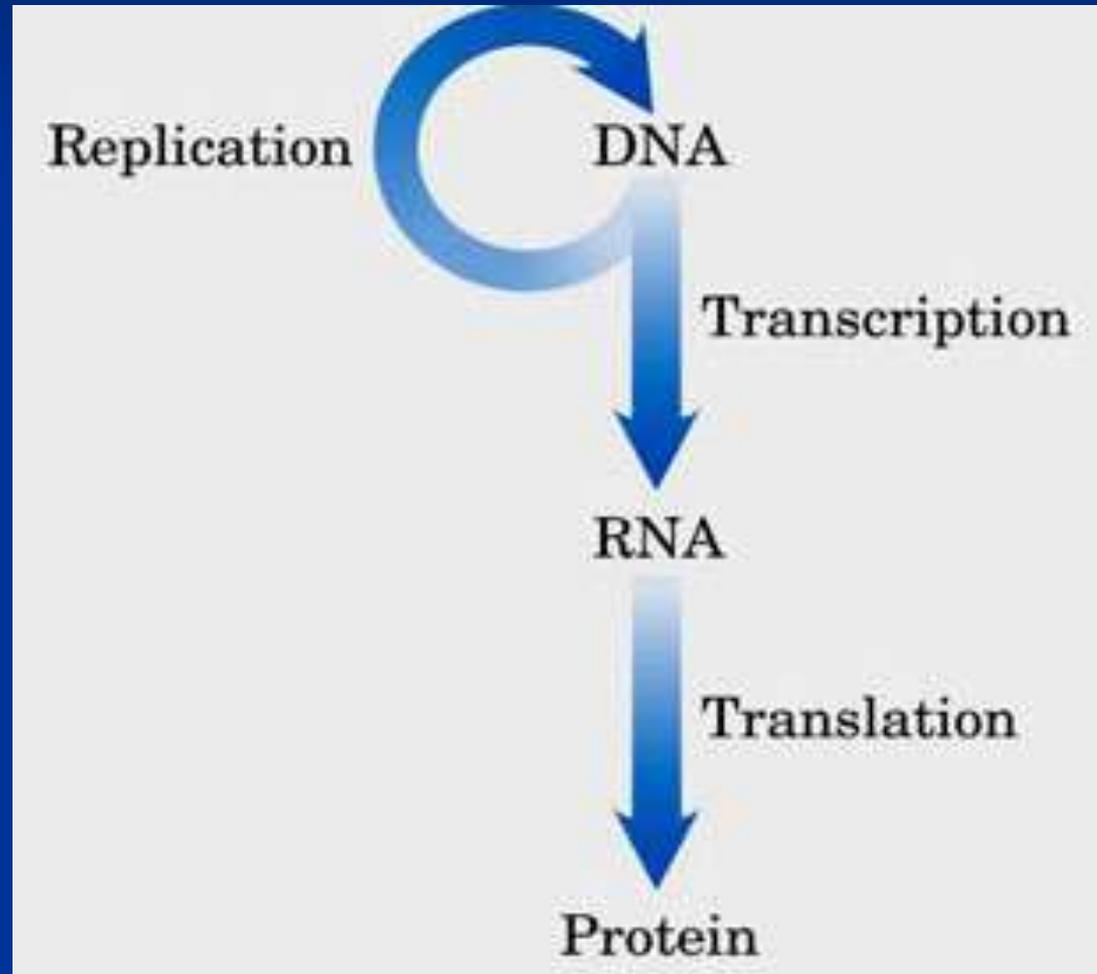


Tecnologia do DNA recombinante

Histórico

- Em 1953 James Watson e Francis Crick, descreveram o DNA como uma dupla fita, enrolada em hélice ao redor de um eixo, sendo as fitas antiparalelas.
- Elucidação do código genético

O Dogma Central da Biologia Molecular



Tecnologia de DNA recombinante

- Ferramentas para o estudo da genética de qualquer organismo
- Isolamento, clonagem expressão genes de diferentes organismos.
- Como consequência :
 - O estudo de cada gene individualmente ou em genomas
 - A obtenção de proteínas recombinantes
 - Estudar a função dos genes

Clonagem Molecular

Fragmentos de DNA de interesse

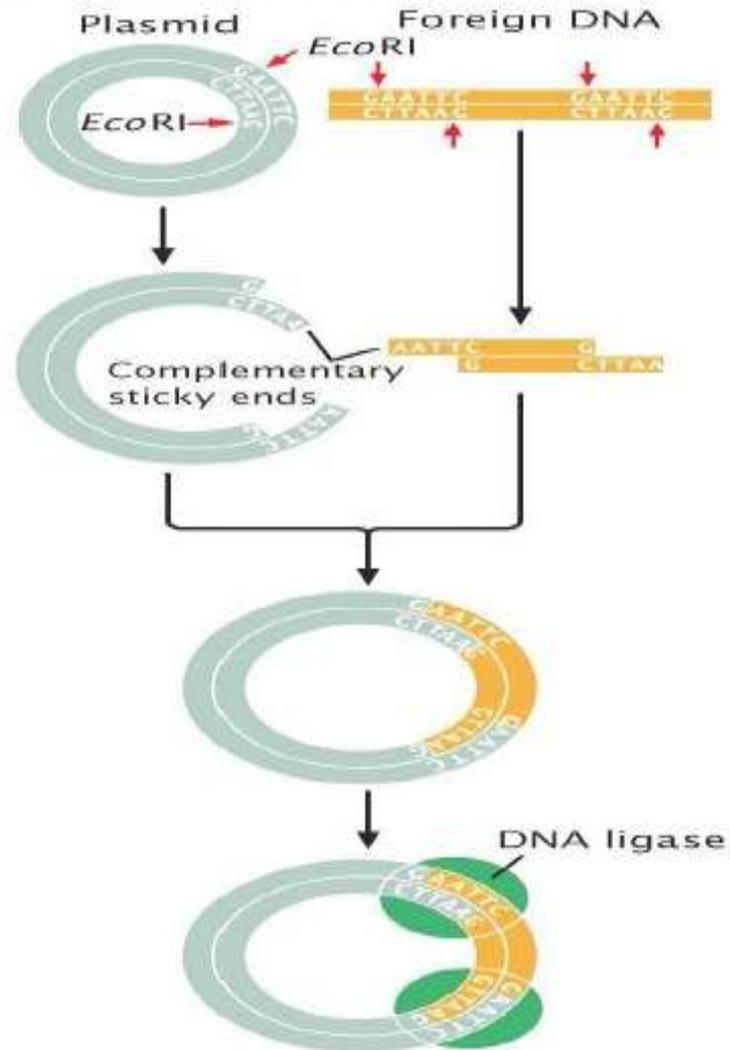
Vetores: Plasmídeos
Fagos
Cosmídeos
BACs/ YACs
Vírus

Hospedeiros:
E.coli
Levedura
Células vegetais
Células animais

Enzimas: Enzimas de restrição
DNA polimerases
DNA ligases
Topoisomerasas
Fosfatases

Construction of a recombinant DNA molecule

(a) Restriction cloning



ENZIMAS

Enzimas que quebram ligações
fosfodiester em RNA e DNA:

A. Endonucleases

1- Enzimas de restrição: tipo I, II e III

2- Deoxyribonucleases

3- Ribonucleases

B. Exonucleases

C. Endonucleases e Exonucleases

Enzimas que trabalham em fosfatos
terminais de DNA e RNA :

A. T4 polinucleotídeo Kinase

B. fosfatase alcalina

Enzimas que ligam DNA:

A. *E. coli* DNA Ligase

B. T4 DNA Ligase

C. T4 RNA Ligase

Enzimas que sintetizam novas ligações:

A. DNA polimerase I

B. Fragmento grande de DNA polimerase I

C. T4 DNA polimerase

D. T7 DNA polimerase modificada

E. *Taq* DNA polimerase

F. RNA polimerases

G. Transcriptase Reversa

H. Terminal Deoxinucleil Transferase

Enzimas que protegem o DNA:

A. DNA metilases

B. Proteínas de ligação a DNA simples fita

C. Topoisomerases

Histórico

- Isolamento de DNA polimerase de *E.coli* – Arthur Kornberg in 1958. Primeira ferramenta para manipulação do DNA *in vitro*
- Necessidade de entendimento detalhado da natureza do material genético sugiram as DNA polimerases, fosfatases, fosforilases e transferases

Histórico

- W. Arber, H. Smith e D. Nathans, premio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1978 - Descoberta das endonucleases de restrição. Que permitiu a dissecação de genomas em fragmentos com tamanhos possíveis de se manipular.

Classificação

- Enzimas que quebram ligações fosfodiéster em RNA e DNA
- Enzimas que ligam DNA
- Enzimas que sintetizam novas ligações
- Enzimas que trabalham em fosfatos terminais de DNA e RNA
- Enzimas que protegem o DNA

Enzimas que quebram ligações fosfodiester em RNA e DNA

A. Endonucleases

- 1- Enzimas de restrição: tipo I, II e III
- 2- Deoxyribonucleases
- 3- Ribonucleases

B. Exonucleases

C. Endonucleases e Exonucleases

Enzimas que quebram ligações fosfodiéster em DNA

A- Endonucleases

1- Enzimas de restrição: Enzimas que cortam o DNA em sequências específicas.

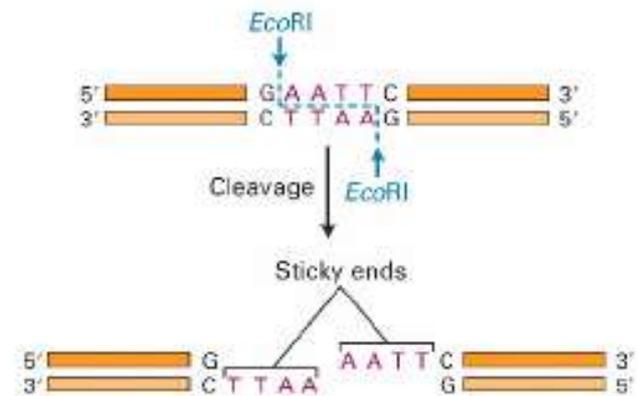
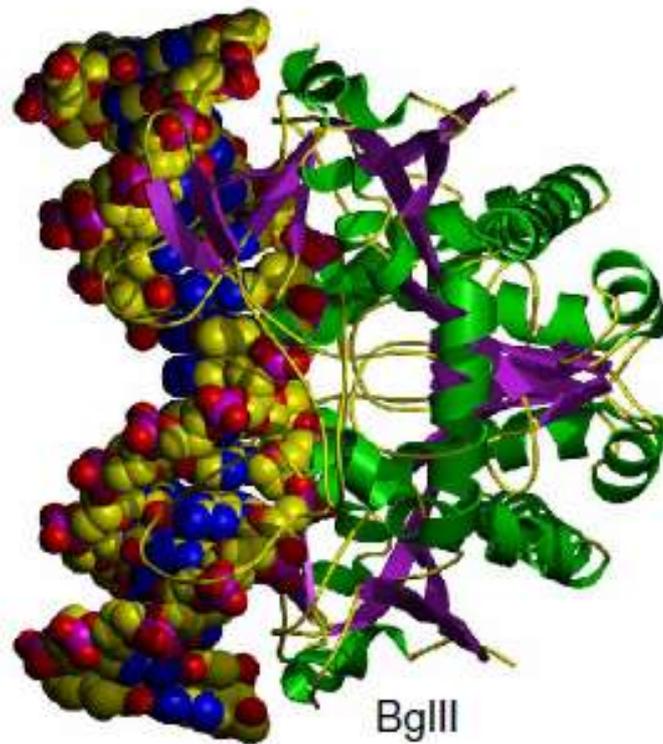
Descoberta das enzimas de restrição

- Pesquisadores descobriram o sistema de restrição/modificação em DNA de bacteriófagos
- Quando os fagos λ eram transferidos para células de *E.coli* foi observado um crescimento restrito
- Foi postulado que a presença de enzimas degradativas nas células hospedeiras destruíam o DNA do fago.

Sistema de modificação restrição

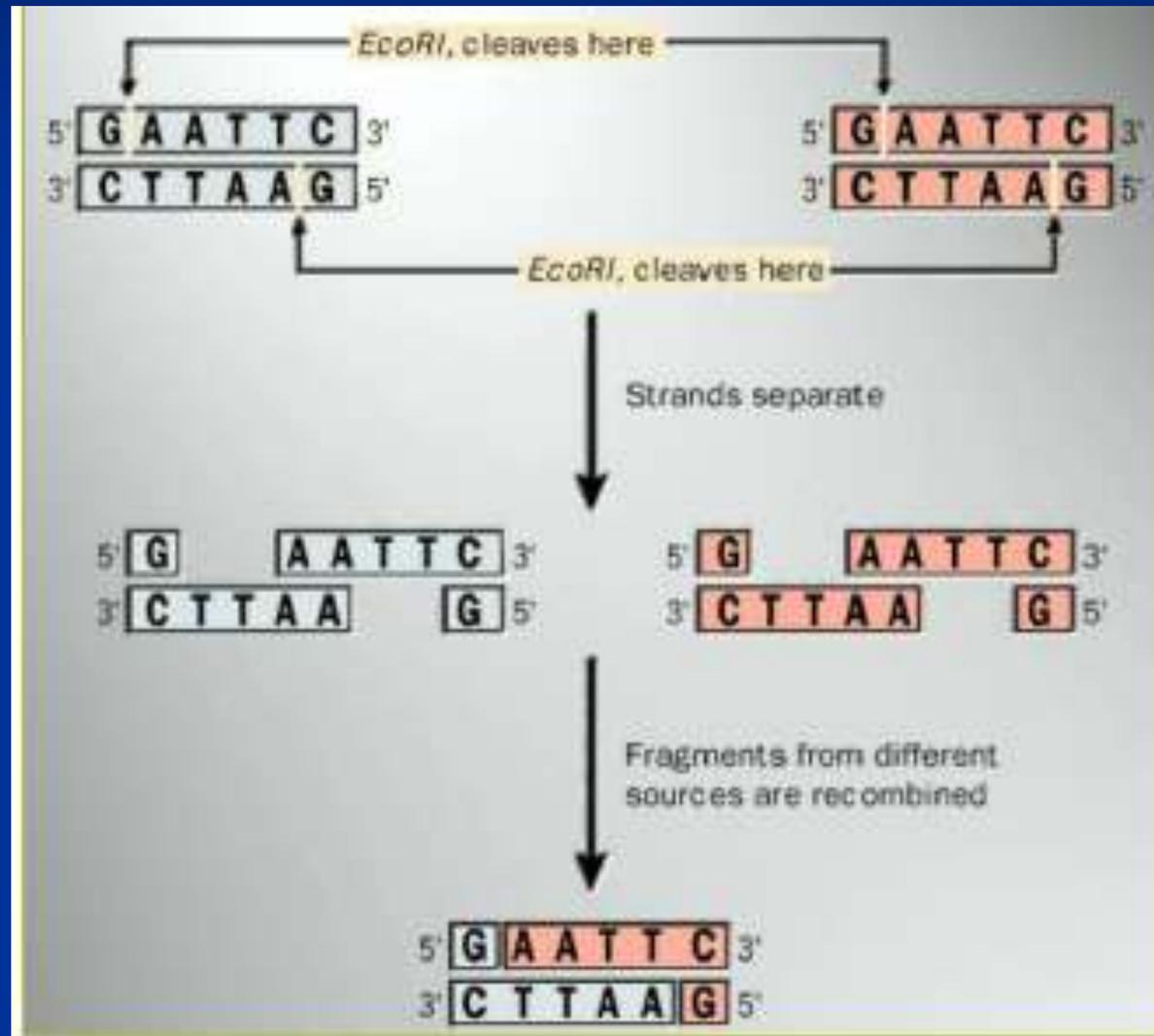
- Constitui um mecanismo de defesa das células contra a introdução de um DNA exógeno dentro da célula.
- Consiste em dois componentes:
 - **Endonuclease de restrição:** que reconhece uma curta sequência de DNA e cliva o DNA em uma sequência específica.
 - **Metilase:** adiciona grupo metil a uma C ou A dentro da mesma sequência de reconhecimento. Esta modificação faz com que o DNA do hospedeiro se torne resistente a degradação pela endonuclease de restrição

Enzimas de Restrição



Enzimas de restrição

O DNA é cortado com as enzimas de restrição que reconhecem pequenas seqüências específicas com 4 a 6 pares de bases.



Existem 3 classes de endonucleases de restrição

- Enzimas do tipo I
- Enzimas do tipo II
- Enzimas do tipo III

Sequências de reconhecimento das enzimas de restrição

Tipo I

EcoAI
EcoKI
StySPI

GAGNNNNNNNGTCA
AACNNNNNNGTGC
AACNNNNNNGTTC

Corte na mais de 1000 pb da sequência de reconhecimento que é bipartida e assimétrica

Tipo II

EcoRI
BalI
PstI

G/AATTC
TGG/CCA
CTGCA/G

Corte na, ou muito próximo da sequência de reconhecimento que é **PALINDRÓMICA** e de 4 a 8 pb

Tipo III

EcoP151
EcoPI
HinfIII

CAGCAG
AGACC
CGAAT

Corte a 24-26 pb a jusante da sequência de reconhecimento que é assimétrica e de 5 a 7 pb

Locais de corte, se^quências de reconhecimento, locais de restrição

N- A, C, G ou T; R- G ou A

Sistemas de modificação/restrição:

Enzimas do tipo I:

São grandes multissubunidades polipeptídicas (> 400.000 Da; 3 sub unidades) que possuem atividade de restrição (endonuclease) e atividade de modificação (metilase)

Enzimas do tipo III:

Composta por 2 subunidades (250.000 Da)

Esta clivagem ocorre 10-25 nucleotídeos da sequência de reconhecimento específica e há degeneração de várias bases na terminação dos fragmentos gerados

Sistemas de modificação/restrrição:

Enzimas do tipo II:

Smith e colaboradores da escola de medicina da universidade de John Hopkins isolaram a primeira enzima de restrição do tipo II de *Haemophilus influenzae* Rd (Smith and Wicox, 1970).

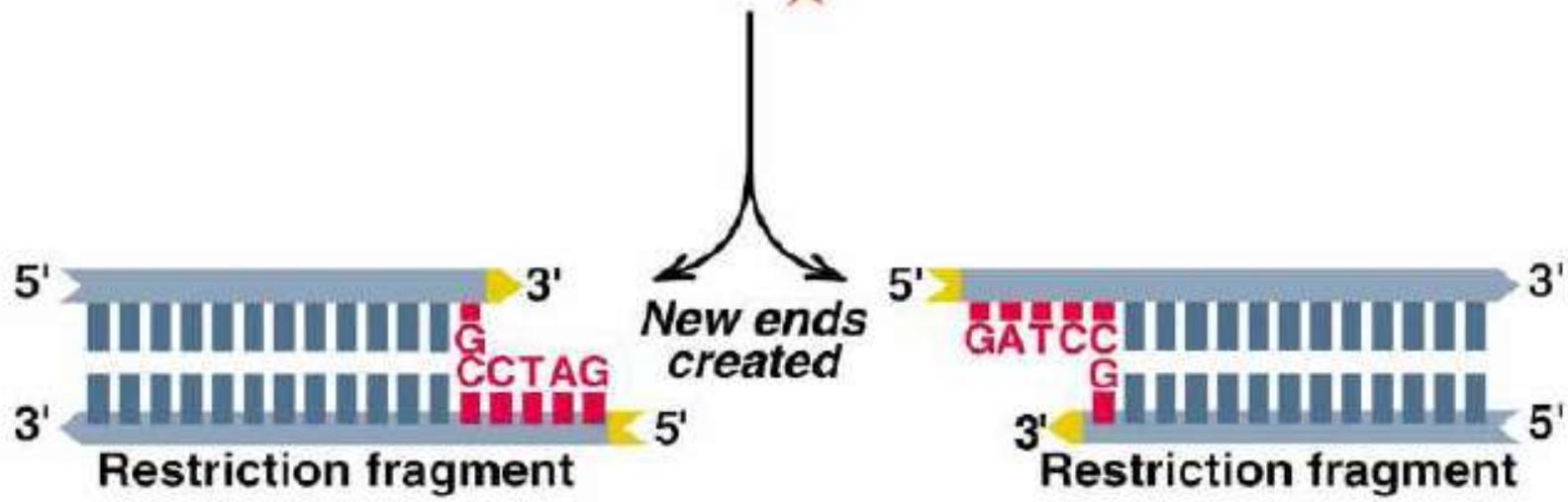
Tem a propriedade de clivar o DNA produzindo fragmentos de vários tamanhos, todos com terminação idêntica.

Enzimas do tipo II

Seu substrato natural é o DNA dupla fita que possui alto grau de simetria, lendo a mesma informação na direção $5' \rightarrow 3'$ ao longo da fita de cima e de baixo na mesma direção. Tais seqüências são chamadas de **Palíndromos**

Palíndromos são seqüências de DNA com simetria inversa, como por exemplo, a seqüência de nucleótídeos da cadeia I lida da esquerda para a direita ($5'$ para $3'$) é a mesma da cadeia II lida da direita para a esquerda (igualmente $5'$ para $3'$)

*Bam*H1 restriction site, GGATCC



Os palíndromos reconhecidos pelas enzimas de restrição têm 4 ou 6 pares de bases

Tais seqüência possuem dois lados de simetria e as seqüências de reconhecimento palindrômicas são os substratos para as enzimas de restrição do tipo II.

PALINDROMOS

5' - RADAR - 3'



5' - MADAM - 3'



Eco R I

5' - GAA TTC - 3'



3' - CTT AAG - 5'



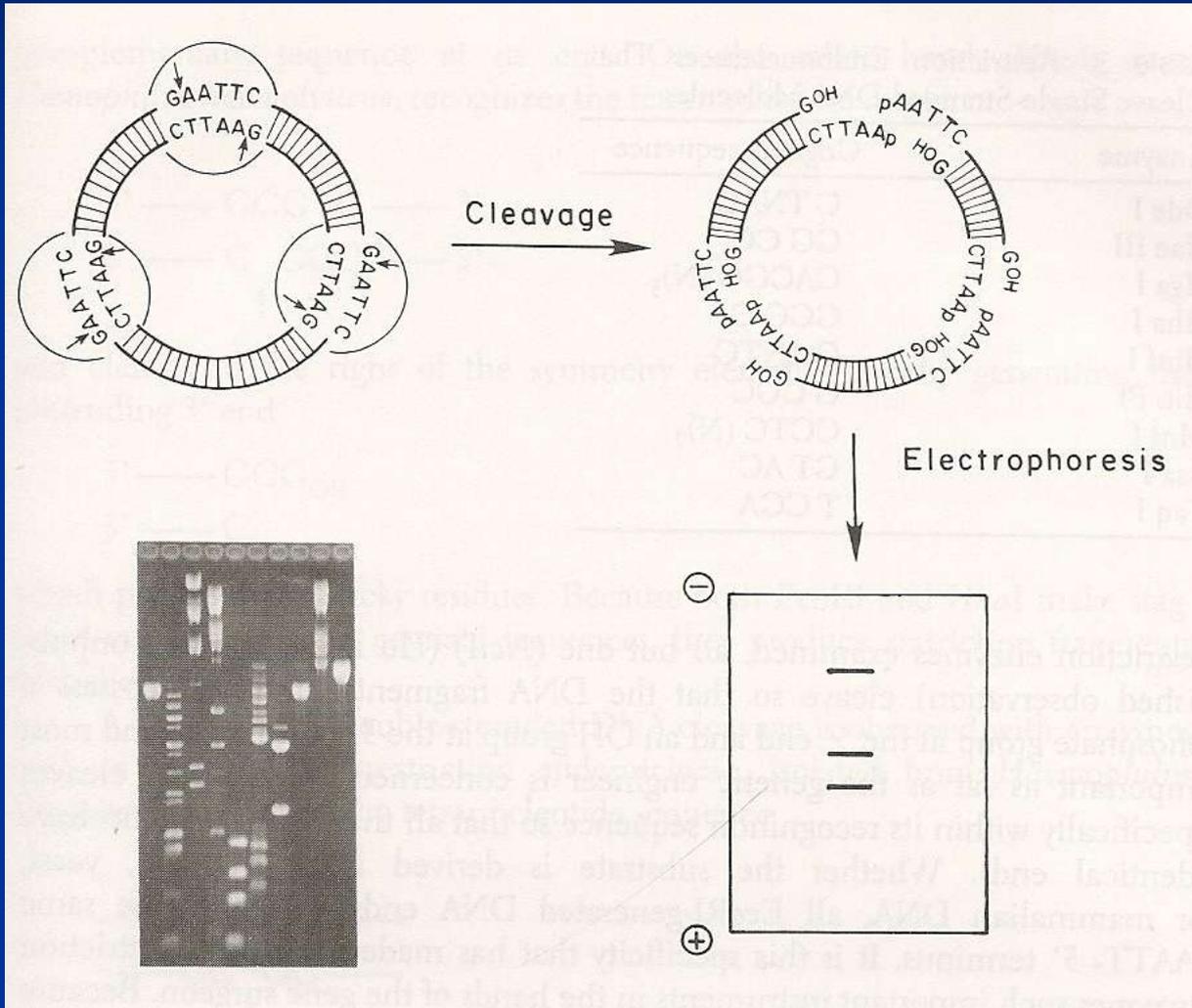
O nome da enzima de restrição

O nome deriva do microrganismo em que ela foi isolada

Exemplos:

- *Bam* HI , foi isolada de da espécie *Bacillus genus amyloliquefaciens*, cepa H e foi cronologicamente a primeira (I) endonuclease isolada desta fonte.
- *Eco* RI, RII, RIII e RV, representam enzimas com atividades distintas isoladas da enterobacterium *E.coli* cepa R.

Digestão de uma molécula de DNA circular com *Eco* RI



Tipos de corte das enzimas de restrição:

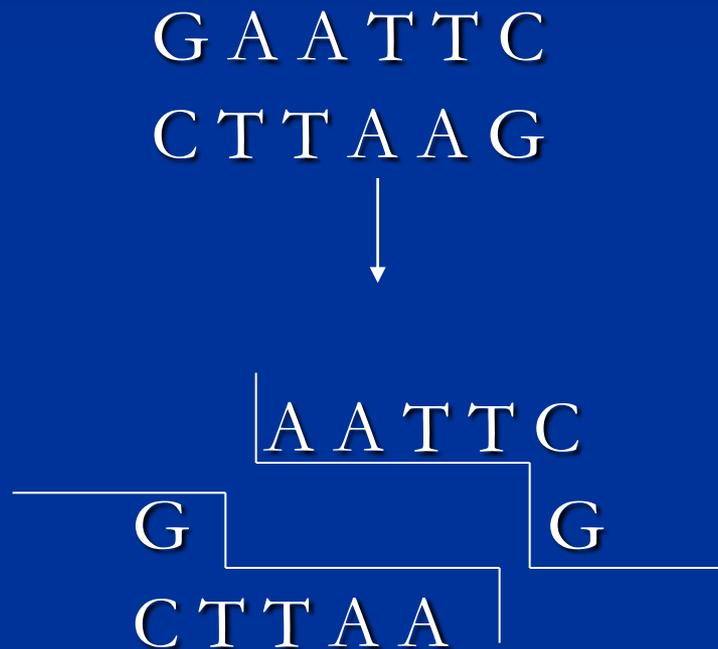
Cortes que produzem extremidades cegas (*blunt ends*)

G T T A A C
C A A T T G

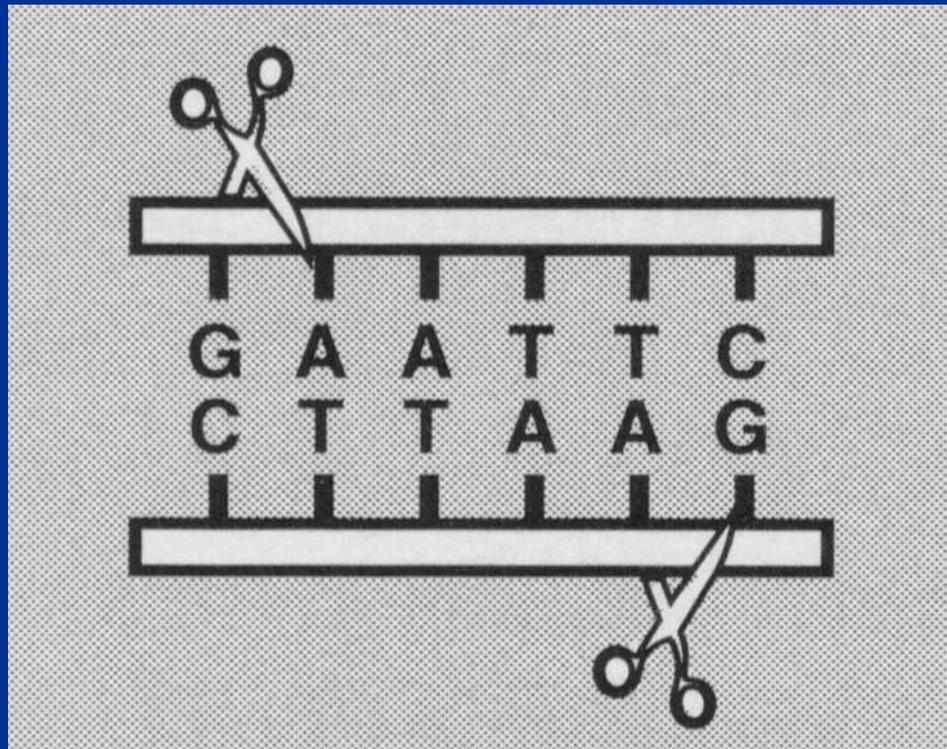
G T T ↓ A A C
C A A T T G

Tipos de corte das enzimas de restrição:

- Cortes que produzem extremidades coesivas (*sticky ends*)

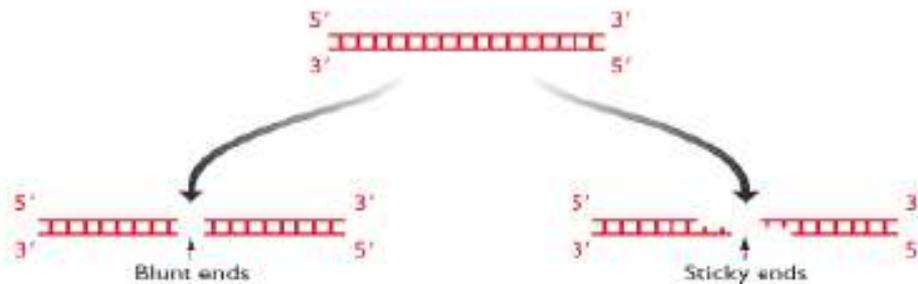


- A enzima *Eco* RI, tem sido a enzima mais estudada e caracterizada entre todas as enzimas de restrição.
- Ela reconhece o sítio:



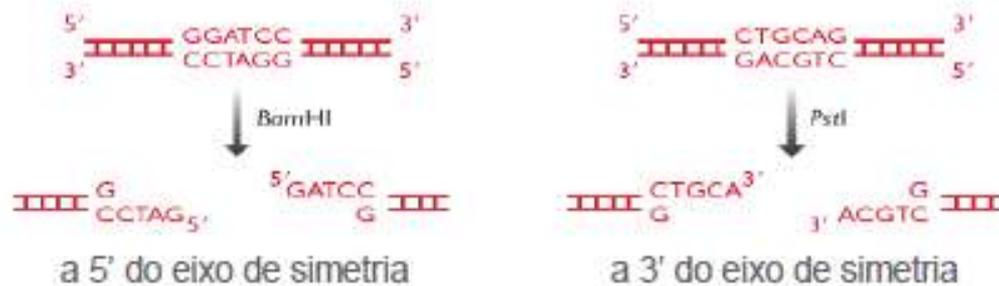
Resultado da digestão do DNA com diferentes enzimas de restrição

(A) Blunt and sticky ends



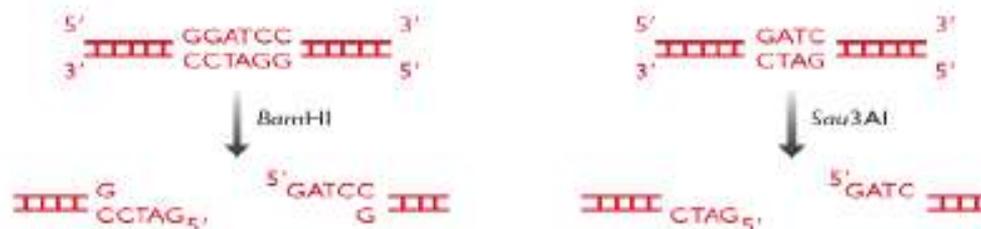
Extremidades **cegas** e **coesivas** (ou salientes)

(B) 5' and 3' overhangs



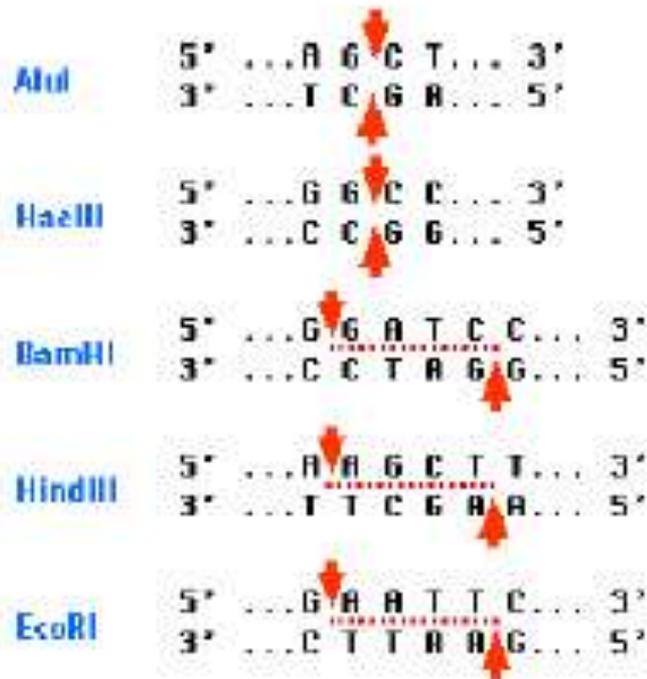
Extremidades 5' e 3' projectadas

(C) The same sticky end produced by different enzymes



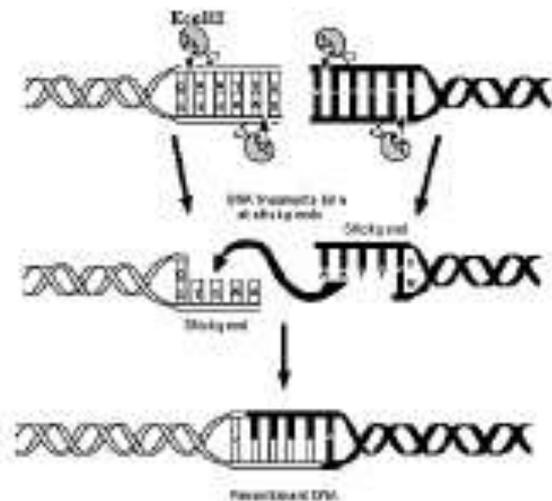
As mesmas extremidades coesivas, produzidas por diferentes enzimas de restrição

Produtos de digestão com Enzimas de Restrição



Extremidades coesivas

Extremidades abruptas (cegas)



**Restriction Enzyme
Action of EcoRI**

Seqüências de reconhecimento

Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a)			
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		<p>5' overhang</p>
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		<p>3' overhang</p>
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		<p>Blunt ends</p>
(b)			
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>		<p>Blunt ends</p>
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		<p>5' overhang</p>

Table 2 (Continued)

Restriction enzyme	Cognate sequence	Buffer ^a	Assay temp °C	Heat inactive ^b	Cleavage frequencies			
					λ	PBR 322	SV 40	ϕ X 174
Bfr I	C↓TTAG	M	37	?	3	0	1	2
Bgl I	CCCNNNN↓NGGC	H	37	Yes	20	0	1	0
Bgl II	A↓GATCT	H	37	No	6	0	0	0
Bln I	C↓CTAGG	H	37	?	2	0	2	0
Bmy I	G(G/A/T)GC (C/T/A)↓C	MK	37	?	38	10	4	3
BpuA I	GAAGAC(2/6)↓	H	37	?	—	—	—	—
BsaM I	CAATGC(1/1)↓	H	65	No	46	1	—	4
BsaO I	CG(A/G)(T/C)↓CG	M	50	No	22	7	—	1
BscA I	T↓CCGGA	H	55	?	24	1	0	0
BsiW I	C↓GTACG	H	55	No	1	0	0	2
BsiY I	CCN ₃ ↓N ₂ CG	M	55	?	176	20	10	19
Bsm I	GAATGC(1/1)↓	H	65	No	46	1	4	3
Bsp 1286	G(G/A/T)GC (C/A/T)↓C	L	37	Yes	38	10	4	3
BspM I	ACCTGC(4/8)↓	H	37	Yes	—	1	0	—
BspM II	T↓CCGGA	H	60	?	24	1	0	0
BsrBR I	GATNN↓NNATC	M	65	No	21	0	0	2
BssH II	G↓CGCGC	M	50	Partial	6	0	0	1
Bst I	C↓GATCC	M	55	?	5	1	1	0
Bst71 I	GCAGC(8/12)↓	H	50	No	199	21	—	14
Bst98 I	C↓TTAAG	H	37	No	3	0	—	2
Bst1107 I	GTA↓TAC	H	37	Yes	3	1	0	0
BstB I	TT↓CGAA	M	65	No	—	—	0	—
BstE II	G↓GTNACC	H	60	No	13	0	0	0
BstN I	CC↓(A/T)GG	H	60	?	50	6	17	2
BstO I	CC↓(A/T)GG	M	60	No	71	6	—	2
BstU I	CG↓CG	L	60	?	>50	23	0	4
BstX I	CCAN ₅ ↓NTGG	H	65	Partial	13	0	1	3
BstZ I	C↓GGCCG	H	37	No	2	1	—	0
Bsu36 I	CC↓TNAGG	H	37	No	2	0	—	0
Cel II	GC↓TNAGC	H	37	?	6	0	1	0
Cfo I	CCG↓C	M	37	Partial	215	31	2	18
Cfr10 I	(A/G)↓CCCG(T/C)	H	37	No	3	1	0	0
Cfr13 I	G↓GNCC	M	37	Yes	74	15	11	2
Cla I	AT↓CGAT	M	37	Partial	15	1	0	0
Csp I	CG↓G(A/T)CCG	HK	30	Yes	5	0	—	0
Csp45 I	TT↓CGAA	M	37	Yes	7	0	—	0
Cvn I	CC↓TNAGG	MK	37	Yes	2	0	0	0
Dde I	C↓TNAG	H	37	No	104	8	20	14
Dpn I	GMA↓TC	H	37	Yes	116	22	0	0
Dra I	TTT↓AAA	L	37	Partial	13	3	12	2
Dra II	(A/G)G↓GNCC(T/C)	L	37	Yes	3	4	3	0

(Table continues)

Pontos importantes

- O substrato é DNA dupla fita
- A enzima cliva especificamente dentro da seqüência de reconhecimento e todos os fragmentos de DNA possuem terminações idênticas.
- Especificidade das enzimas de restrição do tipo II
- Uma **unidade** da atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima requerida para clivar completamente **1 μ g de DNA em 1 hora na temperatura requerida**

Pontos importantes

- Fatores como temperatura, composição e pureza dos substrato e ambiente iônico.
- Em geral muitas das enzimas de restrição disponíveis vão funcionar adequadamente com um dos três tipos de sistemas tampões que contém, baixa, média ou alta concentração de cloreto de sódio, correspondendo a 0, 50 e 100 mM de NaCl, respectivamente.

Pontos importantes

- Algumas enzimas podem requerer íons específicos como potássio ou amônio
- A maioria das enzimas tem um pH ótimo entre 7.2 e 7.6.

Entretanto, se a composição do tampão de ensaio for alterada muito drasticamente as enzimas poderão não clivar o DNA totalmente, ou clivar parcialmente gerando mais que o número esperado de fragmentos.

Pontos importantes

- Atividade “Star”: é resultado de uma diminuição na especificidade com a qual a enzima de restrição reconhece a seqüência. O fenômeno é chamado atividade “Star”, denotado com asterisco (*).

Pontos importantes

Fatores que podem influenciar na especificidade da enzima

- alta quantidade de enzima,
- DNA ratio (unidades/ μg DNA),
- alta concentração de glicerol (acima de 5% deve ser evitado),
- pH alto,
- baixa concentração de sal,
- substituição de Mn^{2+} por Mg^{2+}

Pontos importantes

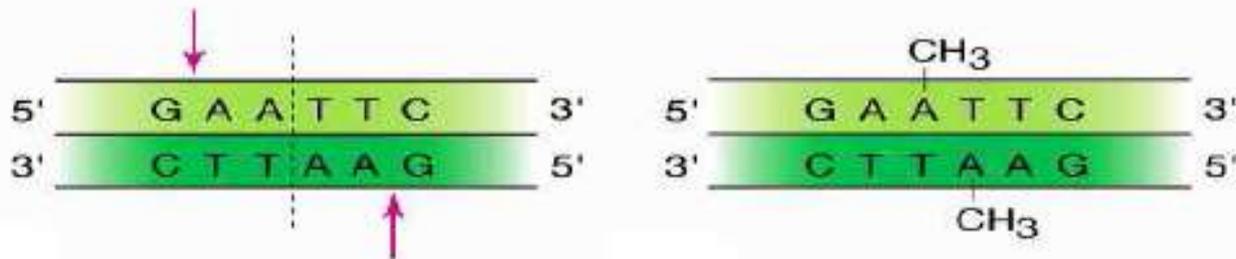
- Forma física do DNA pode influenciar na clivagem.
- Normalmente a uma molécula de DNA linear é digerido por completo mais rapidamente com poucas unidades de enzima do que um DNA super espiralado, DNA circular.

Padrão de metilação dos nucleotídeos

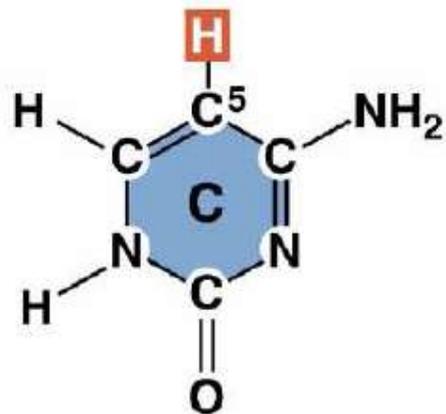
- *E. coli*, por exemplo possui vários sistemas de metilação:
 - O produto do gene *dam* metila adenina para produzir N6-metiladenosina
 - O produto do gene *dcm* metila citosina para formar 5-metilcitosina
- sistema de modificação restrição ou Tipo II metila A ou C dentro da seqüência.
- Metilação por *dam* ou *dcm* metilases é indicada com um asterisco

Modificação do DNA METILAÇÃO

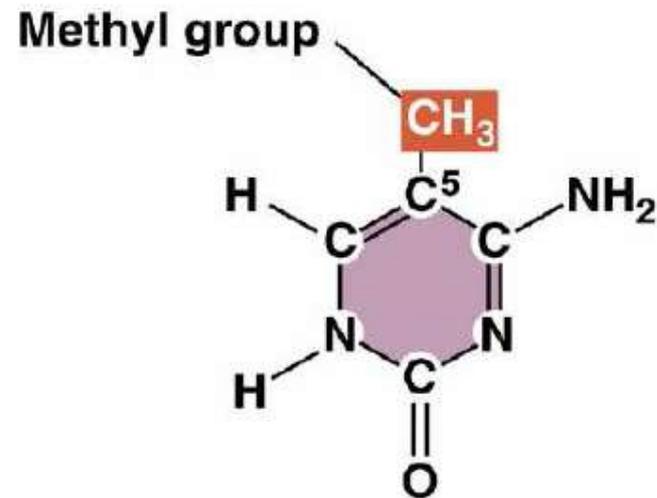
1) Modificação do DNA- METILAÇÃO



Exemplo de metilação



Cytosine



5-Methylcytosine

As metilases podem ser:

- Específicas para um sitio de restrição: exemplo *Eco* RI modifica um resíduo interno de A na seqüência do sitio de *Eco* RI
- Não específicas:
 - *dcm* (metila um resíduo de citosina) na seqüência 5'-CCTGG-3' e 5'-CCAGG-3'
 - *dam* metila resíduos de adenina na seqüência 5'-GATC-3'

Enzimas que quebram ligações fosfodiester em RNA e DNA

Endonucleases

1- Enzimas de restrição: tipo I, II e III

2- Deoxyribonucleases

3- Ribonucleases

B. Exonucleases

C. Endonucleases e Exonucleases

2- Deoxyribonuclease

A. Deoxyribonuclease I (DNase I): Isolada de pâncreas bovino por Moore em 1981, degrada DNA por hidrólise das ligações fosfodiésteres internas para produzir dinucleotídeos e oligonucleotídeos com fosfato 5' e grupos hidroxila 3'.

Aplicações: Esta enzima degradativa tem sido usada durante anos como sonda na estrutura da cromatina para clonar fragmentos randômicos

Clivagem de um fragmento de DNA com a enzima DNase I



Gel de agarose com fragmentos de 40-120 pb após a digestão com DNase I.

2- Deoxyribonuclease

B. Mung Bean nuclease: Isolada de mung bean (Kowalski et al. 1976) é altamente específica para DNA.

Com o DNA completamente desnaturado ela exhibe preferência para clivagem após A ou T, os produtos liberados vão terminar em grupos fosfato 5' e hidroxila 3'. Sua atividade é ótima em pH 5.0 e requer Zn^{2+} e trabalha bem na presença de agentes redutores como cisteína.

Aplicações: Pode ser usada para modificação do sítio de restrição do DNA que está sendo manipulado, ou remoção da extremidade protuberante.

Retirada das extremidades protuberantes
pela *Mung Bean* nuclease



Enzimas que quebram ligações fosfodiester em RNA e DNA

A. Endonucleases

- 1- Enzimas de restrição: tipo I, II e III
- 2- Deoxyribonucleases
- 3- Ribonucleases

B. Exonucleases

C. Endonucleases e Exonucleases

3- Ribonucleases:

Todas são enzimas específicas para simples fita utilizadas para analisar arranjos de ribonucleotídeos na molécula de RNA.

RNase T1: Purificada de *Aspergillus oryzae*, cliva ligações fosfodiéster no lado 3' e 5' de resíduos de G para produzir fragmentos terminando em Gp.

Aplicações: é utilizada como uma G-endonuclease específica para análise de seqüências de RNA

RNase U2: Isolada de *Ustilago shaerogena*
Cliva primariamente no lado 3' de adeninas e
algumas clivam guanosina. Aplicações: Usada
para ferramenta para análise de sequências
de RNA

RNase A: Isolada de pâncreas bovino.
Realiza clivagem de pirimidinas no 3' para
produzir oligonucleotides terminando em C.

RNase CL3: Isolada de fígado de galinha é estável termicamente e em ambiente ácido. Forte especificidade para C

RNase PhyM: Isolada de *Physarum polycephalum*, cliva em C e G

RNase *B.cereus*: hidrolisa cadeias de RNA nas sequencias C e U.

RNase H: Degrada fita de RNA em DNA:RNA heteroduplex, produzindo oligonucleotídeos fosforilados no 5'.

Enzimas que quebram ligações fosfodiester em RNA e DNA

A. Endonucleases

- 1- Enzimas de restrição: tipo I, II e III
- 2- Deoxyribonucleases
- 3- Ribonucleases

B. Exonucleases

C. Endonucleases e Exonucleases

B- Exonucleases

São enzimas que operam no final das moléculas de DNA ou RNA

- **Exonuclease III:** Possui 4 atividades enzimáticas: atividade exonucleásica 3' → 5', atividade RNase H, fosfatase 3' e atividade endonucleásica.
- Todas estas atividades são manifestadas em dupla fita. A enzima remove o o fosfato terminal e então hidrolisa DNA removendo o nucleosídeo 5' monofosfato do final 3' da molécula.

- **Exonuclease VII:** Isolada de *E.coli*, hidrolisa DNA simples fita de uma maneira processiva, liberando grandes oligonucleotídeos que são degradados subsequentemente em pequenos pedaços.

- **Lambda Exonuclease:**

Isolada em 1962 de extratos de *E.coli* lisogênicos de bacteriófago Lambda, esta enzima foi preparada e cristalizada em 1967.

Degrada DNA do 5' → 3' de maneira possessiva. Tem forte preferência para hidrolisar pontes de nucleotídeos internos de 50-250 vezes mais rápido em dupla fita DNA

Ela não degrada RNA.

Aplicações: tem sido usadas para produzir moldes simples fita para seqüenciamento de DNA

■ T7 gene 6 exonuclease:

Análoga a lambda exonuclease, foi isolada de *E.coli* infectada com fago T7. Ela é o produto do T7 gene 6, que foi clonado e a enzima foi isolada da superprodução destas células

Aplicações: Possui vantagens em relação a lambda exonuclease, como pureza e degradação uniforme.

Enzimas que quebram ligações fosfodiester em RNA e DNA

A. Endonucleases

- 1- Enzimas de restrição: tipo I, II e III
- 2- Deoxyribonucleases
- 3- Ribonucleases

B. Exonucleases

C. Endonucleases e Exonucleases

C- Endo e Exonucleases

- **Nuclease Bal 31:** enzima extracelular isolada de *Alteromonas espejiana*. Possui atividade endodeoxyribonuclease com especificidade para simples fita bem como atividade exonuclease capaz de degradar simultaneamente região 5' e 3' terminal de DNA duplex. Reconhece DNA simples fita e cliva DNA supercoiled, picotado, danificado por radiações UV.
- **Aplicações:** Usada para mapear sítios de restrição em fragmentos de DNA para produzir deleções controladas em DNA

- **Neurospora Crassa Nuclease:**

Atua como uma endonuclease em DNA ou RNA simples fita e como uma exonuclease em DNA dupla fita.

Aplicações: Separação de fragmentos em gel desnaturante permite determinar tamanho e posicionamento de seqüências complementares ao longo do DNA

- **Nuclease P1:** Isolada de *Penicillium citrinum*, possui atividades exo e endonucleases, hidrolisa ligações fosfodiéster em RNA e DNA simples fita
- **Nuclease S1:** Isolada de *Aspergillus oryzae* tem sido muito utilizada na análise de hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA. Ela degrada RNA ou DNA simples fita. Tem sido utilizada para sondar estruturas de DNA em regiões de desnaturação de fitas

Classificação

- Enzimas que quebram ligações fosfodiéster em RNA e DNA
- Enzimas que ligam o DNA
- Enzimas que sintetizam novas ligações
- Enzimas que trabalham em fosfatos terminais de DNA e RNA
- Enzimas que cobrem, protegem e torcem o DNA

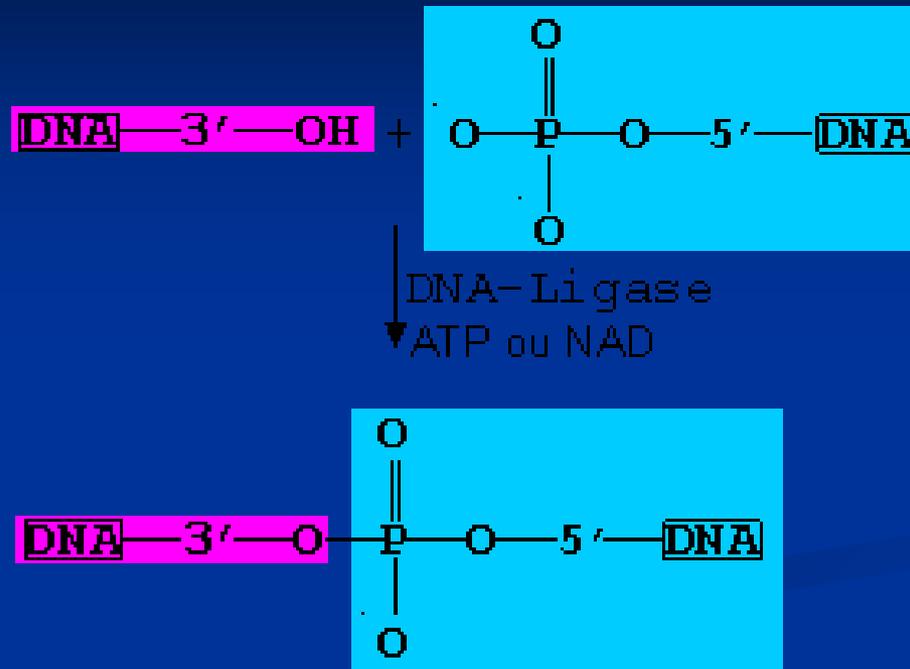
Enzimas que ligam o DNA:

- Enzimas que podem reparar ou juntar ligações fosfodiester que foram clivadas por nucleases ou algum processo químico.
- A. *E.coli* DNA Ligase
- B. T4 DNA Ligase
- C. T4 RNA Ligase

E. coli DNA Ligase:

Possui 74.000Da.

Catalisa a formação de ligações fosfodiester internucleotídeos em moléculas de DNA como substrato processando resíduos adjacentes, um com grupo fosfato 5' e outro com grupo hidroxila 3'.



DNA ligase catalisa a junção de duas fitas de DNA que são partes da molécula da dupla-hélice.

Tipos de fragmentos de DNA que são ligados pela DNA ligase

a) Fragmentos com extremidades coesivas

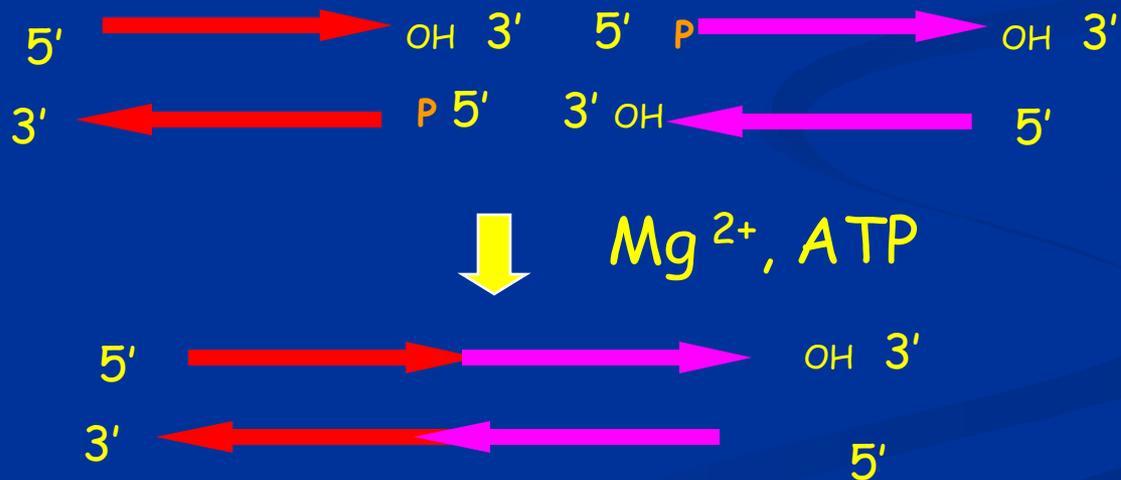
As extremidades coesivas produzidas por várias enzimas de restrição permitem dois fragmentos de DNA ligarem-se facilmente, através da formação de pontes de hidrogênio pela complementariedade das bases.

b) Fragmentos com extremidade não coesivas

DNAs portando extremidades não coesivas são ligados com muito menos eficiência que aqueles que tem extremidades coesivas. Uma concentração muito maior de DNA ligase e mesmo dos DNAs envolvidos é necessária para que as moléculas com extremidades não coesivas sofram reação de ligação.

- **T4 DNA ligase:** Isolada de células de *E.coli* infectadas bacteriofago T4. A enzima catalisa a ligação em DNA simples fita . Utiliza ATP como cofator.

- T4 DNA ligase: ligar ou juntar ácidos nucleicos
 - clonagem de fragmento de DNA em vetor



T4 DNA Ligase:

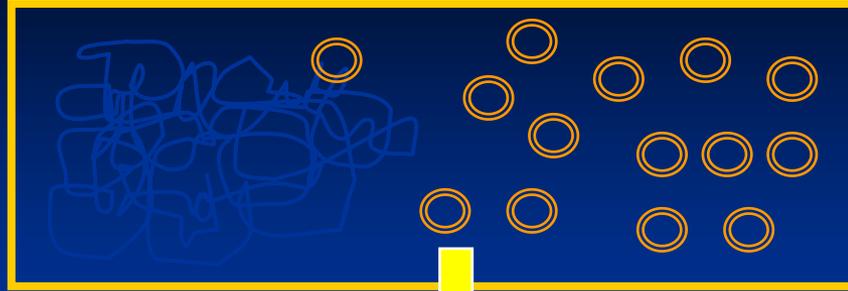
- Aplicações: usada para produzir moléculas recombinantes
- Sua atividade também é importante na clonagem de DNA cromossomal que tem sido fragmentado por sonicação ou degradado parcialmente por DNase I.

T4 DNA Ligase:

Existem parâmetros que podem afetar a eficiência de ligação:

- 1- Concentração do DNA
- 2- Concentração de terminações compatíveis
- 3- Tamanho dos fragmentos
- 4- Presença ou ausência de extremidades coesivas
- 5- Temperatura
- 6- Composição do meio iônico

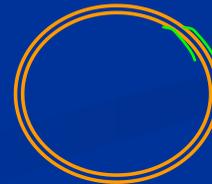
E. coli



Plasmídeo



Digestão



Reação de ligação



Ligação

Reação de ligação com *T4* DNA Ligase

- As reações geralmente são realizadas em volumes pequenos (5 – 50 μ l)
- A quantidade de DNA utilizada nas reações varia entre 10-1000 ng
- Temperatura ótima entre 4° C a 12 °C (16-18 horas)
- Cálculo do número de moles de vetor e inserto podem ser determinados pela seguinte relação:

$$\frac{\text{ng de vetor} \times (\text{kb}) \text{ tamanho do inserto} \times \text{inserto:vetor}}{\text{Tamanho do vetor (Kb)}} = \text{ng of insert}$$

Exemplo de proporção inserto:vetor

- Quanto de um inserto de 0.5kb poderia ser adicionado em uma reação de ligação com 50ng de DNA vetor de tamanho 3kb? Com uma proporção 3:1?

$$\frac{50 \text{ ng de vetor} \times 0,5 \text{ kb inserto} \times 3/1}{\text{Tamanho do vetor}} = 25 \text{ nanogramas de inserto}$$

Exemplo de reação de ligação:

■ Vetor:	50 ng
■ Fragmento de DNA:	25 ng
■ T4 DNA Ligase:	1 μ l
■ Tampão (10x) :	5 μ l
■ água para completar o volume final :	X μ l
Volume total	<hr/> 50 μ l

■ T4 RNA Ligase:

Esta RNA ligase isolada de *E.coli* infectada com bacteriófago T4 catalisa formação de ligações fosfodiéster em uma reação dependente de ATP

A reação pode ser com duas moléculas de RNA que poderão ser unidas e são alinhadas com dupla hélice

T4 RNA Ligase

- Aplicações: tem sido usada para circularizar ribo e deoxyribonucleotídeos e para ligar oligonucleotídeos para produzir longas moléculas de RNA