

Aula de **Bioquímica II**

Tema:

Tecnologia do DNA Recombinante

Prof. Dr. Júlio César Borges

Depto. de Química e Física Molecular – DQFM

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Universidade de São Paulo – USP

E-mail: borgesjc@iqsc.usp.br

Tecnologia do DNA Recombinante

Conjunto de técnicas que permitem a manipulação de moléculas de DNA específicas, considerando as propriedades do DNA.

→ Tecnologia desenvolvida a partir da década de 1970 com o acúmulo do conhecimento sobre DNA, RNA e vírus.

Baseia-se nas propriedades do DNA

→ **Repositório da informação genética**

→ **Formada por duas cadeias de Ácido Deoxiribonucleotídico;**

→ **As duas cadeias são complementares;**

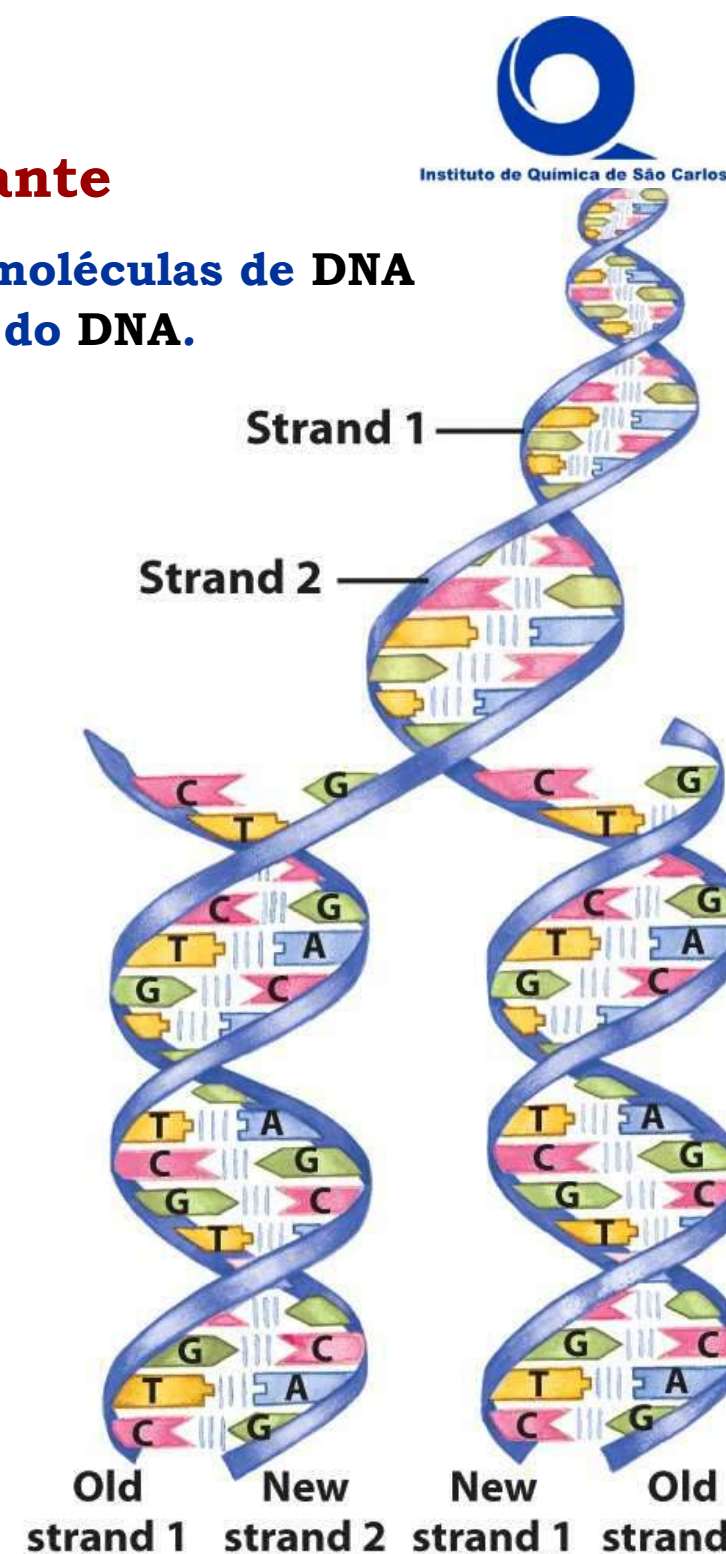
→ **Orientam-se em direções opostas;**

→ **É “estável” em meio alcalino;**

→ **Pode ser desnaturado e renaturado;**

→ **Pode ser sintetizado quimicamente com marcações;**

→ **As propriedades do DNA são universais.**



Tecnologia do DNA Recombinante ou Biologia Molecular

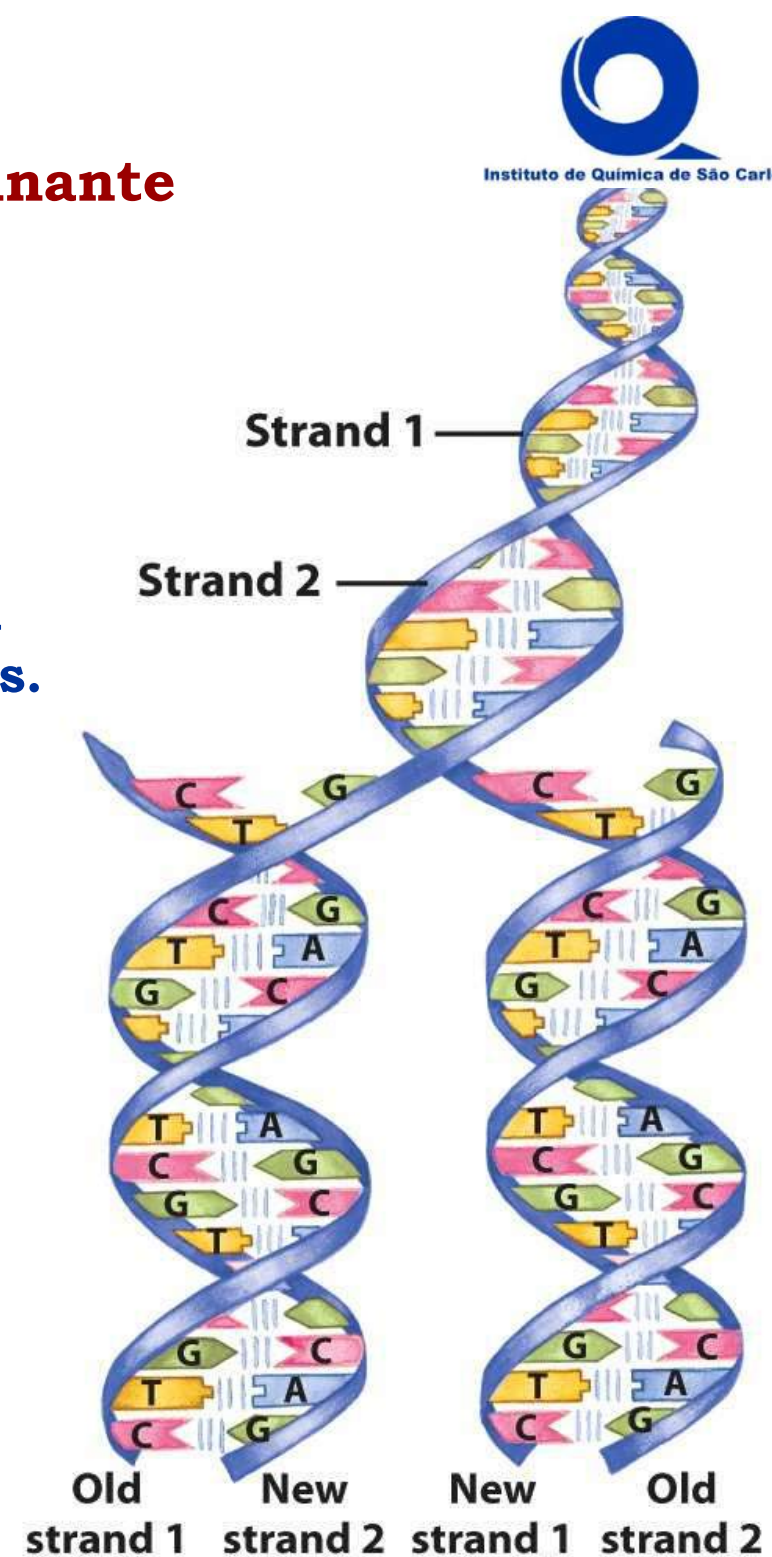
**DNA → Fita dupla complementar
→ Permite auto-replicação**

→ Baseia-se no uso de uma maquinaria enzimática celular específica e comum de diferentes organismos.

Alta multidisciplinaridade

- Genética
- Genômica e afins
- Biologia Molecular
- Bioquímica
- **Química Biológica**
- Biologia de Sistemas
- Biologia Celular
- Microbiologia

- Medicina
- Agronomia
- Engenharia Química
- Bioinformática
- Robótica
- Nanotecnologia
- Materiais
- Etc.



Tecnologia do DNA Recombinante

→ **Clonagem:** produção de organismos idênticos derivados de um ancestral comum

→ **Clonagem Molecular:** Perpetuação de uma **MOLÉCULA DE DNA** de sequência específica

Organismo Geneticamente Modificado: OGM = Transgênico

Organismo portador de material genético – um gene, parte de um gene, ou um conjunto de genes – oriundo de um ou mais organismos diferentes.

Transgene

Gene ou fragmento de DNA que foi transportado artificialmente de um organismo Doador para um organismo Receptor criando o OGM.

Tecnologia do DNA Recombinante: Aplicações

- **Estudo dos genes de um organismo = Estudos genômicos;**
- **Estudo da regulação de um gene ou conjunto de genes;**
- **Desenvolvimento de Vacinas e de Vacinas de DNA;**
- **Desenvolvimento de Terapias gênicas;**
- **Obtenção de transgênicos;**
 - **Vegetais ou animais resistentes a pragas;**
 - **Vegetais ou animais mais produtivos;**
 - **Vegetais ou animais que produzem medicamentos ou vacinas;**
- **Produção de produtos biotecnológicos/medicamentos/enzimas;**
- **Diagnóstico médico;**
- **Tecnologia forense (crimes, paternidade, controle se qualidade);**
- **Estudo do produto final do gene: RNA/Proteína.**

Estudos funcionais e estruturais de proteínas

Depende da obtenção da proteína-alvo pura, estável e em larga escala para estudos da relação estrutura-função da proteína-alvo e sua interação com ligantes → Inibidores → Fármacos

Se torna o fator limitante do processo!!!

Solução: Produção heteróloga de proteínas

Produção de uma Proteína do Organismo X em microorganismos (*Escherichia coli* - principal), leveduras, vegetais ou animais.

Obtenção de proteínas em larga escala

→ Para aplicação farmacológica:

- Insulina, anticorpos, imunotoxinas (quimeras proteicas entre a cadeia leve de anticorpo monoclonal e alguma toxina), vacinas, etc.;

→ Para aplicação biotecnológica:

- Uso comercial de enzimas específicas;
- Catálise de reações orgânicas específicas;
- Produção de enzimas para degradar celulose do bagaço de cana;

→ Para estudos científicos:

- Estrutura/função/regulação de proteínas/enzimas.
 - Deleções, mutagênese sítio dirigida, proteínas quiméricas, etc

Tecnologia do DNA Recombinante

Uso de diversas enzimas para executar passos específicos de manipulação do segmento de DNA alvo

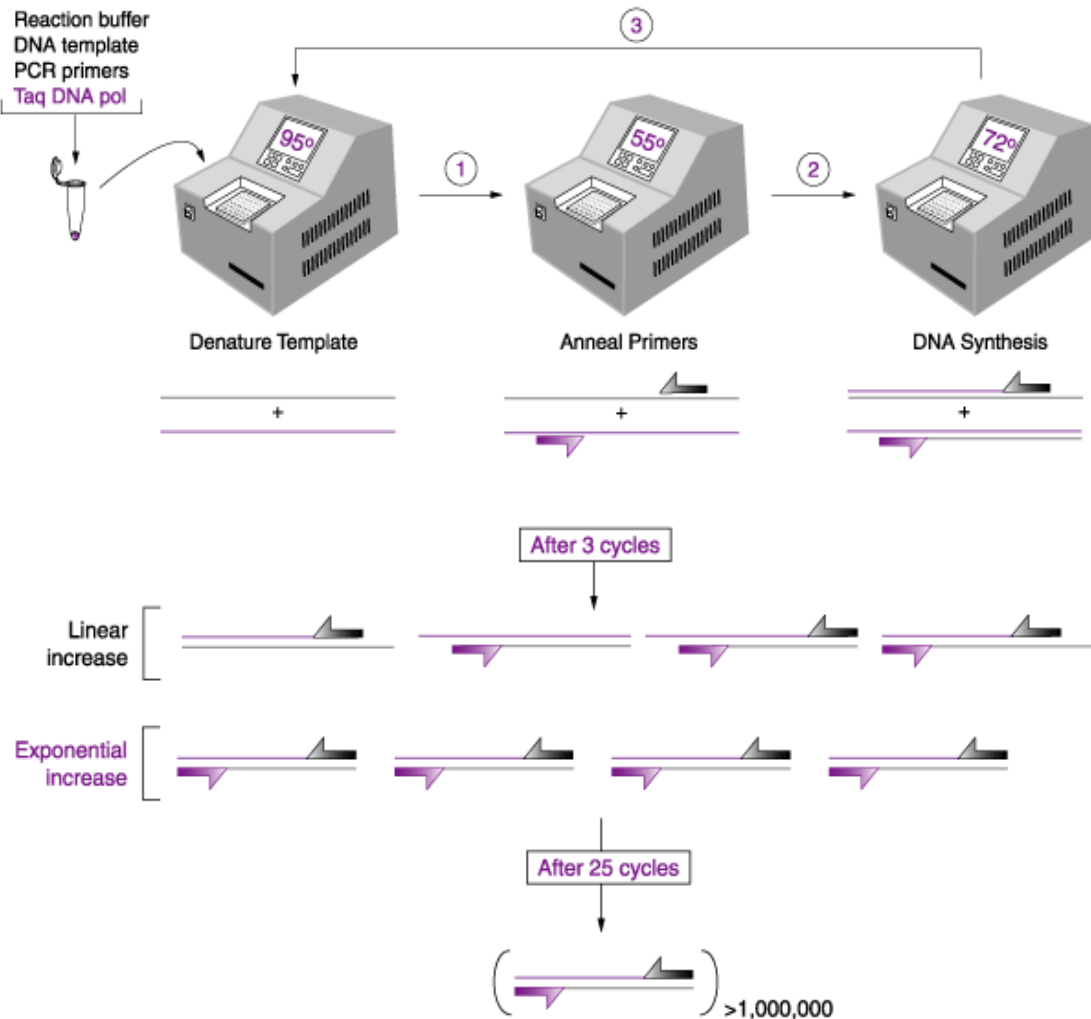
- 1 – Moléculas específicas de DNA podem ser amplificadas**
 - **Reação em cadeia da polimerase - PCR**
- 2 – O DNA pode ser cortado em posições específicas**
 - **Endonucleases de restrição**
- 3 – Seleção de pequenas moléculas de DNA capazes de auto-replicação**
 - **Vetores contendo marcas de seleção**
- 4 – Diferentes moléculas de DNA podem ser ligadas covalentemente**
 - **DNA-Ligase → DNA recombinante**
- 5 – Moléculas de DNA sintéticas podem ser inseridas em células vivas**
 - **Transformação de células → Geração de OGMs**
- 6 – Células contendo o DNA recombinante pode ser selecionada**
 - **Seleção do clone de interesse**

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Ciclo térmico de síntese *in vitro* de DNA pela DNA pol

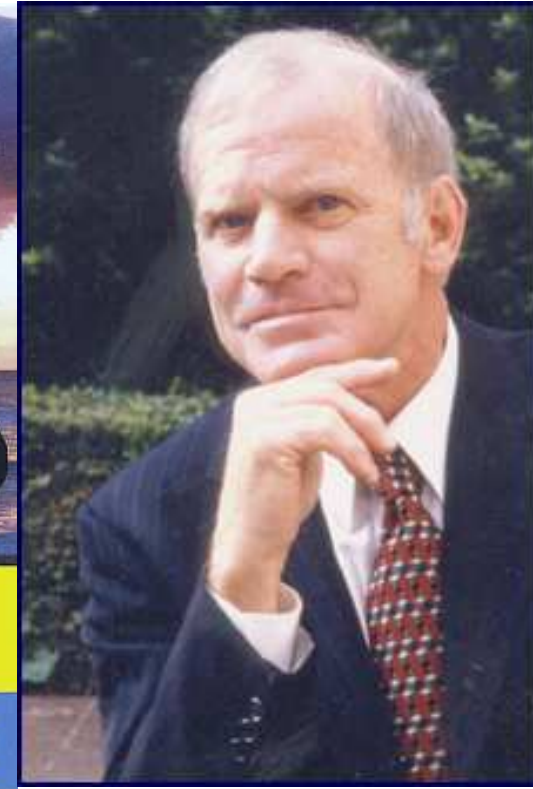
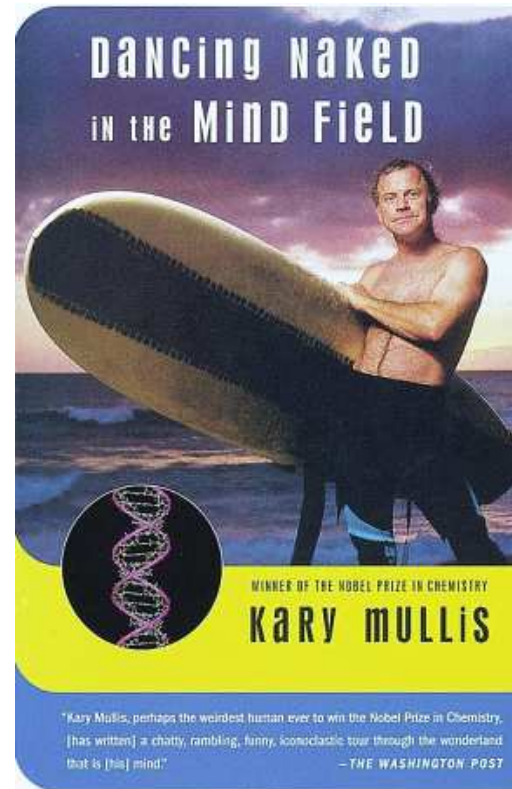
Permite a amplificação de um fragmento de DNA específico > 1e6

Necessita de Primer = iniciador = oligonucleotídeo sintético específico



Kary Mullis

Nobel Prize winner Chemistry (1993)



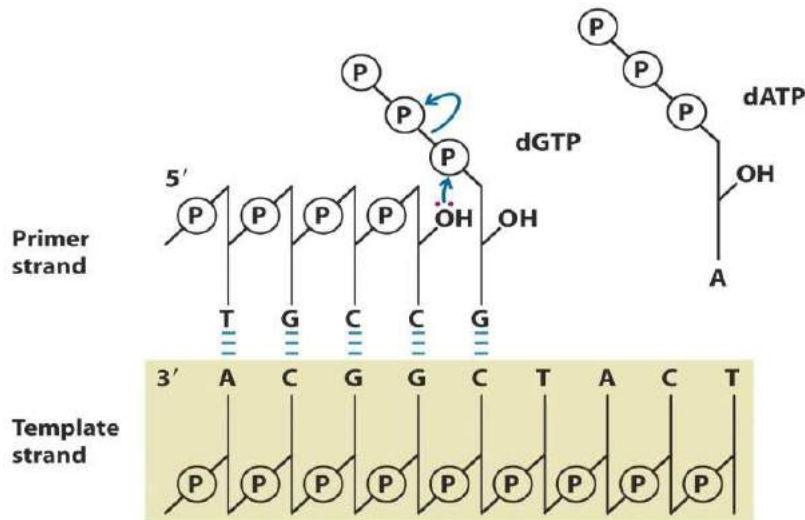
Clonagem Molecular

→ Desenho do Primer

→ Usa o fato da DNAPol necessitar de um iniciador para a polimerização

- Deve Flanquear a sequência de DNA de interesse

- Pode carregar modificações na sequência para introduzir sítios de restrição para endonucleases



São oligonucleotídeos de DNA complementares ao DNA de interesse

Podem ser desenhados a partir da sequência de uma proteína
→ Primer degenerados

Known amino acid sequence H_3N^+ --- Gly --- Leu --- Pro --- Trp --- Glu --- Asp --- Met --- Trp --- Phe --- Val --- Arg --- COO^-

Possible codons (5') GGA UUA CCA UGG GAA GAC AUG UGG UUC GUU AGA (3')

GGC UUG CCC GAG GAU UUU GUC AGG

GGU CUA CCU GUG GUA CGA

GGG CUC CCG GUU CGC

CUU CGU

CUG CGG

Region of minimal degeneracy

Synthetic probes UGG GAAG GAU AUG UGG UUC GU

20 nucleotides long, 8 possible sequences

Clonagem Molecular

→ Síntese química do Primer

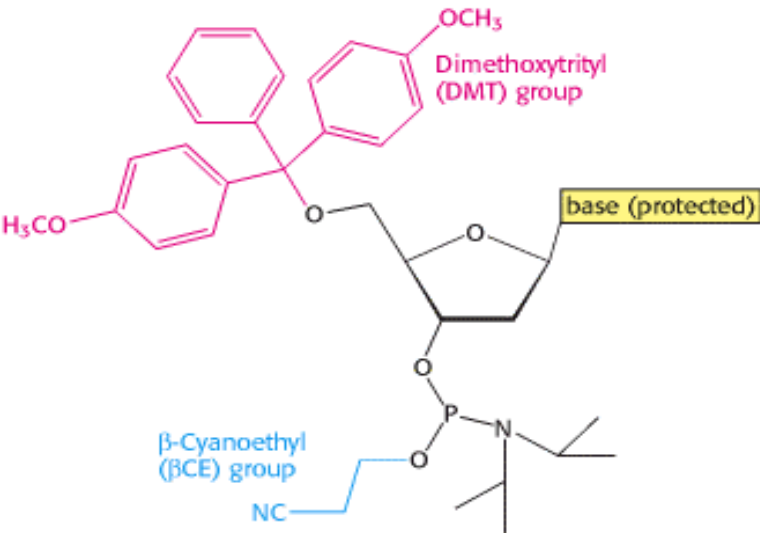
→ Síntese em fase sólida

1- Acoplamento

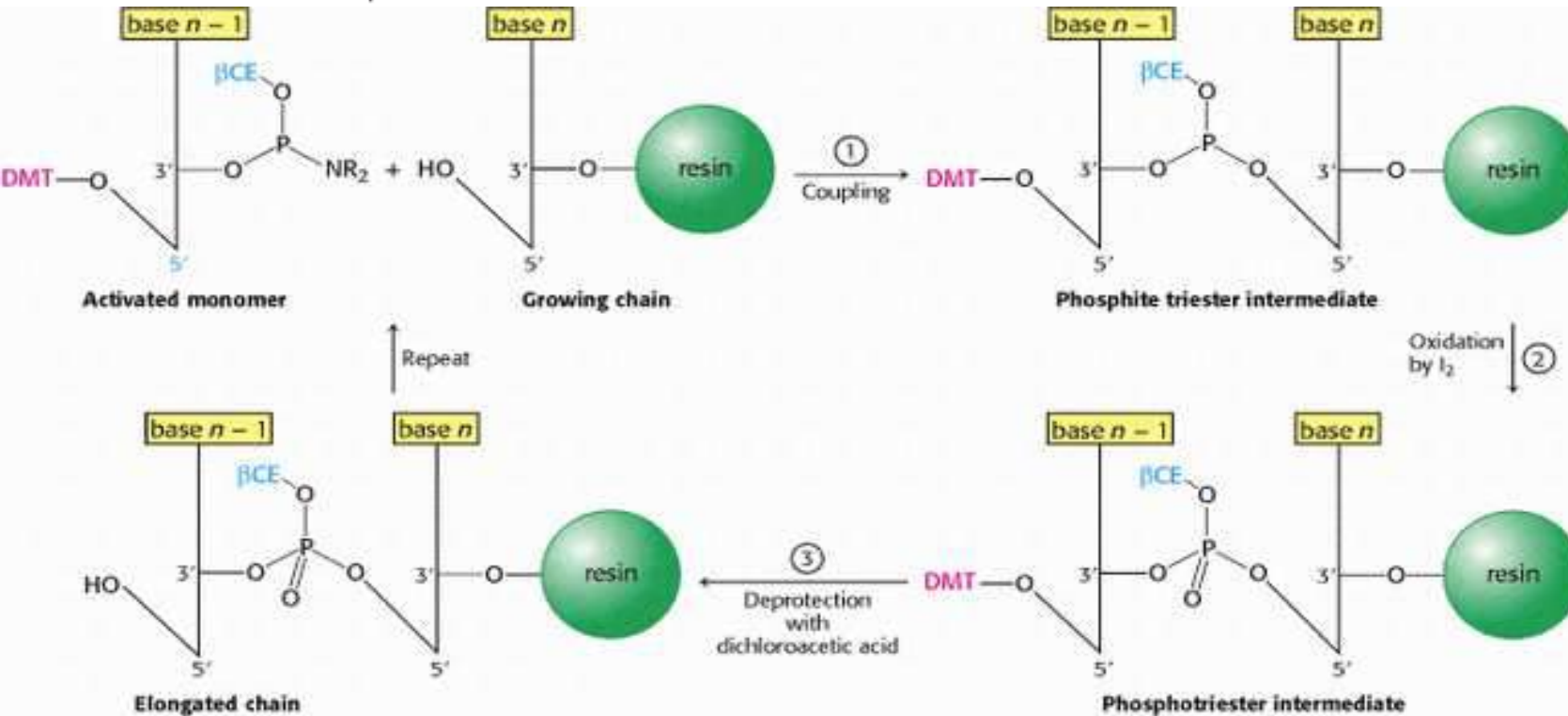
2- Oxidação

3- Desproteção

n vezes



A deoxyribonucleoside 3'-phosphoramidite with DMT and BCE attached



→ Finalização da síntese:
NH₃ desprotege todos os grupos e retira o oligonucleotídeo da fase sólida

- Purificação por HPLC

Clonagem molecular

→ Reação em Cadeia da Polimerase

Polymerase Chain Reaction - PCR

Reação cíclica que se baseia em 3 etapas:

1° - Desnaturação do DNA

- ~95 °C

2° - Anelamento do Primer

- ~45-65 °C

3° - Polimerização

- 72 °C

→ Depende de DNA pol termoestável:

- *Thermus aquaticus* polimerase: **Taq polimerase**

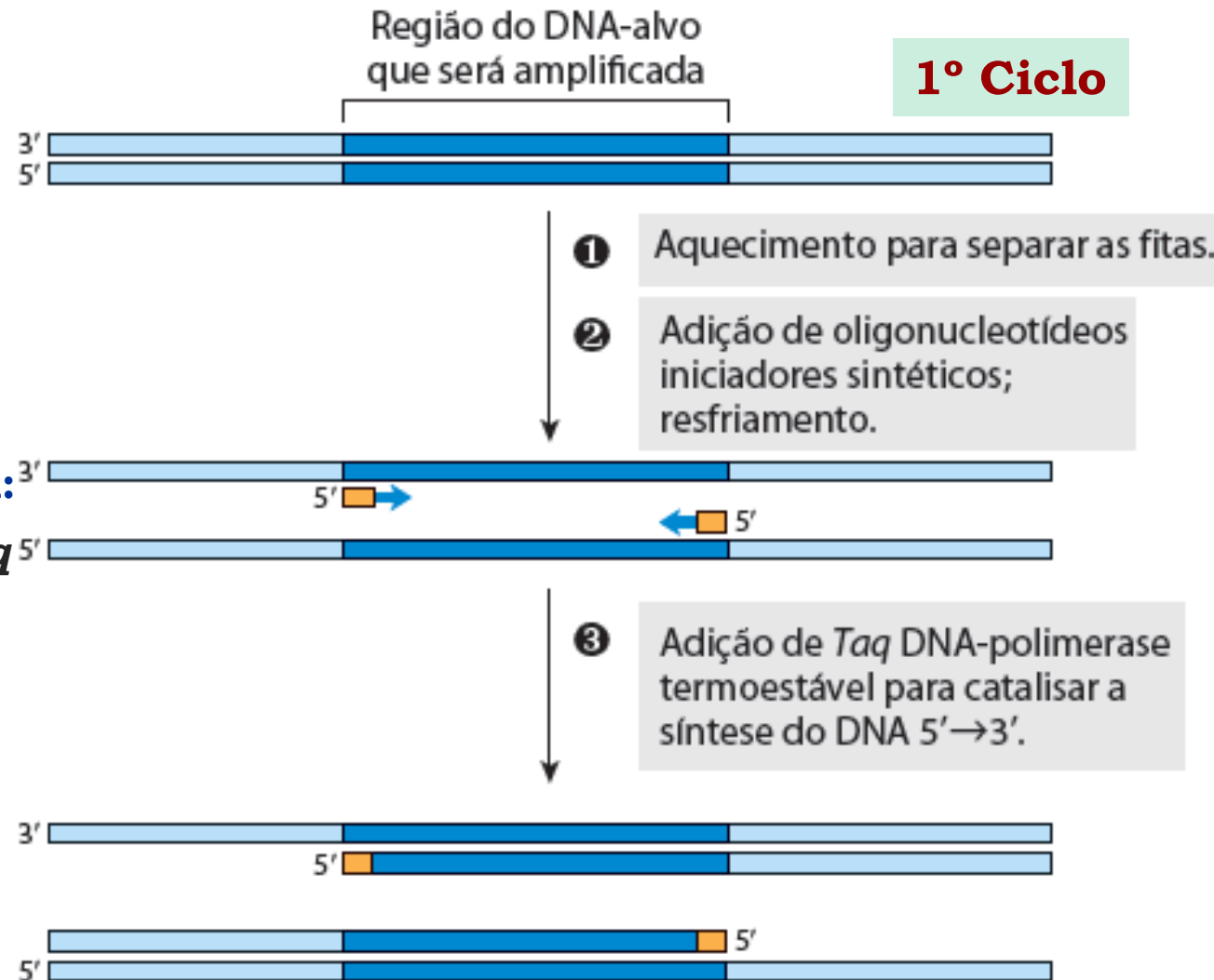
Requer:

- DNA molde

- Par de primers flanqueando o DNA molde

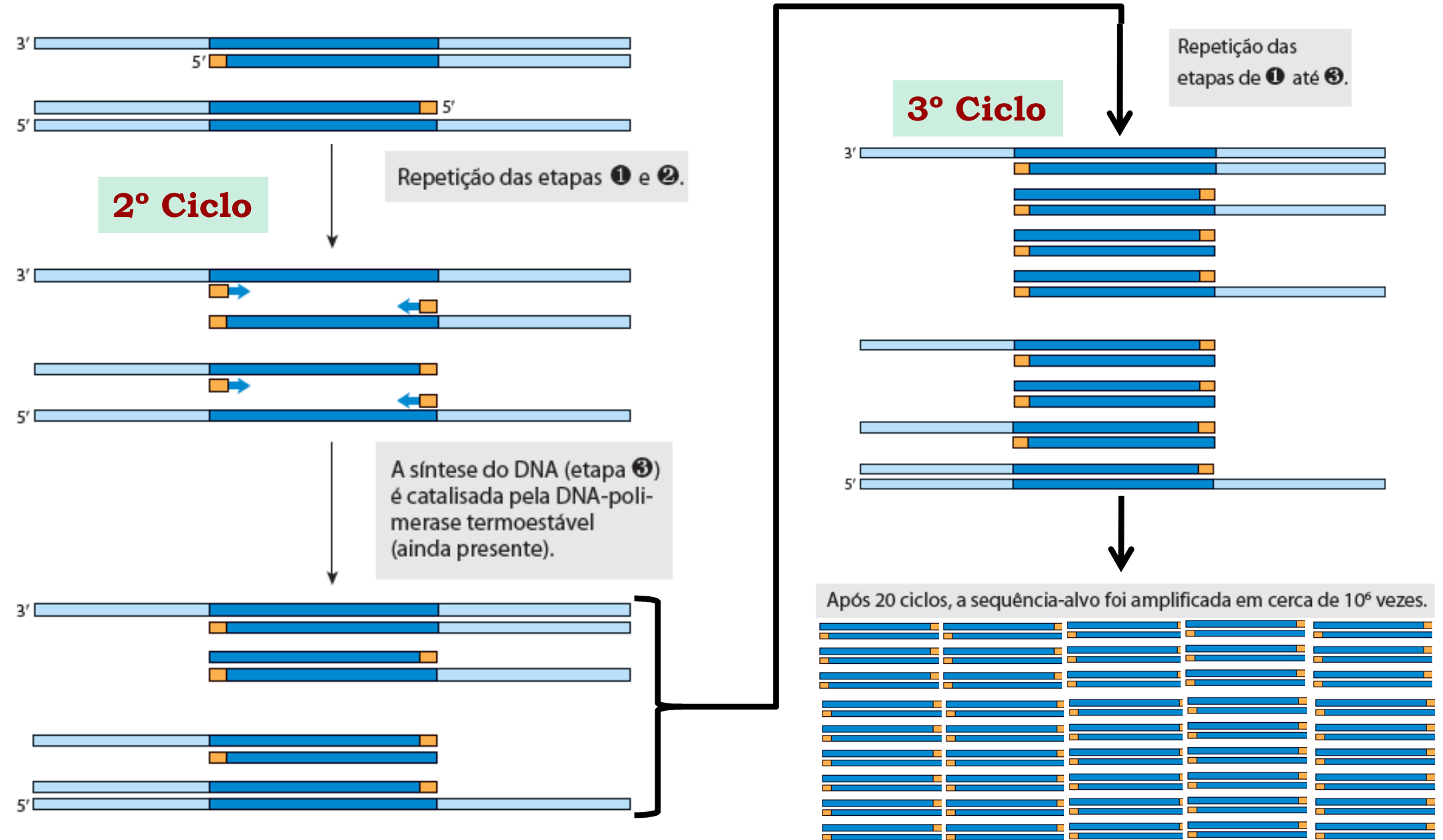
- Os 4 dNTPs

- Mg²⁺



Clonagem molecular

→ PCR (Continuação)

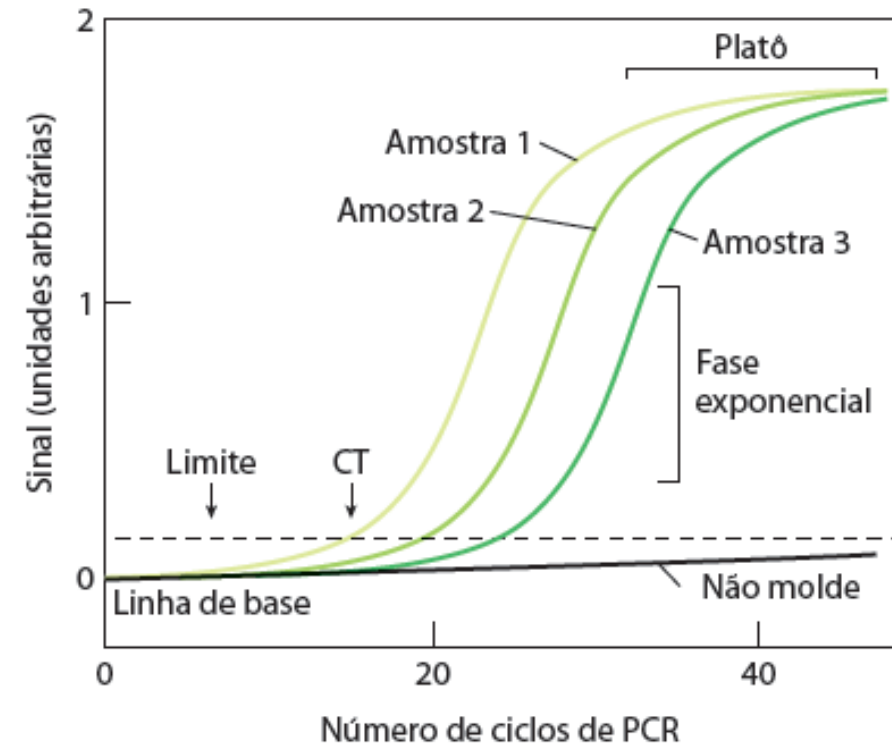
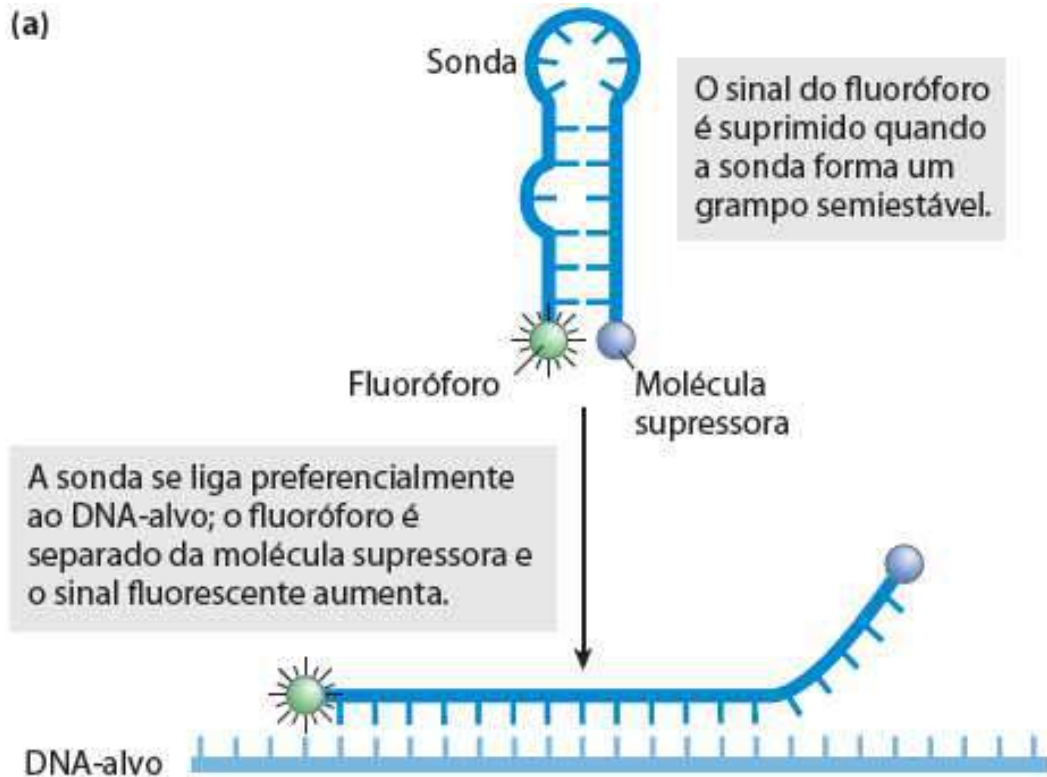


Clonagem molecular

→ PCR quantitativa

→ Permite quantificar analiticamente a quantidade de DNA/cDNA numa amostra

- Aplicações em diagnóstico clínico laboratorial, forense, criminalística, monitoramento ambiental, controle de qualidade, avaliação de transgênicos, etc.
- Usa sonda fluorescente suprimida num oligonucleotídeo específico



Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Características e vantagens

1) Sequência alvo não precisa ser conhecida

→ apenas os flancos para o desenho dos primers de DNA

2) A sequência alvo pode ser muito maior do que os primers

3) Os primers não precisam anelar perfeitamente com a sequência alvo

→ Permite amplificar conjunto de sequências similares

→ Permite introduzir mudanças/mutações na sequência alvo

4) A PCR é altamente específica

→ Pode ser modulado pela temperatura de anelamento

5) Altamente sensível

→ Uma única molécula de DNA pode ser amplificada e detectada

→ Amplifica 1 bilhão de vezes após 30 ciclos (2^n , sendo n o número de ciclos)

6) Inúmeras aplicações tecnológicas, em diagnóstico, forense e até

paleontológicas

Endonucleases de Restrição

Enzimas de Restrição

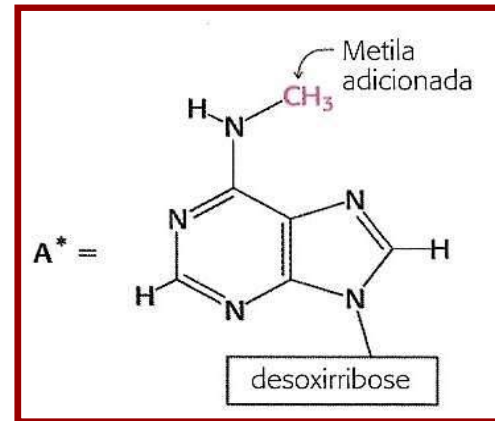
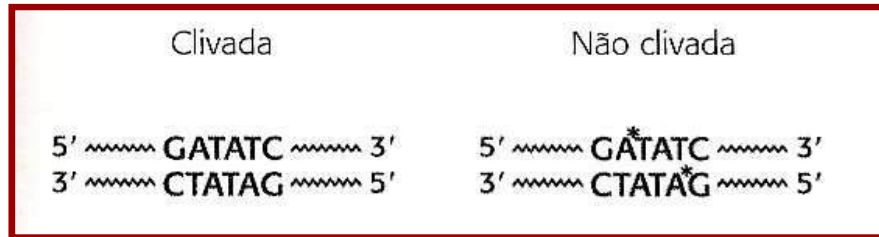
- Enzimas Especializadas em degradar DNA exógeno em bactérias
- Mecanismo de defesa contra infecção viral

Altíssima especificidade

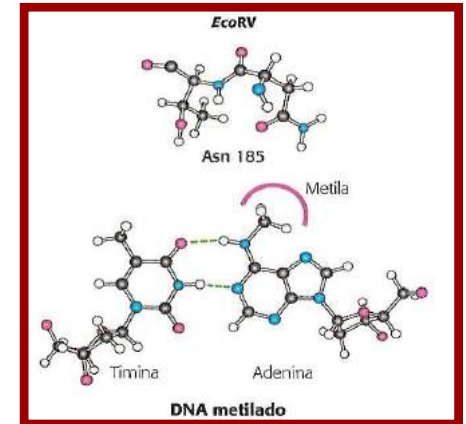
- Reconhecem sequências específicas – Sítios de restrição

→ Reconhecem apenas o DNA Exógeno

→ Metilases marcam o DNA Endógeno



Metilação no DNA endógeno



Impedimento estérico

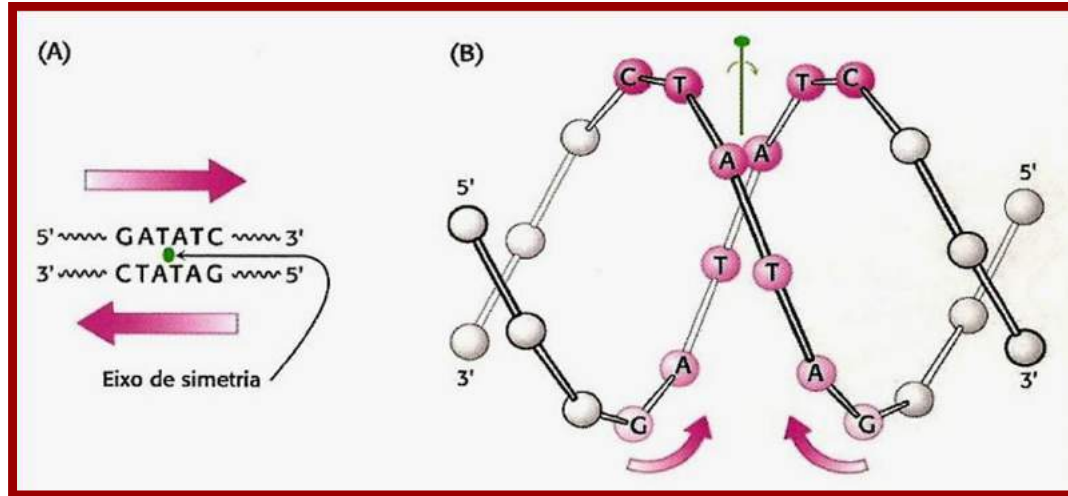
- Reconhecem Sequências palindrômicas de DNA
- Sequências lidas da mesma forma em ambos os sentidos, ou seja, em ambas as fitas de DNA

Palindrome

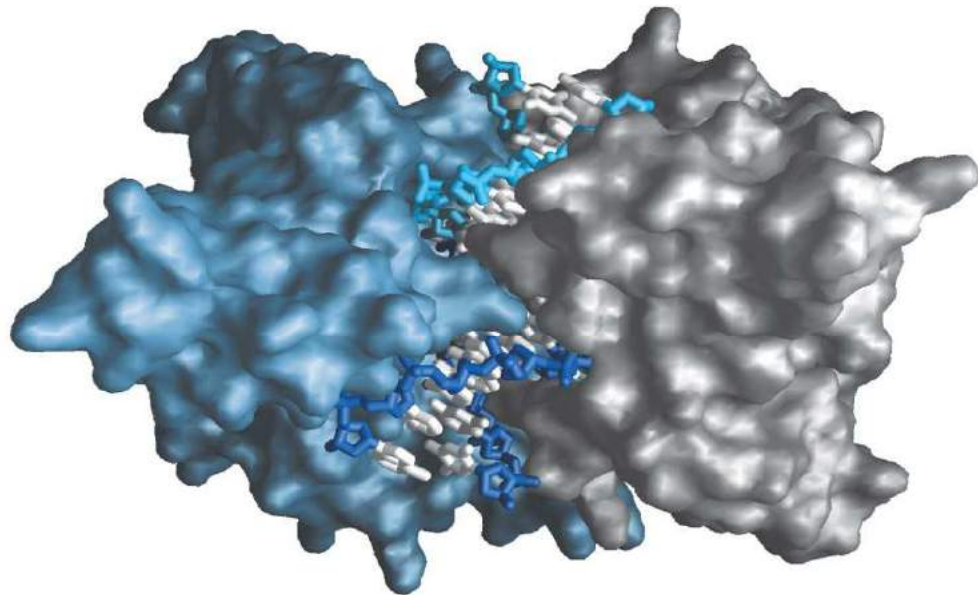


Endonucleases de Restrição

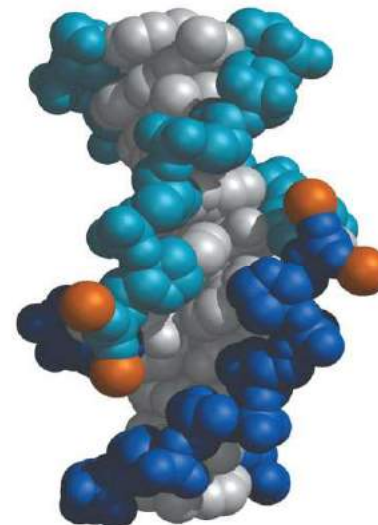
Enzimas de Restrição



→ Enzima dimérica age nas duas fitas do DNA



(a)



(b)

Endonucleases de Restrição

- Tipo I → Clivagem em sítios aleatórios em até 1000 pb do sítio de reconhecimento
- Tipo II → Clivagem dentro do sítio de reconhecimento
- Tipo III → Clivagem em sítios aleatórios em ~25 pb do sítio de reconhecimento
- Clivagem em extremidades **coesivas/adesivas** ou **cegas**

TABLE 9-2 Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases

| | | | |
|----------------|--|-----------------|--|
| <i>Bam</i> HI | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G } \underline{\text{GATC}}^* \text{ (3')} \\ \text{CCTAG} \uparrow \\ \text{*} \end{array}$ | <i>Hind</i> III | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ A } \underline{\text{AGCTT}} \text{ (3')} \\ \text{TTCGAA} \uparrow \end{array}$ |
| <i>Cl</i> AI | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ AT } \underline{\text{CGAT}}^* \text{ (3')} \\ \text{TAGCTA} \uparrow \\ \text{*} \end{array}$ | <i>Not</i> I | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ GC } \underline{\text{GGCCGC}} \text{ (3')} \\ \text{CGCCGG} \uparrow \text{CG} \end{array}$ |
| <i>Eco</i> RI | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G } \underline{\text{AATTC}}^* \text{ (3')} \\ \text{CTTAA} \uparrow \text{G} \\ \text{*} \end{array}$ | <i>Pst</i> I | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ CTG } \underline{\text{CAG}}^* \text{ (3')} \\ \text{GACGT} \uparrow \text{C} \\ \text{*} \end{array}$ |
| <i>Eco</i> RV | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ GAT } \underline{\text{ATC}} \text{ (3')} \\ \text{CTAATAG} \uparrow \end{array}$ | <i>Pvu</i> II | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ CAG } \underline{\text{CTG}} \text{ (3')} \\ \text{GTCGAC} \uparrow \end{array}$ |
| <i>Hae</i> III | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ GG } \underline{\text{CC}}^* \text{ (3')} \\ \text{CCGG} \uparrow \\ \text{*} \end{array}$ | <i>Tth</i> 111I | $\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ GACNN } \underline{\text{NNGTC}} \text{ (3')} \\ \text{CTGNNN} \uparrow \text{CAG} \end{array}$ |

Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by each restriction endonuclease. Asterisks indicate bases that are methylated by the corresponding methylase (where known). N denotes any base. Note that the name of each enzyme consists of a three-letter abbreviation (in italics) of the bacterial species from which it is derived, sometimes followed by a strain designation and Roman numerals to distinguish different restriction endonucleases isolated from the same bacterial species. Thus *Bam*HI is the first (I) restriction endonuclease characterized from *Bacillus amyloliquefaciens*, strain H.

Vetores

Plasmídios e bacteriófagos

→ Moléculas de DNA capazes de auto-replicação -

- Diferentes de cromossomas bacterianos

- Tamanho: 1 a 200 kbp

- Diferentes vetores para diferentes objetivos

→ Carregam vantagens para o hospedeiro → marcas de seleção

→ Contém sistemas de Origem de auto-replicação – sequência *Ori*

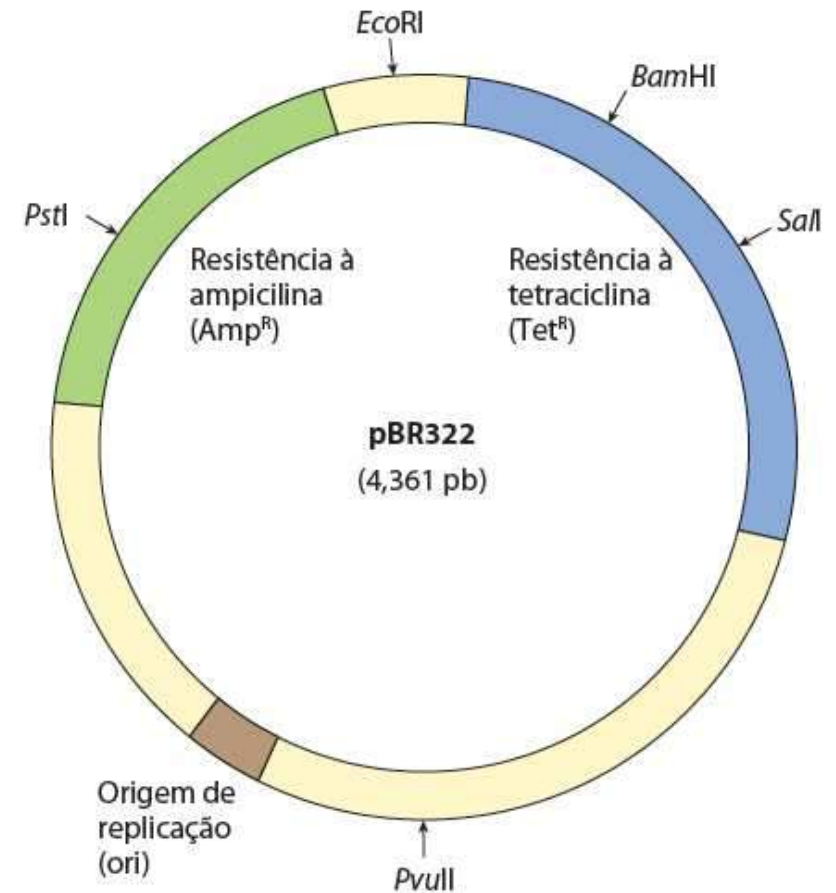
→ Codificam Proteínas

- Resistência a antibióticos

Plasmídeos

→ 1 a 100-1000 cópias por bactéria

→ Parasitas moleculares



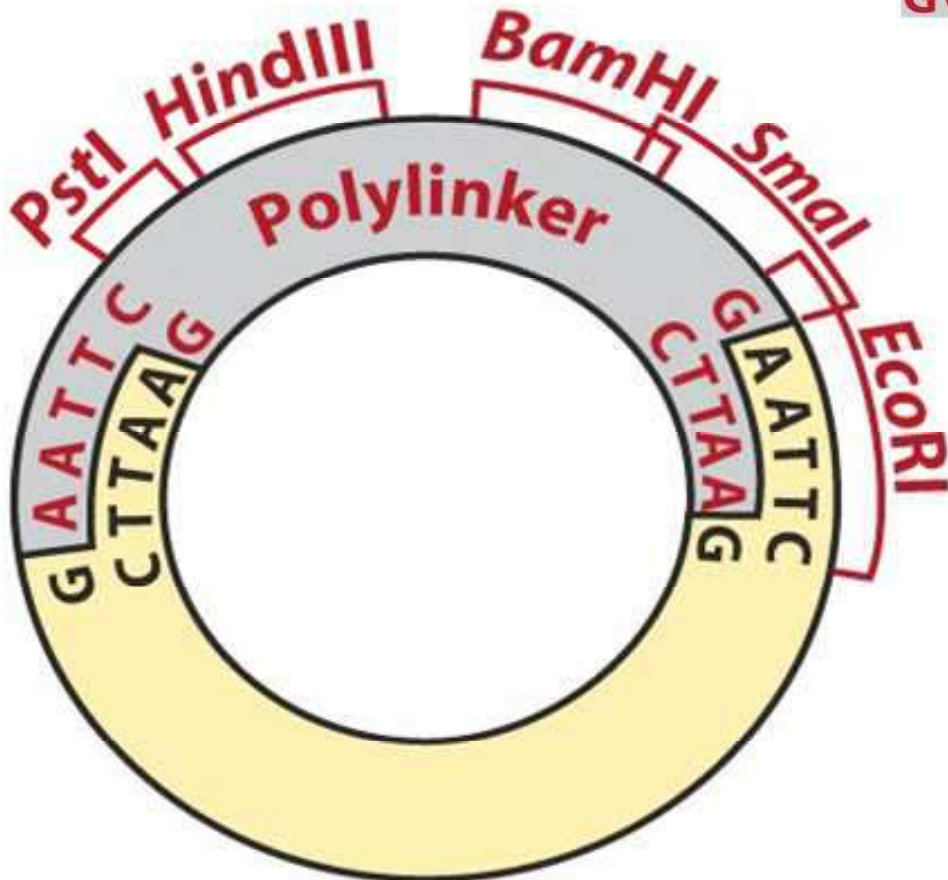
Vetores de clonagem

- Permite a propagação de moléculas de DNA de interesse
- Possuem sítios múltiplos de clonagem
- Permitem a inserção de sequências de DNA



Synthetic polylinker (Sítio Múltiplo de Clonagem)

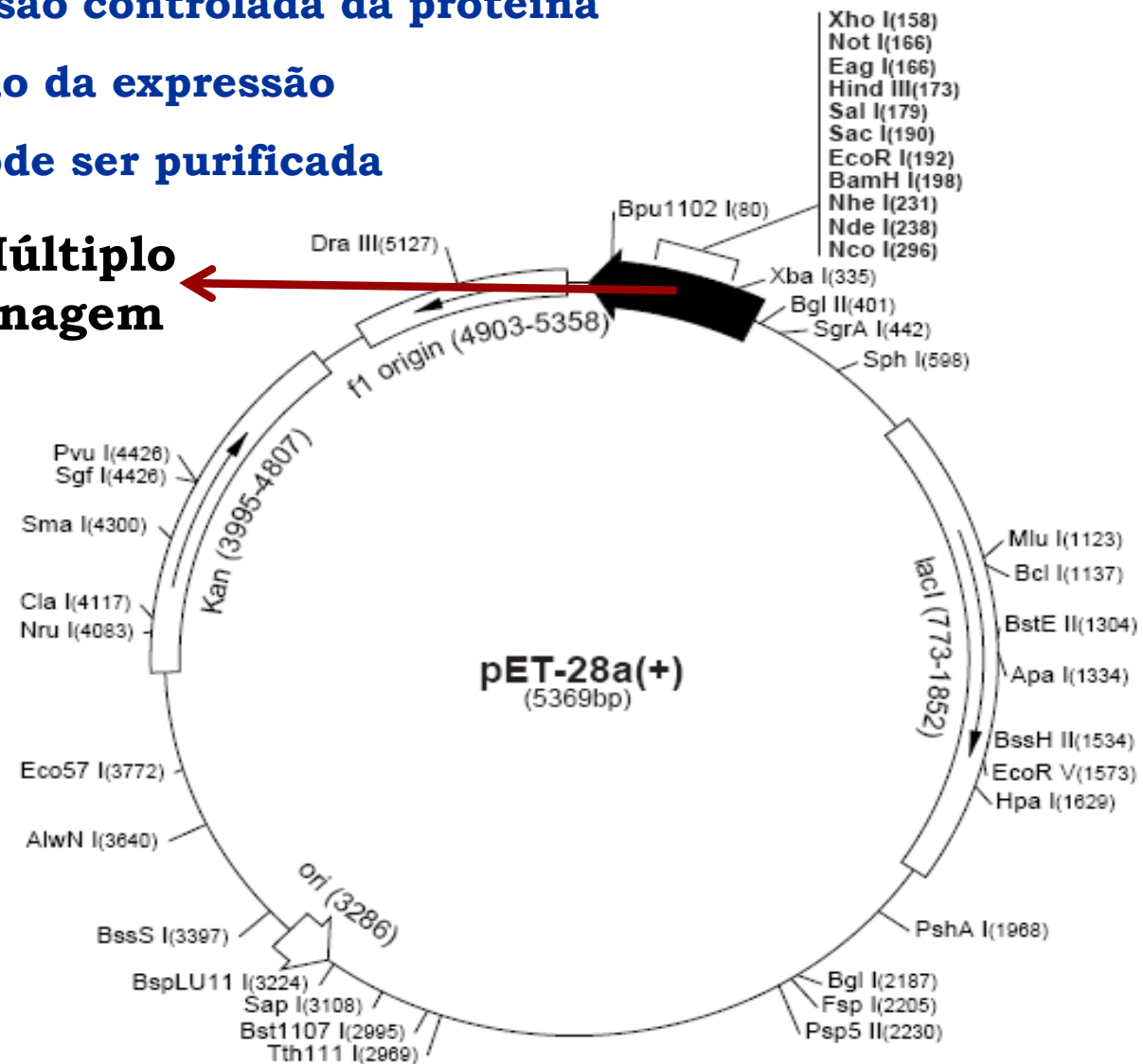
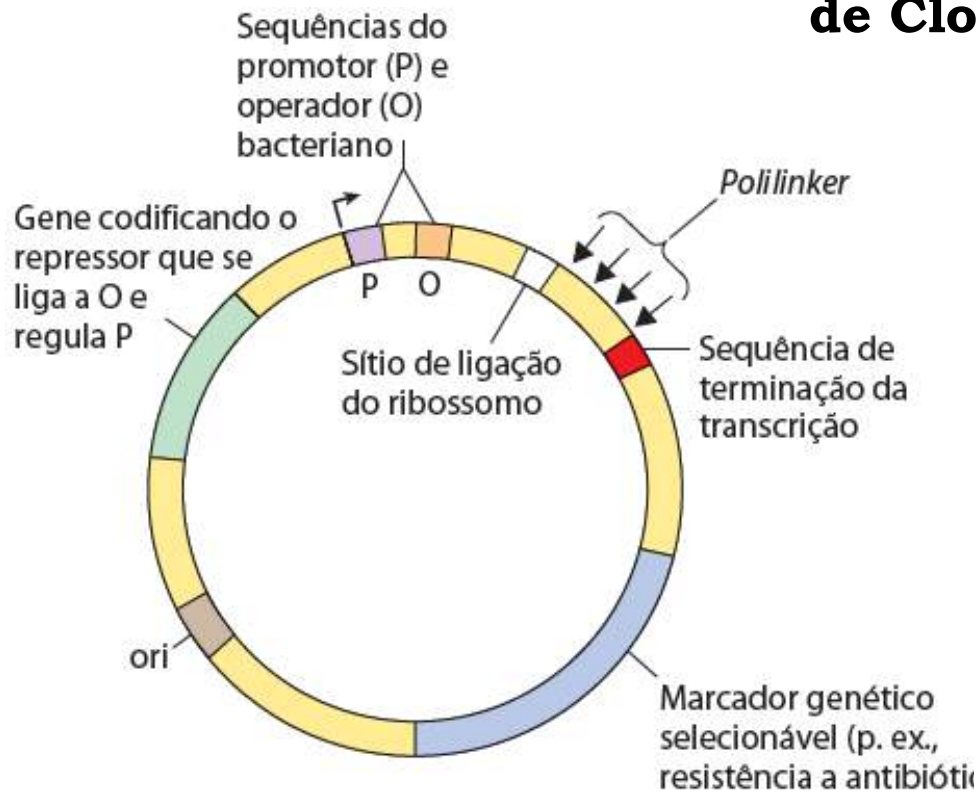
- O Sítio Múltiplo de Clonagem pode ser aberto por Endonucleases de restrição.
- Uma sequência de DNA pode ser inserida – As sequências de DNA podem ser seladas nas extremidades por uma DNA ligase.



Vetores de Expressão

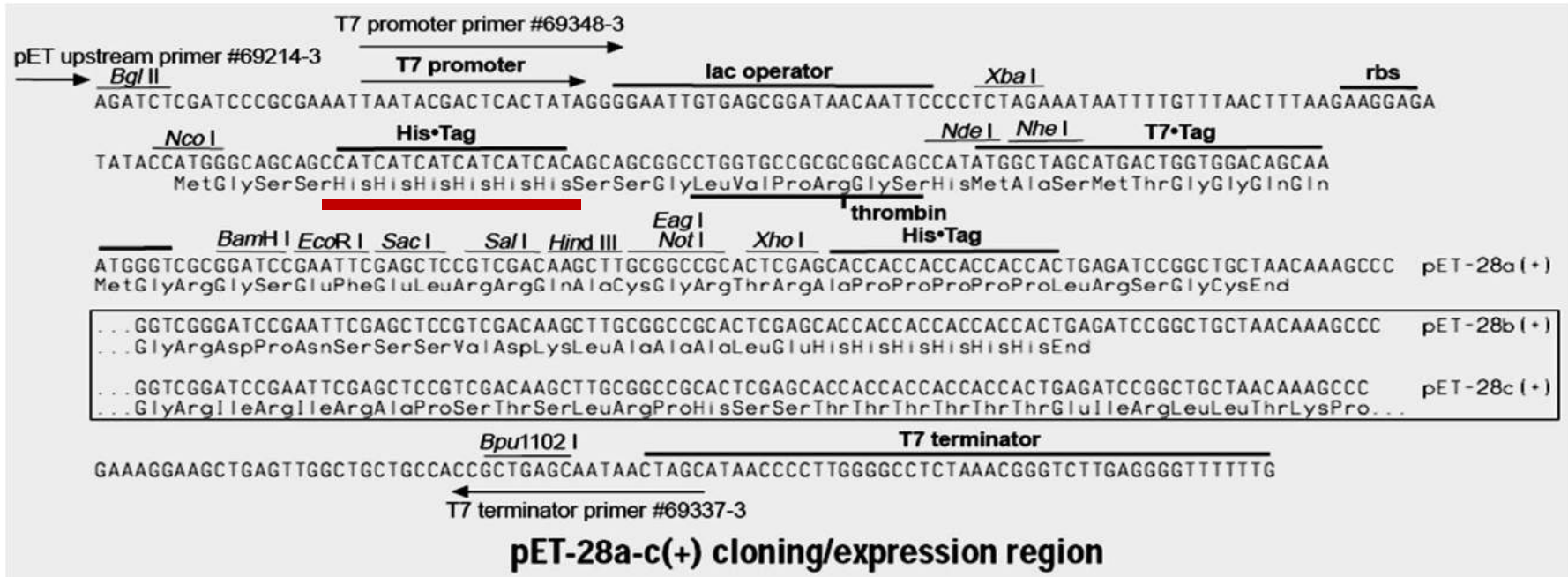
- Permite expressar uma proteína
- Fragmento de DNA deve ser inserido em fase de leitura
- Permite a expressão controlada da proteína
 - Indução da expressão
- Proteína pode ser purificada

Sítio Múltiplo de Clonagem



Vetores de Expressão

Sítio Múltiplo de Clonagem pET28a

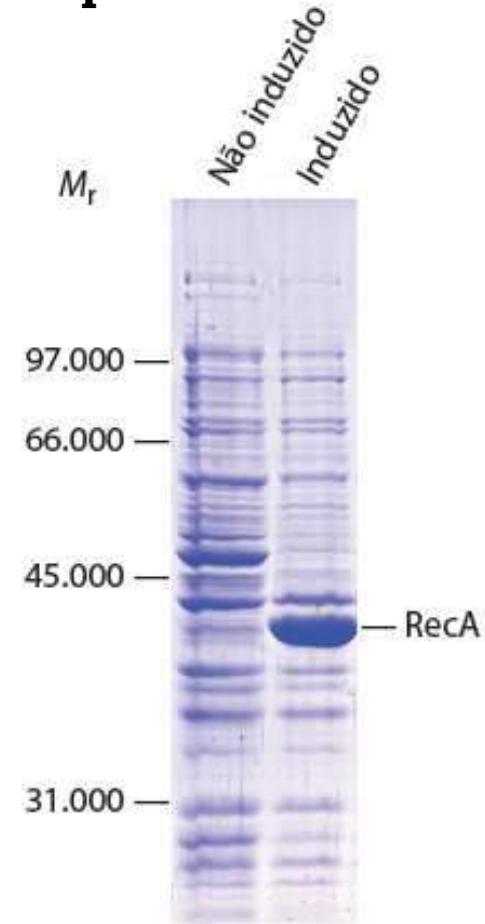
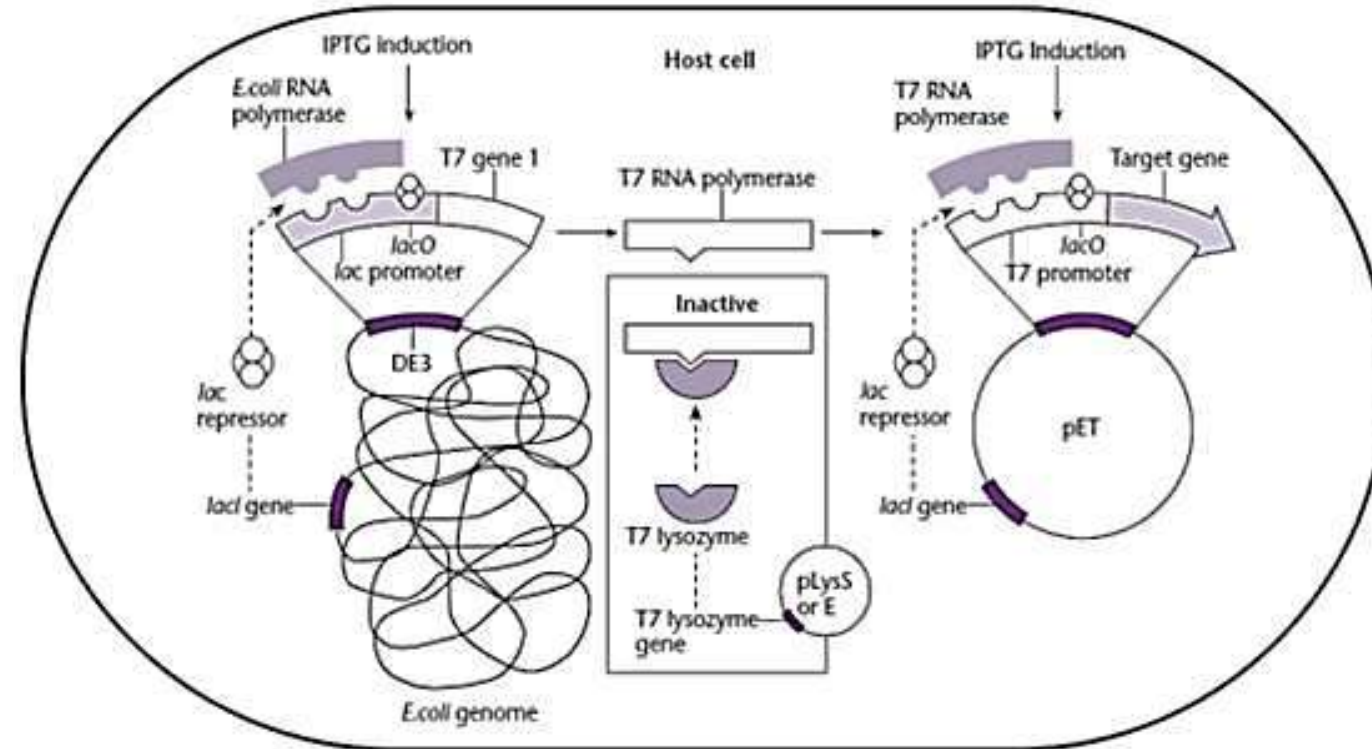


**Marcadores de fusão
usados para a purificação
da proteínas por
cromatografia de afinidade**

| Marcadores proteicos/ peptídicos | Massa molecular (kDa) | Ligante imobilizado |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------|
| Proteína A | 59 | Porção Fc da IgG |
| (His) ₆ | 0,8 | Ni ²⁺ |
| Glutaciona-S-transferase (GST) | 26 | Glutaciona |
| Proteína ligante de maltose | 41 | Maltose |

Vetores de Expressão

Indução de proteínas pelos Vetores pET



IPTG = indutor

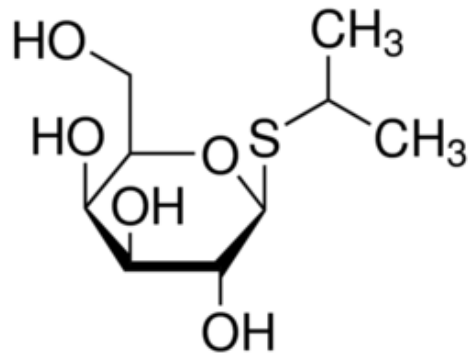
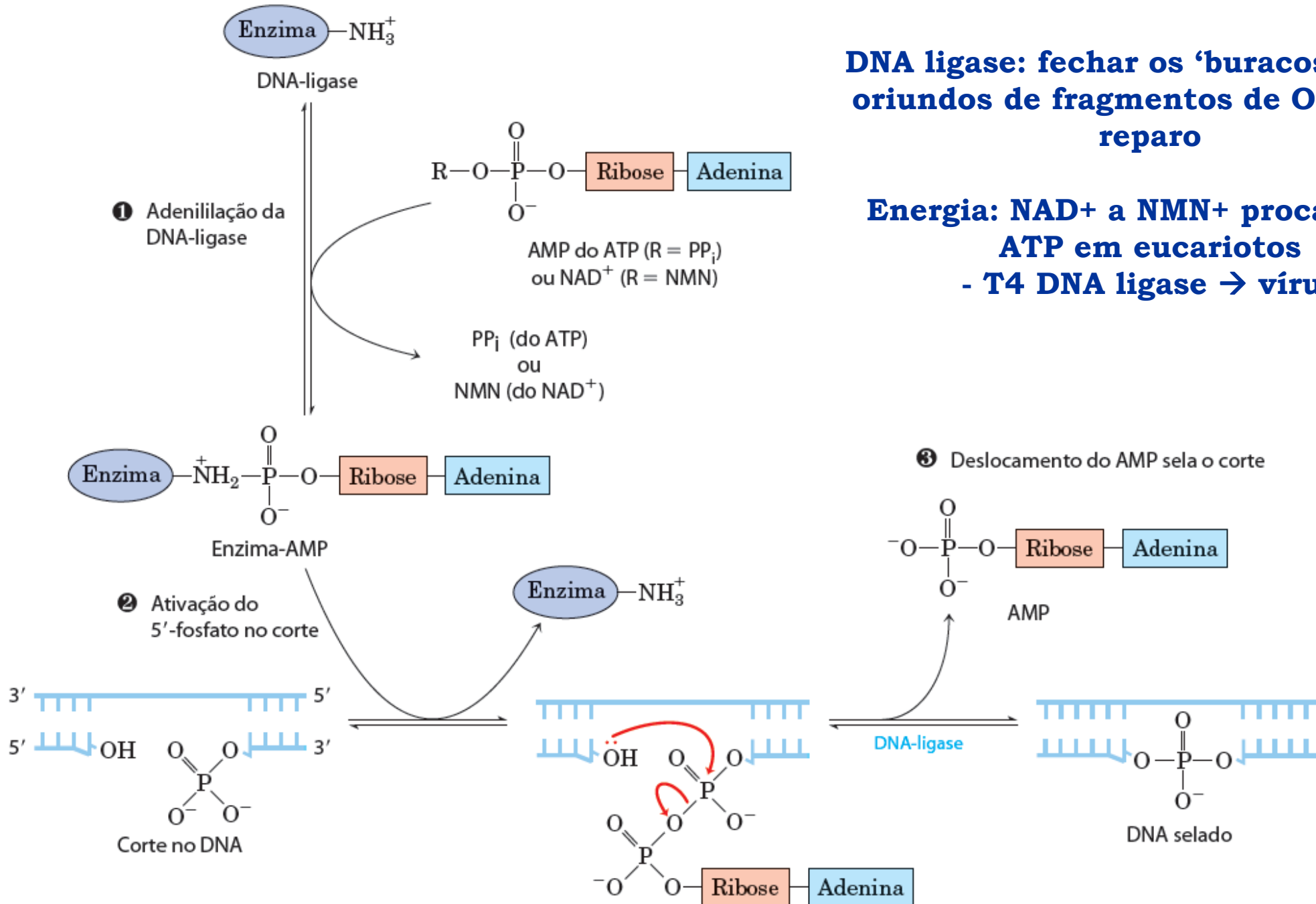


FIGURA 9-8 Expressão regulada da proteína RecA em uma célula bacteriana. O gene que codifica a proteína RecA, fusionado com o promotor T7 do bacteriófago, é clonado em um vetor de expressão. Em condições normais de crescimento (não induzido), nenhuma proteína RecA aparece. Quando a RNA-polimerase de T7 é induzida na célula, o gene *recA* é expresso e grandes quantidades da proteína RecA são produzidas. As posições dos marcadores de peso molecular padrão que correm no mesmo gel são indicadas.

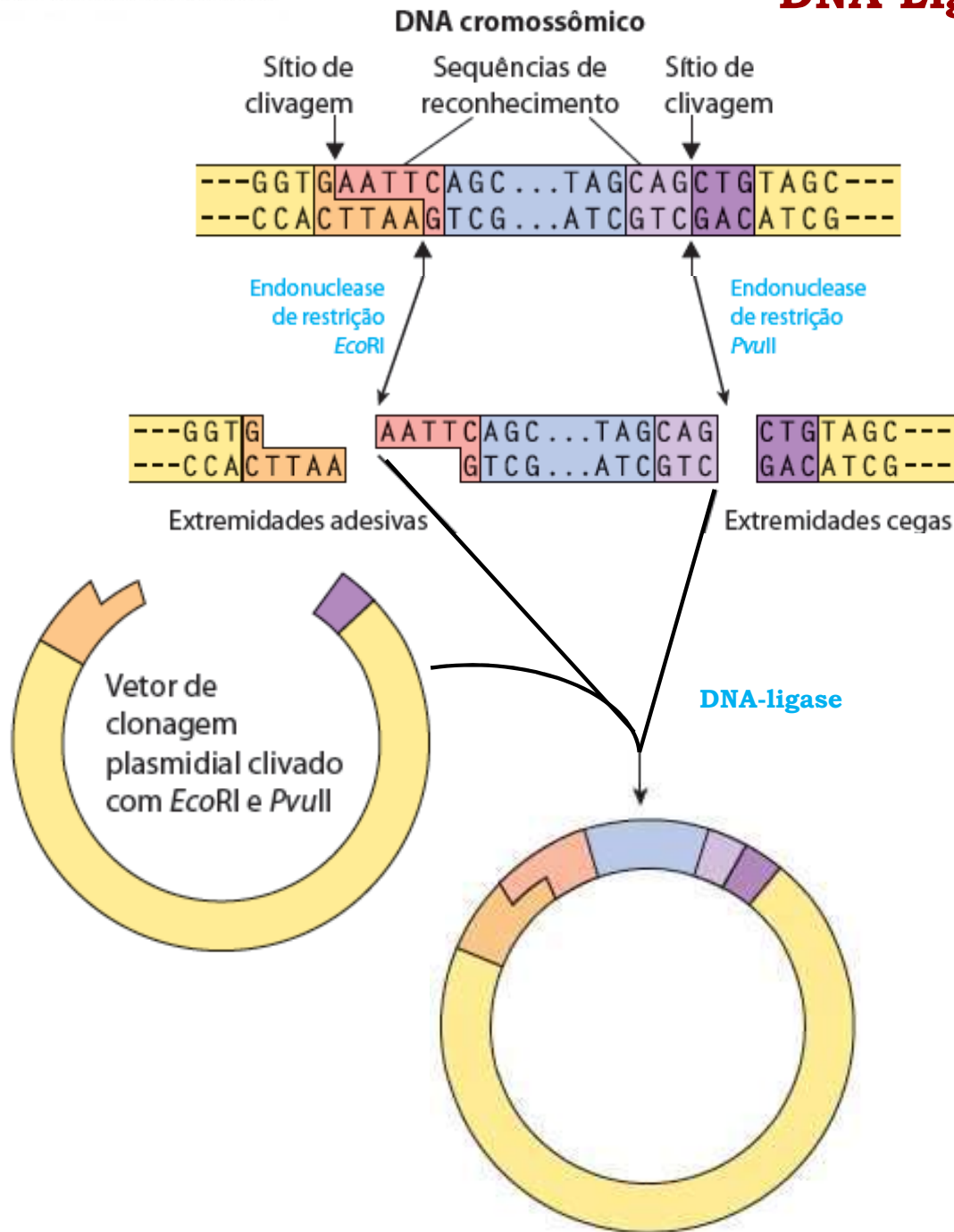
DNA-Ligases

DNA ligase: fechar os 'buracos' (nicks) oriundos de fragmentos de Okasaki e reparo

**Energia: NAD⁺ a NMN⁺ procaríotos;
ATP em eucariotos
- T4 DNA ligase → vírus**



DNA-Ligasas



→ Permitem a ligação de diferentes moléculas de DNA

Ligam fragmentos de DNA clivados com pares de Endonucleases de restrição

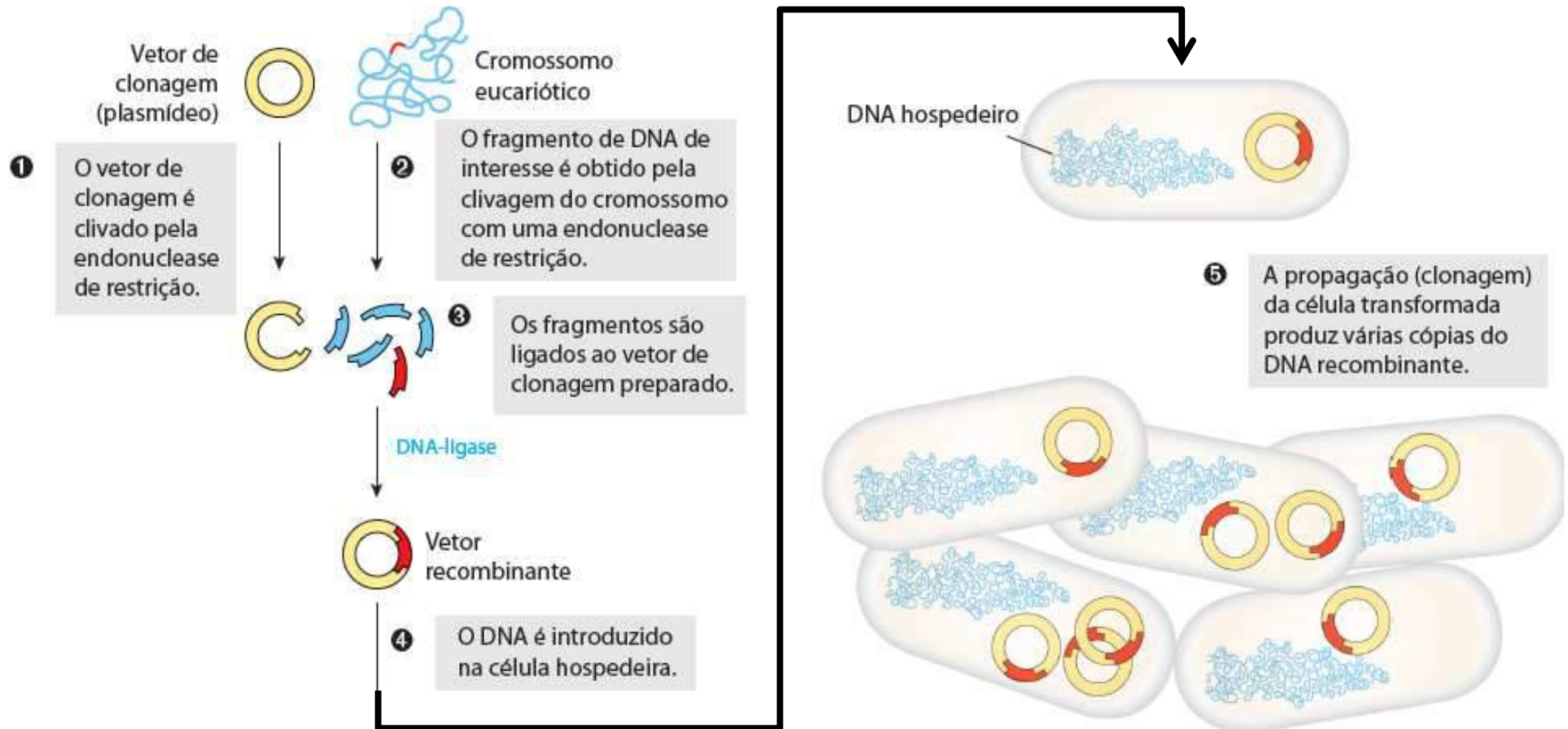
- Ligação de extremidades produzidas por pelo 1 Endonuclease de restrição que produza pelo menos 1 extremidade ocasional ligação na orientação adequada

Bibliotecas

→ Bibliotecas de DNA → a partir de DNA genômico

- DNA genômico pode ser fragmentado mecanicamente ou enzimaticamente em pedaços menores

- Clonados em fagos e plasmídios



Bibliotecas genômicas

→ Bibliotecas de DNA → a partir de DNA genômico

- Permite o sequenciamento genômico

Permite o estudo do potencial gênico do organismo e sua regulação

- Função predita por comparação

Genômico comparativa

Identificação de genes:

Homólogos: ancestral comum na espécie

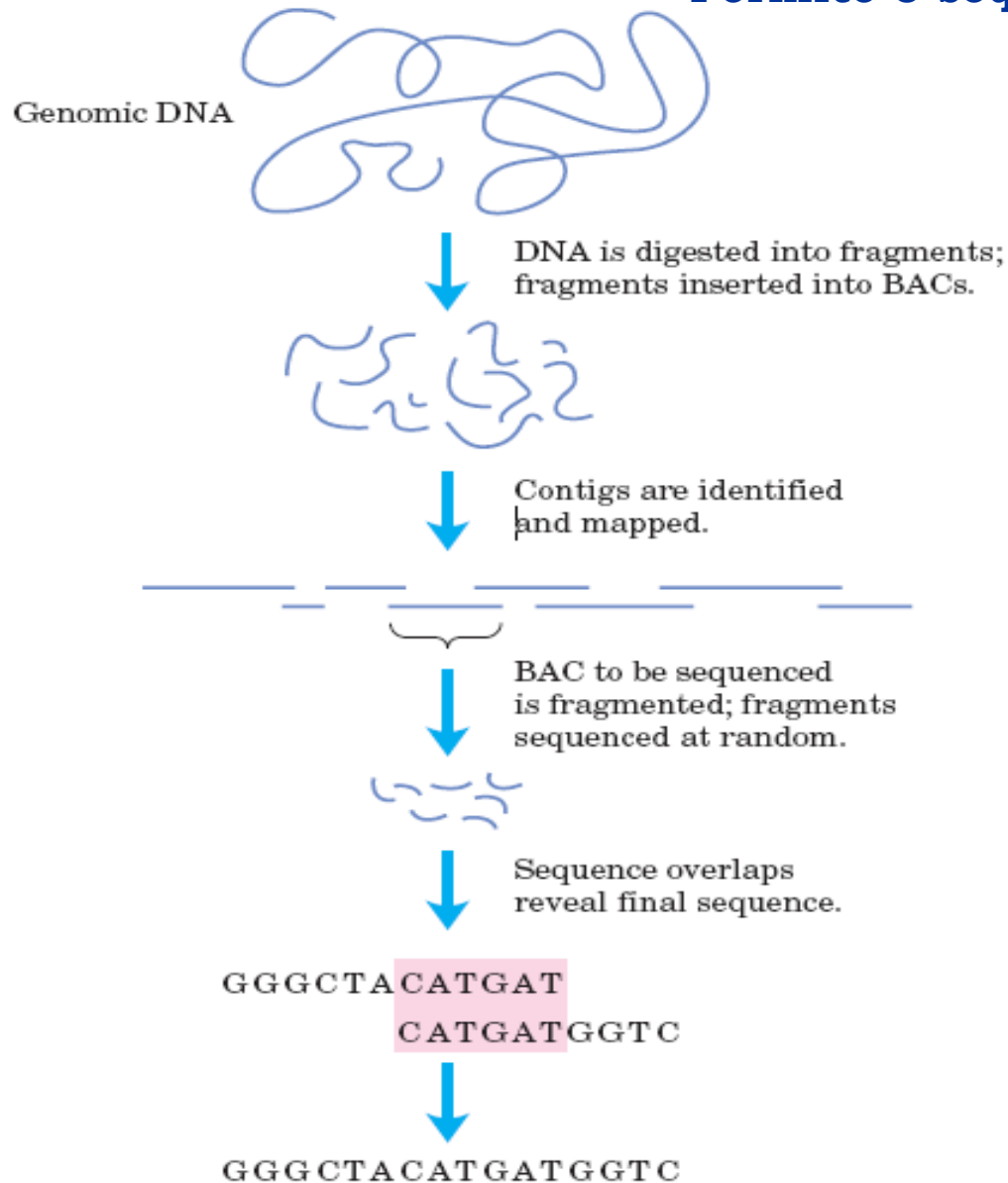
Ortólogos: ancestral comum em #s espécies

Parálogos: genes semelhantes na espécie

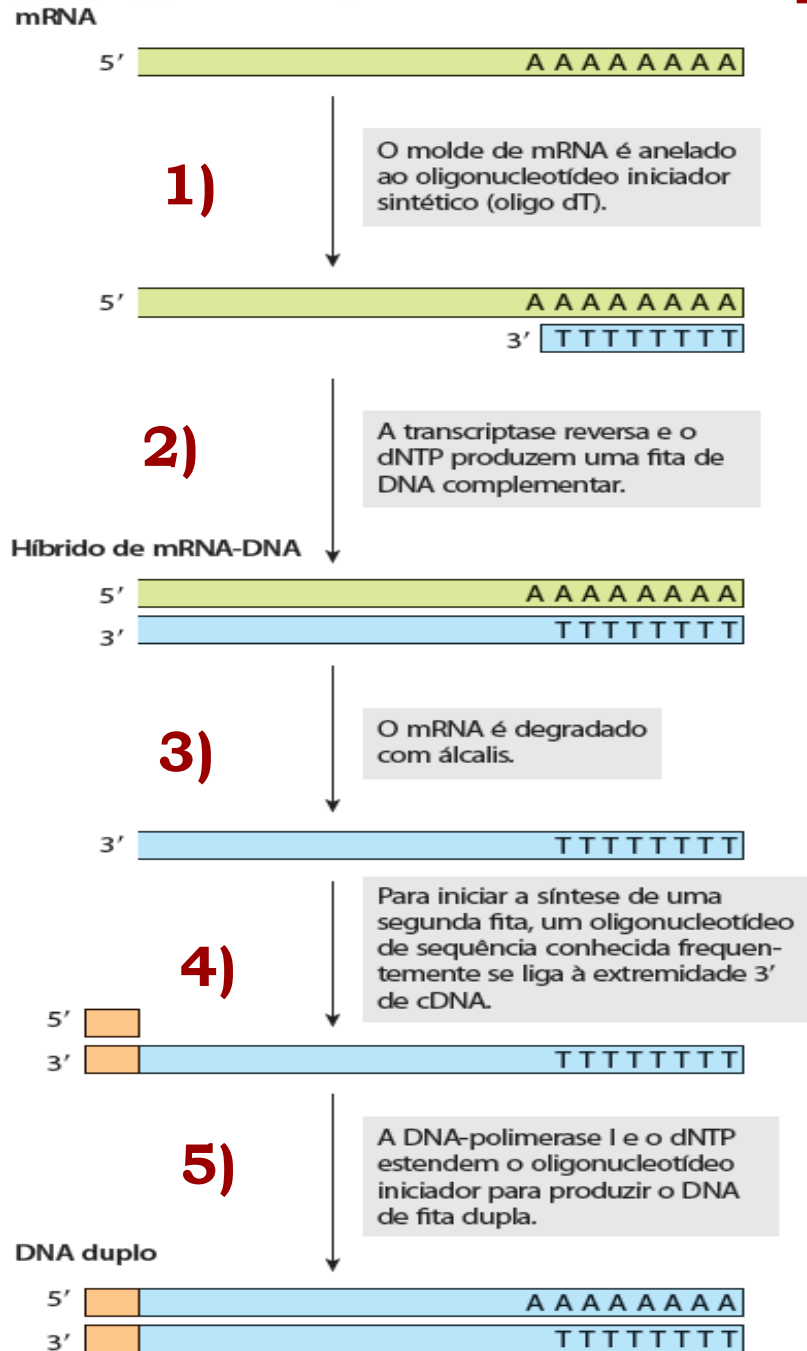
Pseudogenes: genes não funcionais no genoma

Sintenia: conservação da organização gênica em #s espécies

| Cromossomo 9 humano | Cromossomo 2 de camundongo |
|---------------------|----------------------------|
| <i>EPB72</i> | <i>Epb7.2</i> |
| <i>PSMB7</i> | <i>Psmb7</i> |
| <i>DNM1</i> | <i>Dnm</i> |
| <i>LMX1B</i> | <i>Lmx1b</i> |
| <i>CDK9</i> | <i>Cdk9</i> |
| <i>STXBP1</i> | <i>Stxbp1</i> |
| <i>AK1</i> | <i>Ak1</i> |
| <i>LCN2</i> | <i>Lcn2</i> |



Bibliotecas de cDNA



→ Bibliotecas de cDNA → a partir de moléculas de mRNA

1) mRNA podem ser purificados usando resina contendo Oligo-dT fixado

2) Necessita da Transcriptase Reversa → converte mRNA em cDNA

3) mRNA pode ser degradado quimicamente ou enzimaticamente (RNase H)

4) DNAPol I duplica fita simples usando oligo-dA como primer (pode conter sítios de restrição)

5) Clonagem num vetor adequado

→ cDNA = DNA complementar a um mRNA

→ Representa o conteúdo de mRNA de uma célula/tecido → Transcriptoma

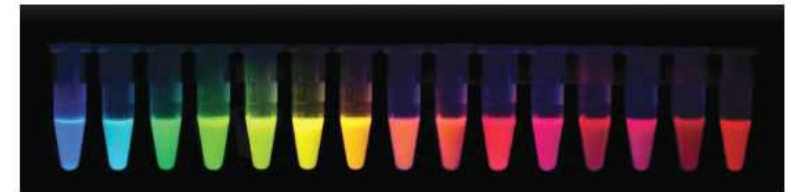
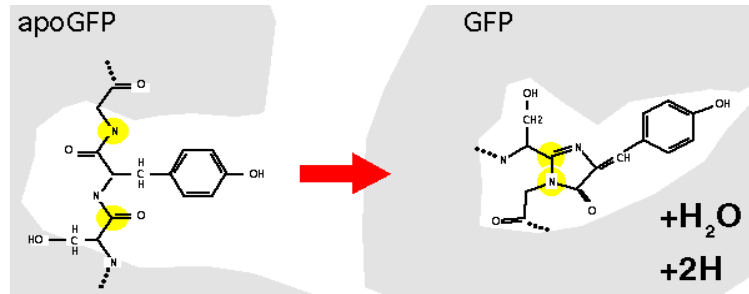
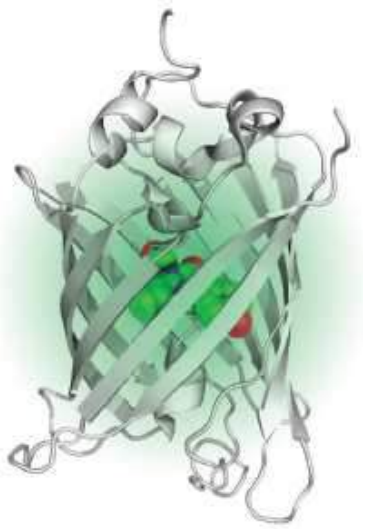
Bibliotecas especializadas de cDNA

Permitem estudar localização e função por interação do produto gênico

→ Requer: 1) gene repórter; 2) seleção; 3) identificação

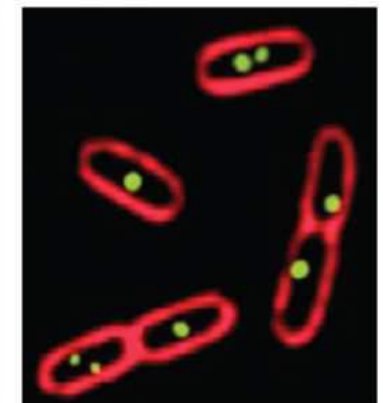
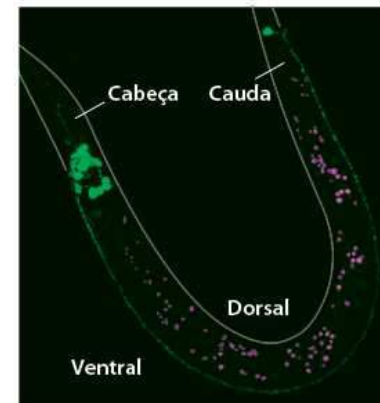
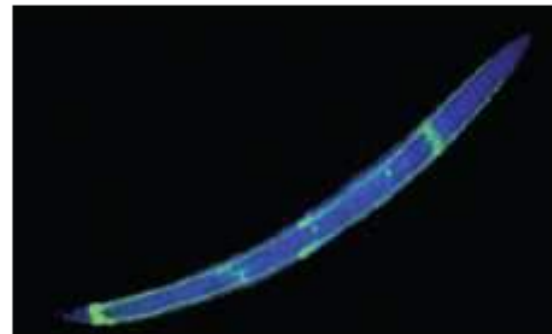
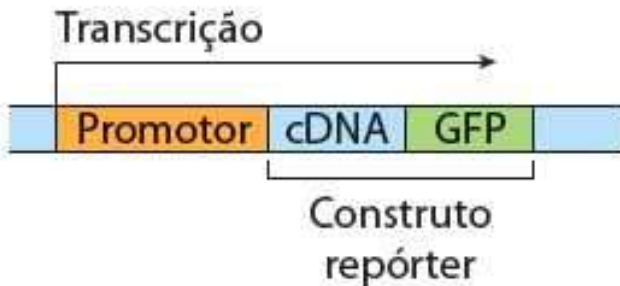
→ Ex: β -galactosidade

→ Green Fluorescent protein: GFP



→ Estudo de promotores

→ Estudo da localização celular/tecidual



Bibliotecas especializadas de cDNA

Permitem estudar localização e função por interação do produto gênico

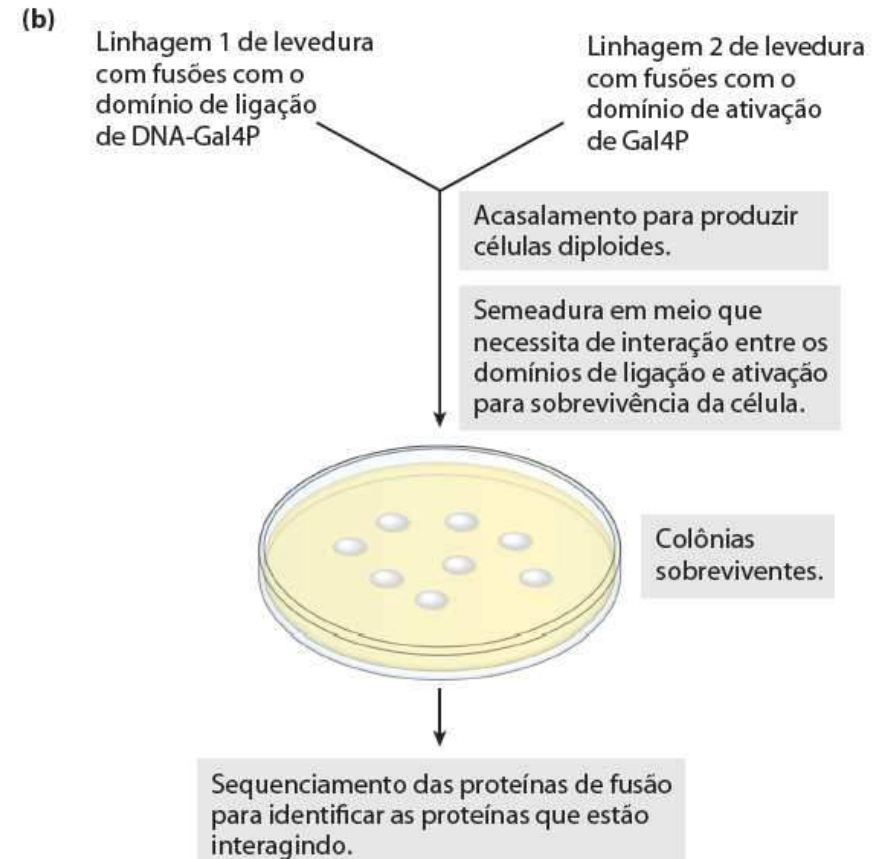
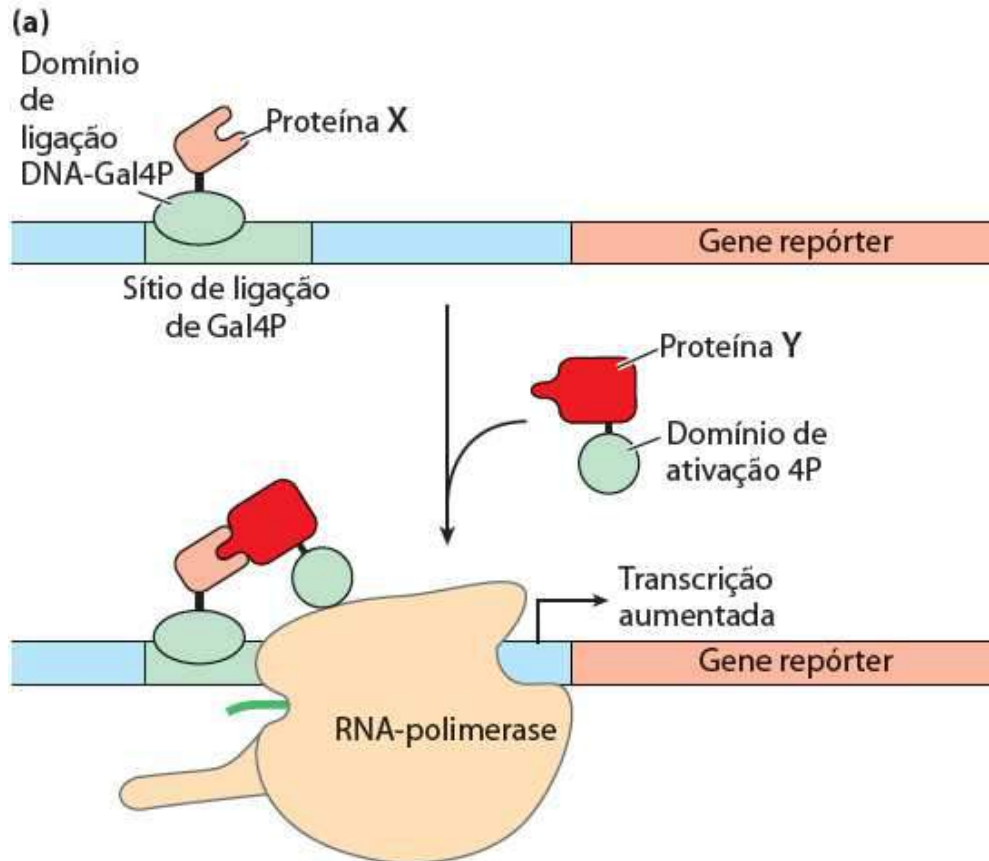
Experimento de duplo híbrido

- Análise em larga escala de interação proteína-proteína ou proteína-RNA *in vivo*

“A culpa por associação”

Usa proteína modular ou multi-domínio

Cada domínio é clonado em fusão com o DNA da proteína alvo (isca) e uma biblioteca de cDNA (presa)



Clonagem Molecular

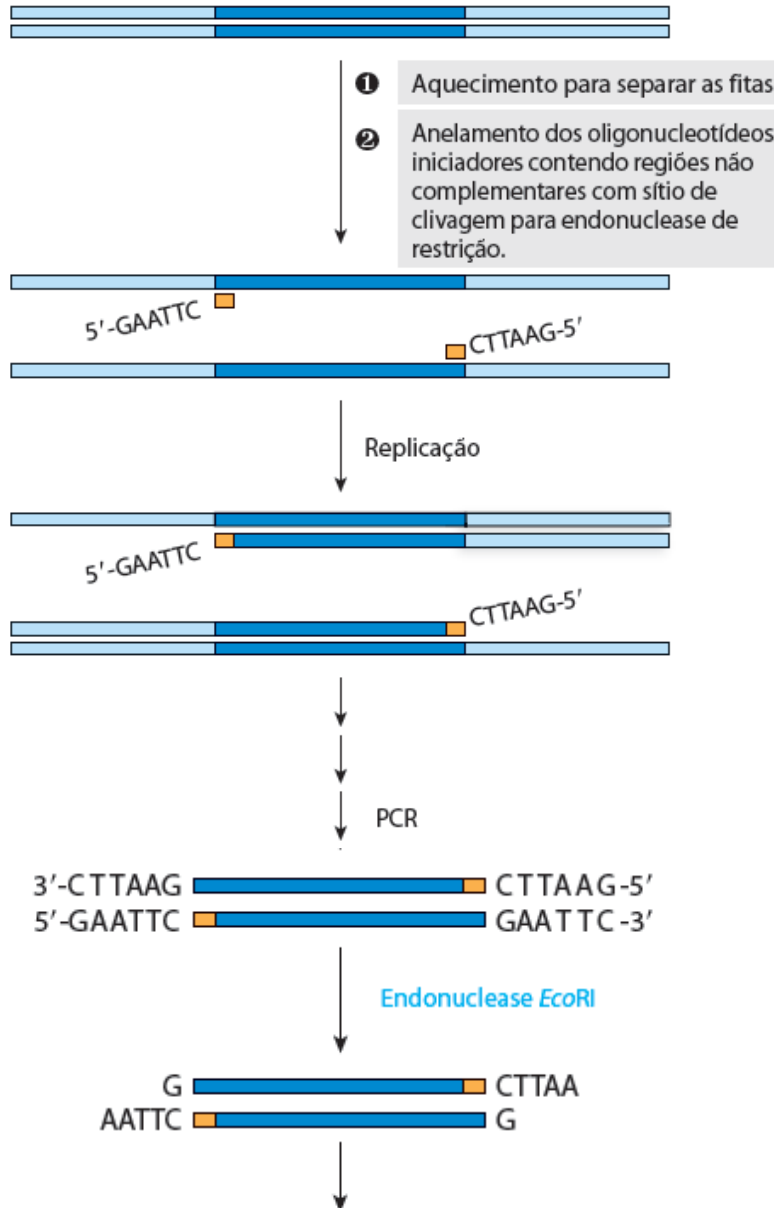
Construção de uma molécula de DNA de interesse = Engenharia Genética

Protocolo básico para a clonagem envolve:

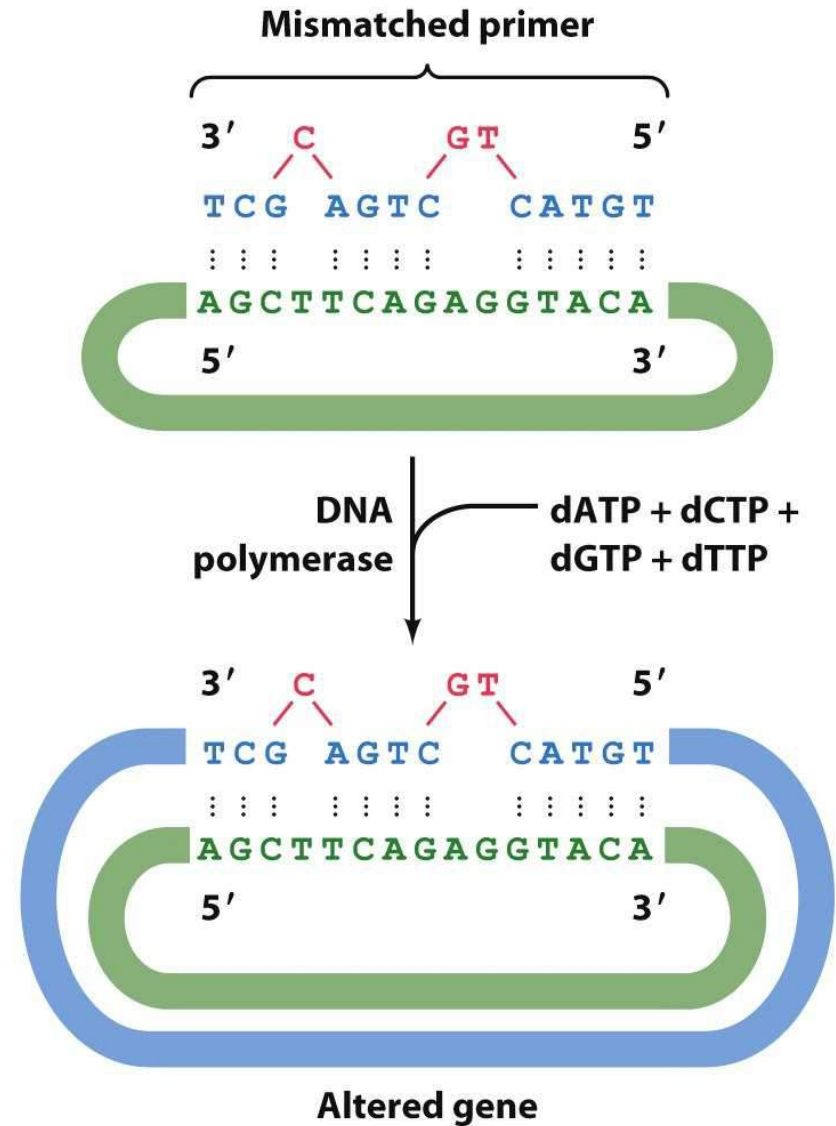
1. Escolher um gene de interesse → Desenhar *Primer* → **Bioinformática**
2. Amplificar o fragmento de DNA → **PCR**
3. Isolar o fragmento de interesse no gel de agarose → **Eletroforese**
4. “Cortar” DNA em posição definida → **Enzima de restrição**
5. Ligar com vetor de clonagem → **DNA ligase**
6. Inserir o DNA-recombinante numa célula competente → **Transformação**
7. Selecionar as células com DNA modificado → **Seleção dos clones de interesse**
8. Sequenciamento do DNA → **Confirmação**

Clonagem molecular

→ PCR → **Tolera modificações pontuais nos primers**



Clonagem por inserção em um sítio de *EcoRI* em um vetor de clonagem.

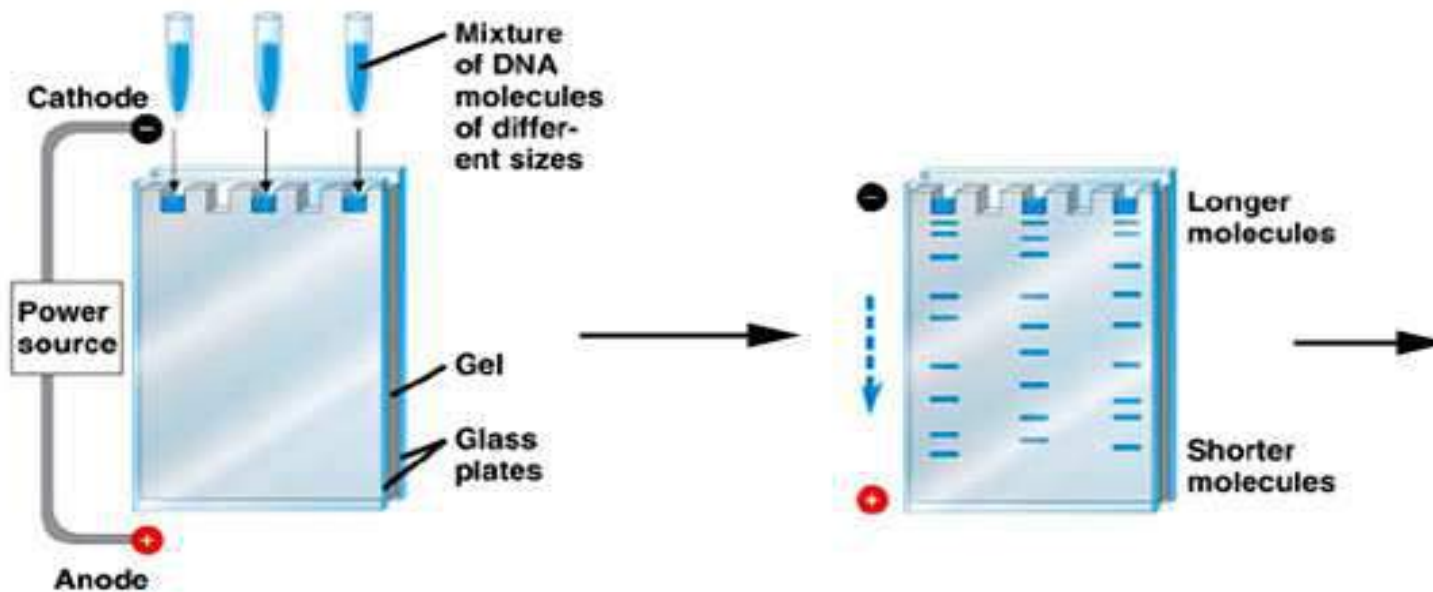
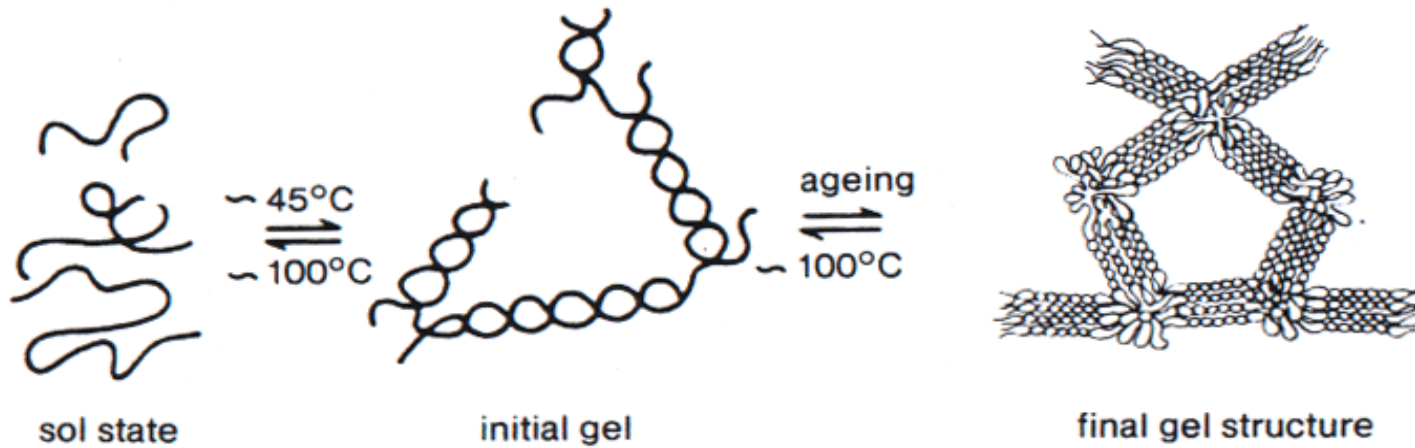


Eletroforese de DNA

Fase estacionária → Agarose

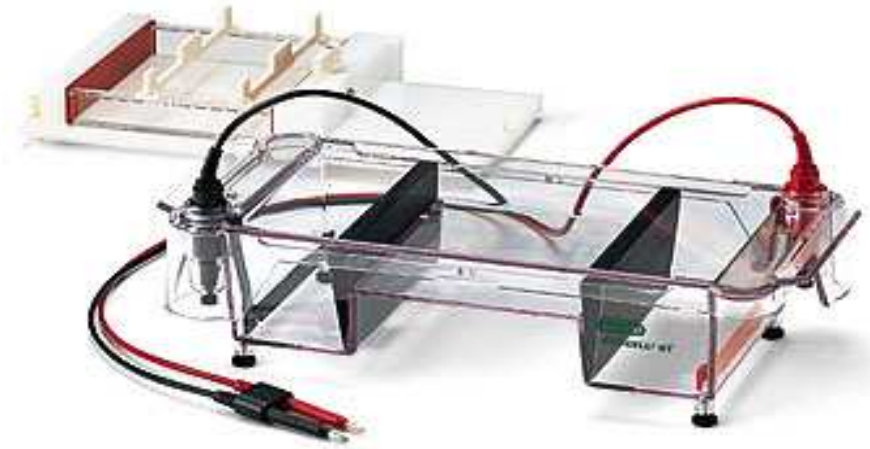
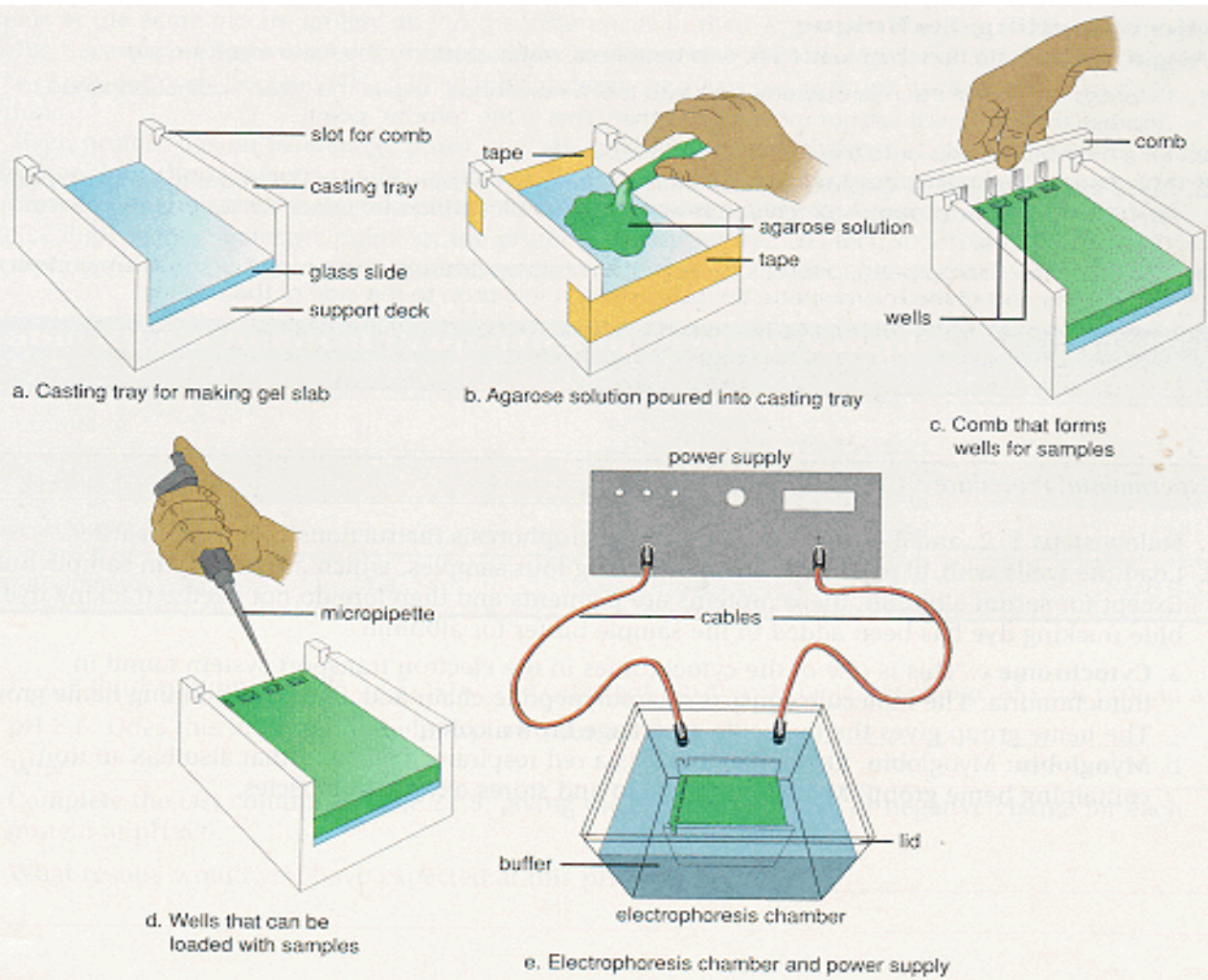
Grande aplicação em técnicas de Biologia Molecular

→ **Permite purificar fragmento de DNA de interesse para clonagem**



Eletroforese de DNA

Montagem do gel na cuba horizontal

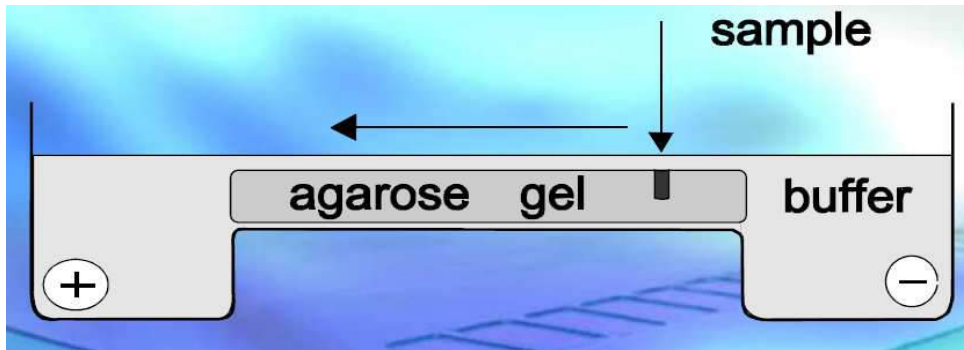


Eletroforese de DNA

Fase estacionária → Agarose

Eletroforese horizontal

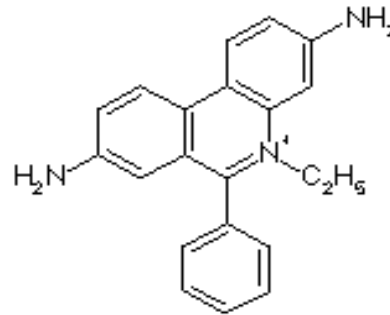
Permite quantificar a concentração de DNA numa amostra



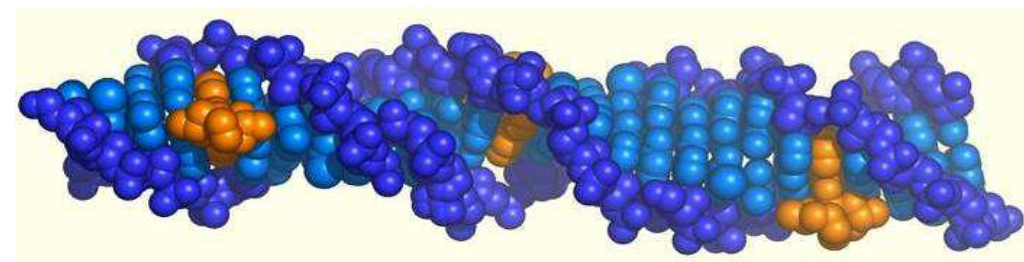
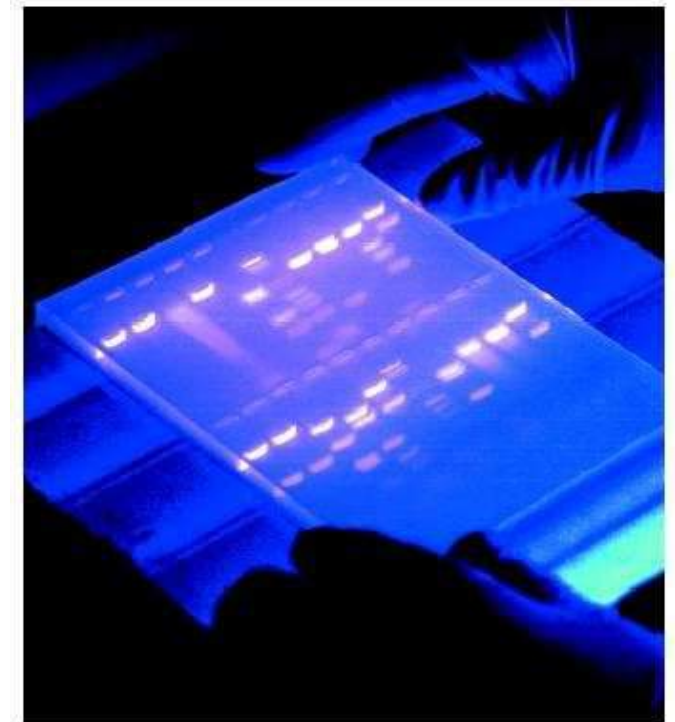
Sistema tampão contínuo

Excisão da banda de interesse do gel para posterior purificação

Incubação com brometo de Etídio



Exposição a luz UV

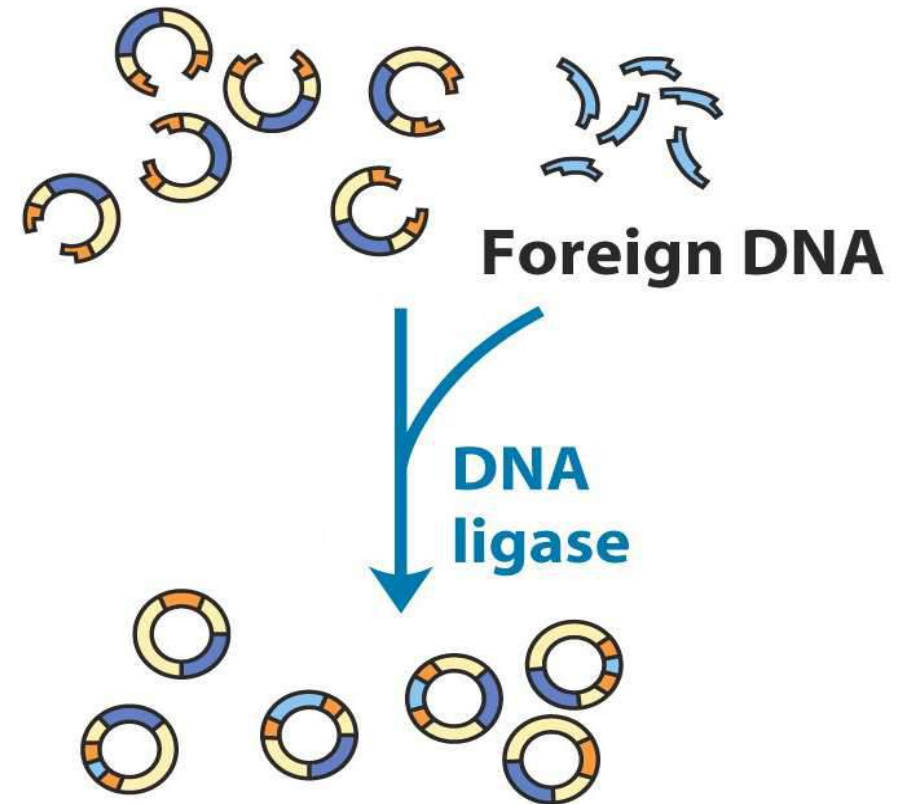
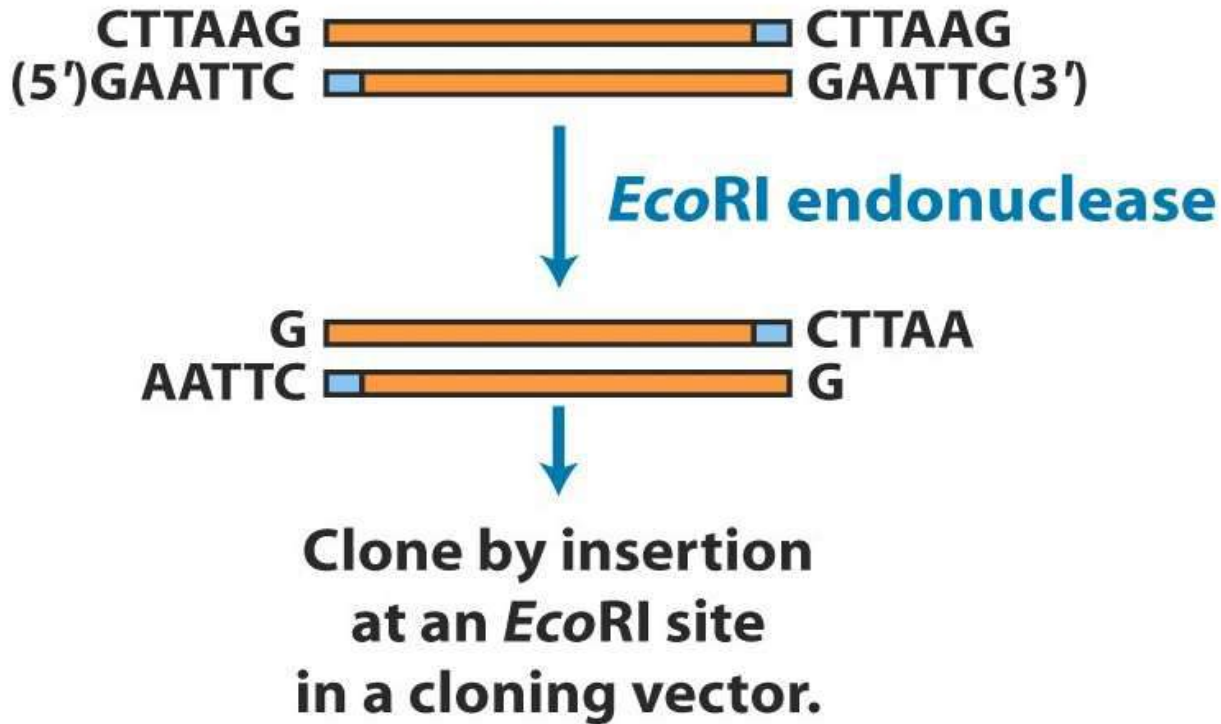


Clonagem Molecular

Estratégia geral

→ Clivar DNA e Vetor com as Endonucleases de Restrição adequadas

→ Ligar DNA e Vetor, digeridos com as Endonucleases de Restrição, com a DNA ligase



Clonagem Molecular

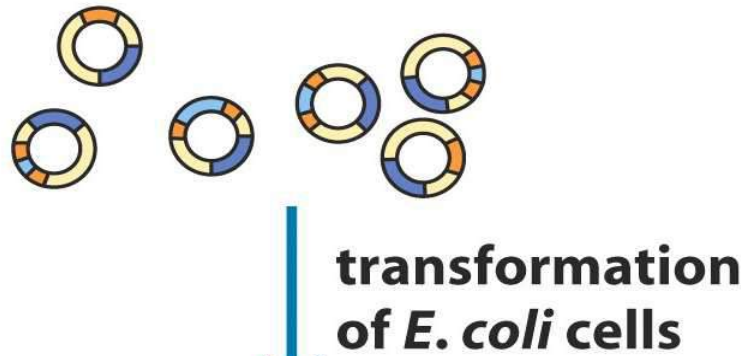
Transformação de células

→ Permite a introdução de DNA exógeno em células adequadas
- etapa crucial para a criação de um clone

- Eletroporação

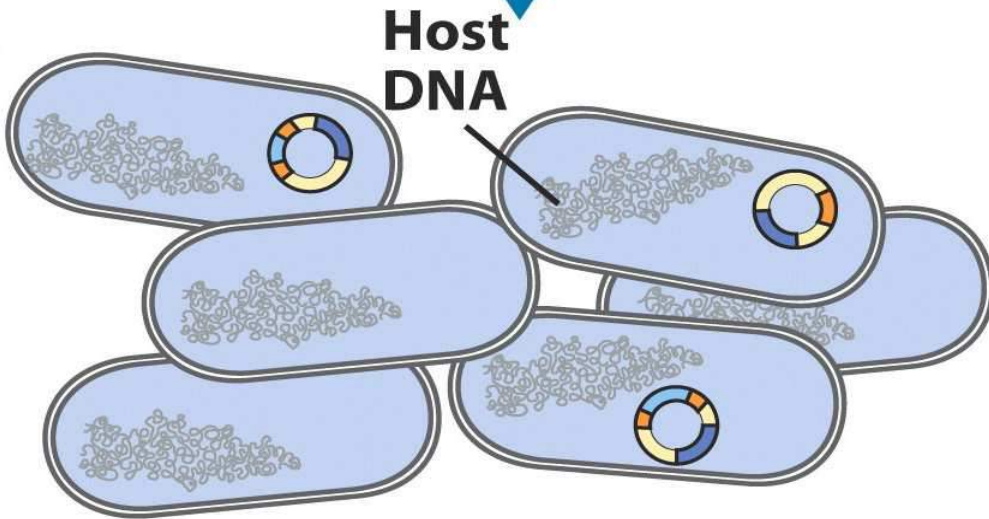
- Choque térmico

- Cálcio


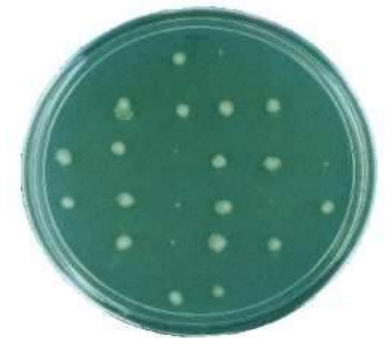


Seleção de clones transformantes

Usa-se meio seletivo no qual somente as células que contêm os plasmídios com a marca de seleção sobreviverão
Ex: Antibiótico



Plaqueamento
em meio seletivo

Agar containing
ampicillin +
tetracycline

Clonagem Molecular

Algumas estratégias de seleção

- Uso conjunto de diferentes estratégias

→ Marcador de seleção

- O vetor oferece à célula transformante alguma vantagem seletiva
- Seleção positiva → permite crescimento da célula transformada no meio
- Seleção negativa → mata a célula crescimento da transformada no meio

→ Marcador de triagem

- Célula transformada positivamente muda de cor ou fluoresce

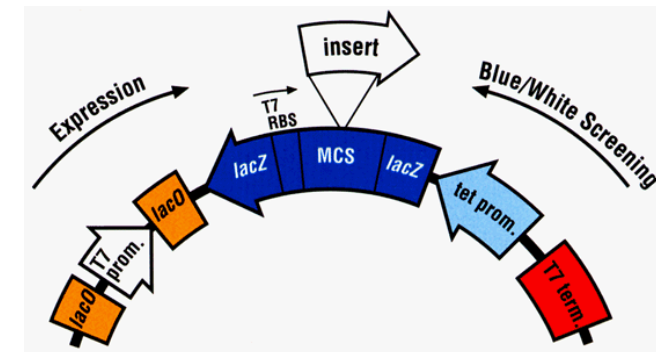
→ PCR de colônia

- Averiguação se a colônia transformante que cresceu no meio contendo o marcador de seleção apresenta o DNA alvo

→ Análise com Enzimas de restrição

- O vetor selecionado deve liberar o inserto do tamanho esperado

→ Confirmação por sequenciamento do inserto de DNA



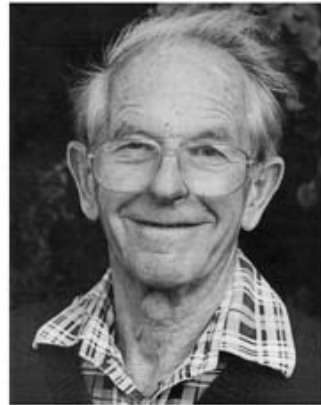
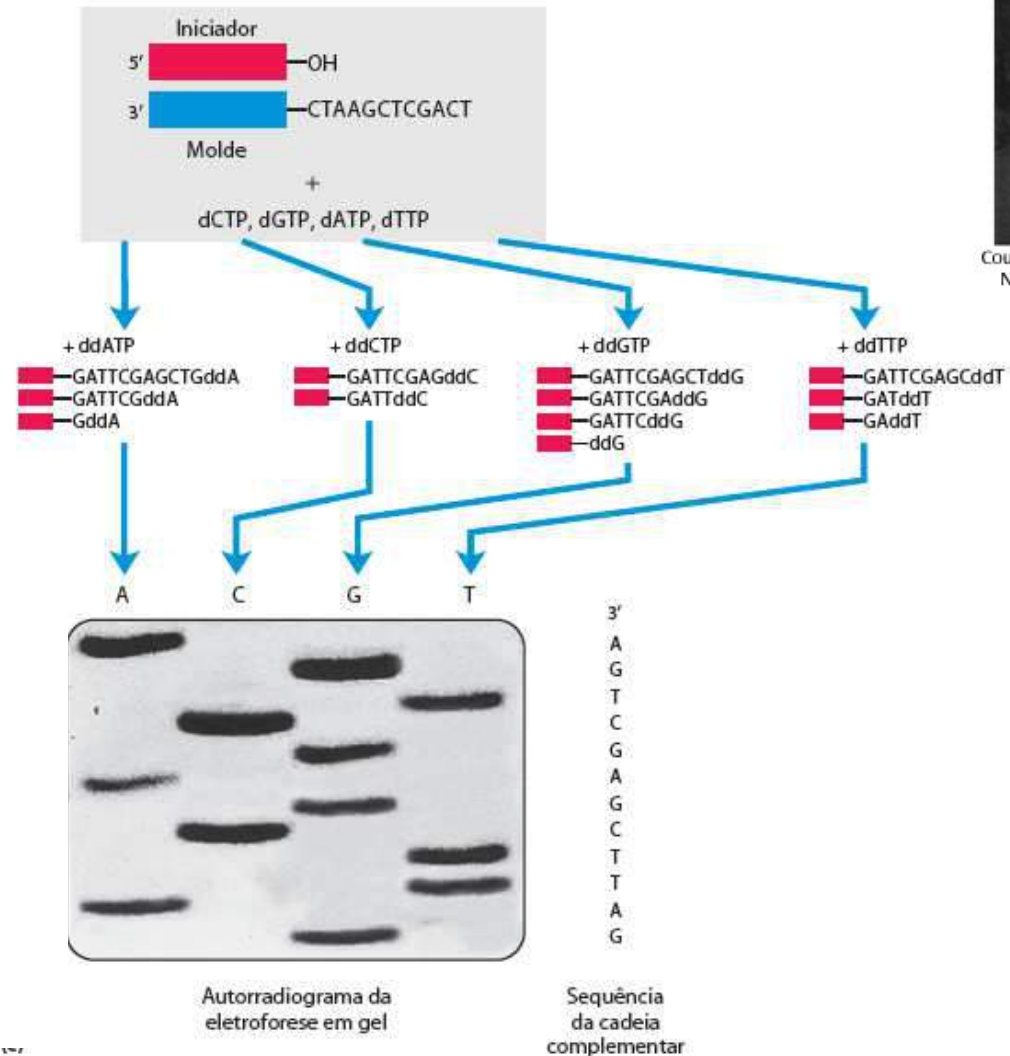
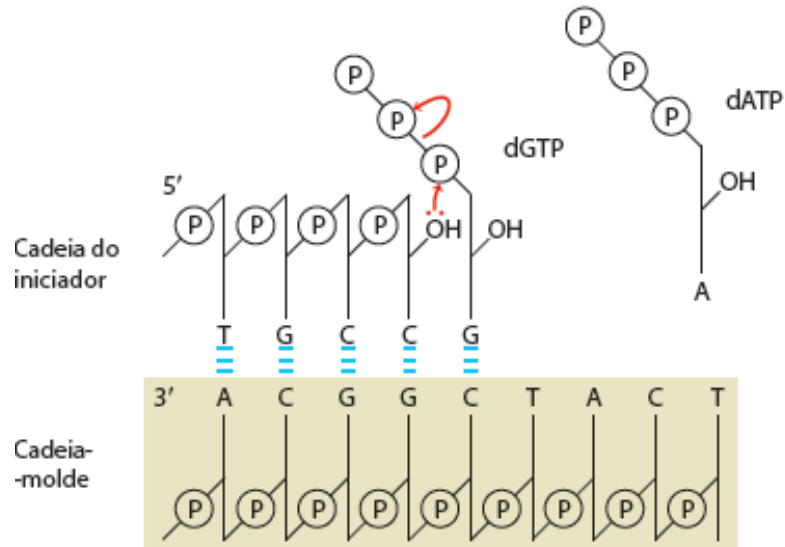
Sequenciamento de DNA

→ Derivação indireta da função de proteínas → rápido e confiável

→ Método de Dideóxi-Ribonucleotídeos

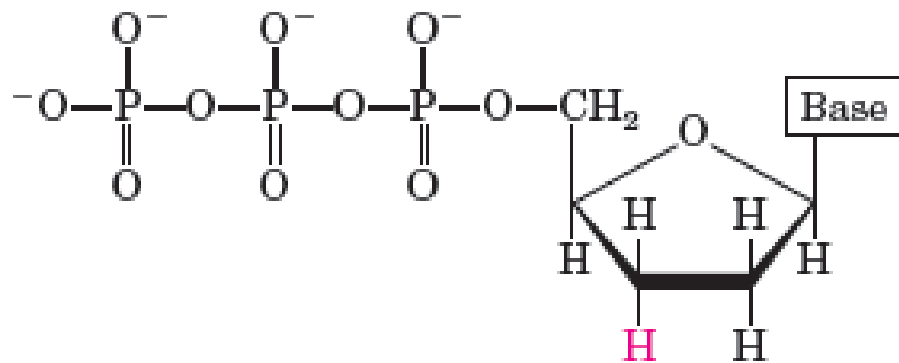
- “Envenenamento” da reação de PCR

- usa-se 1 único primer



Courtesy of Dr. F. Sanger, MRC, Cambridge. Noncommercial, educational use only.

Frederick Sanger
Nobel Prize winner
Chemistry
(1958 e 1980)



Análogo ddNTP

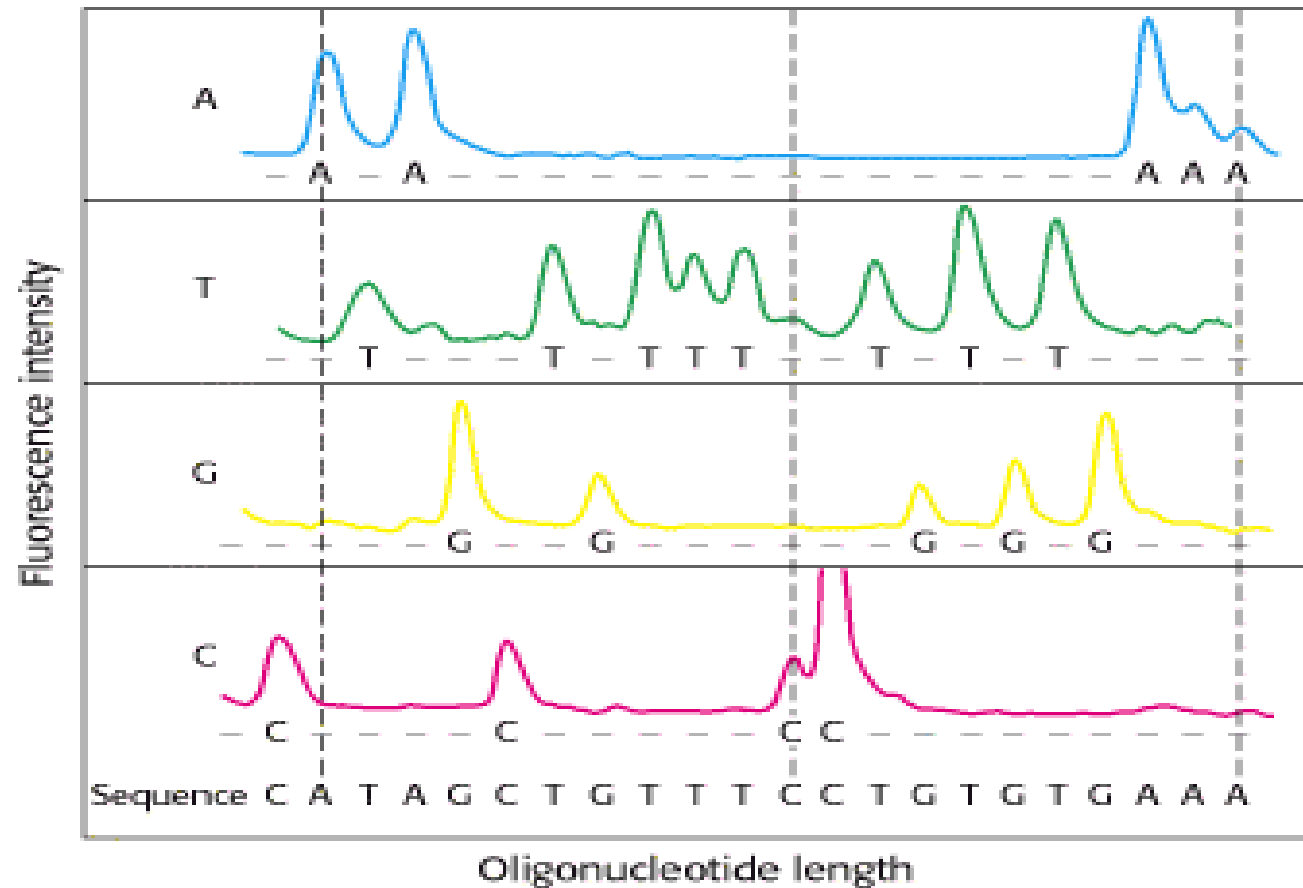
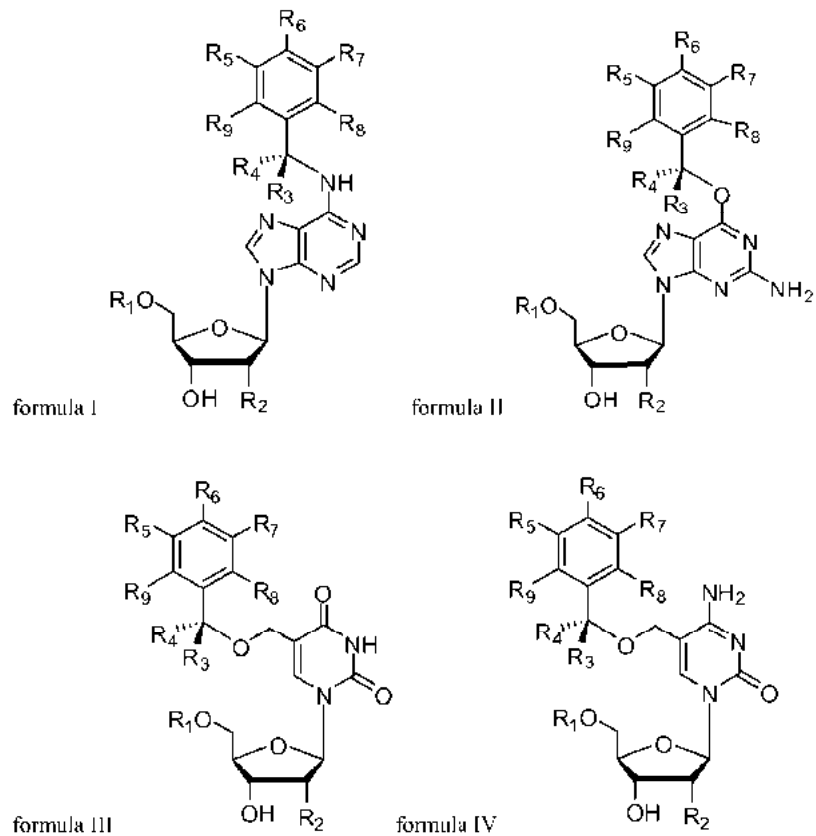
Sequenciamento de DNA

→ Método de dideoxi-ribonucleotídeos

Envenenamento da reação de PCR

→ **Fluorescência** – Necessita de um fluoróforo ligado à molécula

→ **Fluoriceínas** ligadas aos diferentes ddNTP

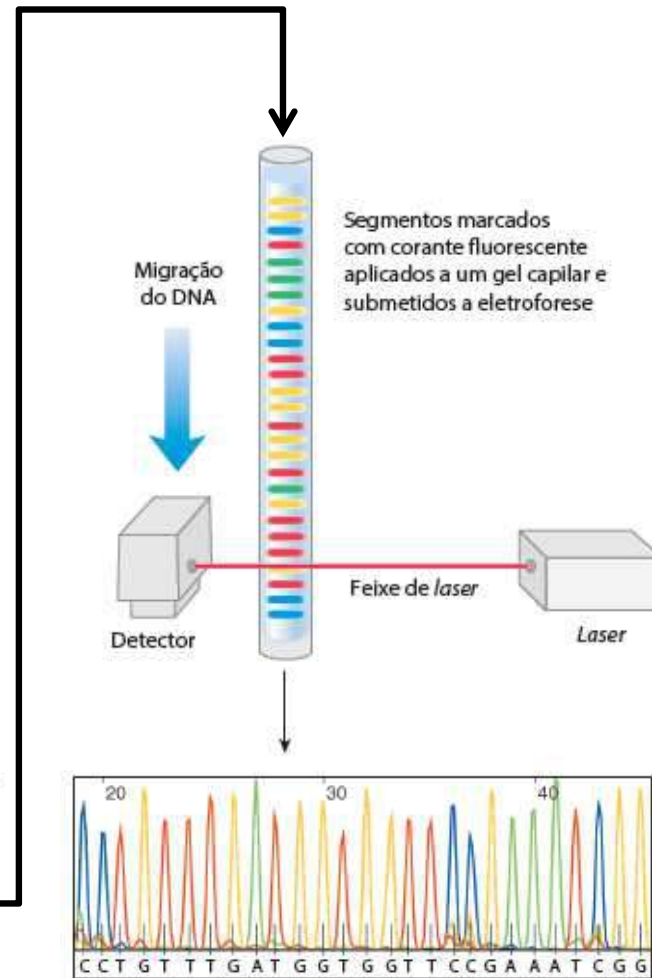
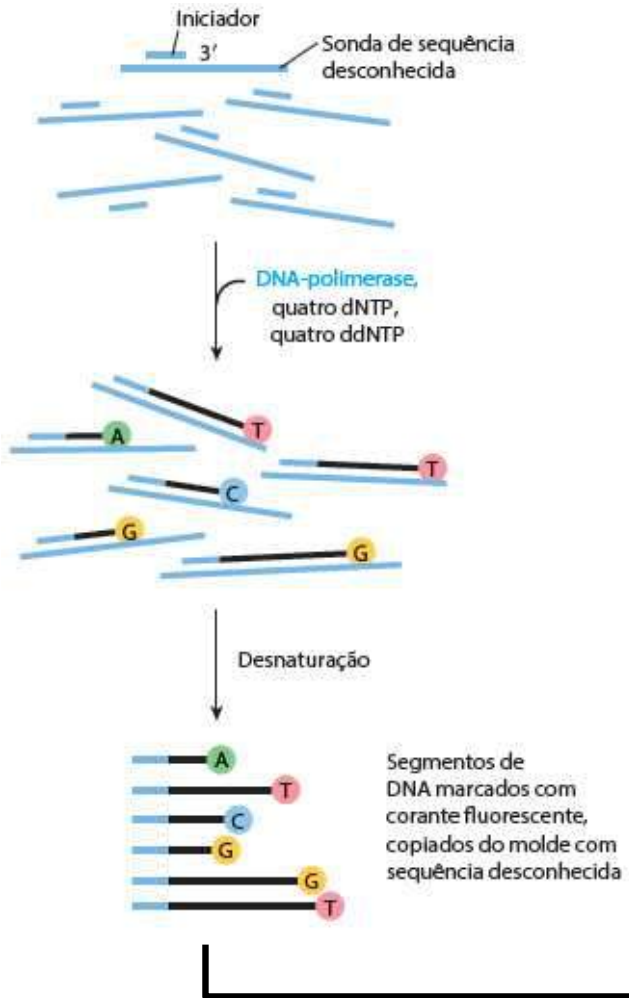


Sequenciamento de DNA

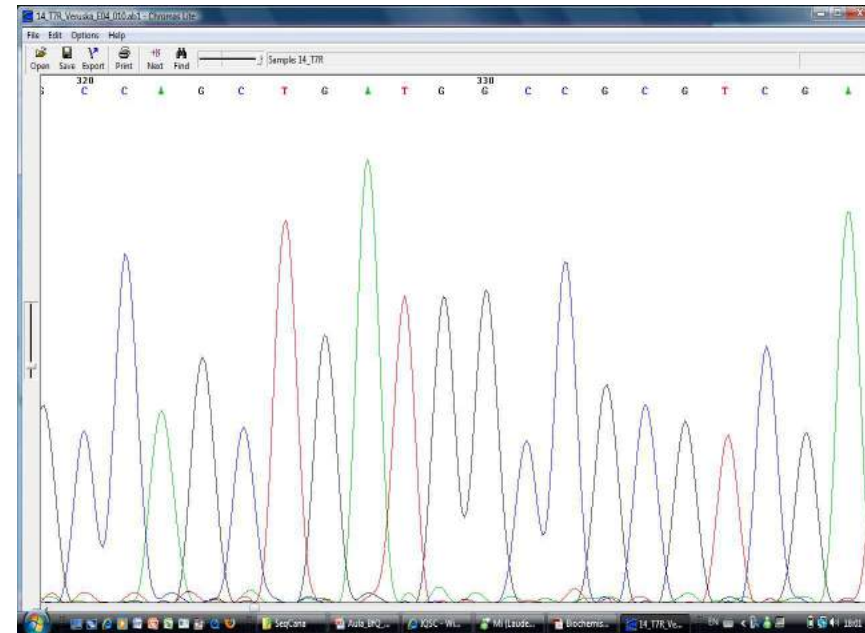
→ Método de Dideoxi-ribonucleotídeos

→ Fluoriceínas específicas ligadas aos diferentes ddNTP que emitem luz em λ diferentes

→ Separação por eletroforese capilar



Resultado gerado por computador após a passagem das bandas pelo detector

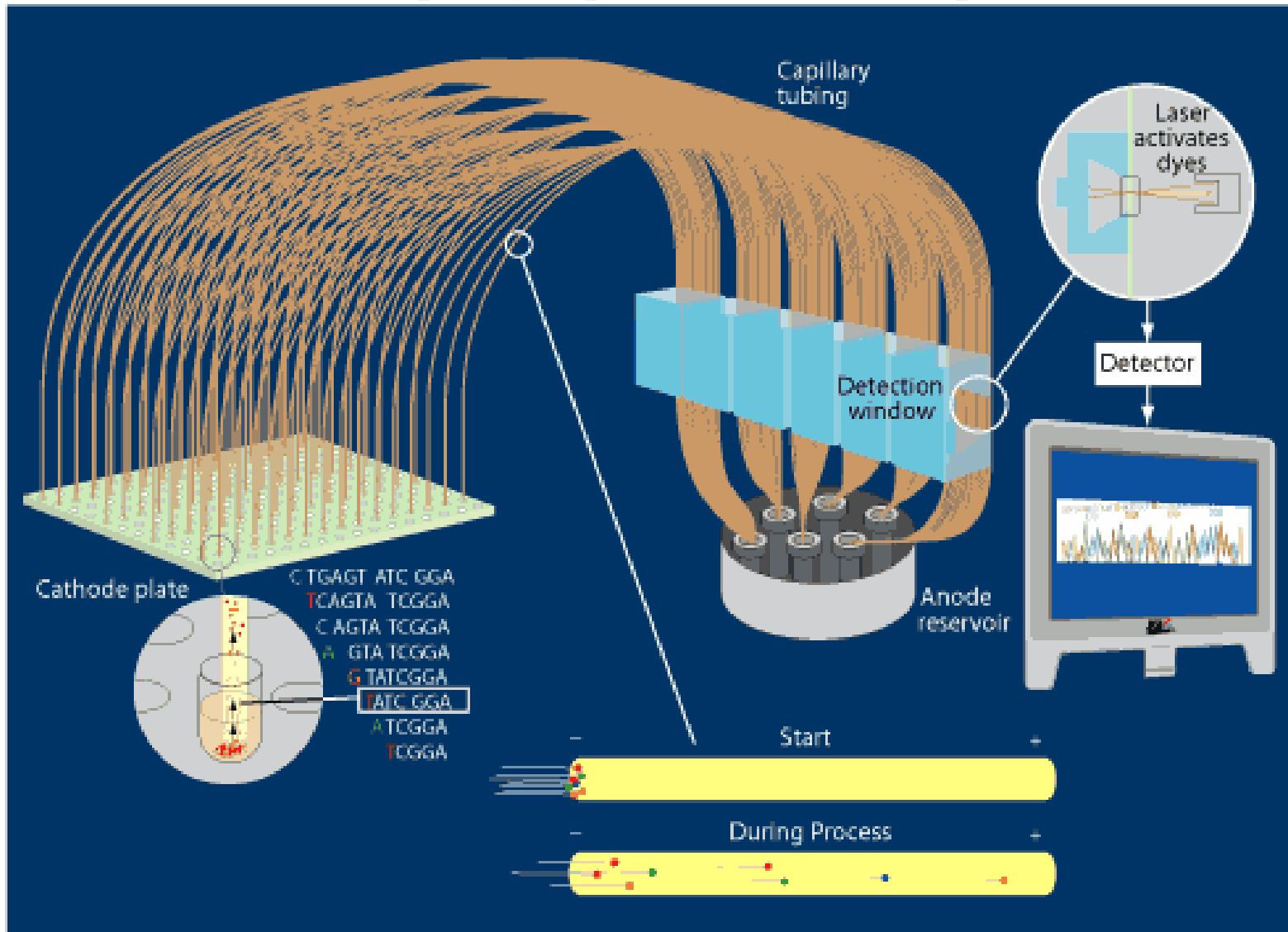


Sequenciamento de DNA

→ Método de Dideoxi-ribonucleotídeos

→ Fluoriceínas específicas ligadas aos diferentes ddNTP que emitem luz em λ diferentes

→ Separação por eletroforese capilar



Sequenciamento de DNA

→ Método de Dideoxi-ribonucleotídeos → Sanger

→ Sequenciamento *shotgun*

- Permite o sequenciamento de grandes fragmentos de DNA

- Genomas

→ Envolve ciclos de:

- Fragmentação aleatória;

- Clonagem dos fragmentos;

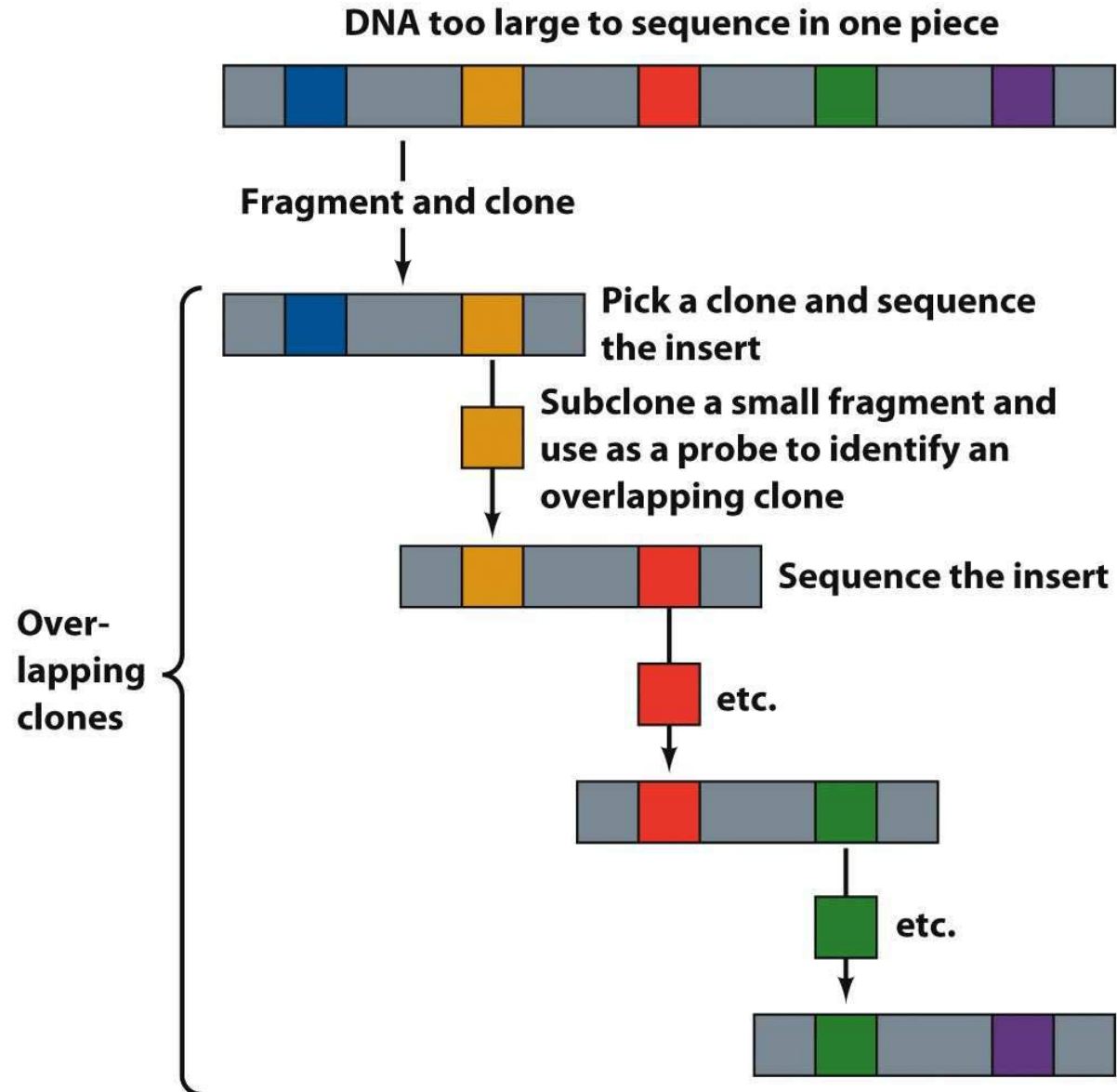
- Separação dos clones, nova

fragmentação e clonagem, se necessário;

- Sequenciamento dos clones gerados

99% de cobertura com 15 x de

redundância.



Sequenciamento de DNA

→ Pirosequenciamento de última geração: “nextgen”

Custo do sequenciamento genômico

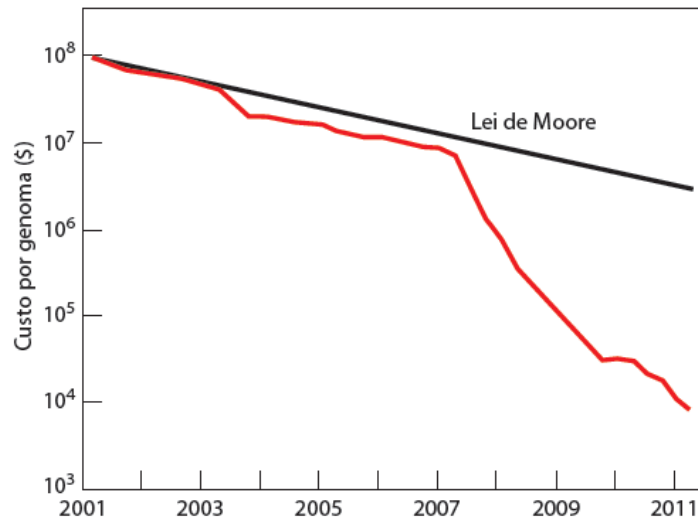
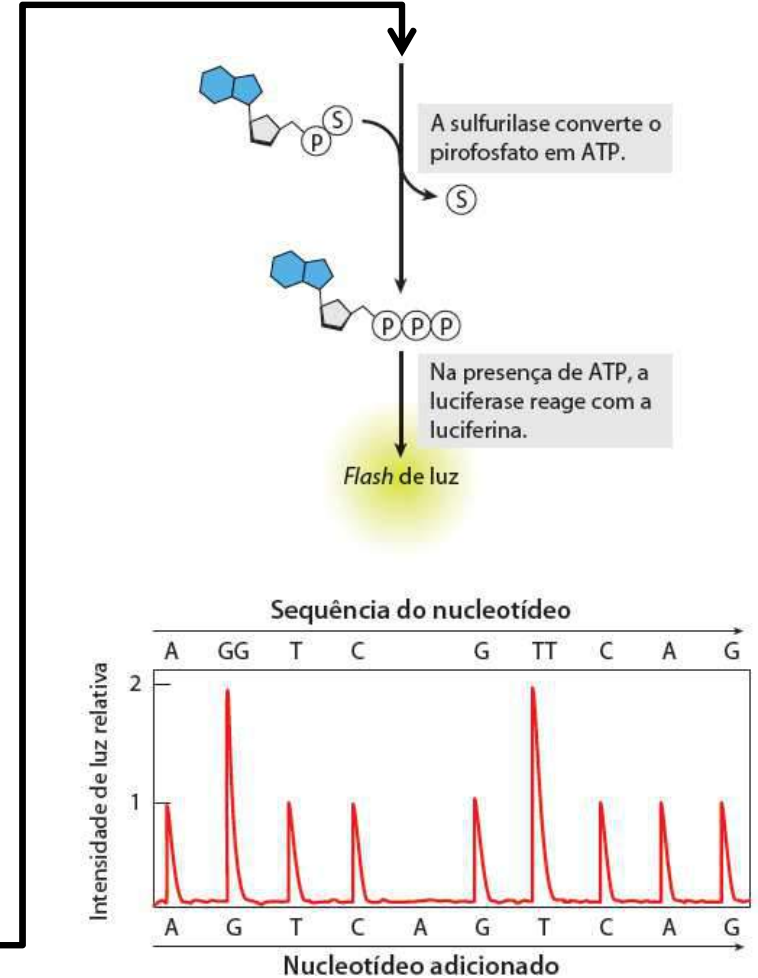
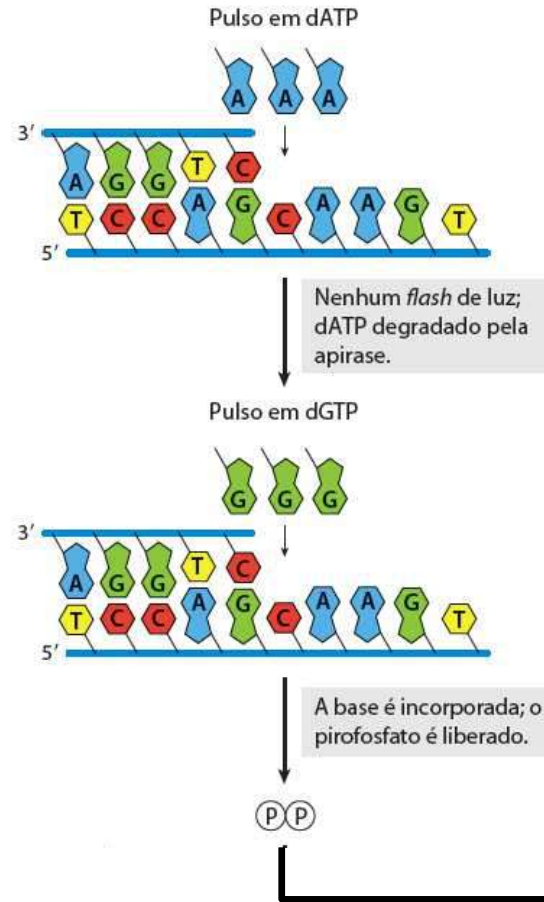


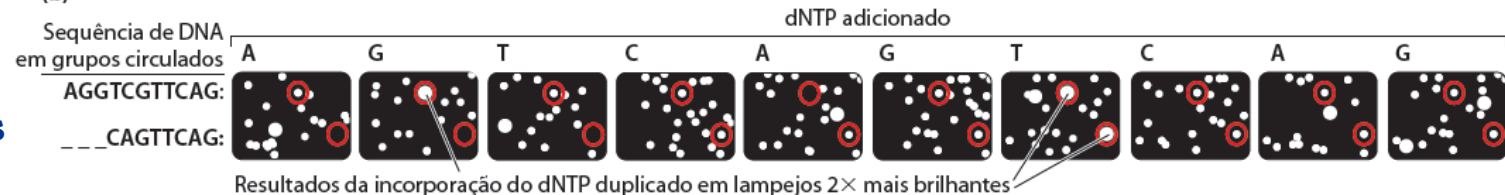
FIGURA Q-1 Desde janeiro de 2008, o custo do sequenciamento do genoma humano tem diminuído mais rápido do que o declínio projetado no custo do processamento de dados pelo computador (Lei de Moore).

- Sequenciamento *shotgun*
- Fragmentos acoplados a adaptadores de DNA e beads
- Diluição em nanopços
- PCR com primers específicos nos nanopços para enriquecimento dos fragmentos
- Pirosequenciamento por PCR nos nanopços

(a)



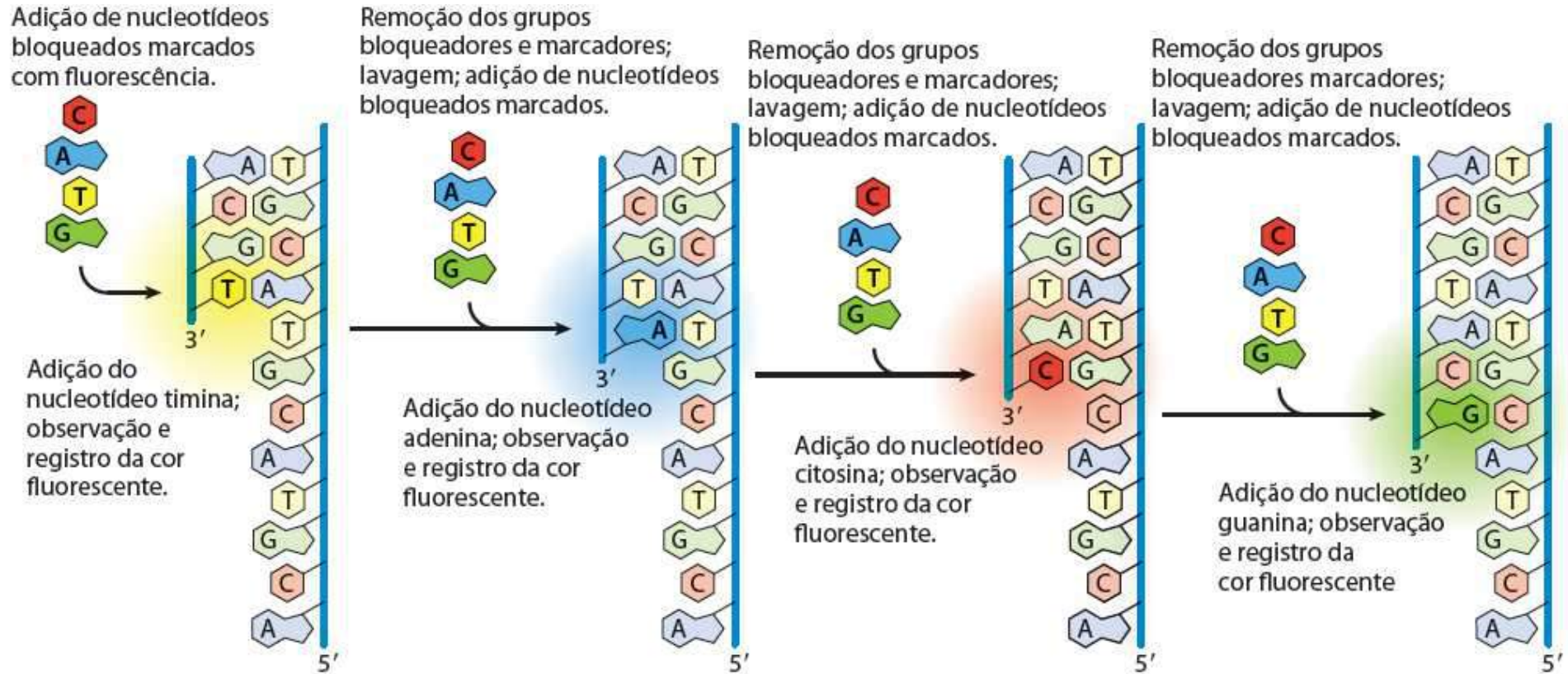
(b)



Sequenciamento de DNA

→ Sequenciamento de terminação reversível da cadeia de última geração: “nextgen”

→ **Ciclo de adição, identificação, desproteção, lavagem**



(b) dNTP incorporado

TACGGTCTC:

CCCCCAGT:



Sequenciamento de DNA

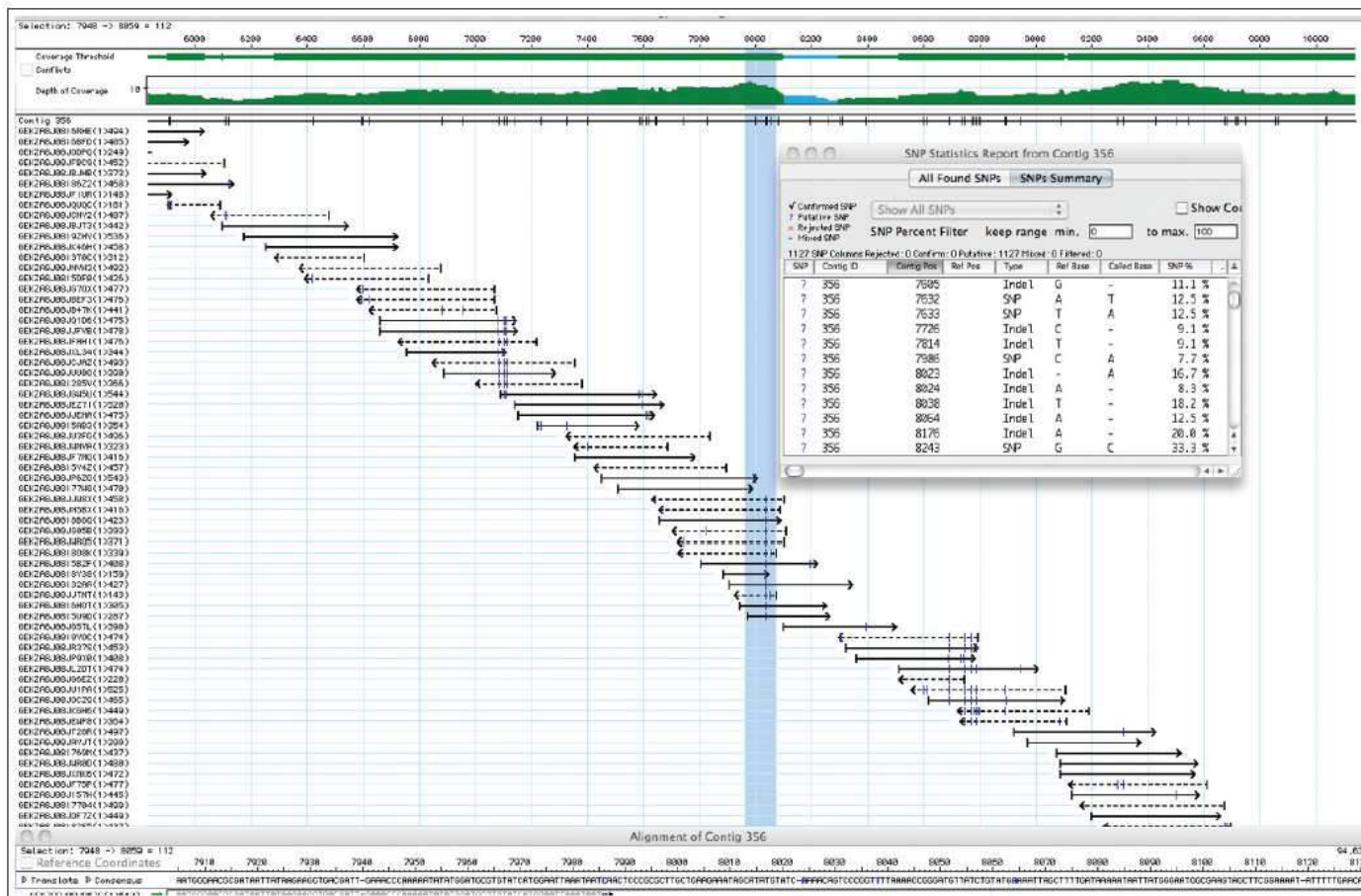
→ Seja qual for a estratégia de sequenciamento → grande custo computacional

- Sequenciamento shotgun → fragmentação aleatória

- Genoma é remontado por sobreposição das sequências obtidas → “contigs”

- É preciso sequenciar o mesmo genoma 10-15 vezes para ter 99% de cobertura

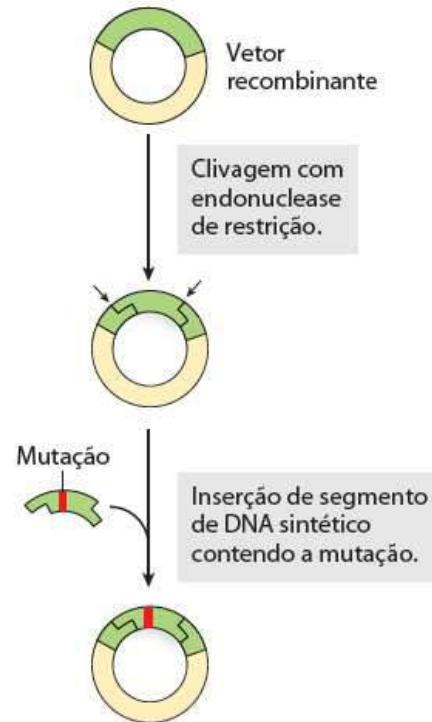
- Há regiões com muitas repetições → requerem estratégia especial para sequenciamento



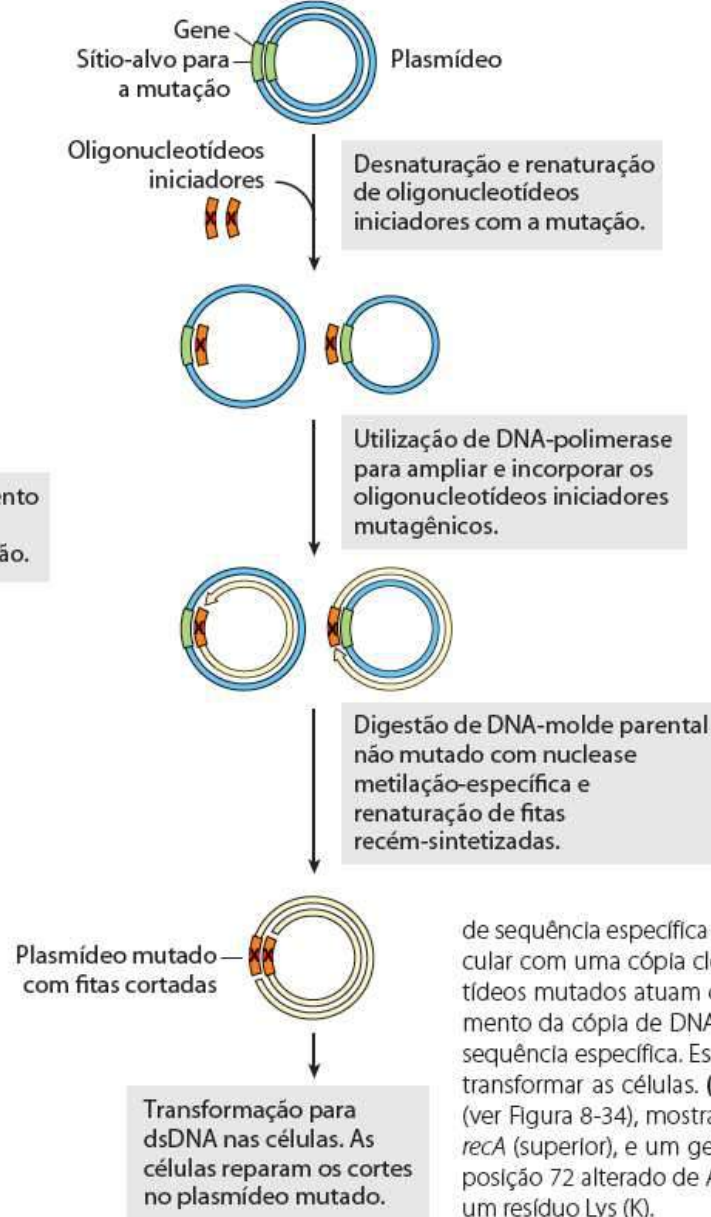
Mutação sítio dirigidas

Proteínas “mutantes” podem ser construídas utilizando a clonagem molecular e PCR

(a) Mutagênese sítio-direcionada



(b) Mutagênese oligonucleotídeo-direcionada



(c)

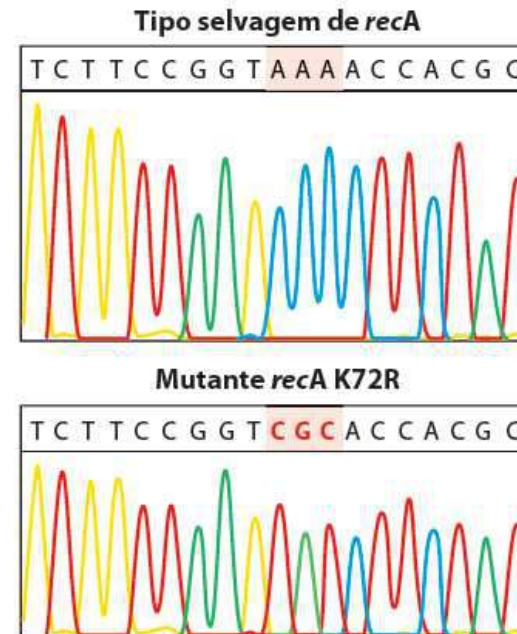


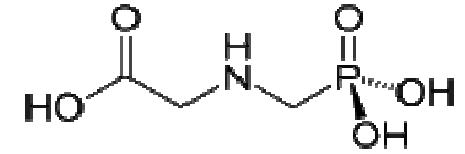
FIGURA 9-10 Duas abordagens para a mutagênese sítio-direcionada. (a) Um segmento sintético de DNA substitui um fragmento removido por uma endonuclease de restrição. (b) Um par de oligonucleotídeos sintéticos e complementares com uma mudança

de sequência específica em uma posição é hibridizado a um plasmídeo circular com uma cópia clonada do gene que será alterado. Os oligonucleotídeos mutados atuam como iniciadores para a síntese de todo o comprimento da cópia de DNA duplex do plasmídeo que contém a mudança de sequência específica. Essas cópias de plasmídeos são então utilizadas para transformar as células. (c) Resultados de um sequenciador automatizado (ver Figura 8-34), mostrando as sequências de um tipo selvagem de gene *recA* (superior), e um gene *recA* alterado (inferior) com o triplo (códon) na posição 72 alterado de AAA para CGC, especificando um Arg (R) em vez de um resíduo Lys (K).

Soja sem herbicida

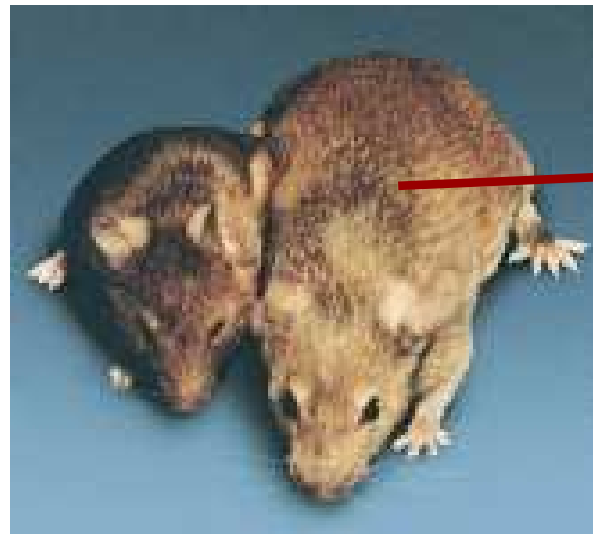


Soja Transgênica + Glifosato



Glifosato
Inibidor da
EPSP Sintase
- Via do ácido
chiquímico

Planta
transgênica
super-
expressando a
luciferase



Rato transgênico
superexpressando o
hormônio de
crescimento
humano

Produção da Proteína de Interesse

- A síntese da proteína de interesse é feita pelo OGMs.

→ Proteína alvo pode ser extraída e purificada para uso posterior.

Proteína produzida é comumente chamada de *Proteína recombinante*.

A Proteína recombinante pura poderá ser estudada por um conjunto de Técnicas Bioquímicas, Biofísicas e de Biologia Molecular

- **Dicroísmo Circular → Estrutura secundária**

- **Fluorescência intrínseca de triptofano → Estrutura Terciária**

- **Ultracentrifugação analítica → Determinar MM e estados associativos**

- **Calorimetria → estabilidade e interação com ligantes**

- **Espalhamento de raios X a baixo ângulo → Tamanho e forma da proteína**

- **Cristalografia de proteínas → Determinar a estrutura da proteína em nível molecular**

- **Ressonância Magnética Nuclear de proteínas → Estrutura Tridimensional**