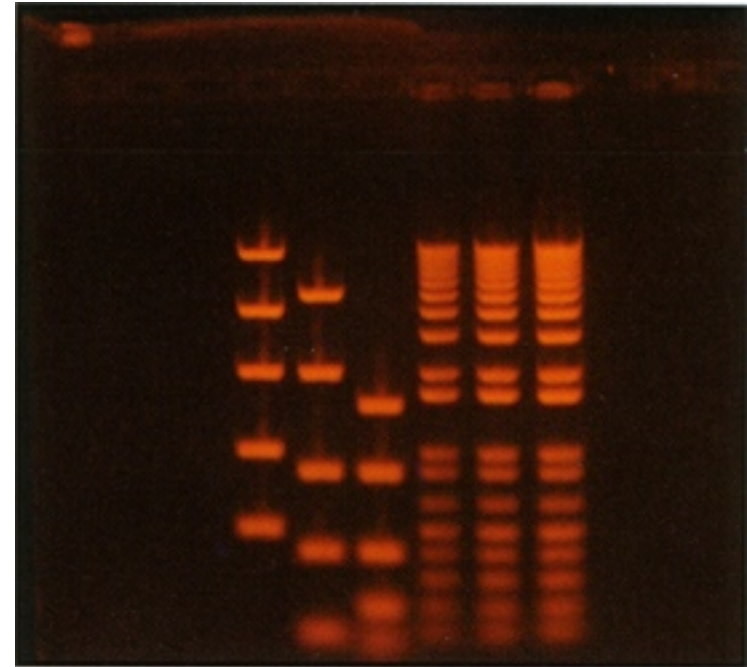
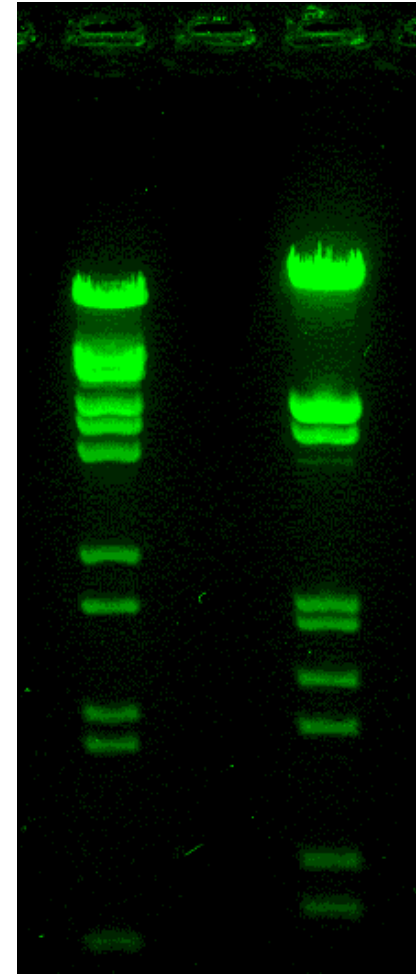


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.

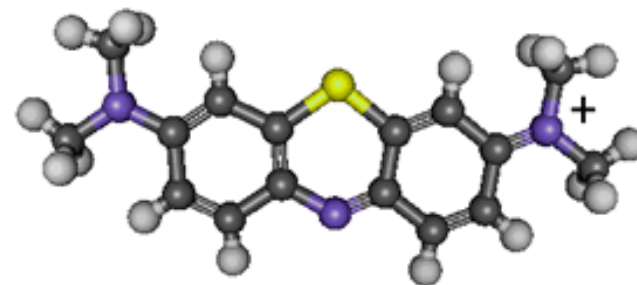


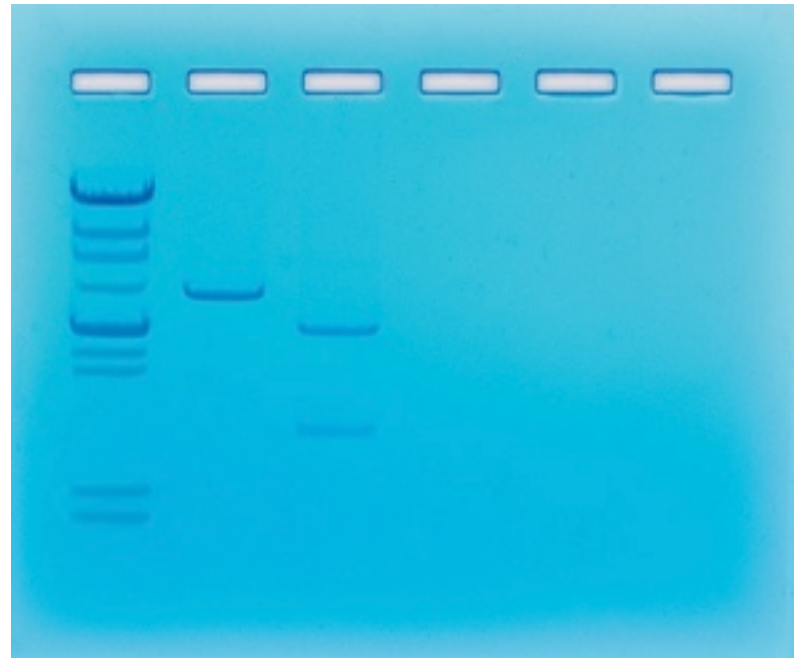
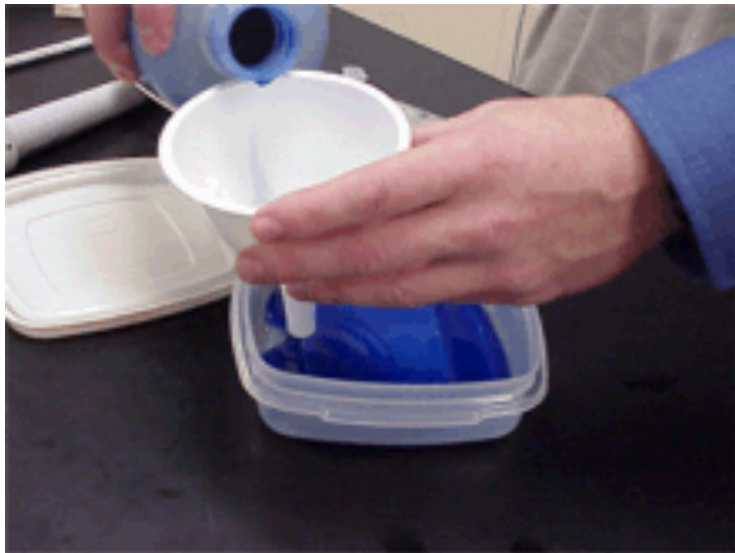
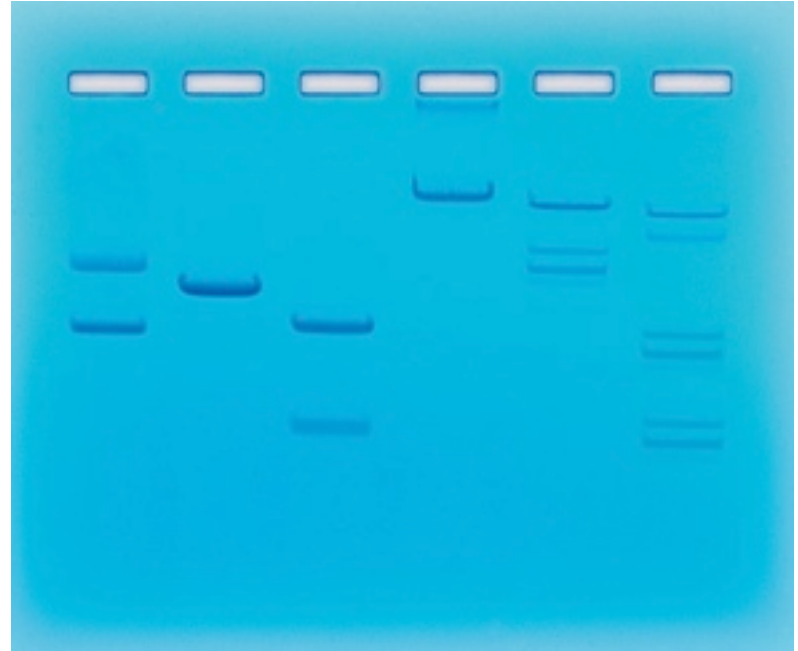
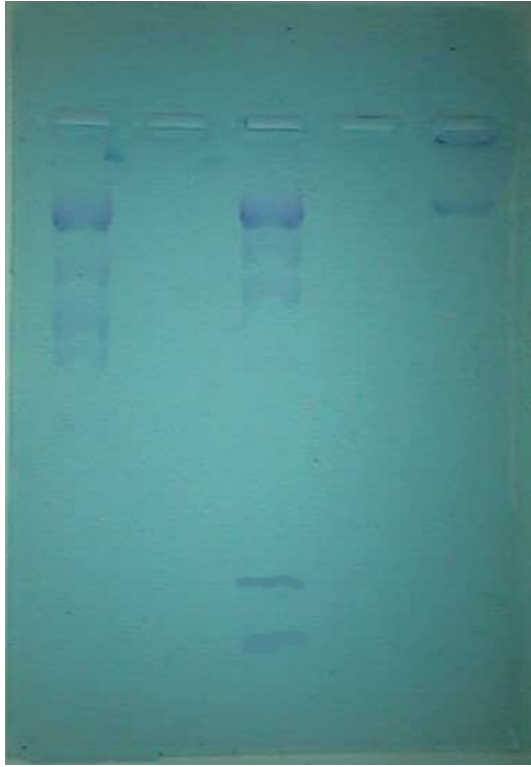
- Corantes à base de cianeto

- ex: **SYBR dyes** (Molecular Probes, Eugene)
- possuem **maior sensibilidade** que o EtBr
- níveis de **ruído de fundo** (background) mais **baixos**
- necessitam de ser visualizados com radiação UV



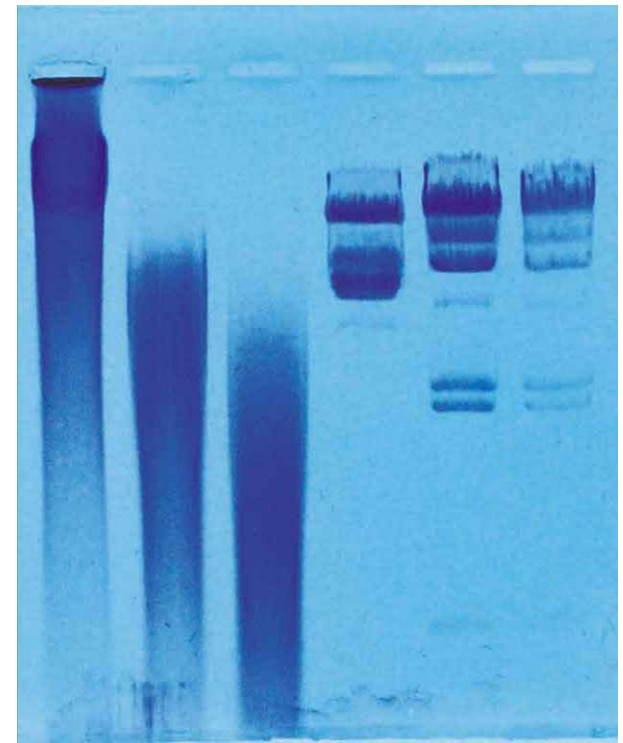
- Azul de metileno (e derivados)
 - o modo exacto de acção não é conhecido
 - não é tão sensível como o EtBr
 - usado na concentração de 0,02 a 0,04% (p/v)
 - adicionado ao gel após separação electroforética na forma de solução
 - necessidade de descorar o gel
 - coloração esvanece com o tempo



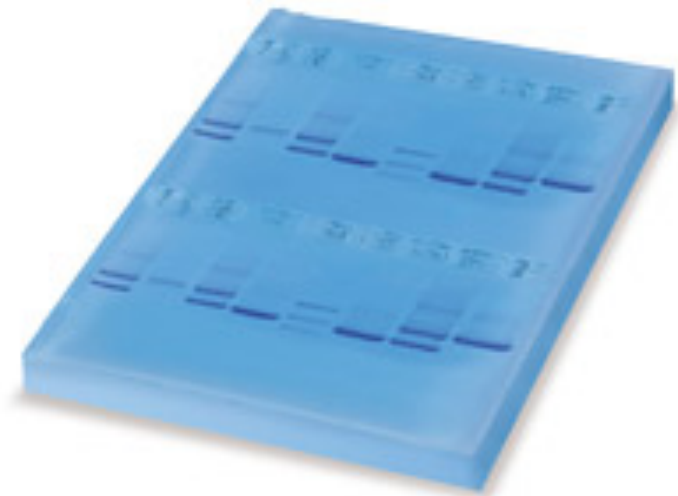


- Azure A

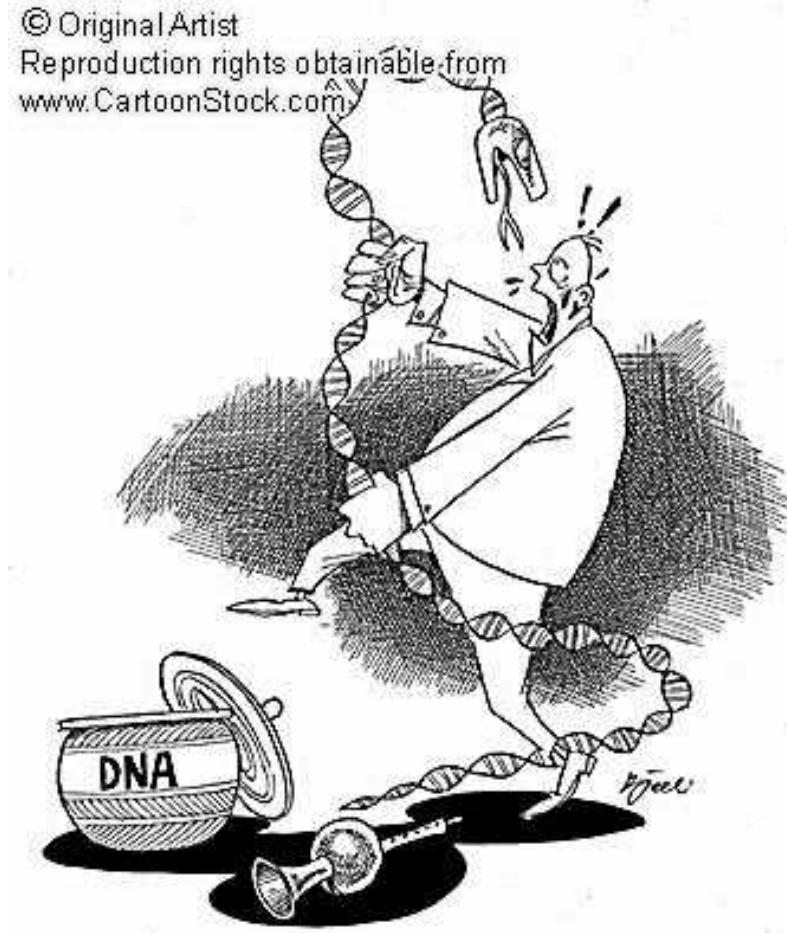
- não tóxico, nem carcinogénico, mas inflamável
- pode ser eliminado sem prejuízo para o ambiente
- adicionado ao gel após separação electroforética
- o DNA aparecerá como bandas azuis
- Solução stock (2x concentrada):
 - 0,08g Azure A
 - 50 mL Etanol 40%
 - diluir 1:2 em água destilada para corar
- o gel corado pode ser guardado indefinidamente a 4 °C



- Fast Blast DNA stain (BioRad)
 - não tóxico, nem carcinogénico
 - pode ser eliminado sem prejuízo para o ambiente
 - adicionado ao gel aquando da sua preparação ou após separação electroforética
 - o DNA aparecerá em bandas azuis
 - (www.biorad.com)



Clonagem, sequenciação e hibridação



Clonagem

- O estudo do DNA ao nível molecular implica o uso de **grandes quantidades deste na sua forma pura**;
- A **clonagem** de um gene (ou de um fragmento de DNA) consiste na **ligação deste a um vector**, originando uma **molécula de DNA recombinante**;

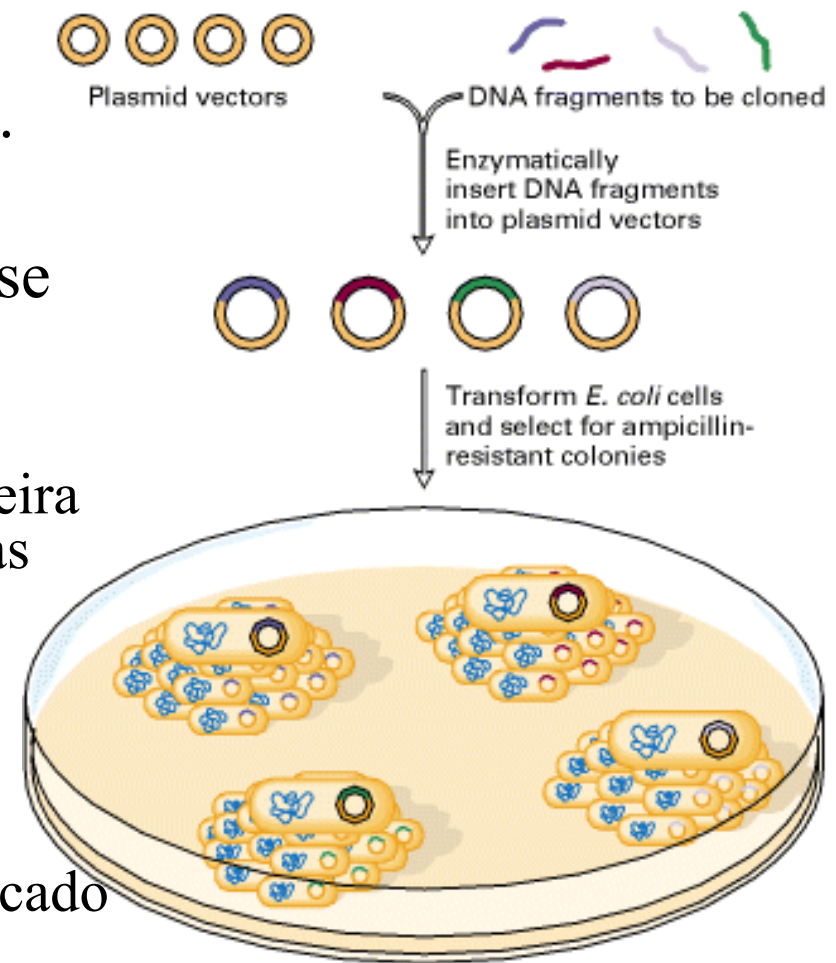


- É introduzida numa célula hospedeira, sendo aí multiplicada.

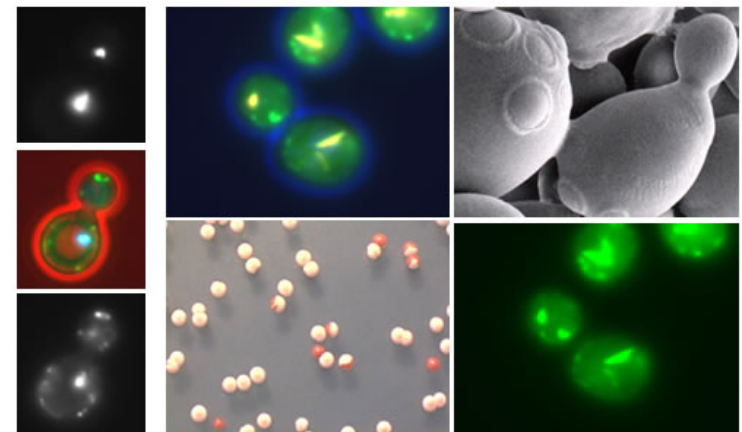
- **DNA Recombinante** – molécula de DNA composta por sequências nucleotídicas derivadas de fontes distintas.

- **Vector** – tem capacidade de se replicar autonomamente;

- à medida que a célula hospedeira se divide, transmite o vector às células filhas, originando um clone de células iguais.
- O DNA de interesse é amplificado muitas vezes e pode ser posteriormente isolado e caracterizado!



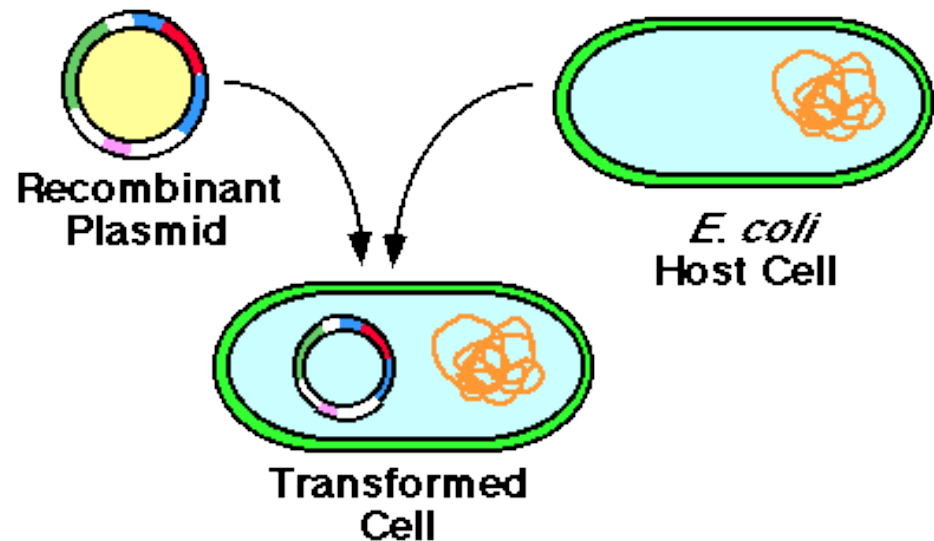
- Actualmente podem ser usados como hospedeiros para a clonagem de DNA:
 - Eucariotas;
 - Procariotas;
 - células de diferentes organismos em cultura.
- Os **vetores** a usar **dependem de vários factores**, como por ex: o hospedeiro a usar, objectivo da clonagem, etc..



Vectores plasmídicos

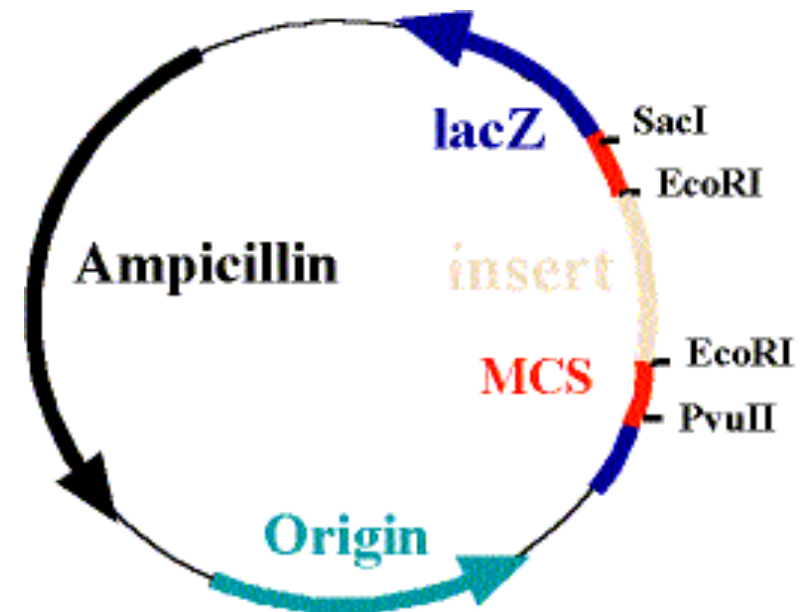
- Os plasmídios mais usados são aqueles que se replicam em *Escherichia coli*;
- São moléculas de DNA, circulares (1,2 – 3,5 kb), com capacidade de replicação independente do genoma bacteriano;

- São introduzidos nas bactérias por um processo designado **Transformação**.



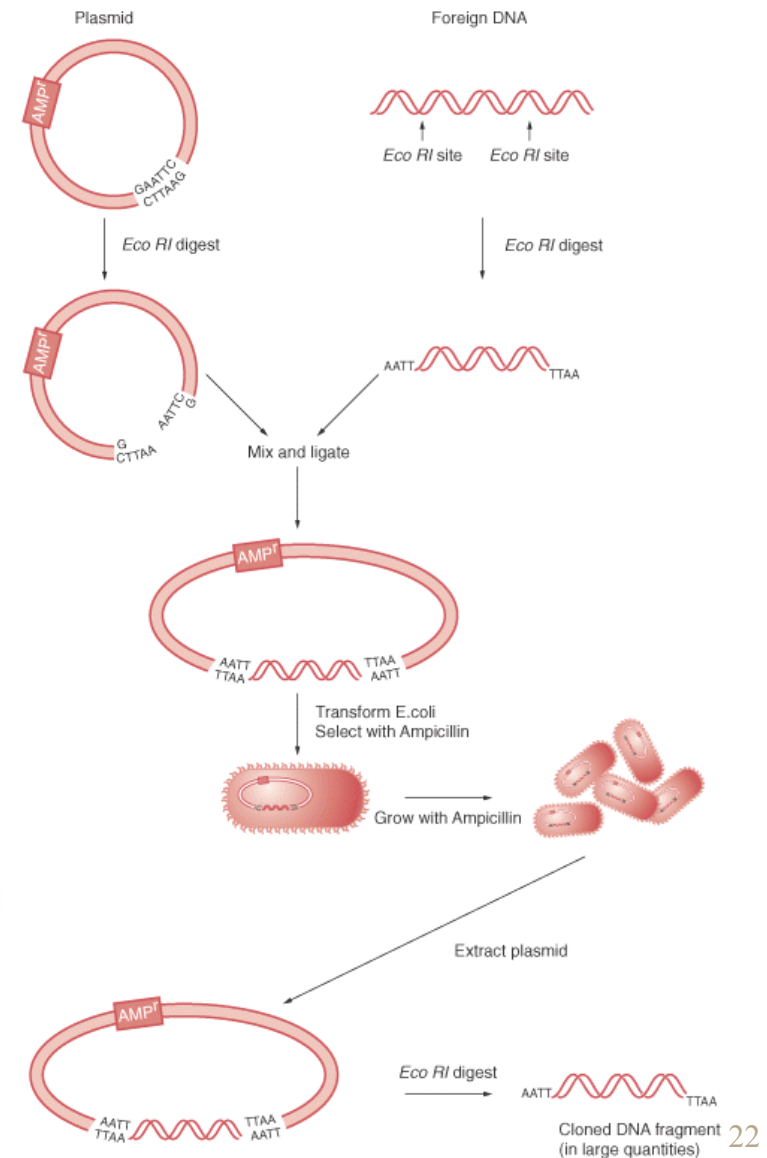
Características comuns dos plasmídios

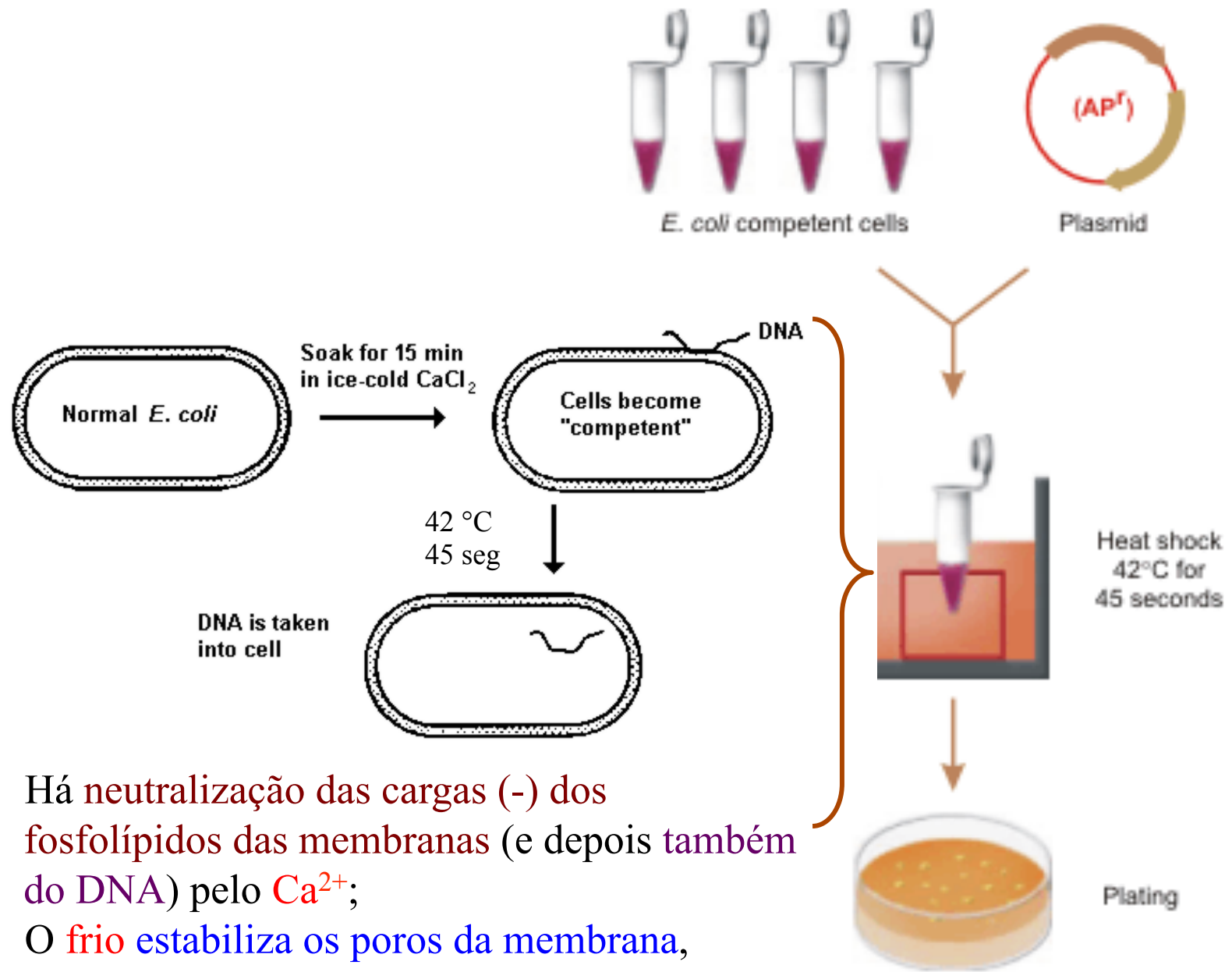
- **origem de replicação (ORI)** – permite a replicação do plasmídio dentro da célula hospedeira
- **região de clonagem (MCS)** – permite a inserção do fragmento de DNA a clonar – **apresenta vários locais de restrição**
- **marcador de selecção** – permite seleccionar os hospedeiros que incorporaram o DNA “estranho” (ex: gene que confere resistência a um antibiótico, como a ampicilina)



Transformação bacteriana

1. O plasmídeo e DNA a clonar são linearizados por corte com a(s) mesma(s) enzima(s) de restrição;
 2. Mistura-se o DNA e o plasmídeo, na presença de DNA ligase, para ocorrer a ligação do fragmento de inserção ao plasmídeo;
 3. Incuba-se a reacção de ligação com uma cultura de *E. coli* **competentes**;
- Células tratadas de modo a mais facilmente incorporarem DNA “estranho”.





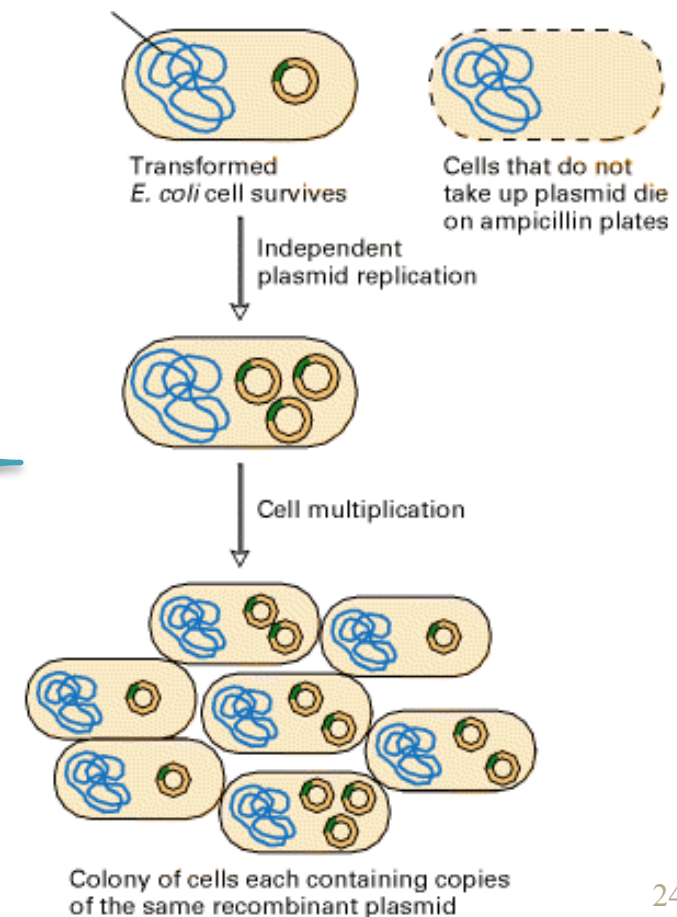
- Há neutralização das cargas (-) dos fosfolípidos das membranas (e depois também do DNA) pelo Ca^{2+} ;
- O frio estabiliza os poros da membrana, aumentando as probabilidades do DNA entrar na célula.

4. Incubam-se em meio nutritivo líquido para que **as células transformadas possam sintetizar as proteínas que conferem resistência ao agente selectivo.**

5. Crescimento das bactérias em meio de cultura sólido contendo um agente selectivo apropriado;



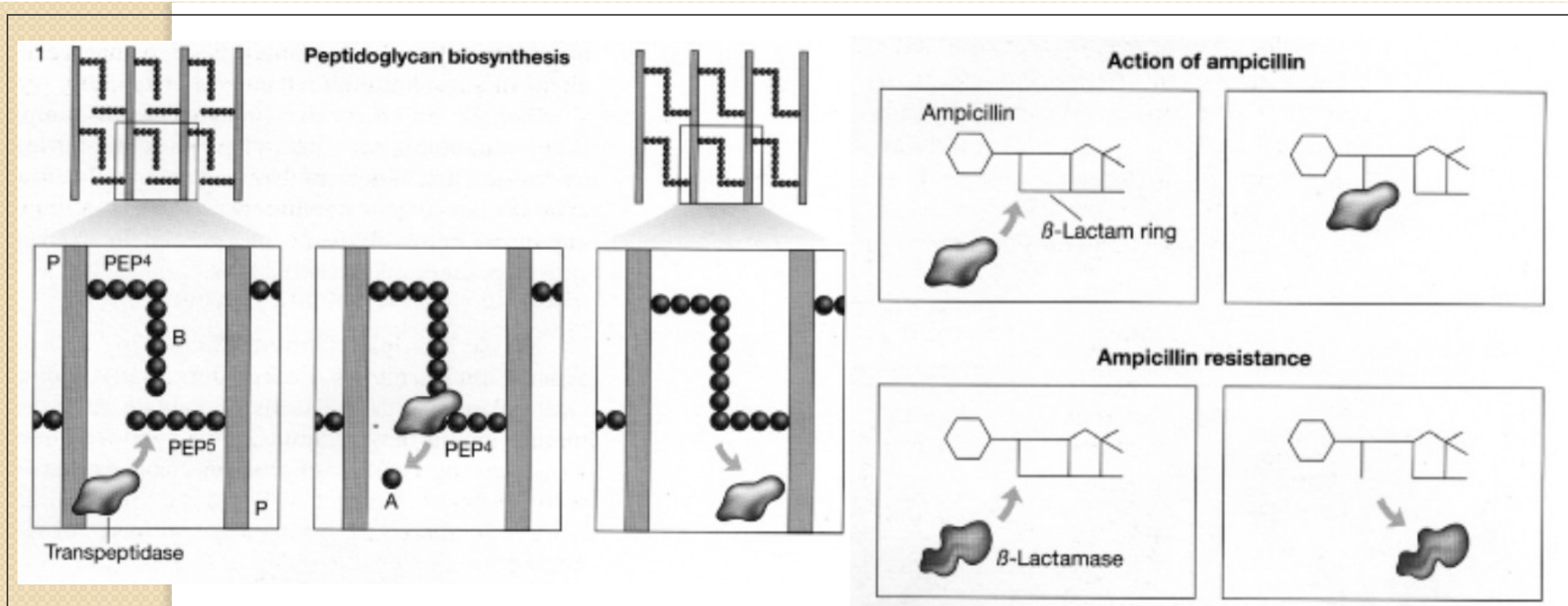
- **Seleccção das bactérias transformadas;** as bactérias não transformadas são eliminadas.
- **Apenas as que incorporaram o vector vivem** porque adquiriram resistência ao agente selectivo codificada no vector.



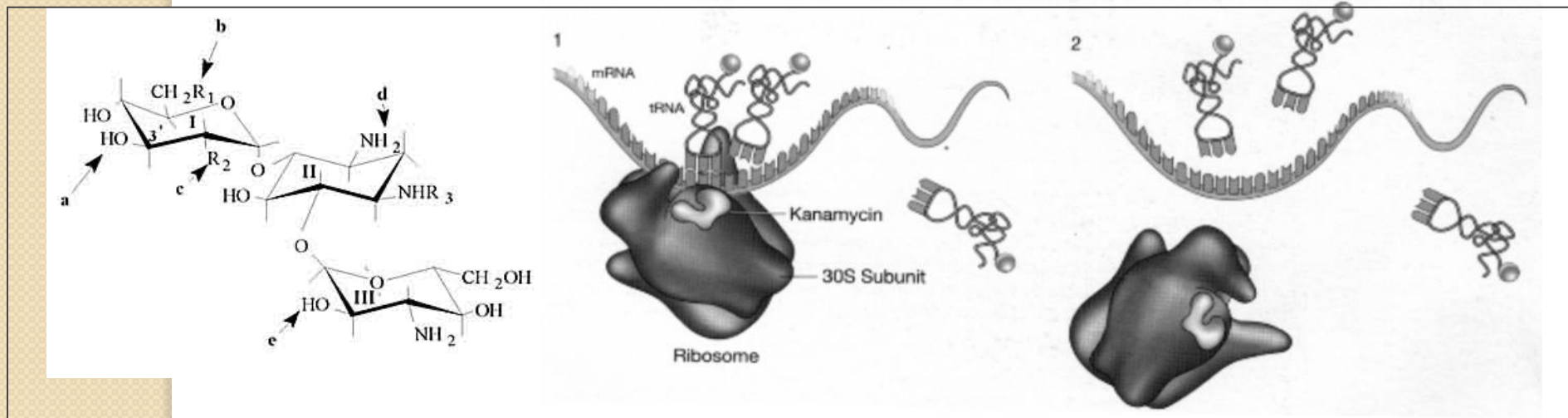
Cloning in a Plasmid Vector

Marcadores de selecção

- genes, localizados no plasmídeo, que codificam proteínas relacionadas com a selecção das células transformadas
- o mais comum é a **resistência a antibióticos** – quando as células são crescidas em meios de cultura, contendo um determinado antibiótico, **apenas as que contêm o plasmídeo que confere resistência a esse antibiótico é que sobrevivem**
- os antibióticos podem actuar a diferentes níveis:
 - membros da família da penicilina (ex: ampicilina): interferem na **síntese da parede celular bacteriana**
 - canamicina, tetraciclina e cloranfenicol – param o crescimento bacteriano porque **actuam ao nível da síntese proteica**



Modo de acção da **ampicilina** ↑ e da **canamicina** ↓



Região de clonagem

- A versatilidade do plasmídio de *E. coli* pode ser aumentada pelo uso de um **local de clonagem múltipla** (*polylinker*)

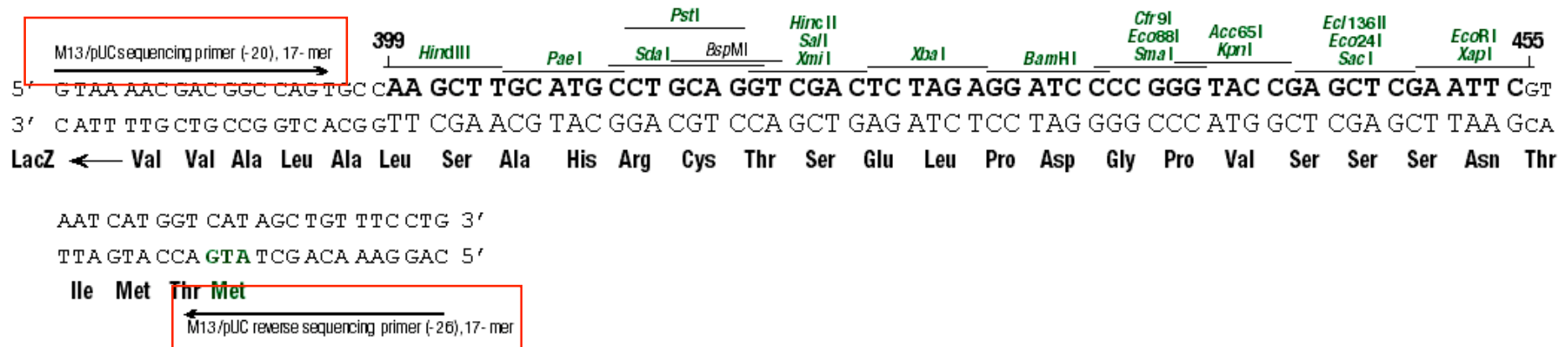


- Sequência sintética de nucleótidos que contém uma cópia de diferentes locais de restrição, os quais não estão presentes noutros locais do plasmídio ⇒ estas enzimas cortam uma vez no plasmídio
- Os plasmídios com local de clonagem múltipla permitem a clonagem do DNA de inserção, gerado com enzimas de restrição diferentes, no mesmo plasmídio, simplificando, deste modo, o procedimento experimental.

Outras regiões

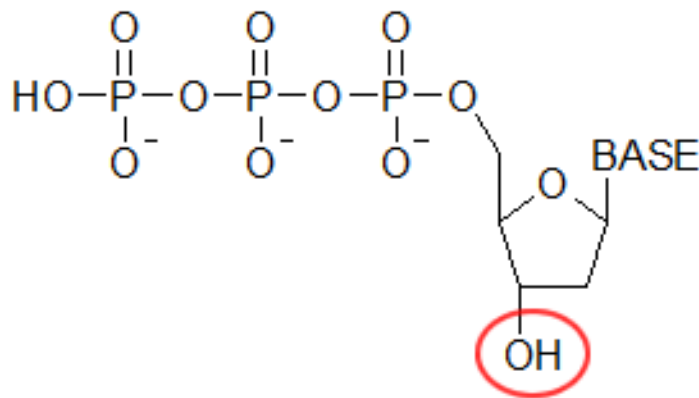
- Alguns plasmídios possuem locais de emparelhamento para oligonucleótidos iniciadores (*primers*) (ex.: M13 Univ e M13 Rev), que são úteis para:

- sequenciar DNA
- amplificar os fragmentos clonados por PCR

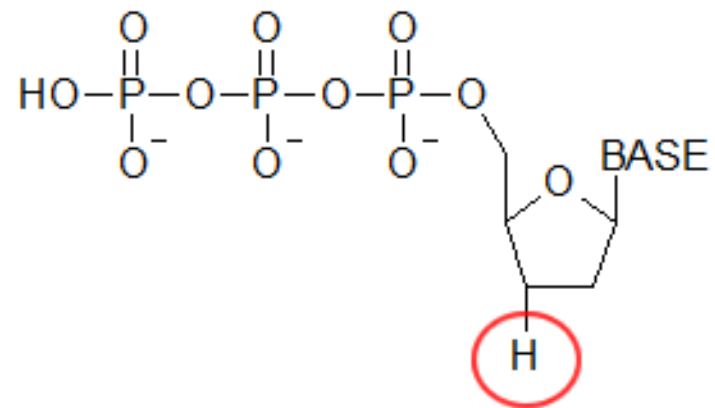


Sequenciação de DNA

- As moléculas de DNA clonadas podem rapidamente ser sequenciadas pelo **método de Sanger**, em que há terminação da síntese da nova cadeia de DNA por dideoxinucleótidos (ddNTPs).



deoxynucleotide triphosphate



dideoxynucleotide triphosphate

Método de Sanger

- Há síntese de moléculas de DNA filhas tendo por molde a molécula clonada (a sequenciar);
- As cadeias filhas são marcadas* (na extremidade 5') e vão diferir umas das outras em 1 nucleótido.
- A sua separação electroforética permitirá estabelecer a sequência de nucleótidos do fragmento original de DNA, devido à diferença de tamanho entre elas.

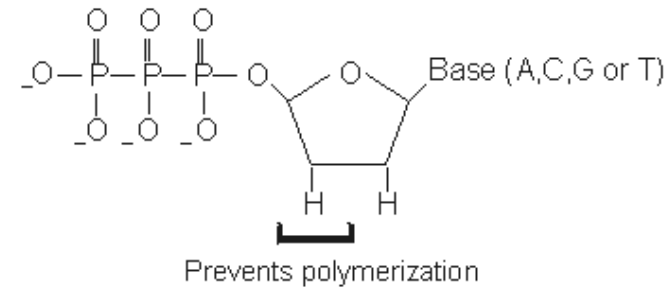
* radioactividade; fluorocromos...

- Durante a síntese há, a determinada altura, e de modo aleatório, **incorporação de ddNTPs**, os quais **previnem a formação de uma ligação fosfodiéster com o nucleótido seguinte**.

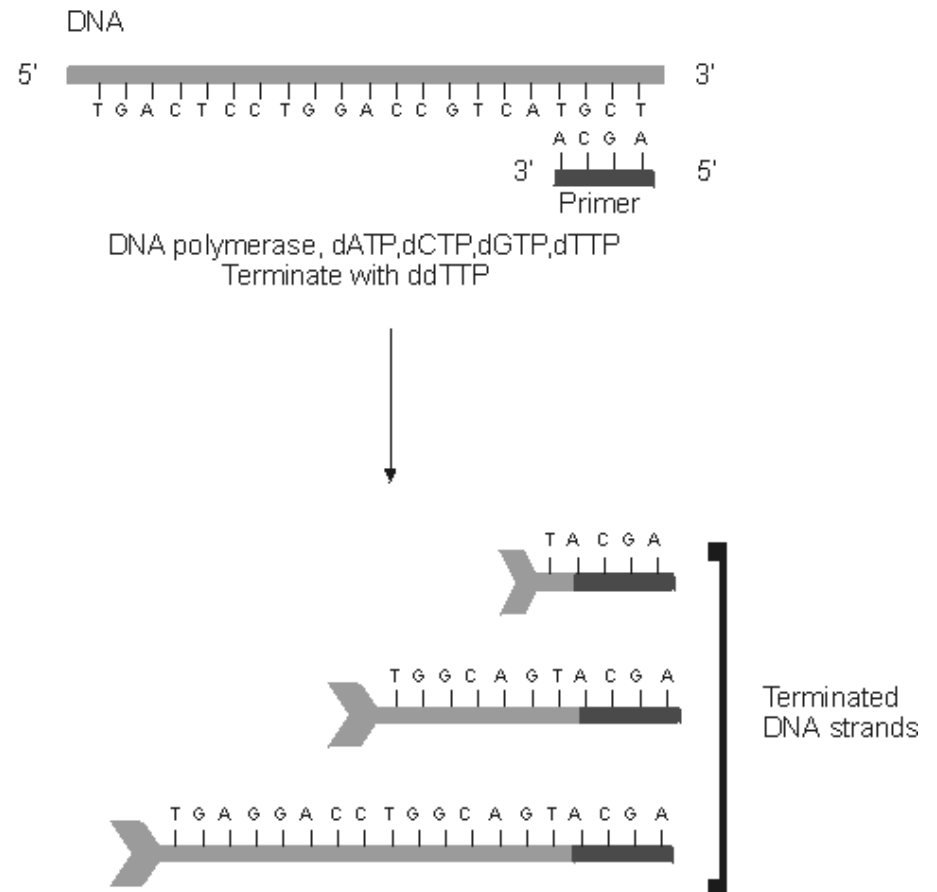


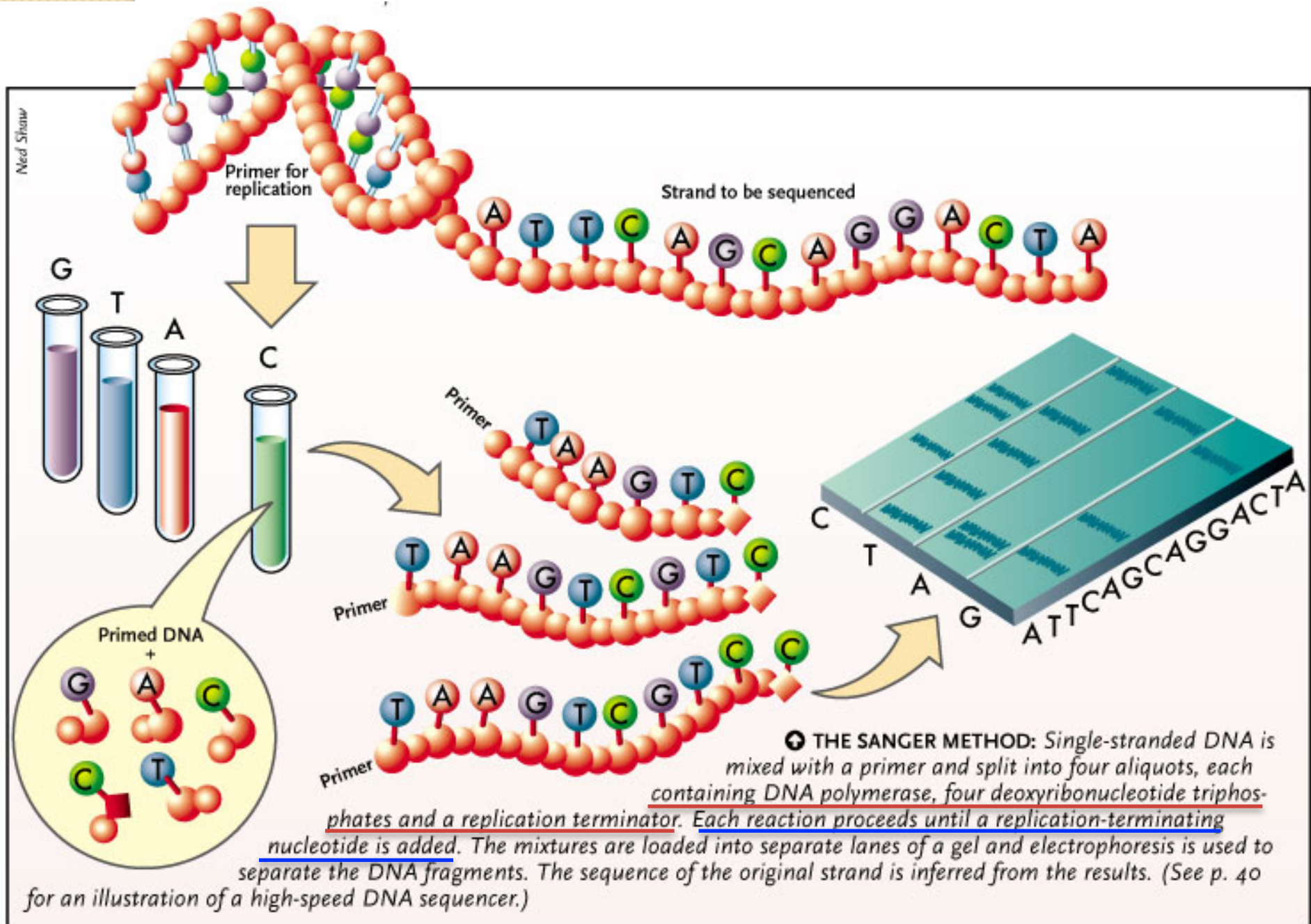
- **Termina a síntese dessa cadeia,** resultando numa cadeia filha truncada.

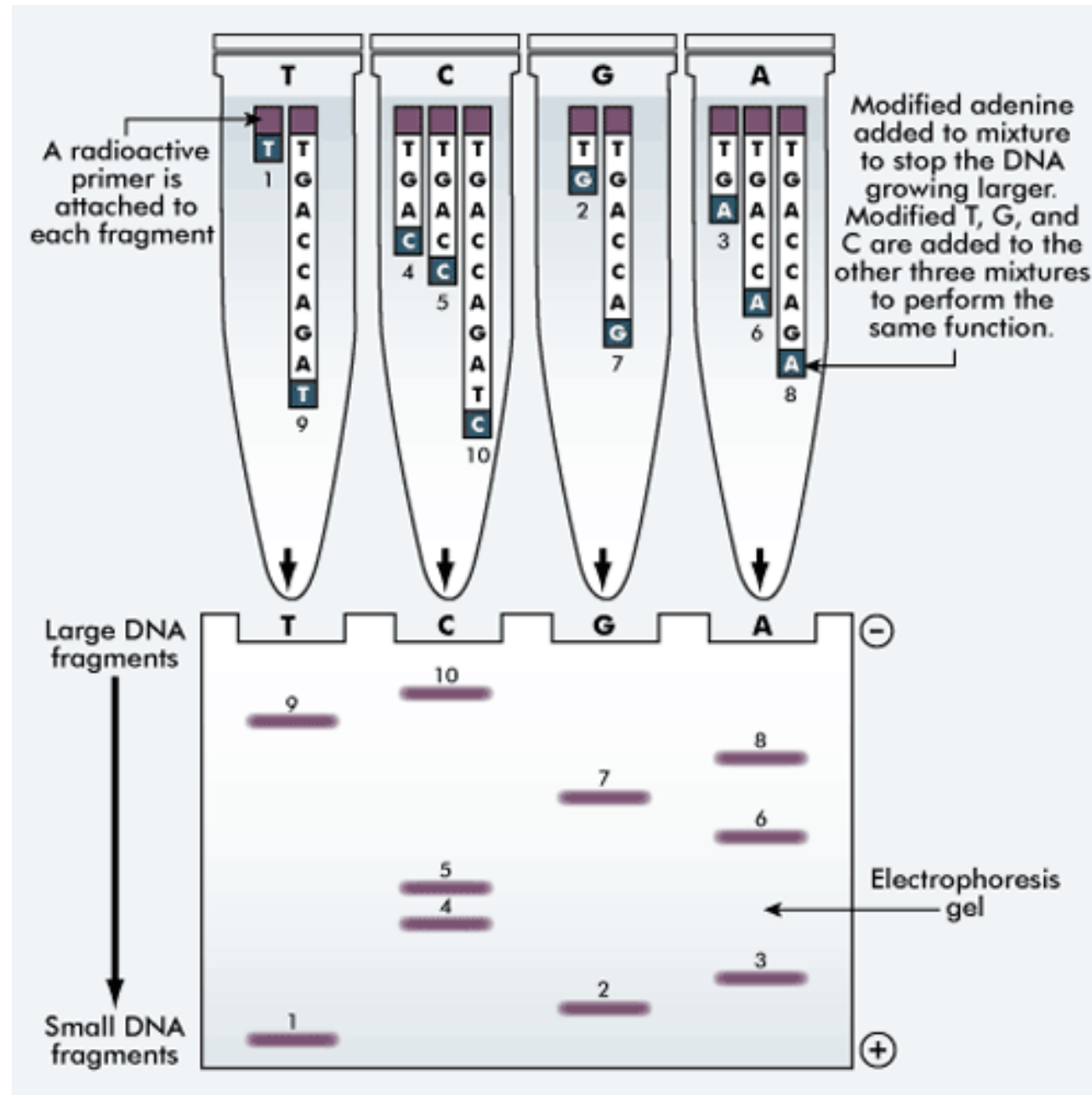
A



B





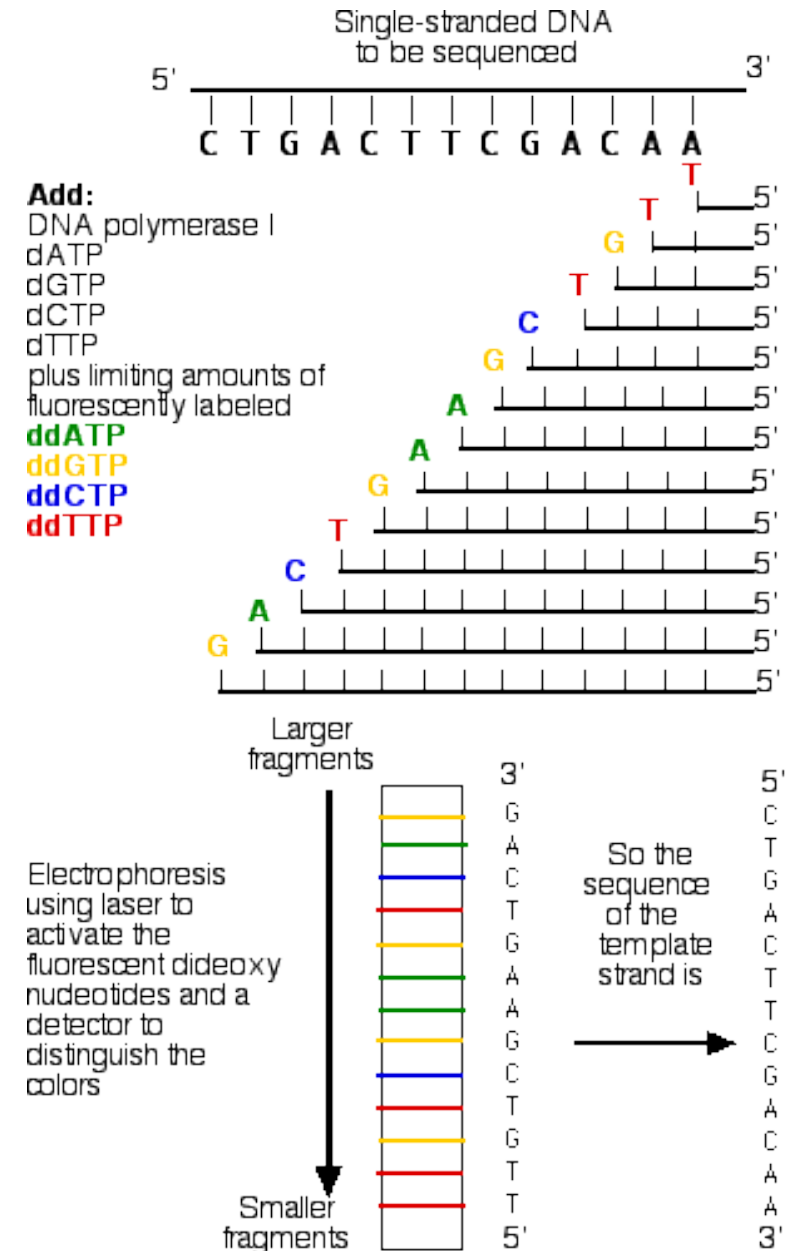
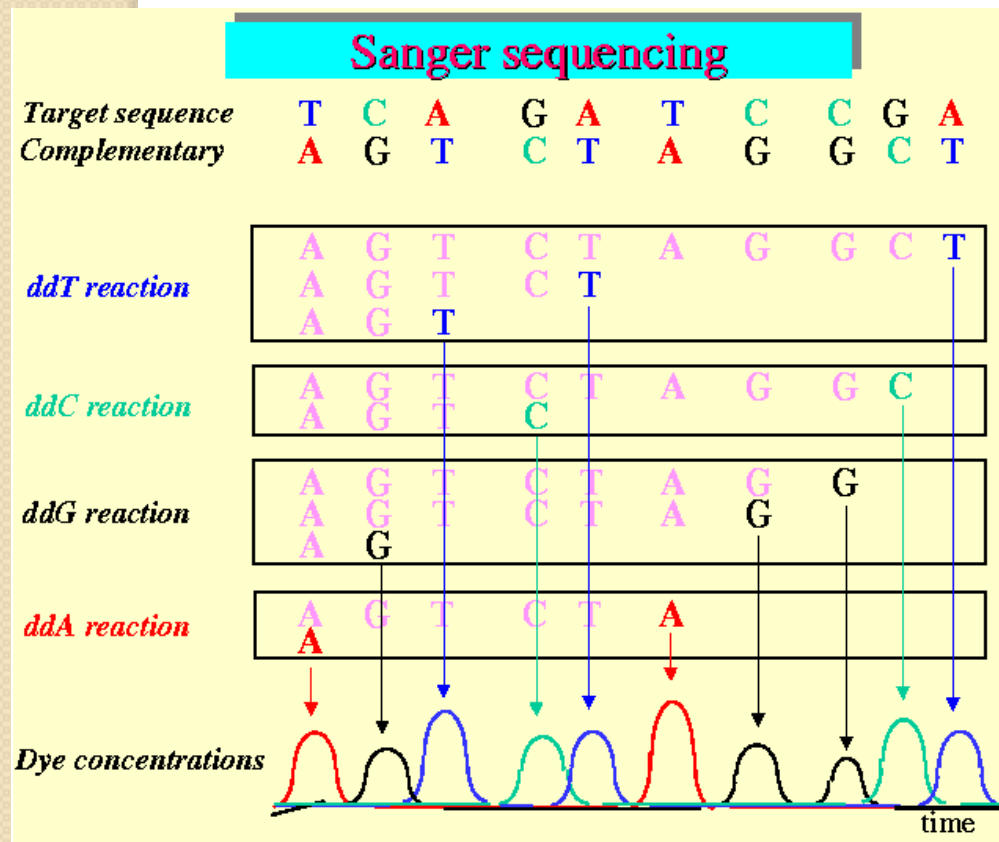


5' TGACCAGATC 3'

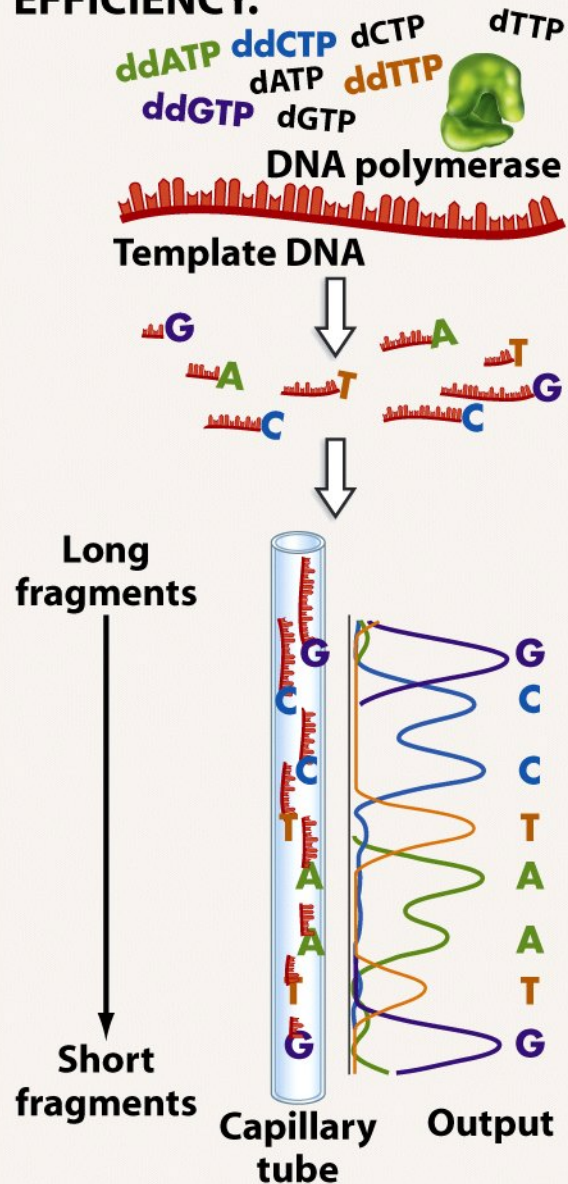
DIDEOXY DNA SEQUENCING



A **inclusão de fluorocromos** de cores diferentes para cada um dos ddNTPs permite fazer a **fácil distinção das diferentes cadeias filhas** pela cor que estas apresentam.



FLUORESCENT MARKERS IMPROVE SEQUENCING EFFICIENCY.



1. Do one sequencing reaction instead of four. Reaction mix contains ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP with distinct fluorescent markers. (With radioactive labels, four reactions are needed—one labeled ddNTP at a time.)

2. Fragments that result have distinctive labels.

3. Separate fragments via electrophoresis in mass-produced, gel-filled capillary tubes. Automated sequencing machine reads output.

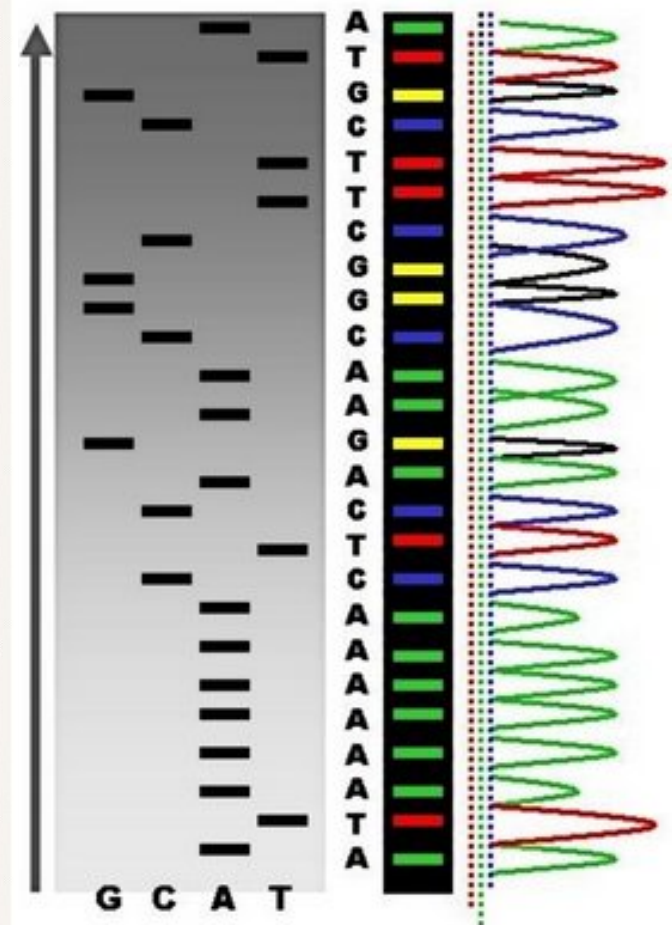
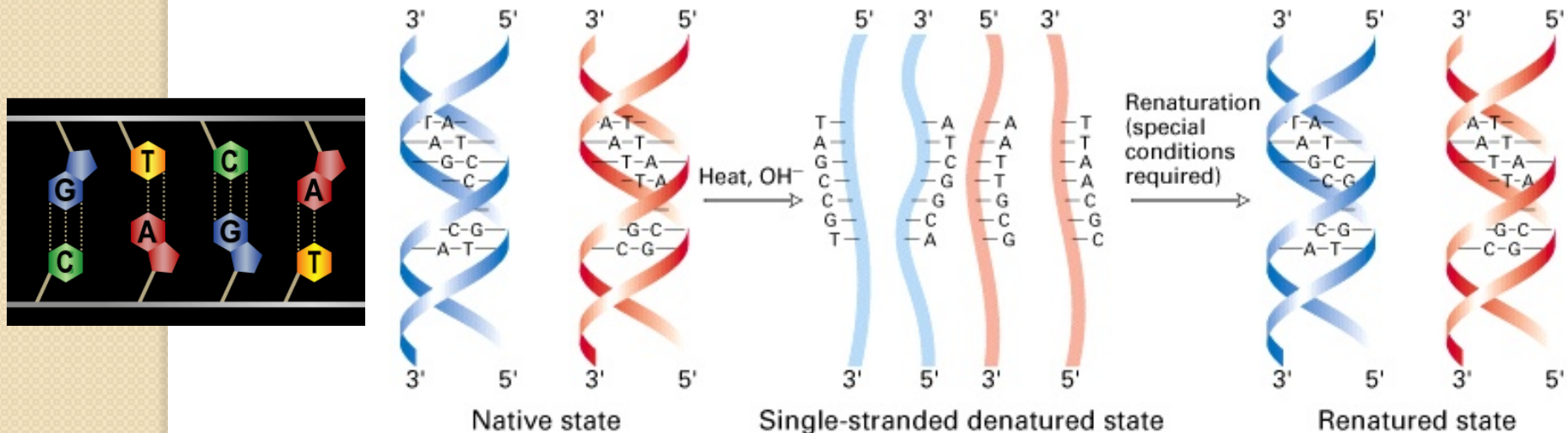


Figure 20-1 Biological Science, 2/e

Hibridação de ácidos nucleicos

- a chave para detectar ácidos nucleicos específicos (DNA ou RNA) é a **capacidade de emparelhamento entre cadeias complementares de RNA ou de DNA**

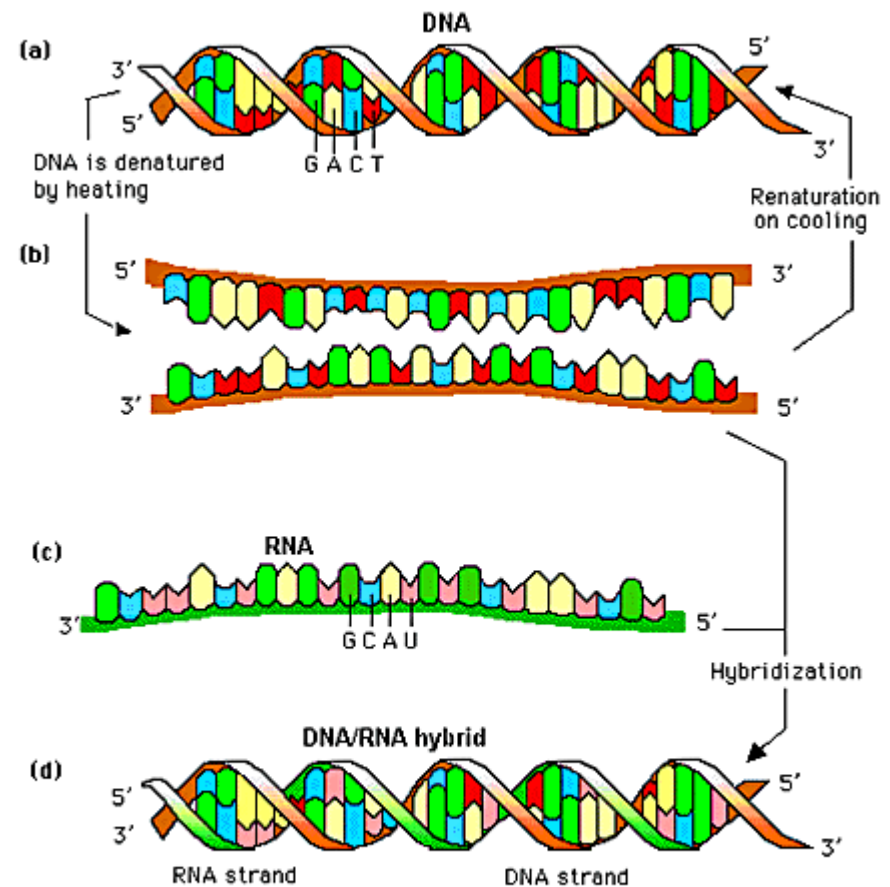


- quando submetidas a **elevadas temperaturas** ou a um **ambiente alcalino** (pH $\geq$ 13), as cadeias complementares do DNA separam-se (**desnaturam**), originando **2 cadeias simples**

- uma vez **removido** o agente desnaturante, estas **cadeias voltam a emparelhar** (renaturam) **de acordo com a complementariedade das suas bases azotadas** — ocorreu **hibridação**

- os **híbridos de ácidos nucleicos** podem ser formados entre:

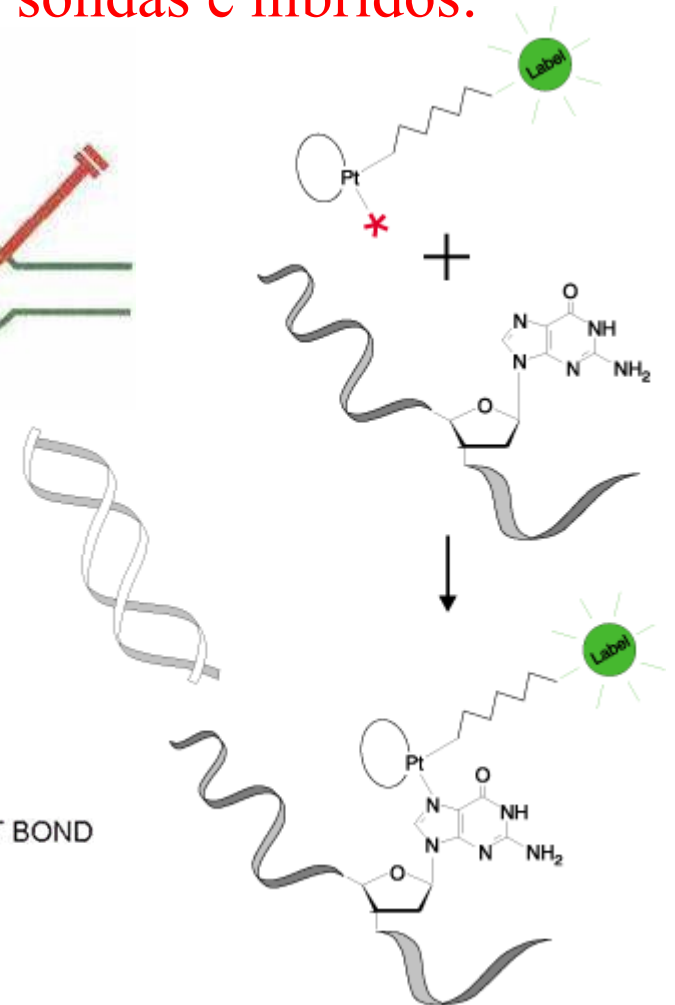
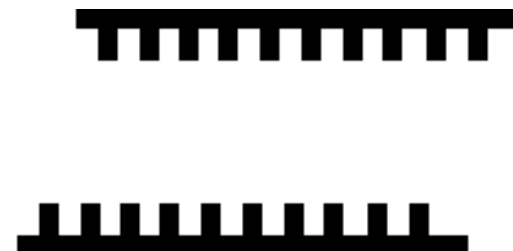
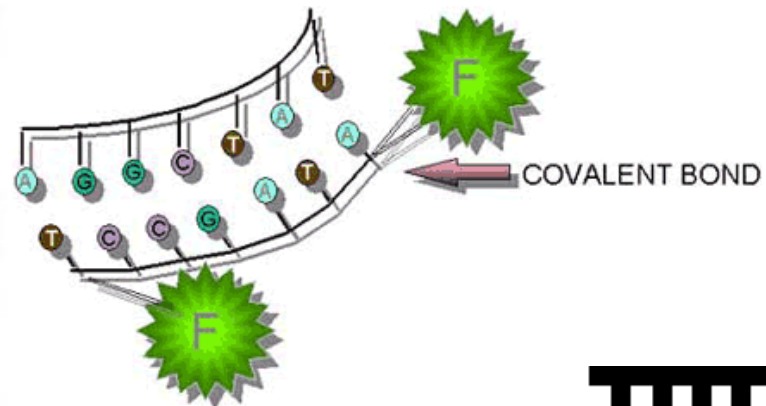
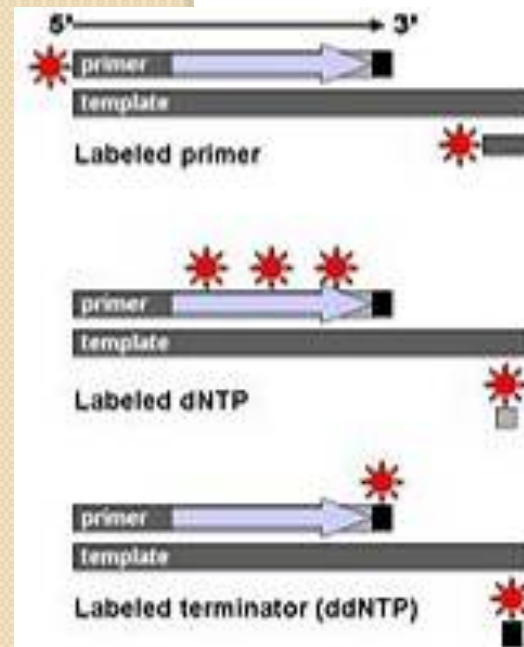
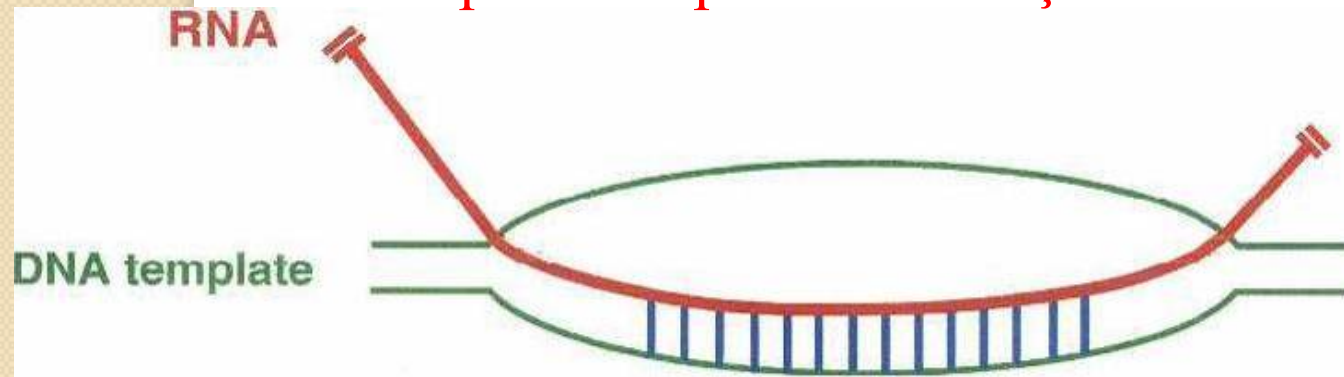
- 2 cadeias de DNA
- 1 cadeia de DNA e 1 de RNA
- 2 cadeias de RNA



Nucleic Acid Hybridization

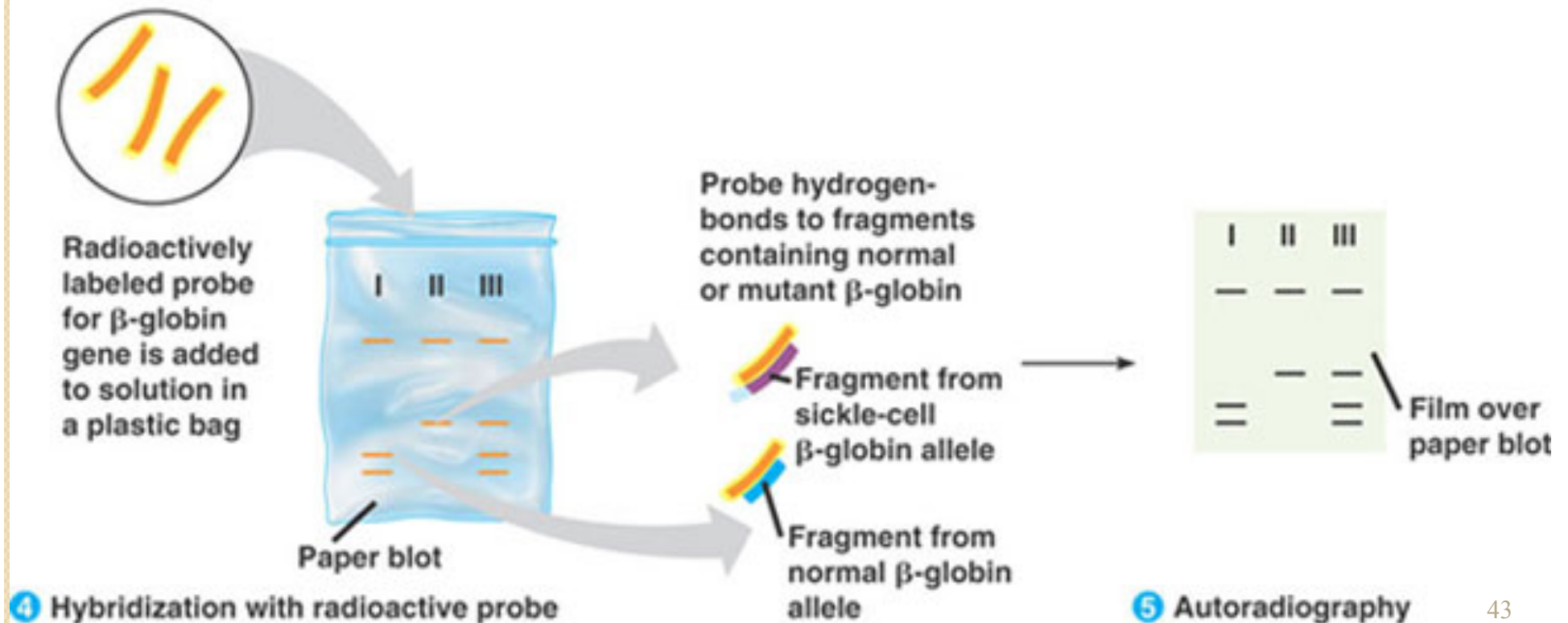
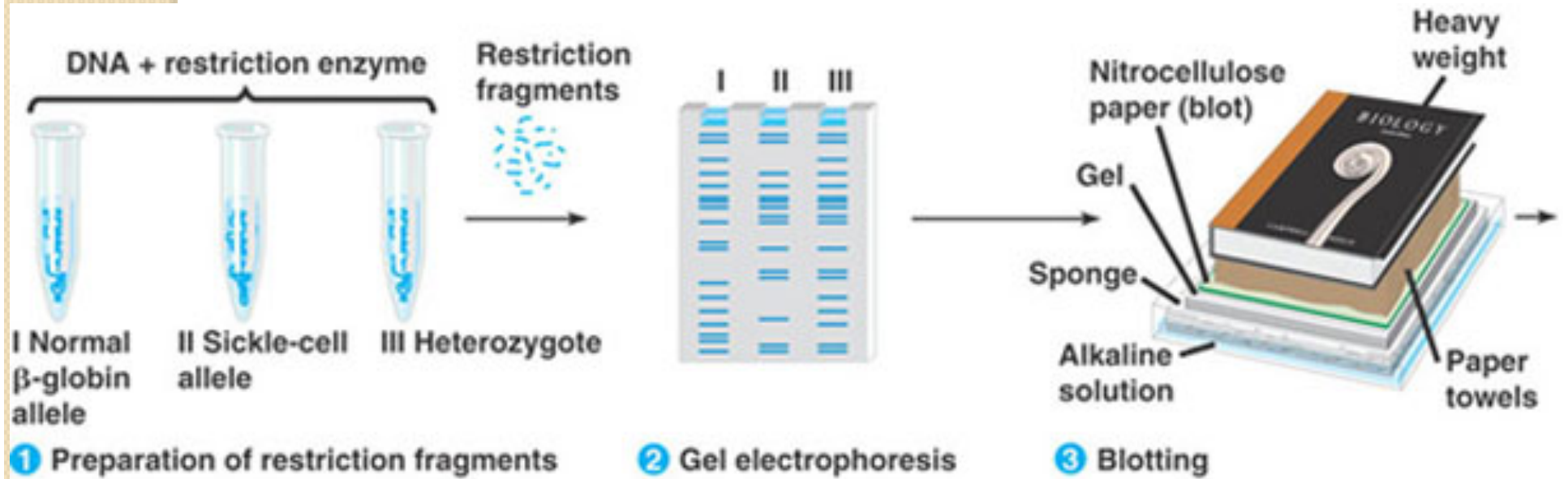
- 
- a hibridação dos ácidos nucleicos permite **detectar sequências de DNA ou de RNA** que são complementares a uma determinada sequência conhecida que pode ser **uma molécula clonada**.
 - esta molécula conhecida **tem de ser marcada**, radioativamente ou com outro composto que facilite a sua **deteção visual**, podendo então **funcionar como sonda**
 - a **sonda desnaturada** vai **hibridar com as sequências de DNA ou RNA** que **lhe são complementares**, as quais serão detectadas em virtude da **marcação dos híbridos sonda/sequência alvo** resultantes

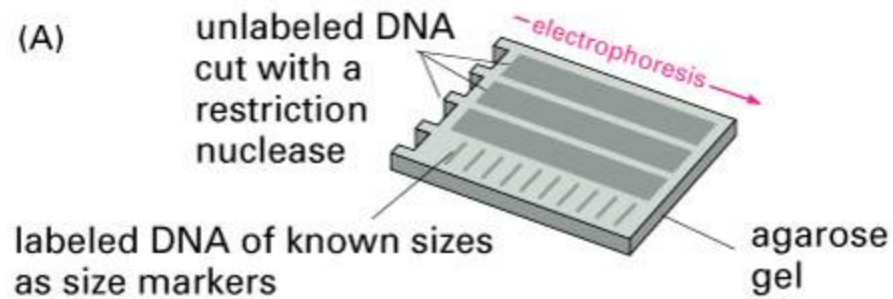
Exemplos de tipos de marcações de sondas e híbridos:



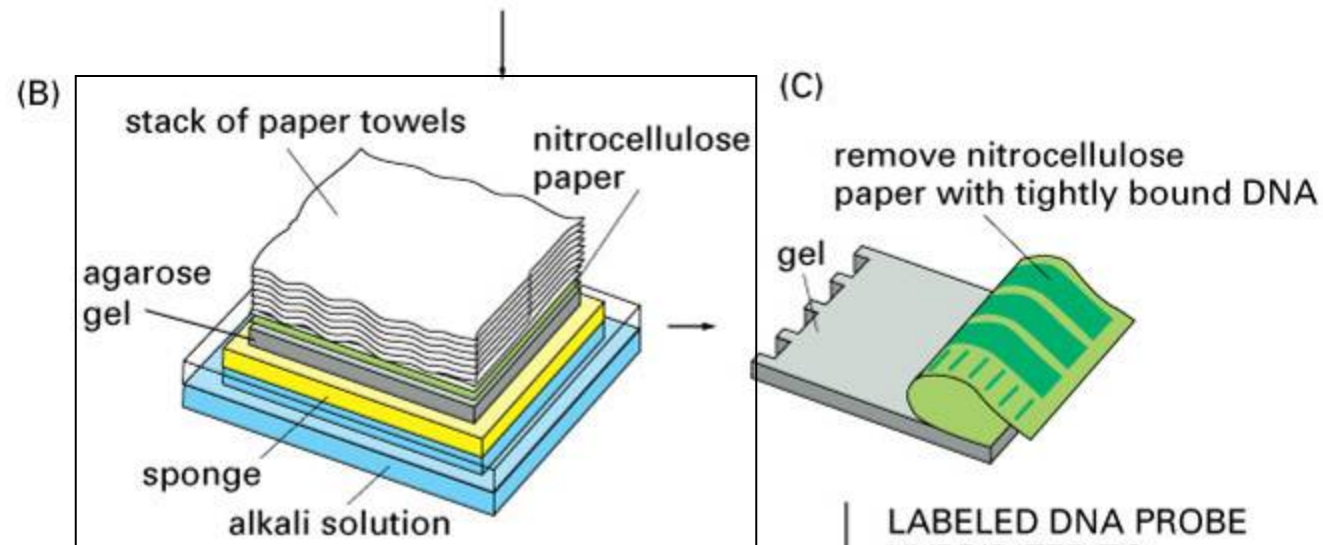
Southern-blotting

- o **DNA** a analisar é **digerido com enzimas de restrição** e os produtos resultantes da digestão são **separados de acordo com o tamanho** por electroforese
- após **desnaturação do DNA no gel**, procede-se à **transferência (blot) capilar** destes fragmentos de DNA para um **suporte sólido** (membrana de nylon ou de nitrocelulose), ao qual ficam ligados **ocupando a mesma posição relativa que ocupavam no gel e no final da electroforese**
- a membrana (com o DNA fragmentado e desnaturado) é colocada numa solução contendo a sonda marcada e desnaturada
- a sonda irá hibridar com as sequências complementares do DNA desnaturado na membrana
- a detecção do híbrido sonda/DNA alvo permitirá saber a posição do(s) fragmento(s) de interesse

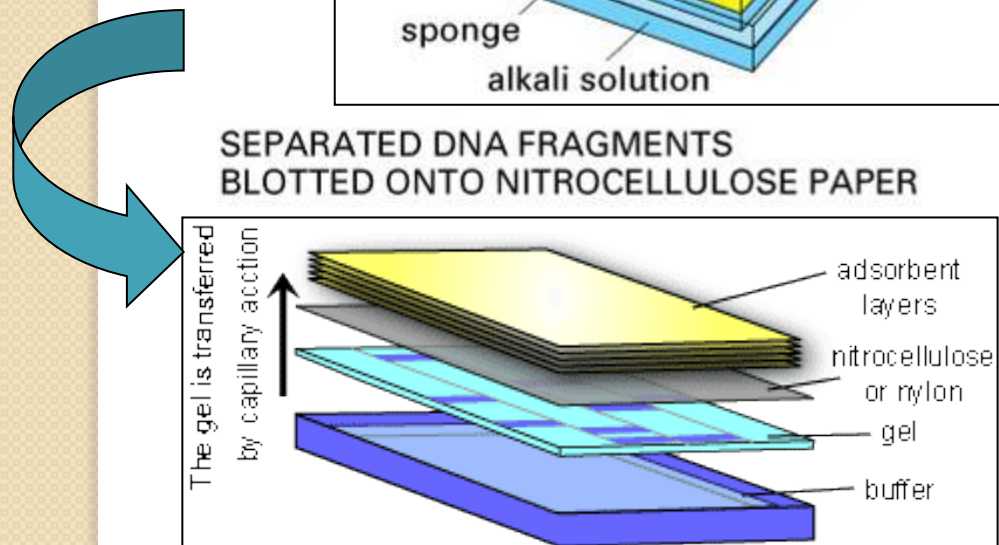




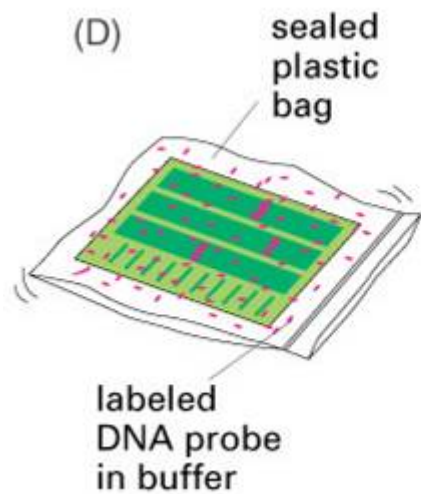
DNA FRAGMENTS SEPARATED BY AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS



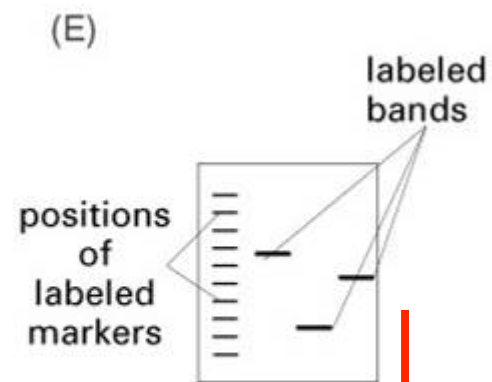
SEPARATED DNA FRAGMENTS BLOTTED ONTO NITROCELLULOSE PAPER



↓
Labeled DNA probe
hybridized to
separated DNA



LABELED DNA PROBE
HYBRIDIZED TO
COMPLEMENTARY DNA
BANDS VISUALIZED BY
AUTORADIOGRAPHY



DNA on membrane (a band "up close")

Low specific activity probe
bound to DNA on membrane

weak signal
on Southern



High specific activity probe
bound to DNA on membrane

strong signal



Northern-blotting

- o **RNA** a analisar é separado com base no seu tamanho por electroforese desnaturante e transferido para um suporte sólido
- o restante procedimento é semelhante ao do Southern-blotting

