

Descoberta da estrutura do DNA e da natureza do código genético



- sequência de bases dos genes?
- função e regulação dos genes?
- manipulação da informação genética?

Tecnologia do DNA recombinante



DNA recombinante

DNA que resulta da junção (não natural)
de DNA proveniente de duas fontes diferentes



Algumas técnicas utilizadas para produzir DNA recombinante

- Corte do DNA em locais específicos utilizando enzimas de restrição → facilita isolamento e manipulação
- Electroforese em gel de agarose → a separação electroforética é o método mais utilizado para estimar o tamanho de fragmento de DNA ou RNA.
- Clonagem utilizando vectores ou PCR → uma molécula é “copiada” de maneira a gerar muitas moléculas iguais
- Hibridação → baseia-se na capacidade que uma sequência de ácidos nucleicos tem de se ligar a uma sequência complementar e serve para identificar uma determinada sequência
- Sequenciação → determinação da sequência de bases, permite identificar genes e deduzir a sequência (e não só) das proteínas

Produção de DNA recombinante

descoberta de 2 tipos de enzimas



Enzimas de restrição

cortam o DNA em locais específicos gerando um conjunto reprodutível de fragmentos de DNA



DNA ligases

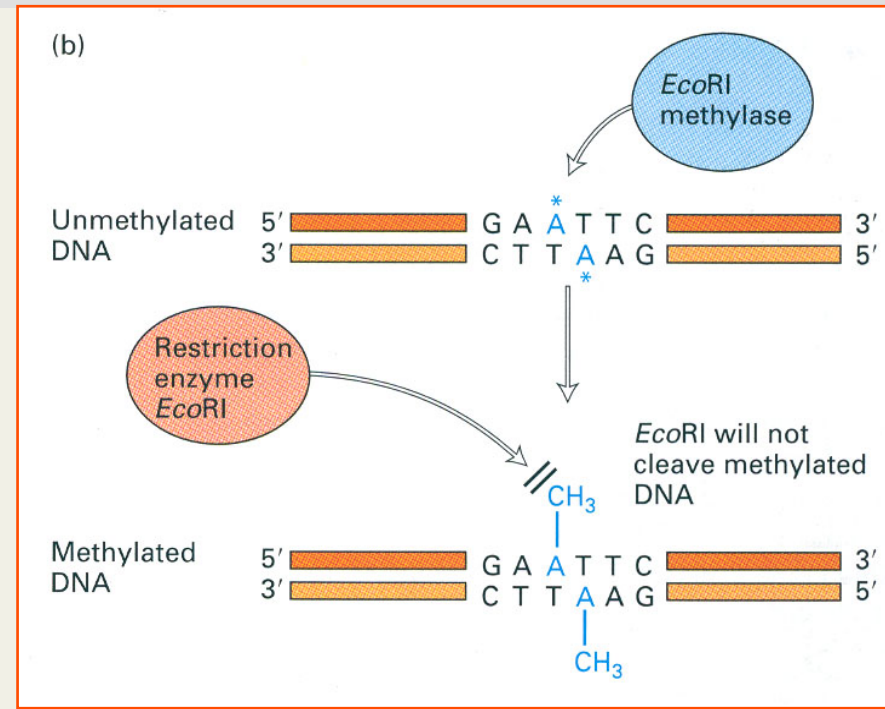
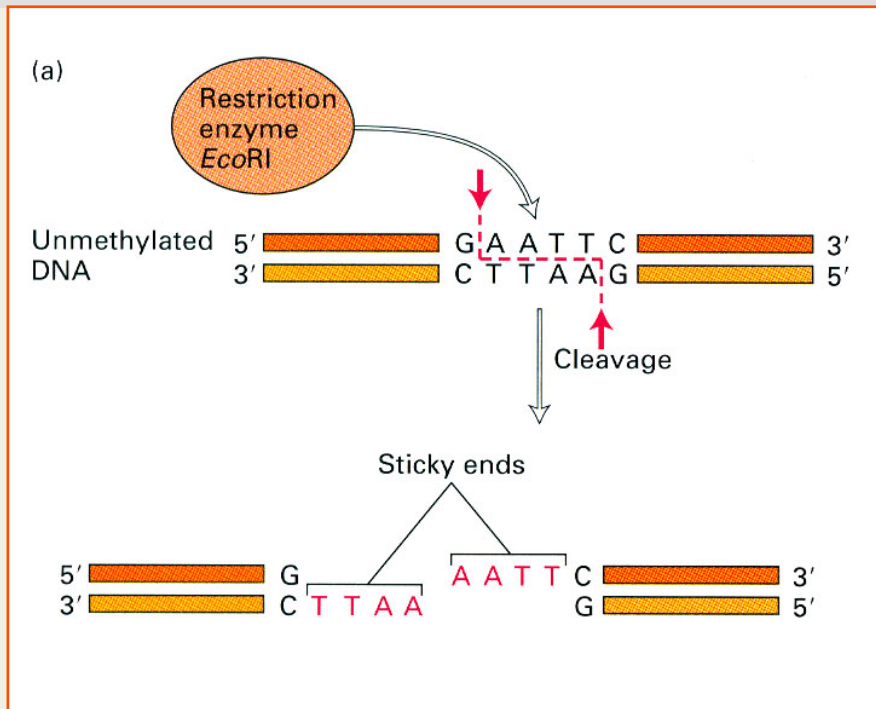
Restabelecem as ligações fosfodiéster entre os grupos fosfato 5' e hidroxilo 3', numa reacção dependente de ATP



Enzimas de restrição

- isoladas de bactérias (destróiem DNA de fagos)
- nome tem origem no nome do organismo do qual foi isolada
ex. EcoRI → *Escherichia coli*, R - estirpe RY13, I - ordem de identificação
- reconhecem sequências de 4 - 8 nucleotídeos → locais de restrição
- seq. curtas - podem ocorrer em qualquer molécula longa de DNA
- uma dada enzima de restrição vai cortar uma dada molécula de DNA sempre nos mesmos locais, produzindo sempre o mesmo conjunto de fragmentos de DNA

Enzimas de restrição



enzima de restrição + metilase → sistema que protege o DNA do hospedeiro e destrói DNA estranho

Enzimas de restrição

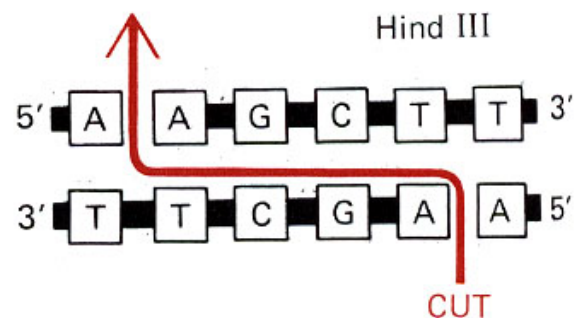
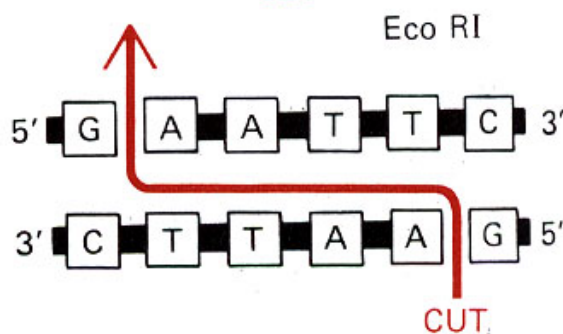
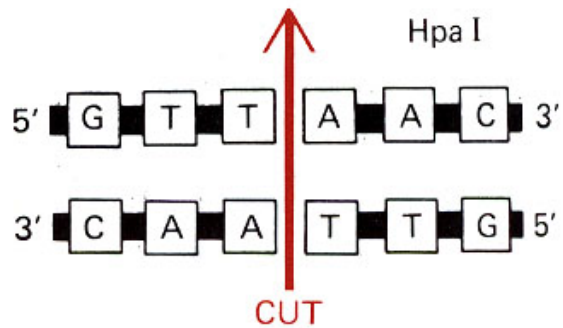
- muitos locais de restrição são repetições invertidas - a sequência das duas cadeias é igual quando lida de 5' para 3' → sequências palindrômicas
- muitas cortam o DNA em ziguezague deixando extremidades de cadeia única - extremidades coesivas



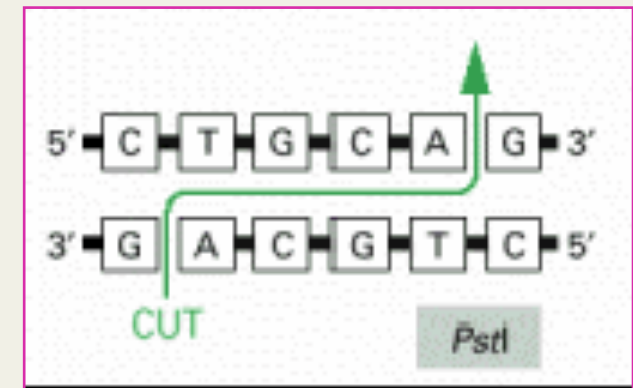
- permite o emparelhamento de "caudas" de diferentes fragmentos de DNA cortados com a mesma enzima
- os dois fragmentos emparelhados podem depois ser unidos pela enzima DNA ligase com consumo de ATP

Enzimas de restrição

Exemplos



- Corte a direita; extremidades de cadeia dupla (*Hpa I*)
- Corte em ziguezague; extremidades de cadeia simples e protuberantes - extremidades coesivas (*Sticky ends*)
- *EcoRI* e *HindIII* a 5', *PstI* a 3'



Enzimas de restrição

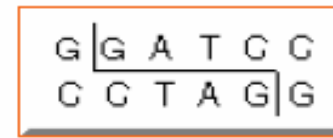
ISOSESQUIZÓMEROS - endonucleases de restrição provenientes de organismos diferentes que reconhecem e cortam de igual forma a mesma sequência de bases.

Ex: *KpnI* - 5'... GGTAC^{*}C...3' -*DpnI*
3'... C^{*}CATGG...5'



ISOCAUDÂMEROS - endonucleases que originam extremidades coesivas compatíveis

Ex: *MboI* - 5'... ^{*}GATC...3' *BamHI* - 5'... G^{*}GATCC...3'
3'... CTAG^{*}...5' 3'... CCTAG^{*}G...5'



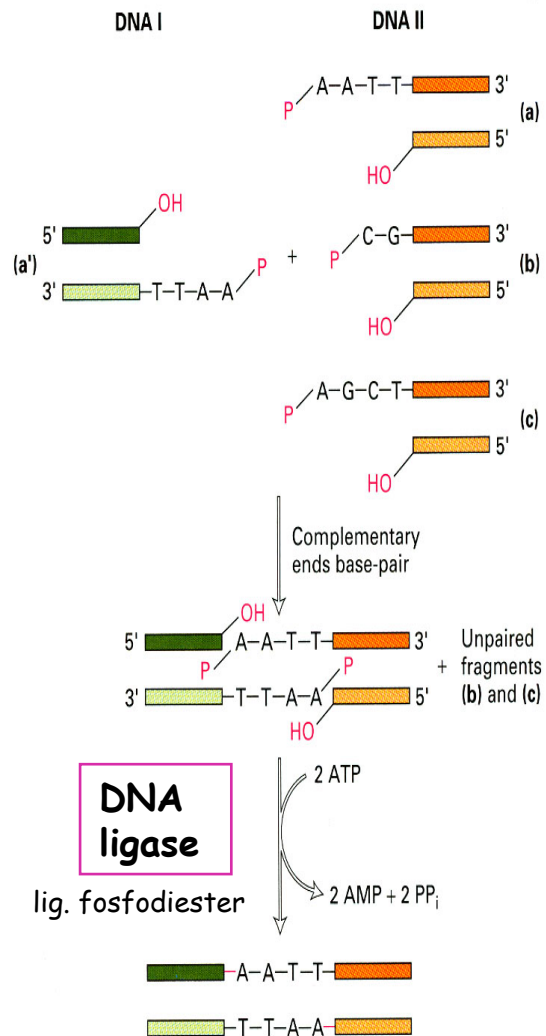
Enzimas de restrição

Microrganismo	Enzima	Sequência Alvo
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i> 37°C	<pre> G A A T T C C T T A A G </pre>
<i>Bacillus amyloliquef aciens H</i>	<i>BamHI</i> 37°C	<pre> G G A T C C C C T A G G </pre>
<i>Bacillus globigii</i>	<i>BglII</i>	<pre> A G A T C T T C T A G A </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeII</i>	<pre> Pu G C G C P i P y C G C G B </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HindIII</i> 37°C Tampão R	<pre> A A G C T T T T C G A A </pre>
<i>Providencia stuartii</i>	<i>PstI</i> 37°C Tampão O	<pre> C T G C A G G A C G T C </pre>
<i>Streptococcus albus G</i>	<i>SalI</i> 37°C Tampão R	<pre> G T C G A C C A G C T G </pre>
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	<pre> T C G A A G C T </pre>
<i>Brevibacterium albidium</i>	<i>BalI</i>	<pre> T G G C C A A C C G G T </pre>
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	<pre> (A G G (Q C T T C C (G G A </pre>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>SmaI</i> 30°C	<pre> C C C G G G G G G C C C </pre>

Temperatura e tampão têm que ser adequados

1 unidade - quantidade nec. para digerir 1 µg DNA numa hora

DNA ligase



- As extremidades obtidas por corte com uma determinada enzima (compatíveis) emparelham e a sua ligação com a **DNA ligase** reconstitui a molécula de DNA

- Para refazer a ligação fosfodiester é necessário **ATP**

Ligar ext. cortadas a direito é mais complexo

Tb se pode modificar as extremidades de modo a torná-las compatíveis