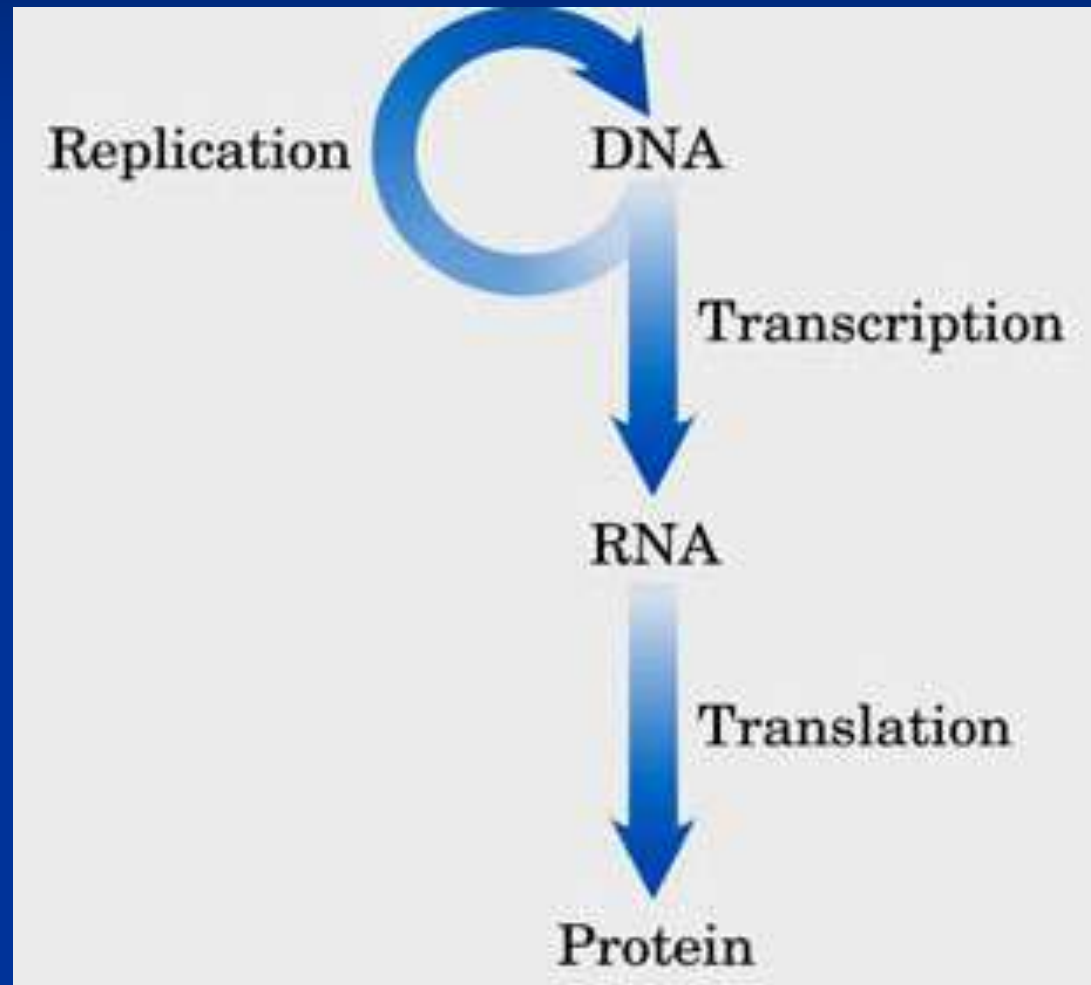


# Tecnologia do DNA recombinante

# 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

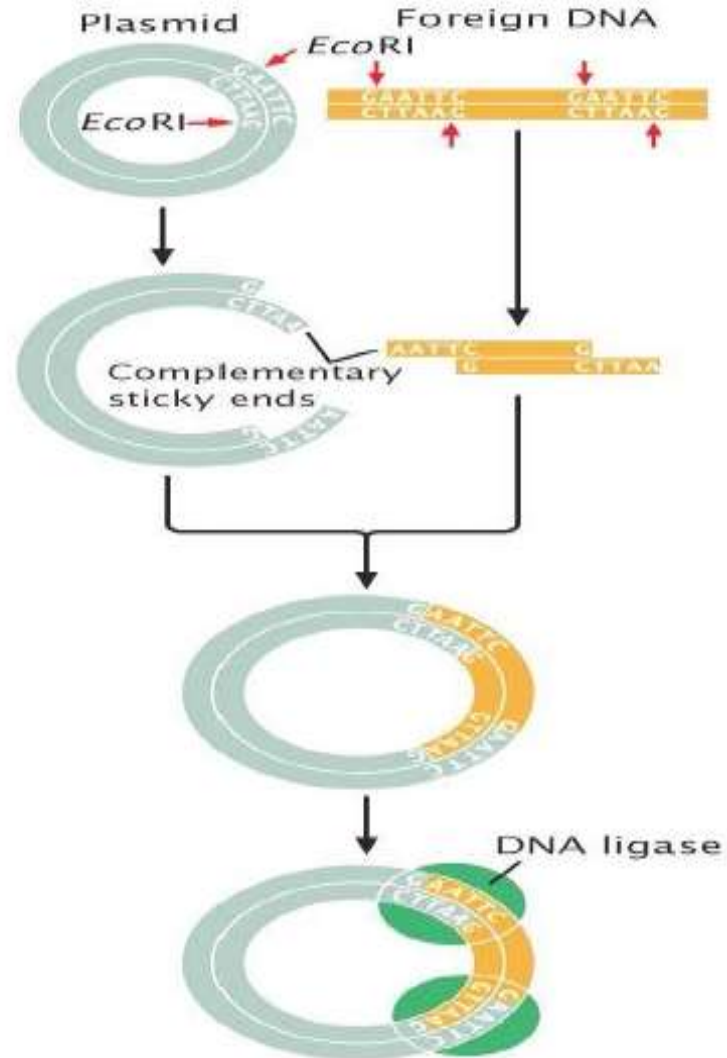
**Vetores:** Plasmídeos  
Fagos  
Cosmídeos  
BACs/ YACs  
Vírus

**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. Topoisomerasas



# 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.

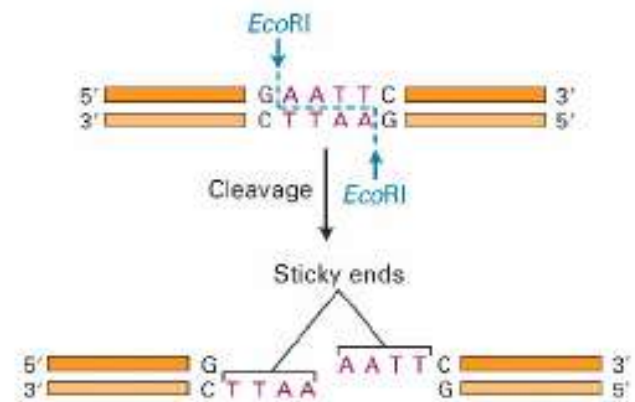
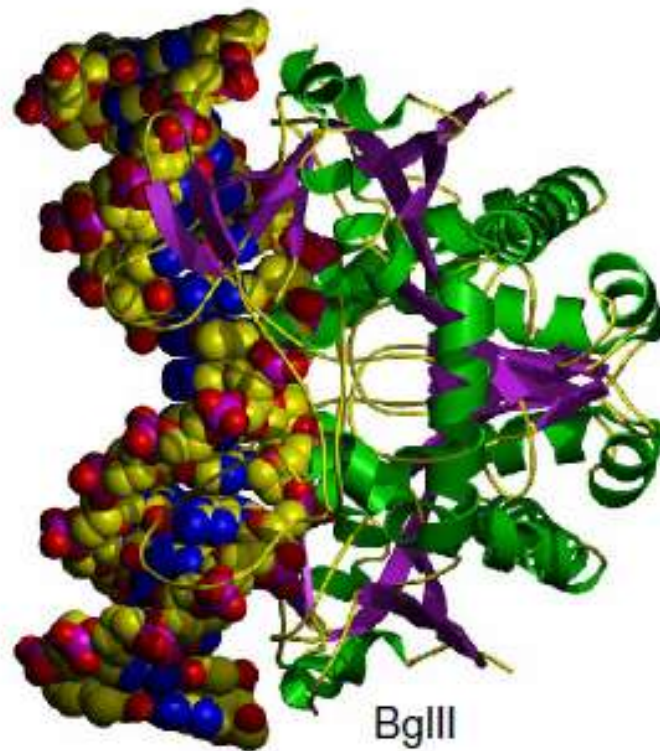
# Descoberta das enzimas de restrição

- Pesquisadores descobriram o sistema de restrição/modificação em DNA de bacteriófagos
- Quando os fagos  $\lambda$  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

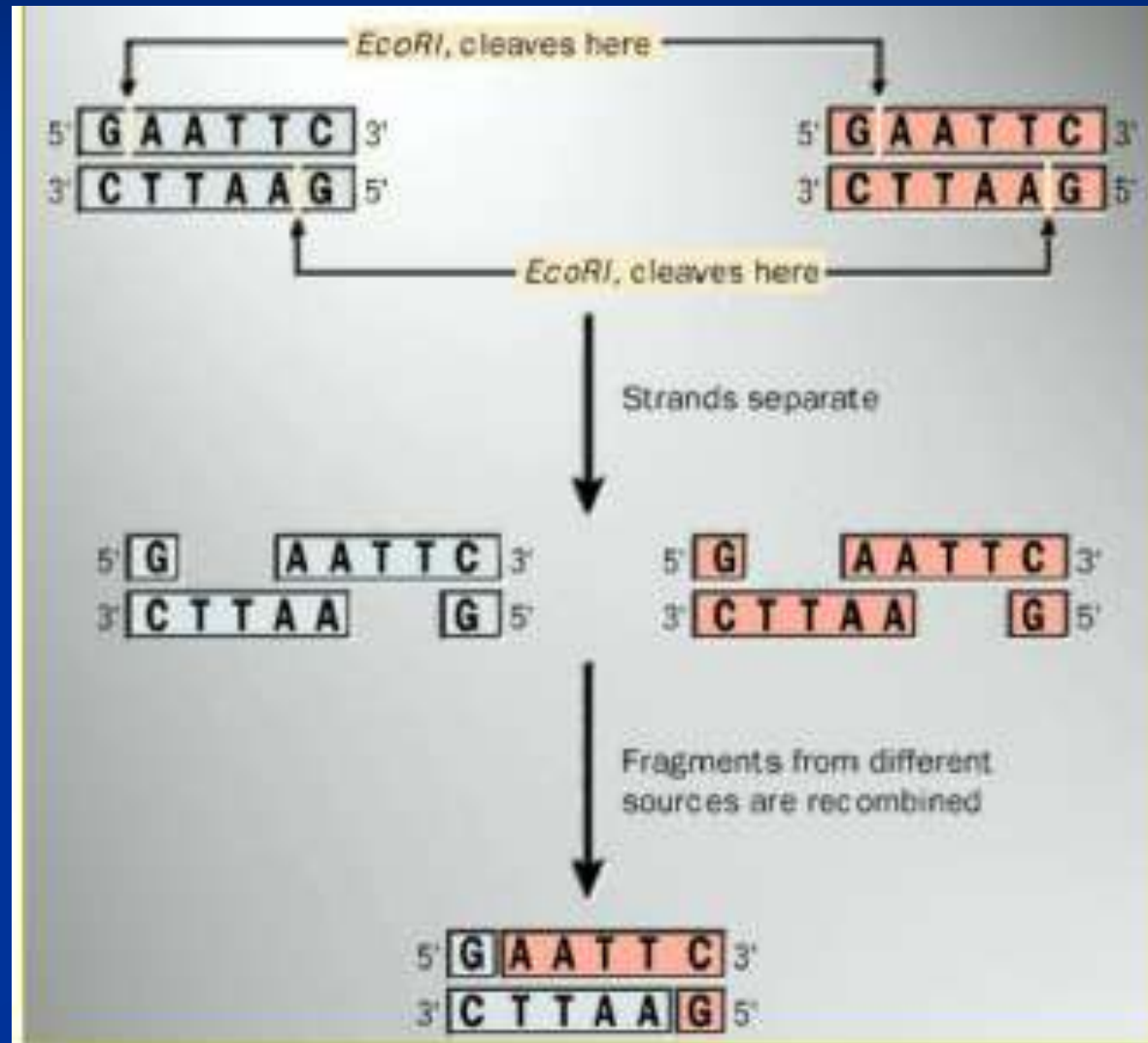
# Enzimas de Restrição





# 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).

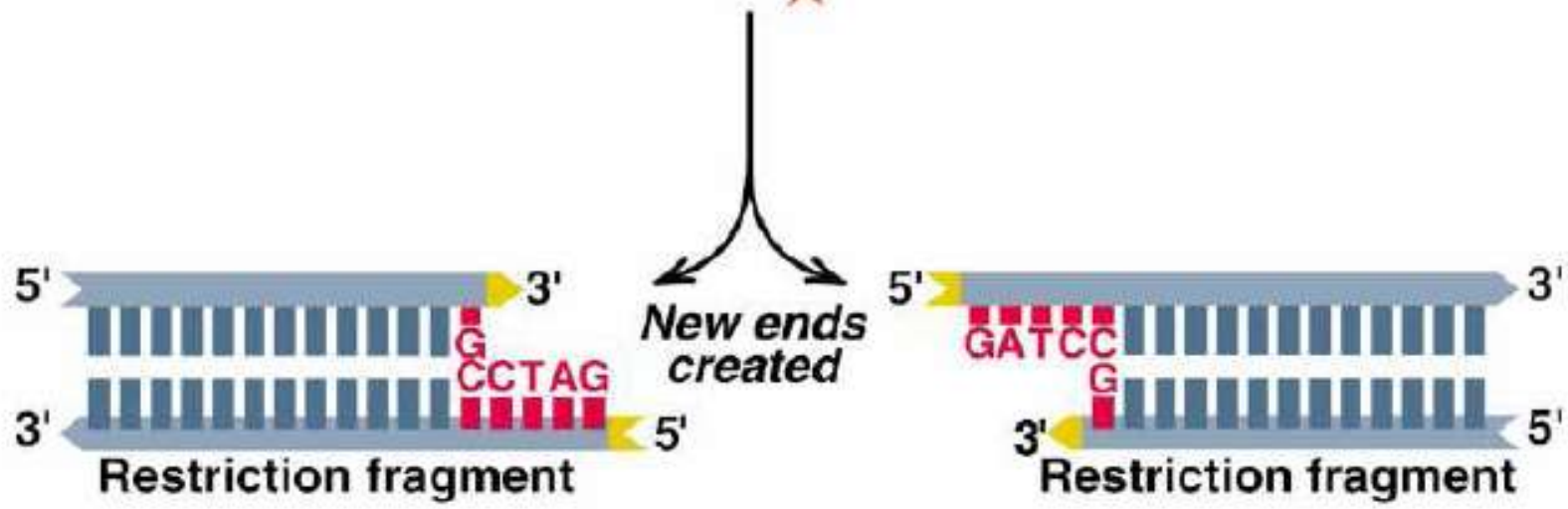
Tem a propriedade de clivar o DNA produzindo fragmentos de vários tamanhos, todos com terminação idêntica.

## 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'



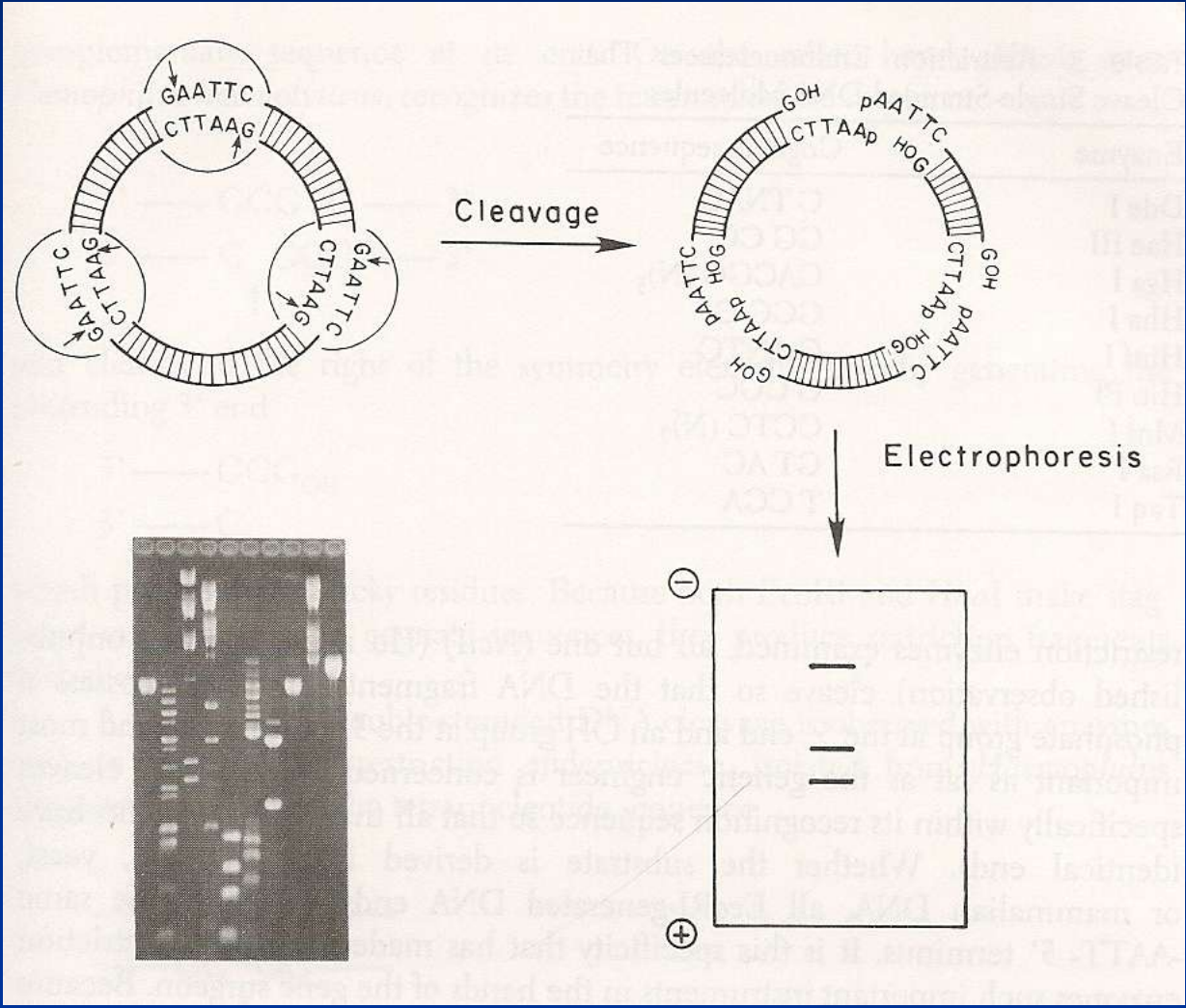
# O nome da enzima de restrição

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:

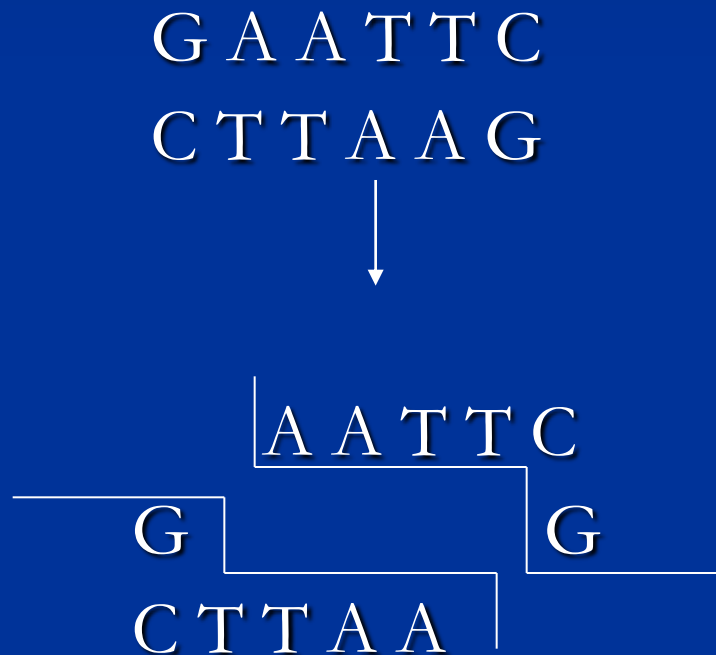
Cortes que produzem extremidades cegas (*blunt ends*)

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

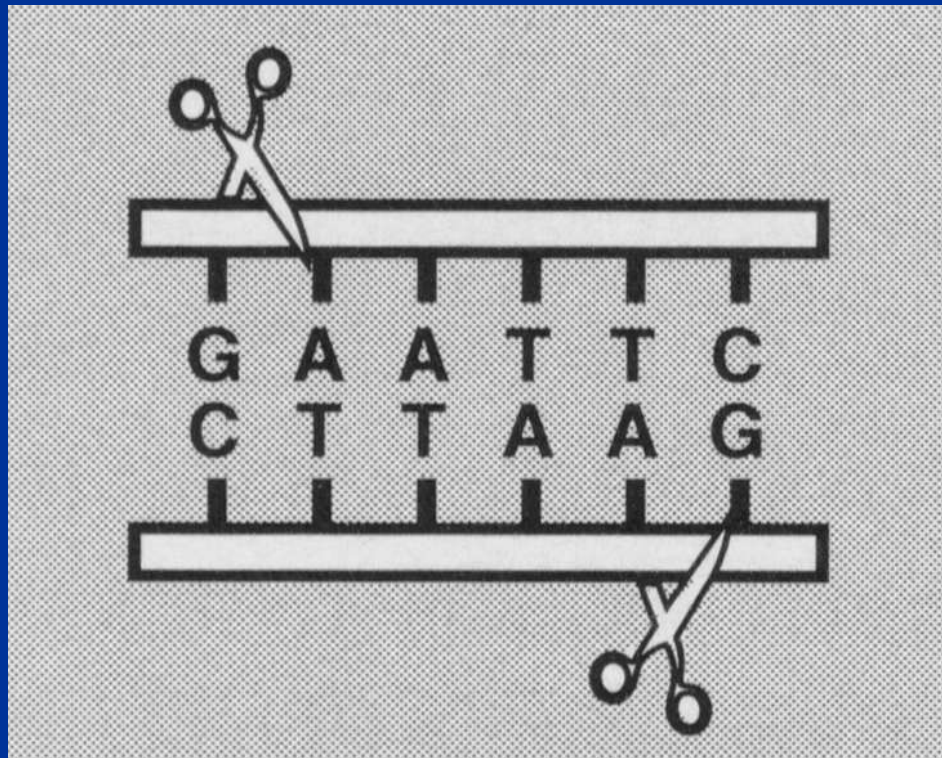
G T T   ↓   A A C  
C A A   T T G

# Tipos de corte das enzimas de restrição:

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



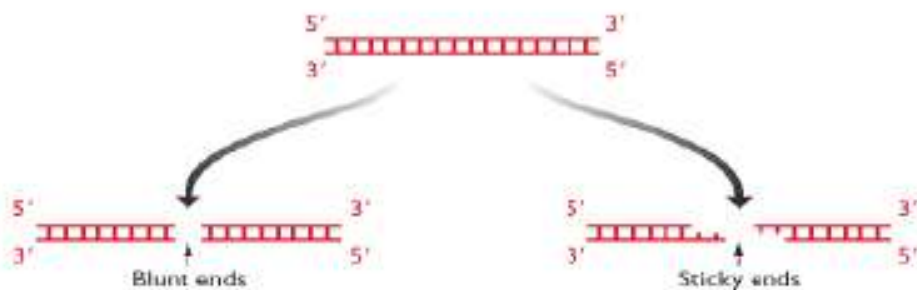
- A enzima *Eco* RI, tem sido a enzima mais estudada e caracterizada entre todas as enzimas de restrição.
- Ela reconhece o sítio:





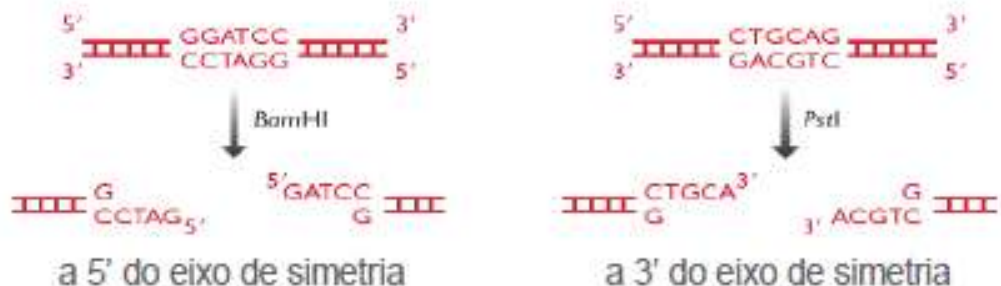
# Resultado da digestão do DNA com diferentes enzimas de restrição

(A) Blunt and sticky ends



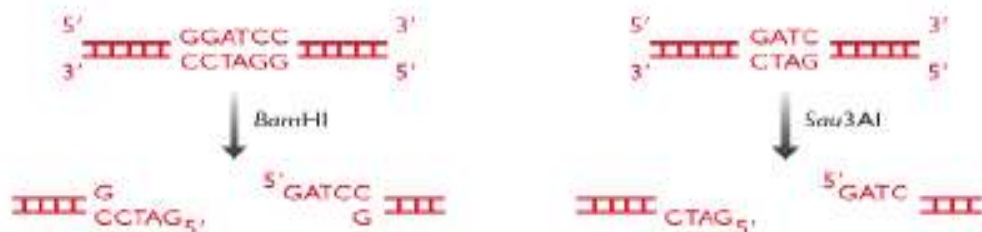
Extremidades **cegas** e **coesivas** (ou salientes)

(B) 5' and 3' overhangs



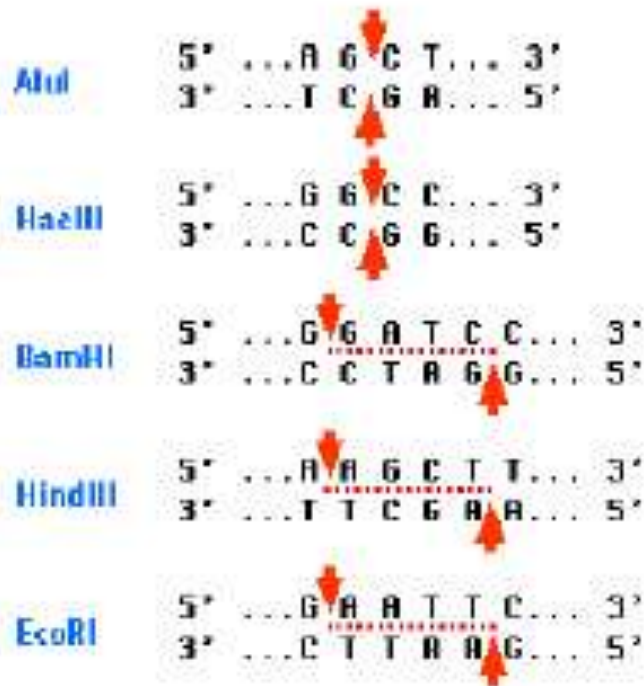
Extremidades 5' e 3' projectadas

(C) The same sticky end produced by different enzymes



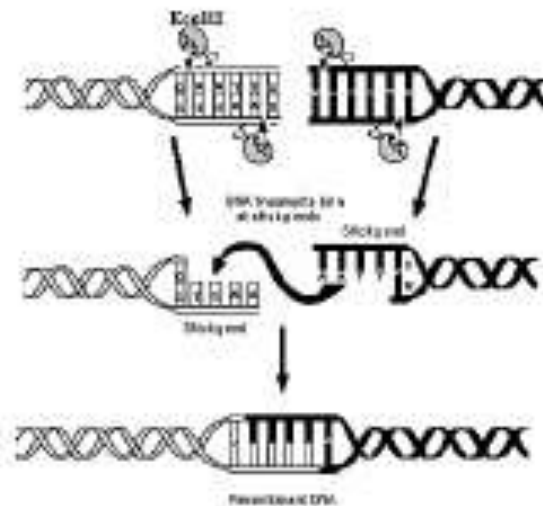
As mesmas extremidades coesivas, produzidas por diferentes enzimas de restrição

# 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>	
	<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		
(b)	<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		

Table 2 (Continued)

Restriction enzyme	Cognate sequence	Buffer <sup>a</sup>	Assay temp °C	Heat inactive <sup>b</sup>	Cleavage frequencies			
					$\lambda$	PBR 322	SV 40	$\phi$ 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 <sub>3</sub> ↓N <sub>2</sub> 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 <sub>5</sub> ↓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	GCG↓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)CCC	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 $\mu$ 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/ $\mu\text{g}$  DNA),
- alta concentração de glicerol (acima de 5% deve ser evitado),
- pH alto,
- baixa concentração de sal,
- substituição de  $\text{Mn}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$

# 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.

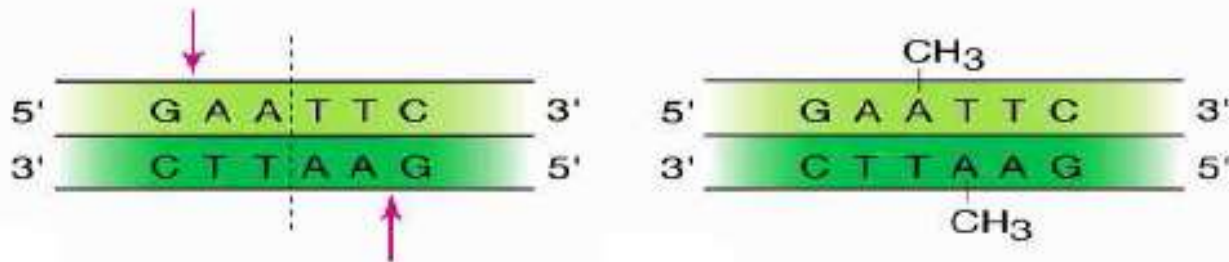


# Padrão de metilação dos nucleotídeos

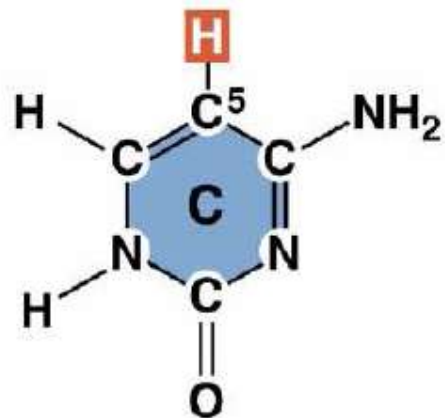
- *E. coli*, por exemplo possui vários sistemas de metilação:
  - O produto do gene *dam* metila adenina para produzir N6-metiladenosina
  - O produto do gene *dcm* metila citosina para formar 5-metilcitosina
- sistema de modificação restrição ou Tipo II metila A ou C dentro da seqüência.
- Metilação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

# Modificação do DNA METILAÇÃO

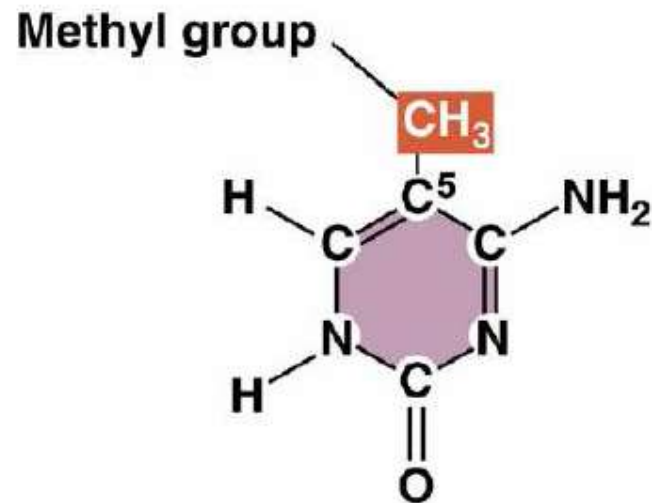
## 1) Modificação do DNA- METILAÇÃO



## 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

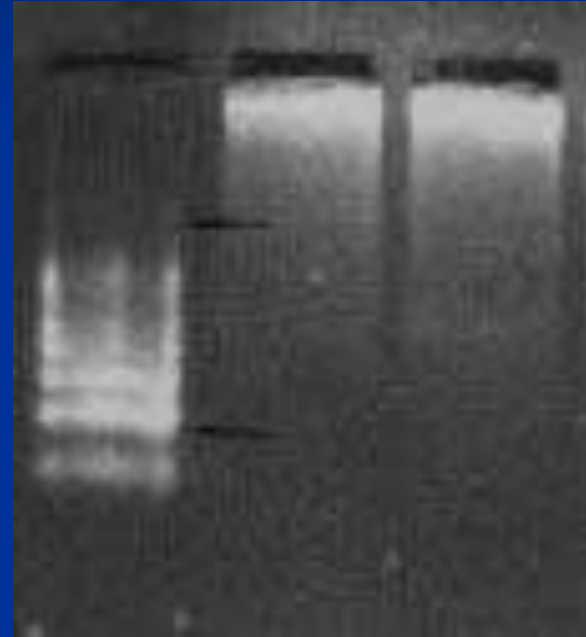
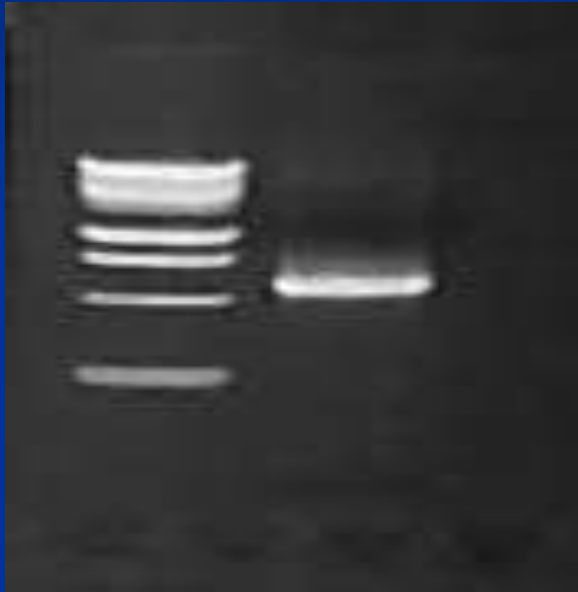
C. Endonucleases e Exonucleases

## 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  $3' \rightarrow 5'$ , atividade RNase H, fosfatase  $3'$  e atividade endonucleásica.
- Todas estas atividades são manifestadas em dupla fita. A enzima remove 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 fosfodiester 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

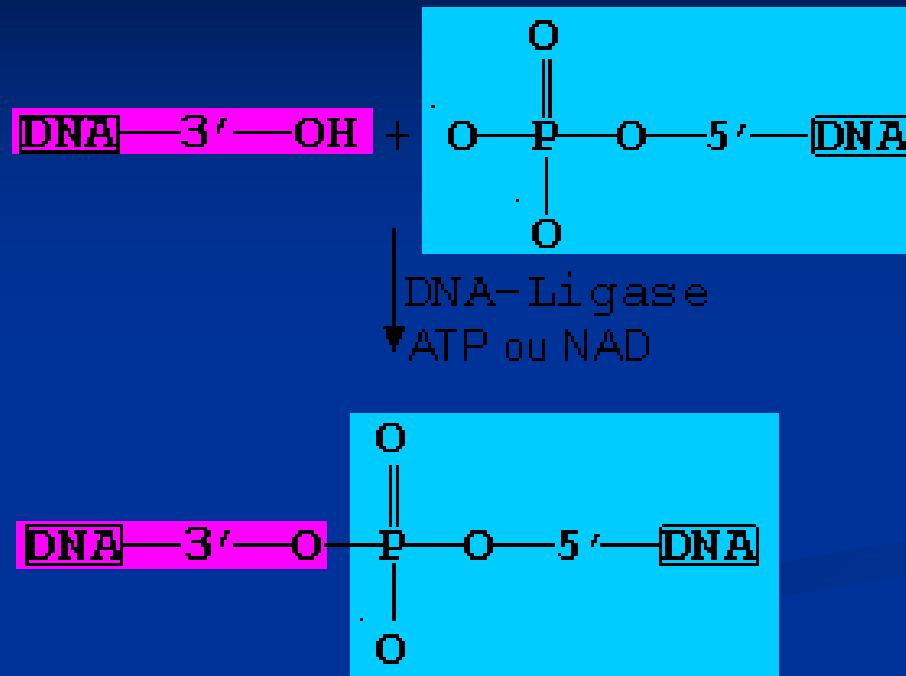
# Enzimas que ligam o DNA:

- 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:

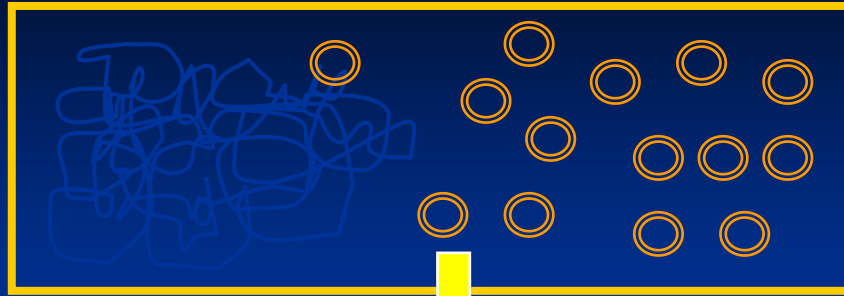
- Aplicações: usada para produzir moléculas recombinantes
- Sua atividade também é importante na clonagem de DNA cromossomal que tem sido fragmentado por sonicação ou degradado parcialmente por DNase I.

# T4 DNA Ligase:

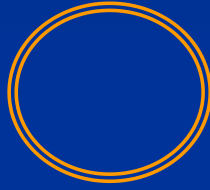
Existem parâmetros que podem afetar a eficiência de ligação:

- 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

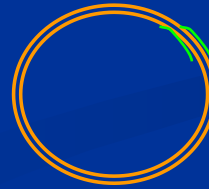
*E. coli*



Plasmídeo



Digestão



Reação de ligação



Ligação

# Reação de ligação com *T4* DNA Ligase

- As reações geralmente são realizadas em volumes pequenos (5 – 50  $\mu$ 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 $\mu$ l
■ Tampão ( 10x) :	5 $\mu$ l
■ água para completar o volume final :	X $\mu$ l
Volume total	<hr/> 50 $\mu$ 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