

Clonagem Molecular

Fragmentos de DNA de interesse

Vetores: Plasmídeos
Fagos
Cosmídeos
BACs/ YACs

Hospedeiros:
E.coli
Levedura
Células vegetais
Células animais

Enzimas: Enzimas de restrição
DNA polimerases
DNA ligases
Topoisomerasas
Fosfatases

Hospedeiro

- O Hospedeiro é um sistema vivo estável, no qual o vetor pode ser propagado.
- O vetor é o mensageiro do gene a clonar.

Que atributos deverão ter as células hospedeiras?

- Algumas estirpes bacterianas e de levedura foram desenvolvidas para as experiências de DNA recombinante.

Que atributos deverão ter as células hospedeiras?

- Os vetores de clonagem devem ter a origem de replicação (*ori*) compatível com o hospedeiro.
- Para que um dado plasmídeo se replique nas células, estas têm de reconhecer o seu local *ori* e aí recomeçar a replicação do DNA.

Que atributos deverão ter as células hospedeiras?

- Por razões de segurança, as células hospedeiras não devem se reproduzir na natureza, o que reduz a probabilidade de infecções acidentais de pessoas que trabalham nos laboratórios e da população em geral

Que atributos deverão ter as células hospedeiras?

- Deve-se evitar a transferência do DNA de uma célula hospedeira para outra, de modo a impedir a disseminação do DNA recombinante nas populações naturais dos organismos.

Tipos de células hospedeiras

- O tipo de células hospedeiras usadas para uma aplicação particular deve depender do objetivo das experiências de clonagem.
- Se o objetivo é isolar um gene para uma análise estrutural, é mais indicado um sistema simples que seja fácil de usar.

Tipos de células hospedeiras

- Se o objetivo é expressar a informação genética em grandes quantidades, um sistema mais específico deve ser recomendado.
- Frequentemente um simples hospedeiro primário é usado para isolar a seqüência que é depois introduzida dentro de um sistema mais complexo para expressão.

Tipos de células hospedeiras usadas para engenharia genética

Grupo	Procariótica / Eucariótica	Tipo	exemplos
Bactéria	Procariótica	Gram - Gram +	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces spp</i>
Fungos	Eucariótica	Unicelulares Multicelular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
Plantas	Eucariótica	Cloroplastos Células inteiras Todo o organismo	Vários tipos Vários tipos Vários tipos
Animais	Eucarióticas	Células inteiras Células de mamíferos Todo o organismo	<i>Drosophila melanogaster</i> Vários tipos Vários tipos

Hospedeiros

- A maioria das manipulações de rotina usam *Escherichia coli* como organismo hospedeiro.

Hospedeiros procarióticos

- Uma célula hospedeira ideal deve ser fácil de manipular e propagar, deve estar disponível em grande quantidade.
- A bactéria *Escherichia coli* preenche estes requisitos, e é usada em muitos protocolos de clonagem.

Hospedeiros procarióticos

- A *Escherichia coli* tem sido estudada com grande detalhe, estes estudos forneceram a informação básica essencial nos quais a engenharia genética é baseada.

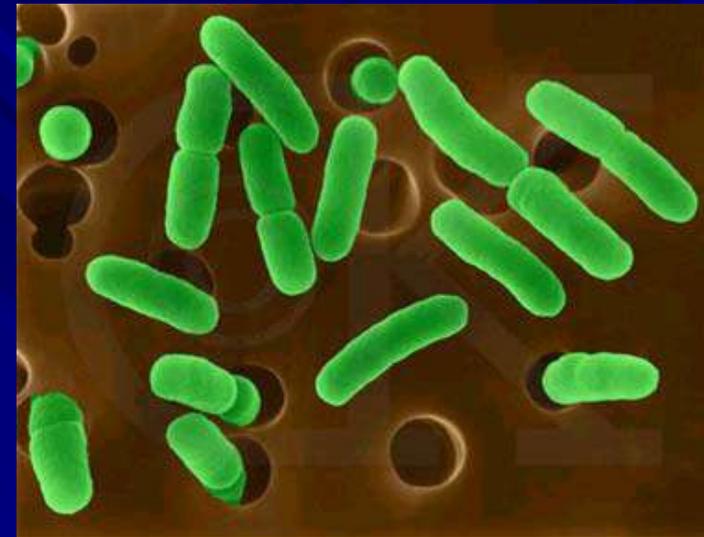
Hospedeiros procarióticos

- A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram (-) com um único cromossomo. A expressão gênica (transcrição e tradução) está ligada, com a síntese de RNAm ficando imediatamente disponível para a tradução.
- Não há maturação do RNAm como acontece nas células eucarióticas. A *Escherichia coli* pode ser considerada como única, como a mais simples célula hospedeira.

Hospedeiros procarióticos

Além da *Escherichia coli*, outras bactérias podem ser usadas em experiências de clonagem de genes, como por exemplo, espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*.

Escherichia coli



- Na realização de um trabalho com DNA recombinante freqüentemente o objetivo é clonar um gene em *E.coli* e conseguir a expressão deste gene.
- Antes de utilizar o sistema de *E.coli* é importante saber alguns conceitos genéticos de *E.coli*.

Escherichia coli

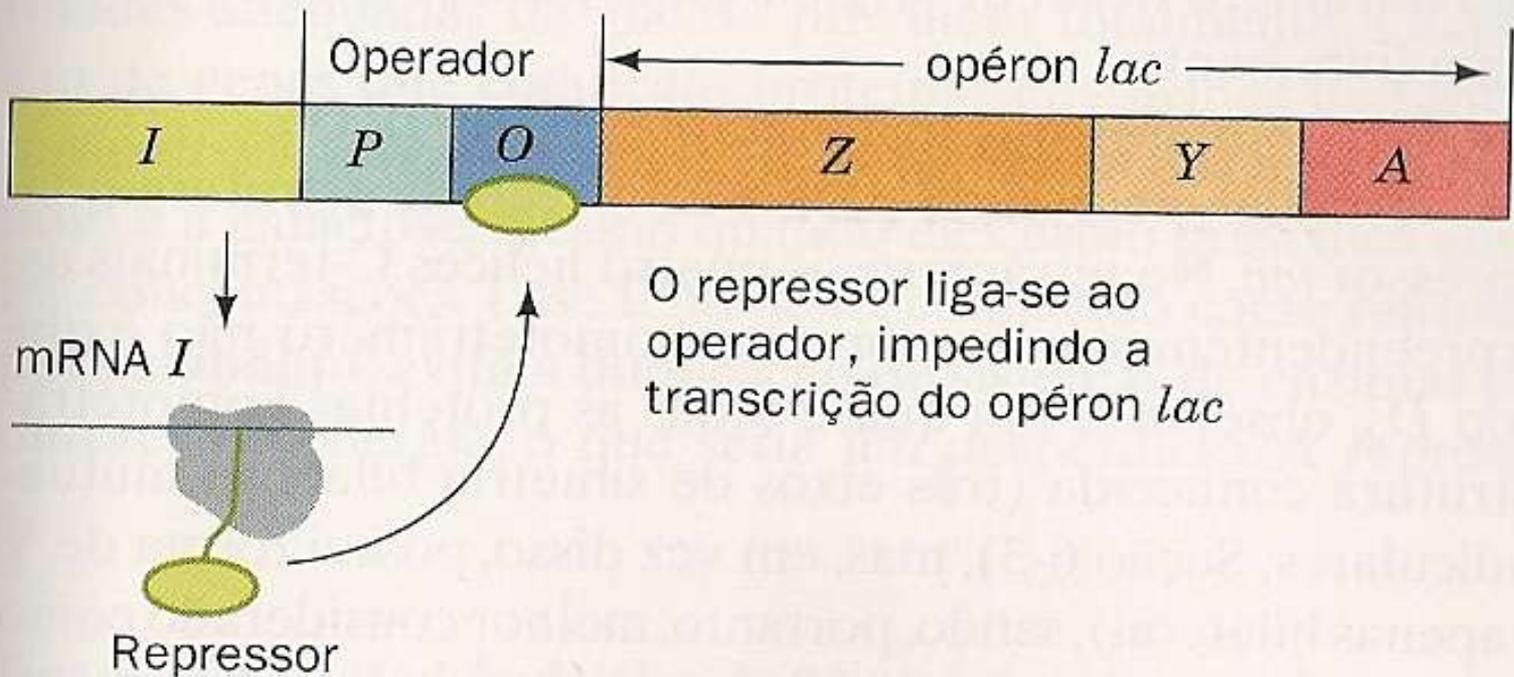
- Em *E.coli* os genes são organizados para formar *operons*.
- Genes organizados em *operons* são normalmente expressos em um promotor e sua transcrição é coordenada.
- A transcrição pode ser regulada de forma positiva ou negativa

Regulação Negativa

- A regulação negativa ocorre pelo uso de proteínas repressoras que ligam em sítios chamados operadores localizados próximos a promotores.
- Alguns repressores podem funcionar simplesmente bloqueando a RNA polimerase se ligando no promotor, mas outras proteínas podem atuar prevenindo outro componente da iniciação da transcrição

Regulação Negativa

(a) Ausência de indutor



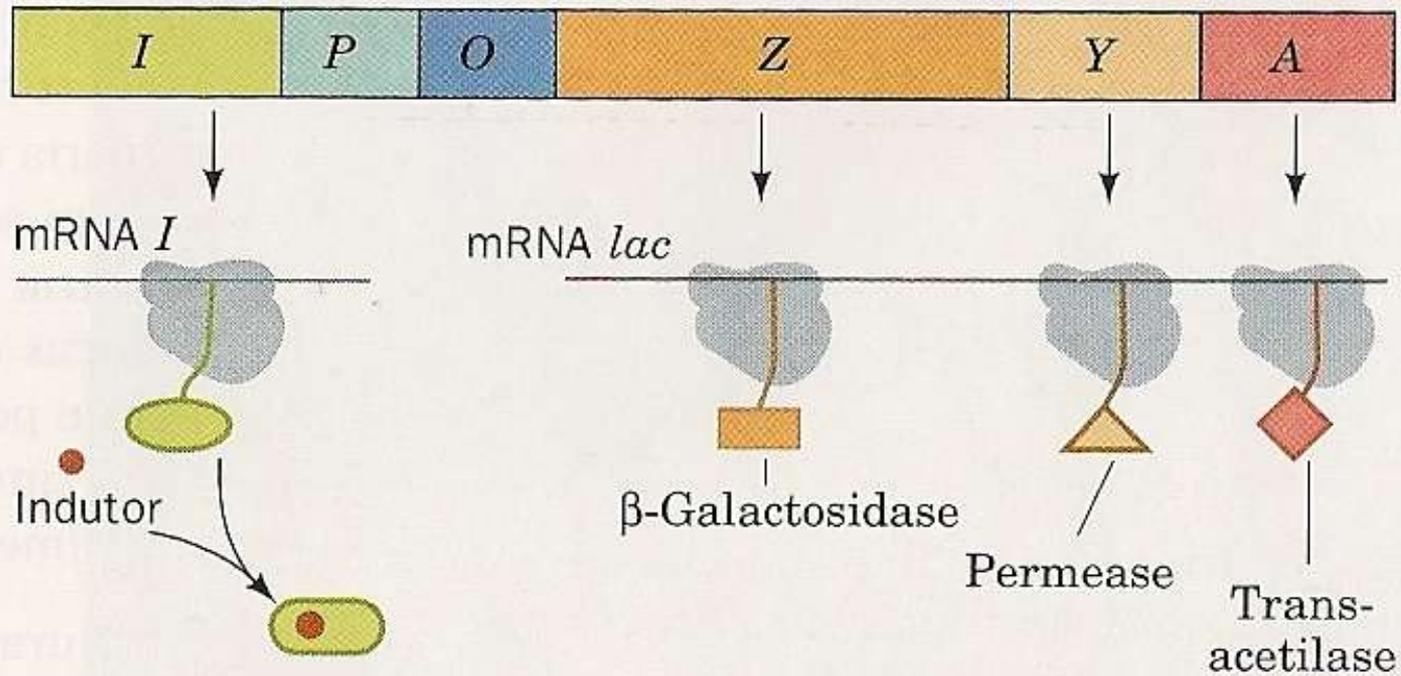
Regulação Negativa

- Promotores sujeitos a regulação negativa são freqüentemente promotores fortes, que podem ser transcritos prontamente. Conseqüentemente a regulação negativa para estes promotores é muito eficiente.
- Para cada repressor há um mecanismo para liberar a repressão. Esse processo é chamado indução.

Regulação Negativa

- A indução acontece na presença de alguma substância que se liga no repressor e inibe a repressão

(b) **Presença de indutor**



O complexo indutor-repressor não se liga ao operador

Transcrição e tradução de genes estruturais *lac*

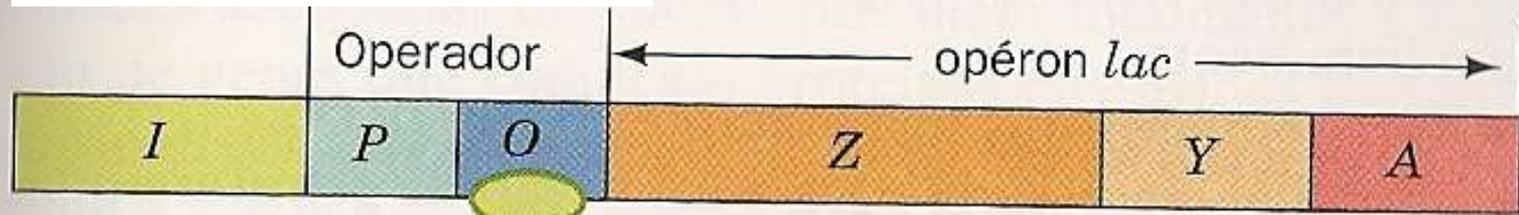
Regulação positiva

- A regulação positiva é exercida por proteínas chamadas ativadoras que se ligam a sítios do DNA localizados próximos aos promotores.
- Os ativadores podem permitir que a RNA polimerase se ligue mais prontamente ao promotor.

Regulação positiva

- A atividade dos reguladores pode ser controlada. Em alguns casos, é controlada pela presença de um ligante.

Regulação positiva



Proteínas ativadoras se ligam a sítios do DNA localizados próximos aos promotores e permitem que a RNA polimerase se ligue mais prontamente ao promotor.

Escherichia coli

- *Escherichia coli* - patogênica a humanos
- cromossomo circular 4.639 pb
- cepas derivadas de K-12
- cepas + utilizadas
 - denominadas por uma ou mais letras + números
 - JM 109, HB 101, DH5- α , DH10, BL21, XL blue,.....

Escherichia coli

- Crescimento rápido a 37°C (ciclo de 20 min)
- Meio mínimo
 - Glicose: melhor fonte de C
 - Extrato de levedura: nutrientes essenciais
 - Triptona e Peptona: fonte aminoácidos
- Cepas de *E. coli* - sem plasmídeo
- Introdução de plasmídeo = transformação que pode ser com tratamento químico (CaCl_2) ou físico (eletroporação)

Hospedeiros Eucarióticos

- Uma desvantagem na utilização de *Escherichia coli* como hospedeiro de clonagem, é que ela pertence a uma célula procariótica, e portanto falta a membrana nuclear (e outras organelas) que se encontram nas células eucarióticas.
- Isto significa que alguns genes eucarióticos não funcionam em *Escherichia coli*, onde não estão no seu ambiente normal.

Hospedeiros Eucarióticos

- Se a produção de uma proteína eucariótica exige um sistema mais complexo, não deve ser fácil assegurar que um hospedeiro procariótico produza a totalidade das proteínas funcionais.

Hospedeiros Eucarióticos

Os eucariontes superiores apresentam um tipo diferente de problemas para a engenharia genética, muitos dos quais requerem soluções especializadas.

Hospedeiros Eucarióticos

Finalidades:

- O objetivo das experiências de clonagem numa planta superior ou animal é para alterar as características genéticas do organismo
- Produzir grandes quantidades de uma proteína particular.

Hospedeiros Eucarióticos

- A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o ser unicelular eucariótico favorito para a engenharia genética. Tem sido usado a séculos na produção da cerveja, do pão e tem sido muito estudado.

Hospedeiros Eucarióticos

- Nos termos da complexidade do genoma, *Saccharomyces cerevisiae* tem cerca de 6318 pares de bases contidos em 17 cromossomos

Hospedeiros Eucarióticos

- Outros fungos podem ser usados em experiências de clonagem de genes:
- *Aspergillus nidulans*
- *Neurospora crassa*.

Hospedeiros Eucarióticos

- As células animais e vegetais podem também ser usadas como hospedeiros para experiências de manipulação gênica.
- Algas unicelulares possuem todas as vantagens dos microrganismos pela sua estrutura e função de células vegetais, e o seu uso em manipulações gênicas cresce à medida que é mais estudada.

Aplicações da tecnologia do DNA recombinante

- Expressão de proteínas recombinantes
- Proteínas produzidas artificialmente a partir de genes clonados



- Tecnologia do DNA recombinante

Por que é importante produzir proteínas recombinantes?

- Dificuldade de se purificar proteínas a partir do tecido original
- Proteínas do tecido podem estar contaminadas
- Proteínas recombinantes podem ser “engenheiradas”
- Processo completamente controlado
- Quantidade
- Especificidade

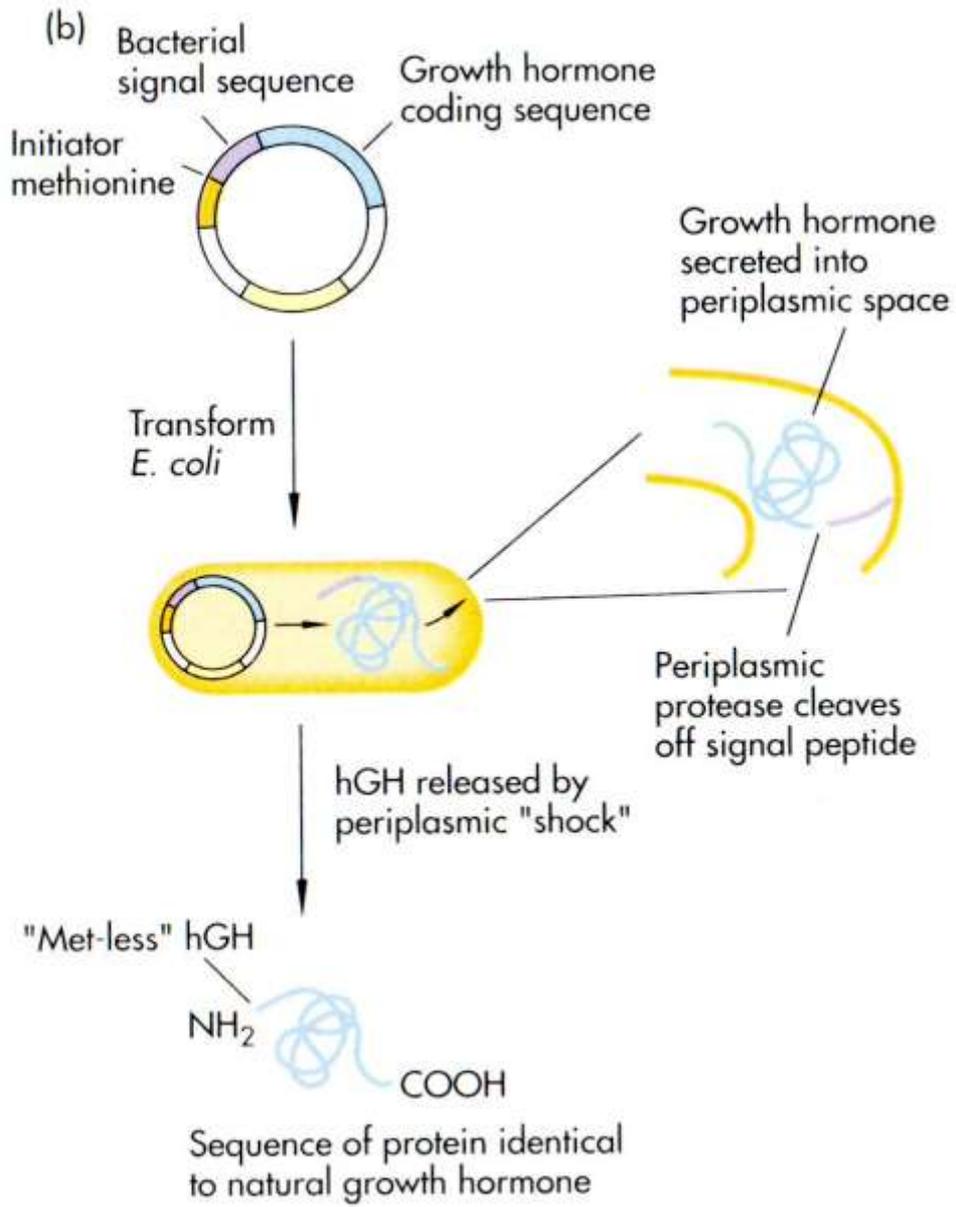
Table 9.1 Examples of proteins approved for clinical use which are produced using recombinant DNA methods

Name of Protein	Organism or Cell Type in Which it is Produced	Used in treatment of:
Insulin	<i>E. coli</i>	Diabetes mellitus
Human growth hormone (hGH)	<i>E. coli</i>	hGH deficiency in children
Various interferons	<i>E. coli</i>	Types of leukemia, chronic hepatitis C, genital warts, multiple sclerosis
Hirudin	<i>S. cerevisiae</i>	Thrombosis
Glucagon	<i>S. cerevisiae</i>	Hypoglycemia
Hepatitis B surface antigen (HBsAg)	<i>S. cerevisiae</i>	Component of vaccine against disease caused by infection with Hepatitis B virus
Factor VIII	Chinese hamster ovary cells (CHO cells)	Hemophilia
Erythropoietin	CHO cells	Anemia
Tissue plasminogen activator (tPA)	CHO cells	Heart attacks and strokes

- Duas aplicações extremamente importantes da tecnologia do DNA recombinante

■ Hormônio de crescimento humano recombinante

A administração deste hormônio durante a infância permite a correção dos casos de nanismo.



Hormônio de crescimento humano

Insulina Humana

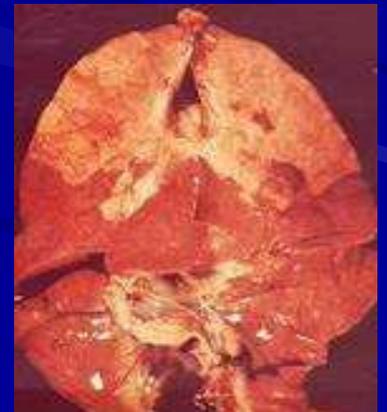
- **1922** - Frederick Grant Banting descobre a insulina.

Insulina purificada de pâncreas de pombos

Insulina porcina

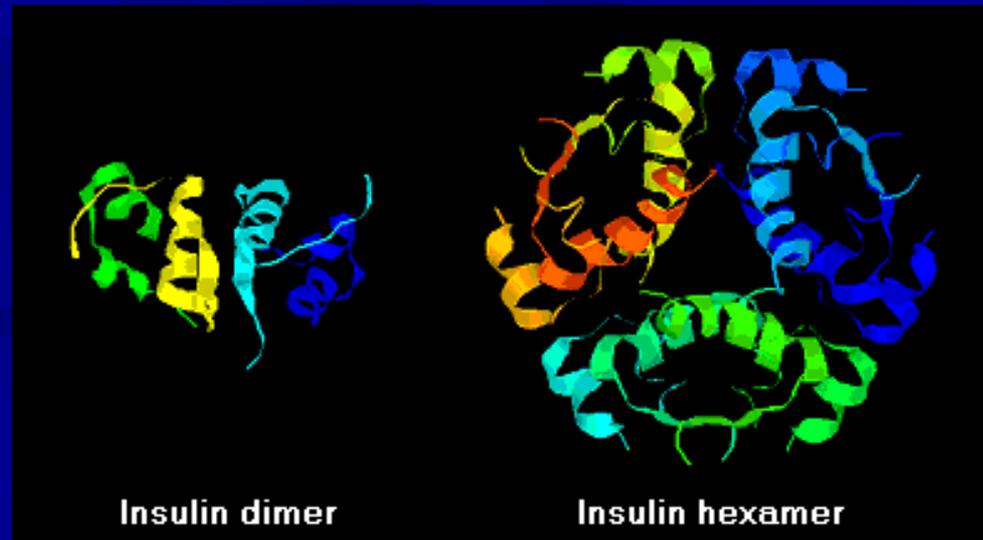


Mycoplasma hyopneumoniae

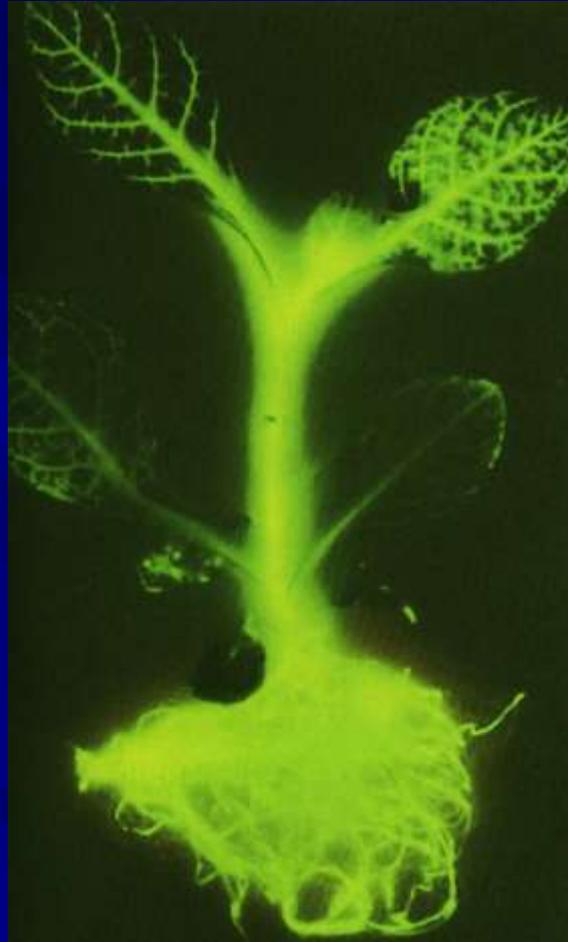


Aplicações da tecnologia do DNA recombinante

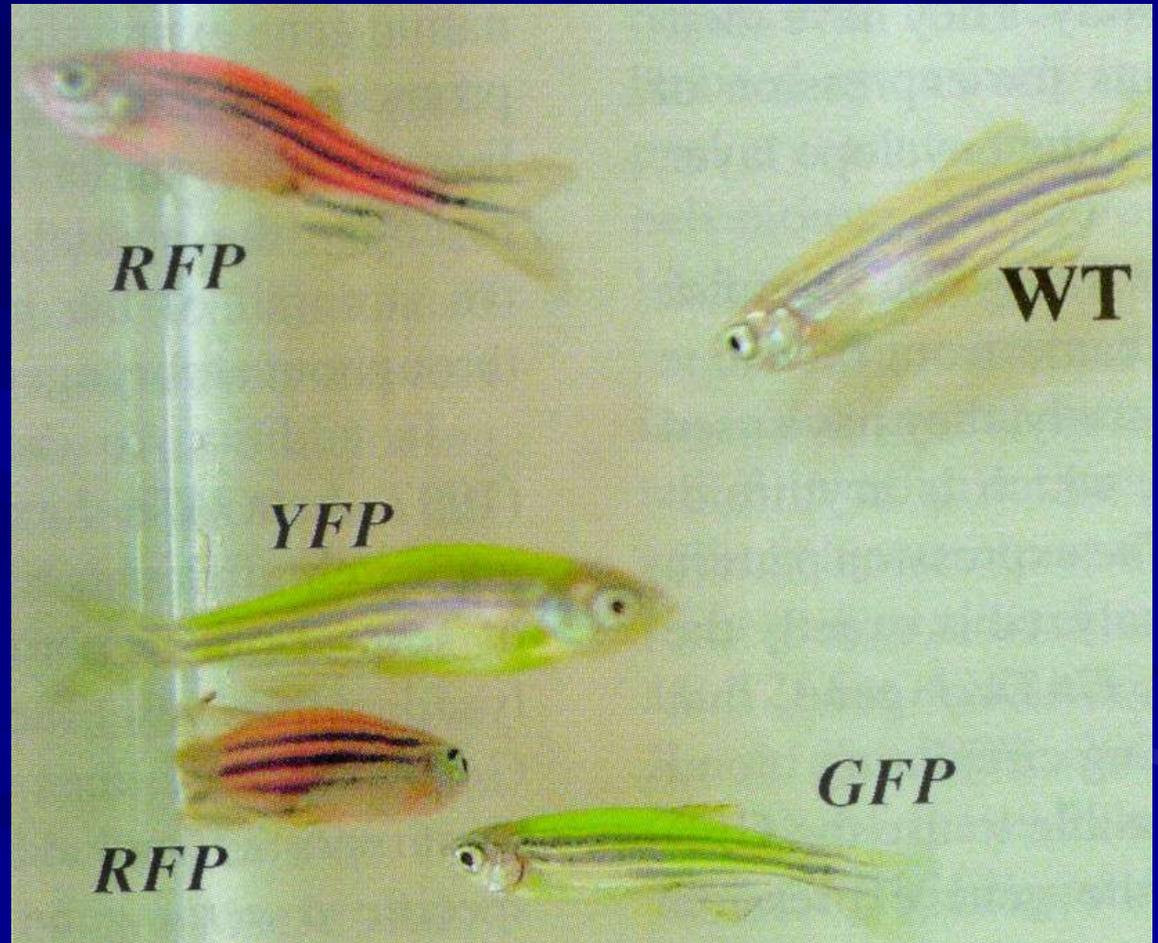
- **1978-** Insulina recombinante humana: possui uma das características mais importantes das proteínas recombinantes –especificidade
- **1982** - Esta insulina é disponibilizada no mercado.



Aplicações da tecnologia do DNA recombinante



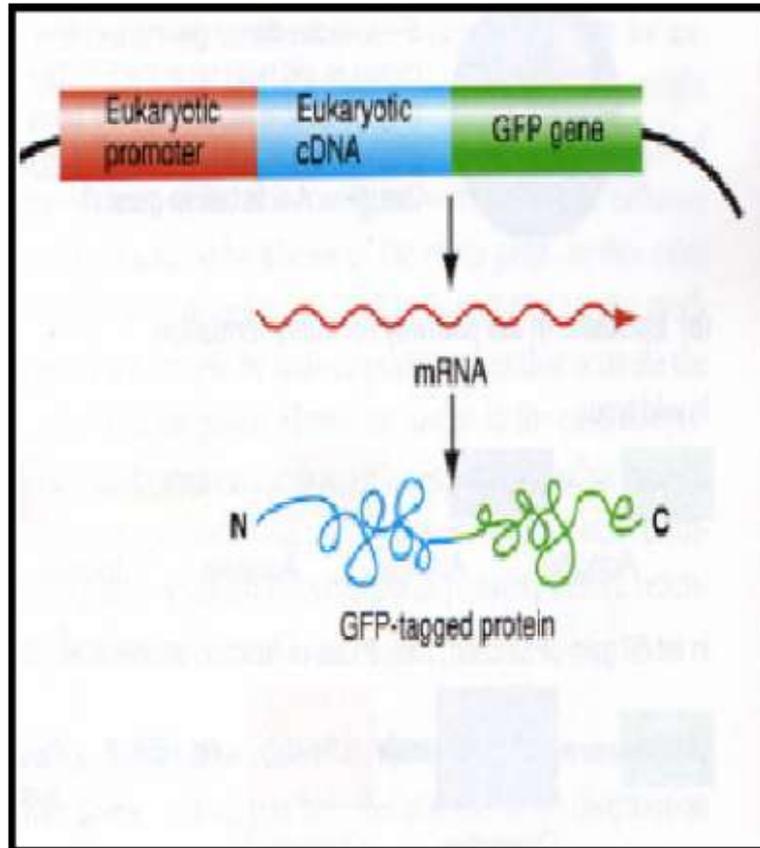
Aplicações da tecnologia do DNA recombinante



Zebrafish
transgênicos: genes
GFP, YFP, RFP

Utilização de genes repórter na localização de proteínas recombinantes

A) Proteína com tag GFP



B) Ratinho transgênico com GFP em fusão com uma proteína epitelial

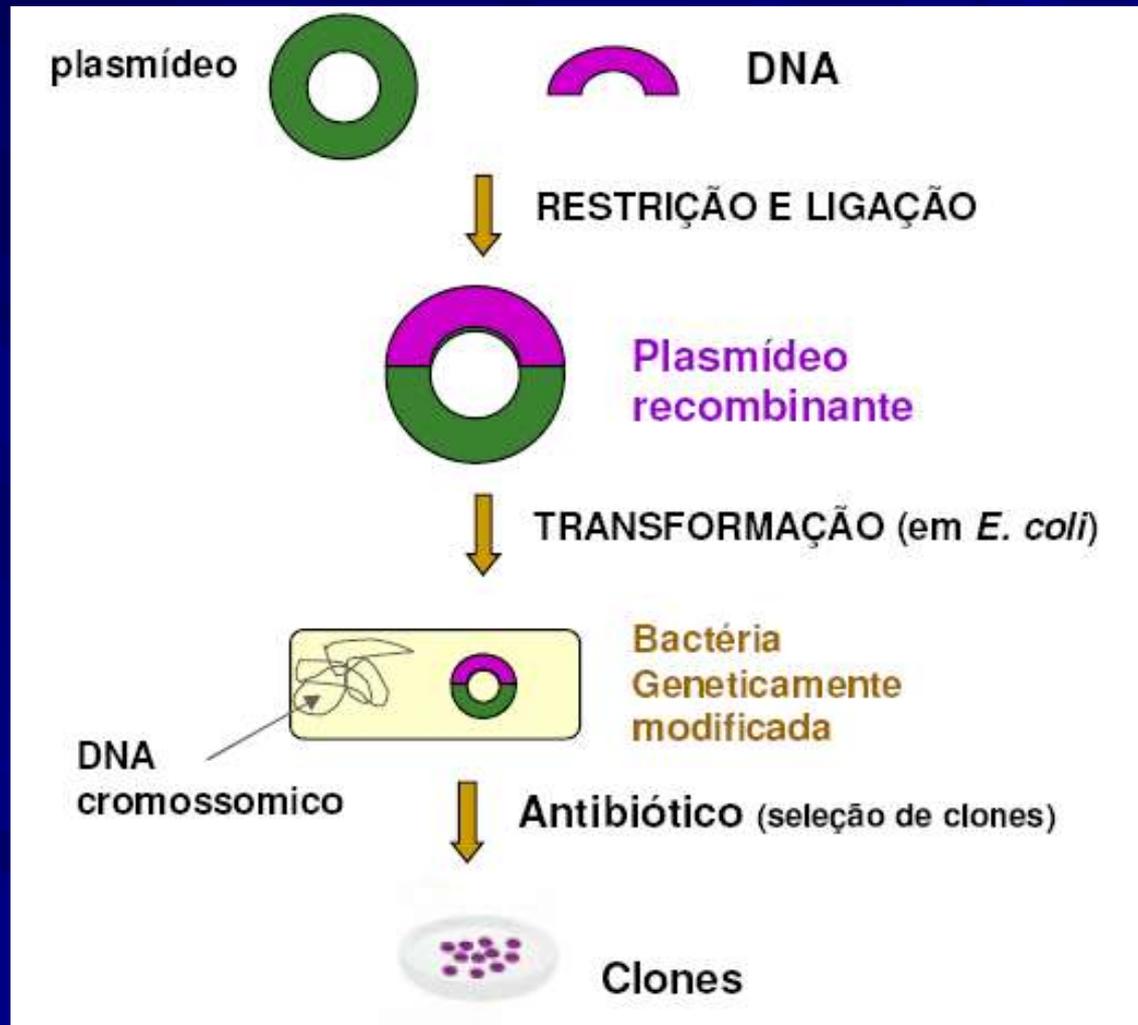


A) O gene recombinante codifica uma proteína de fusão que contém GFP C-terminal.

B) O ratinho contém um transgene marcado com GFP expresso no corpo; o ratinho fluoresce quando iluminado com luz UV.

Figure 19. 18 Genetics: From genes to Genomes, 2/e. (© McGraw-Hill Companies, 2004)

Clonagem



Passos da clonagem

- 1. Escolher um gene de interesse
- 2. Extração de DNA
- 3. Amplificar o fragmento de DNA por PCR
- 4. Isolar o fragmento de interesse no gel de agarose por eletroforese
- 5. “Cortar” o fragmento de DNA em posição definida com enzimas de restrição
- 6. “Cortar” o vetor de clonagem com as mesmas enzimas de restrição

Passos da clonagem

- 7. Ligar com vetor de clonagem utilizando a enzima T4 DNA ligase
- 8. Inserir a molécula recombinante em uma célula hospedeira competente: Transformação
- 9. Selecionar as células com DNA inserido: Seleção dos clones de interesse
- 10. Verificar presença de recombinantes

1. Escolher um gene de interesse:

- Verificar se há sequencias relacionadas depositadas no gene Bank
- National Center for Biotechnology Information

NCBI HomePage - Windows Internet Explorer

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Google multalin OK Enviar para multalin Configurações

NCBI HomePage


National Center for Biotechnology Information
 National Library of Medicine National Institutes of Health

PubMed All Databases BLAST OMIM Books TaxBrowser Structure

Search All Databases for Go

SITE MAP

Alphabetical List
Resource Guide

About NCBI
An introduction to NCBI

GenBank
Sequence submission support and software

Literature databases
PubMed, OMIM, Books, and PubMed Central

Molecular databases
Sequences, structures, and taxonomy

Genomic biology
The human genome, whole

What does NCBI do?

Established in 1988 as a national resource for molecular biology information, NCBI creates public databases, conducts research in computational biology, develops software tools for analyzing genome data, and disseminates biomedical information - all for the better understanding of molecular processes affecting human health and disease. [More...](#)

New dbGaP
NCBI's dbGaP Genome Wide Association Database

NCBI's dbGaP (database of Genotype and Phenotype) provides data from Genome Wide Association (GWA) studies. The resource is intended to help elucidate the link between genes and disease. For each study, users have access to detailed information about the phenotypic variables measured and pre-computed associations between subjects' phenotypes and genotypes. Click here to read the press release. To read more about GWA projects, see NCBI's GWA resource page

BLAST
New BLAST interface beta release

Hot Spots

- ▶ Assembly Archive
- ▶ Clusters of orthologous groups
- ▶ Coffee Break, Genes & Disease, NCBI Handbook
- ▶ Electronic PCR
- ▶ Entrez Home
- ▶ Entrez Tools
- ▶ Gene expression omnibus (GEO)
- ▶ Human genome resources
- ▶ Influenza Virus Resource
- ▶ Map Viewer
- ▶ dbMHC

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Search for [Save Search](#)

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display Show Sort by Send to

All: 2648 Current Only: 2598 Genes Genomes: 2516 SNP GeneView: 1913

Items 1 - 20 of 2648 Page of 133 [Next](#)

- 1:** [IGF1R](#) [Order cDNA clone](#), [Links](#)
Official Symbol IGF1R and **Name:** insulin-like growth factor 1 receptor [*Homo sapiens*]
Other Aliases: CD221, IGFIR, IGFR, JTK13, MGC142170, MGC142172, MGC18216
Other Designations: IGF-I receptor; insulin-like growth factor I receptor; soluble IGF1R variant 1; soluble IGF1R variant 2
Chromosome: 15; **Location:** 15q26.3
Annotation: Chromosome 15, NC_000015.9 (99192761..99507759)
MIM: 147370
GenID: 3480
- 2:** [FSI](#) [Links](#)
 fasting glucose and specific insulin levels [*Homo sapiens*]
Chromosome: 6; **Location:** 6q22-q23
MIM: 606035
GenID: 619503
- 3:** [IRS1](#) [Order cDNA clone](#), [Links](#)
Official Symbol IRS1 and **Name:** insulin receptor substrate 1 [*Homo sapiens*]
Other Aliases: HIRS-1
Other Designations: IRS-1
Chromosome: 2; **Location:** 2q36
Annotation: Chromosome 2, NC_000002.11 (227596033..227663506, complement)
MIM: 147545
GenID: 3667
- 4:** [IL2RA](#) [Order cDNA clone](#), [Links](#)
Official Symbol IL2RA and **Name:** interleukin 2 receptor, alpha [*Homo sapiens*]
Other Aliases: RP11-536K7.1, CD25, IDDM10, IL2R, TCGFR
Other Designations: IL-2 receptor subunit alpha; IL-2-RA; IL-2R subunit alpha; IL2-RA; TAC antigen; interleukin-2 receptor subunit alpha; p55
Chromosome: 10; **Location:** 10p15-p14
Annotation: Chromosome 10, NC_000010.10 (6053506..6104272, complement)
MIM: 147700

Recent activity [Turn Off](#) [Clear](#)

[Gene](#)

[UniGene](#)

[Links](#)

[UniGene](#)

[» See more...](#)

1. [NM_005544.2](#) → [NP_005535.1](#) **insulin receptor substrate 1**

Source sequence(s) [AC010735,AW469017,BC053895](#)

Consensus CDS [CCDS2463.1](#)

UniProtKB/Swiss-Prot [P35568](#)

Related Ensembl [ENSP00000304895](#), [ENST00000305123](#)

Conserved Domains (2) [summary](#)

[cd01204](#)
Location:160 - 263
Blast Score: 504

IRS_PTB; Insulin receptor substrate (IRS) Phosphotyrosine-binding domain(PTB). This domain has a PH-like fold and is found in insulin receptor substrate molecules. IRS molecules have an N-terminal PH domain , which is followed by an IRS-like PTB domain. This...

[cd01257](#)
Location:12 - 113
Blast Score: 466

PH_IRS; Insulin receptor substrate (IRS) pleckstrin homology (PH) domain. PH domains are only found in eukaryotes, and are often involved in targeting proteins to the plasma membrane via lipid binding. PH domains are found in cellular signaling proteins such...

RefSeqs of Annotated Genomes: Build 37.1

The following sections contain reference sequences that belong to a specific genome build. [Explain](#)

Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37), Primary_Assembly

Genomic

1. **NC_000002.11**

Range 227596032..227663505, complement

Download [GenBank](#) [FASTA](#) [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

2. **NT_005403.17**

Range 77805450..77872923, complement

Download [GenBank](#) [FASTA](#) [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Alternate assembly (Celera)

Genomic

1. **AC_000045.1**

Range 221365559..221433035, complement

Download [GenBank](#) [FASTA](#) [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

2. **NW_921618.1**

Range 32280089..32347565, complement

Download [GenBank](#) [FASTA](#) [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

Alternate assembly (LuDaF)

```

/mol_type="genomic DNA"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="2"
gene 1..>67473
/gene="IRS1"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: BestRefseq."
/db_xref="GeneID:3667"
/db_xref="HGNC:6125"
/db_xref="MIM:147545"
mRNA join(1..3801,62540..67473)
/gene="IRS1"
/product="insulin receptor substrate 1"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: BestRefseq."
/transcript_id="NM_005544.2"
/db_xref="GI:187761322"
/db_xref="GeneID:3667"
/db_xref="HGNC:6125"
/db_xref="MIM:147545"
CDS 52..3780
/gene="IRS1"
/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: BestRefseq."
/codon_start=1
/product="insulin receptor substrate 1"
/protein_id="NP_005535.1"
/db_xref="GI:5031805"
/db_xref="CCDS:CCDS2463.1"
/db_xref="GeneID:3667"
/db_xref="HGNC:6125"
/db_xref="MIM:147545"

```

ORIGIN

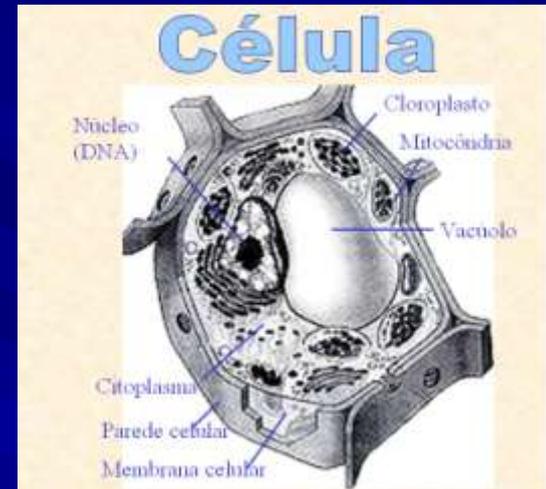
```

1 gttgtttttc ggagcctccc tctgctcagc gttggtggtg gcggtggcag catggcgagc
61 cctccggaga gcgatggctt ctccggacgtg cgcaaggtgg gctacctgcg caaacccaag
121 agcatgcaca aacgcttctt cgtactgcgc gcggccagcg aggctggggg cccggcgcgc
181 ctcgagtact acgagaacga gaagaagtgg cggcacaagt cgagcgcccc caaacgctcg
241 atcccccttg agagctgctt caacatcaac aagcgggctg actccaagaa caagcacctg
301 gtggctctct acaccgggga cgagcacttt gccatcgcgg cggacagcga ggccgagcaa
361 gacagctggt accaggctct cctacagctg cacaaccgtg ctaagggcca ccacgacgga
421 gctgcggccc tcggggcggg aggtggtggg ggcagctgca gcggcagctc cggccttggt
481 gaggtggtgg aggacttgag ctacgggtgac gtgccccag gacccgcatt caaagaggtc
541 tggcaagtga tcctgaagcc caagggcctg ggtcagacaa agaacctgat tggatatctac
601 cgcctttgcc tgaccagcaa gaccatcagc ttctggaagc tgaactcgga ggcagcgccc
661 gtggtgctgc agctgatgaa catcaggcgc tgtggccact cggaaaactt cttcttcac
721 gaggtgggcc gttctgccgt gacggggccc ggggagtctt ggatgcaggt ggatgactct
781 gtggtggccc agaacatgca cgagaccatc ctggaggcca tgggggcat gagtgatgag
841 ttccgccctc gcagcaagag ccagtcctcg tccaactgct ctaaccccat cagcgtcccc

```

2. Extração de ácidos nucleicos

- O DNA está presente nas células de todos os organismos ...



- Extração do DNA genômico do tecido

Os protocolos de extração são baseados:

- 1- Ruptura da parede celular (células vegetais) e membrana plasmática (todas as células)
- 2- Extração de proteínas
- 3- Precipitação do DNA em solução aquosa com agentes desidratantes (sais e álcoois)
- 4- Degradação do RNA residual

2-Amplificação do fragmento de DNA por PCR

Utiliza-se uma DNA polimerase em uma reação de síntese em um tubo

Existem dois pontos importantes nesta reação:

- 1- Ela permite a amplificação do DNA
- 2- Permite selecionar somente a parte do fragmento de DNA que codifica o gene

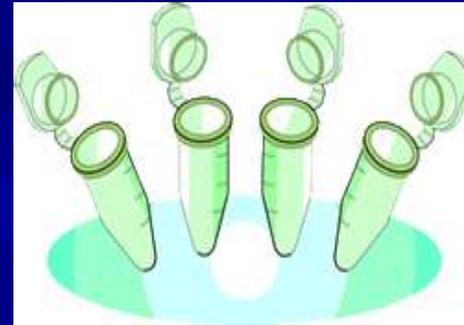
2-Amplificação do fragmento de DNA por PCR

Técnica *in vitro* utilizada para sintetizar muitas cópias de DNA

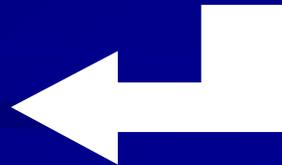
Amplificar uma seqüência alvo específica



Termociclador



DNA molde
dNTP
DNA polimerase
Primers



2-Amplificação do fragmento de DNA por PCR

- Kary Mullis percebeu que utilizando dois *primers* era possível definir a região que se deseja amplificar.

Left hand primer

5'GTCGACGCTGGTTGTTGTG3'

5'GTCGACGCTGGTTGTTGTGGGTGGACAGCGCAGATCGATCCAGAGATGATACTACAGGTT3'

3'CAGCTGCGACCAACAACACCCACCTGTGCGCTCTAGCTAGGTCTCTACTATGATGTCCAA5'

3'GGTCTCTACTATGATGTCCAA5'

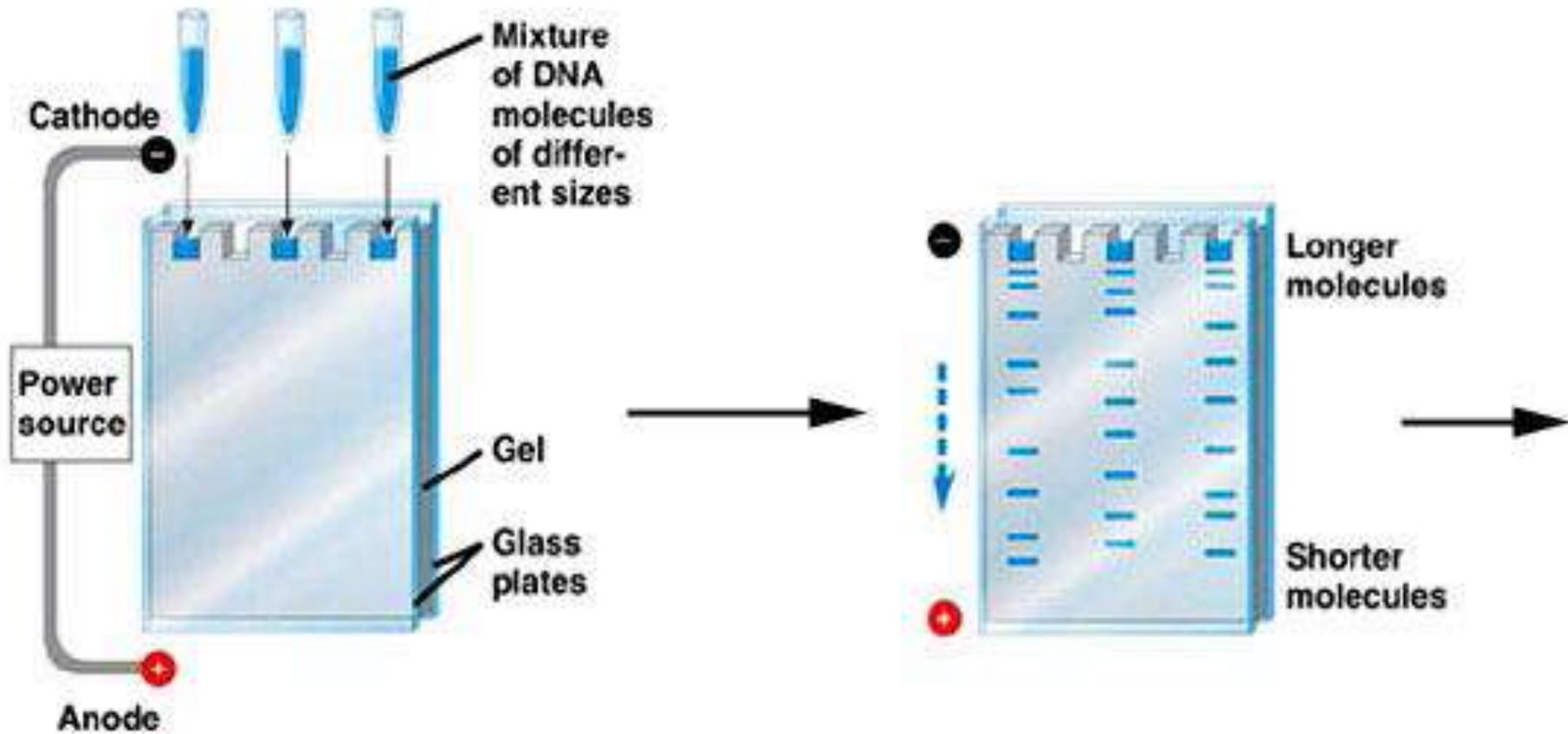
Right hand primer

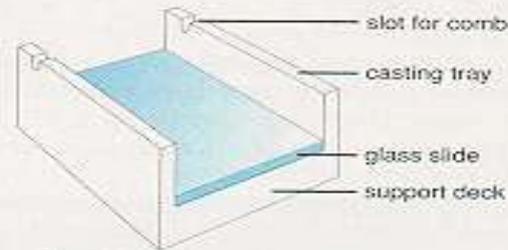
Figure 3.20 The sequence of a short stretch of double-stranded DNA is shown together with two oligonucleotide sequences (shown in bold) which could be used as PCR primers. The left-hand primer would anneal to the 3' end of the bottom strand and initiate synthesis in the direction of the right hand primer.

3-Eletroforese

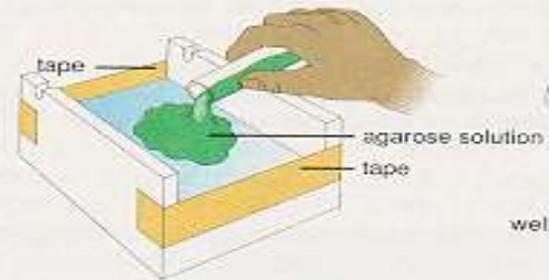
- Agarose
- Permite verificar a presença do produto de amplificação
- Permite purificar o fragmento de DNA de interesse para clonagem

3-Eletroforese

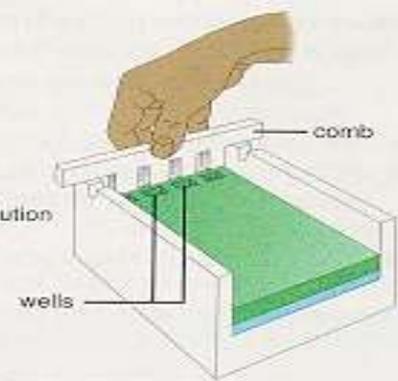




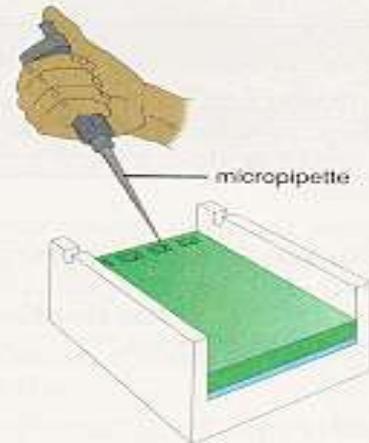
a. Casting tray for making gel slab



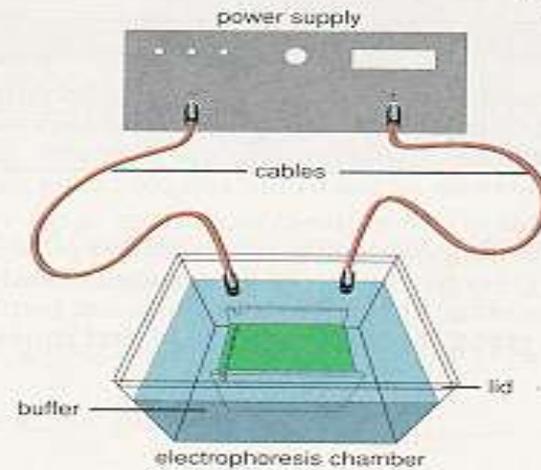
b. Agarose solution poured into casting tray



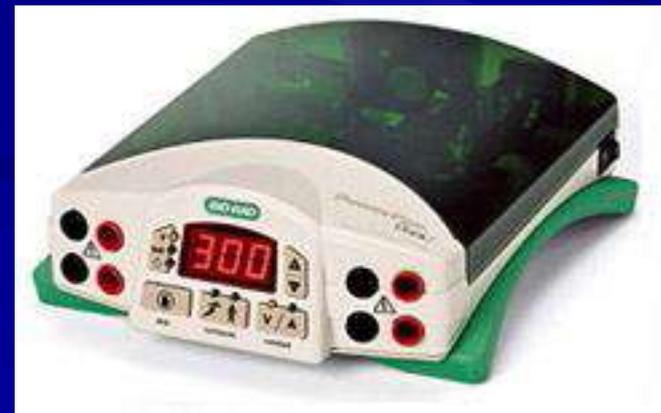
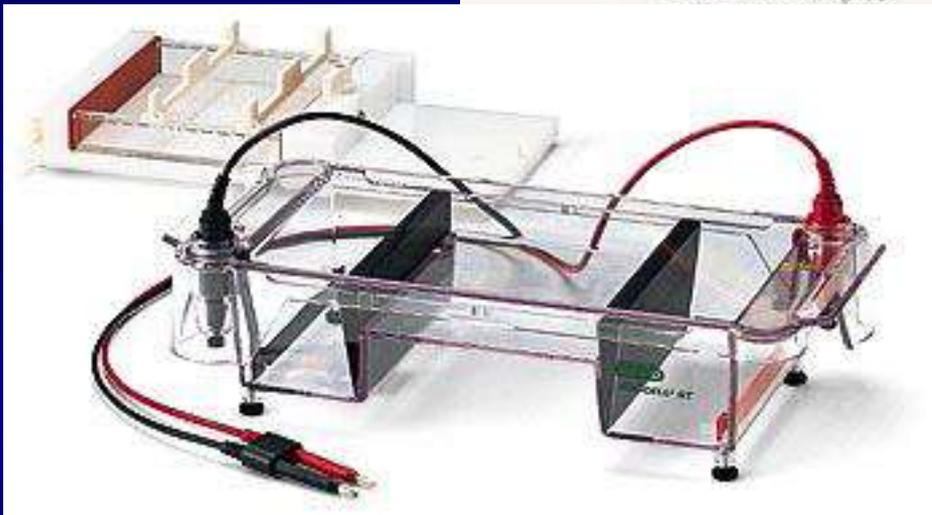
c. Comb that forms wells for samples



d. Wells that can be loaded with samples



e. Electrophoresis chamber and power supply

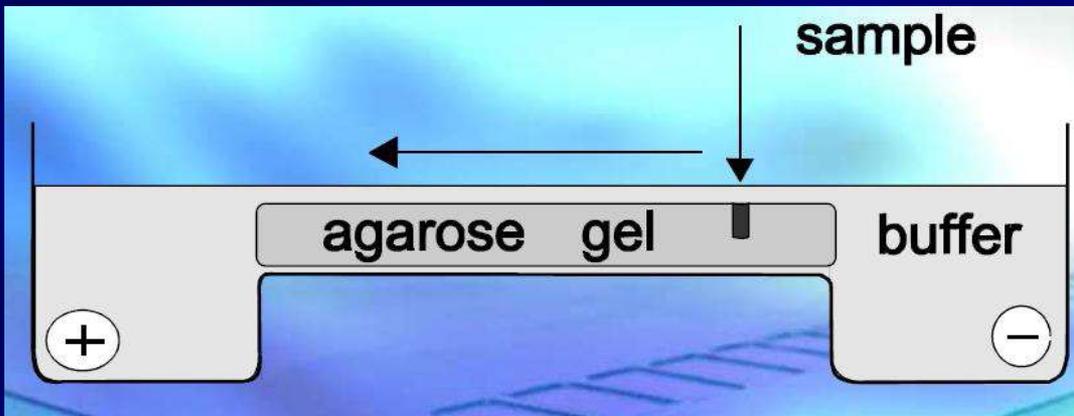


Eletroforese de DNA

Fase estacionária :Agarose

Eletroforese horizontal

Permite quantificar a concentração de DNA numa amostra

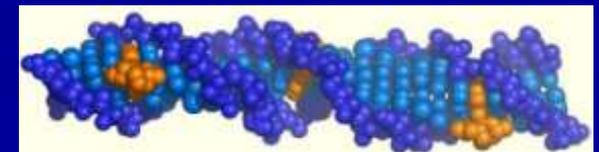


Incubação com brometo de Etídio

Exposição a luz UV



Excisão da banda de interesse do gel para posterior purificação

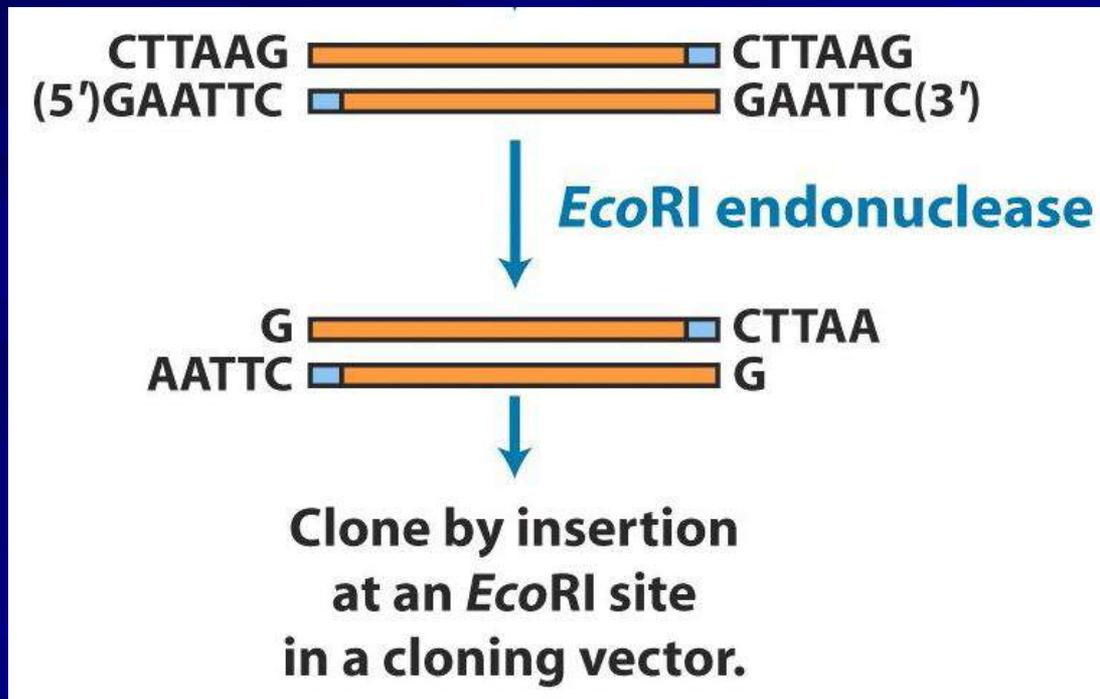


3-Eletroforese em gel de agarose

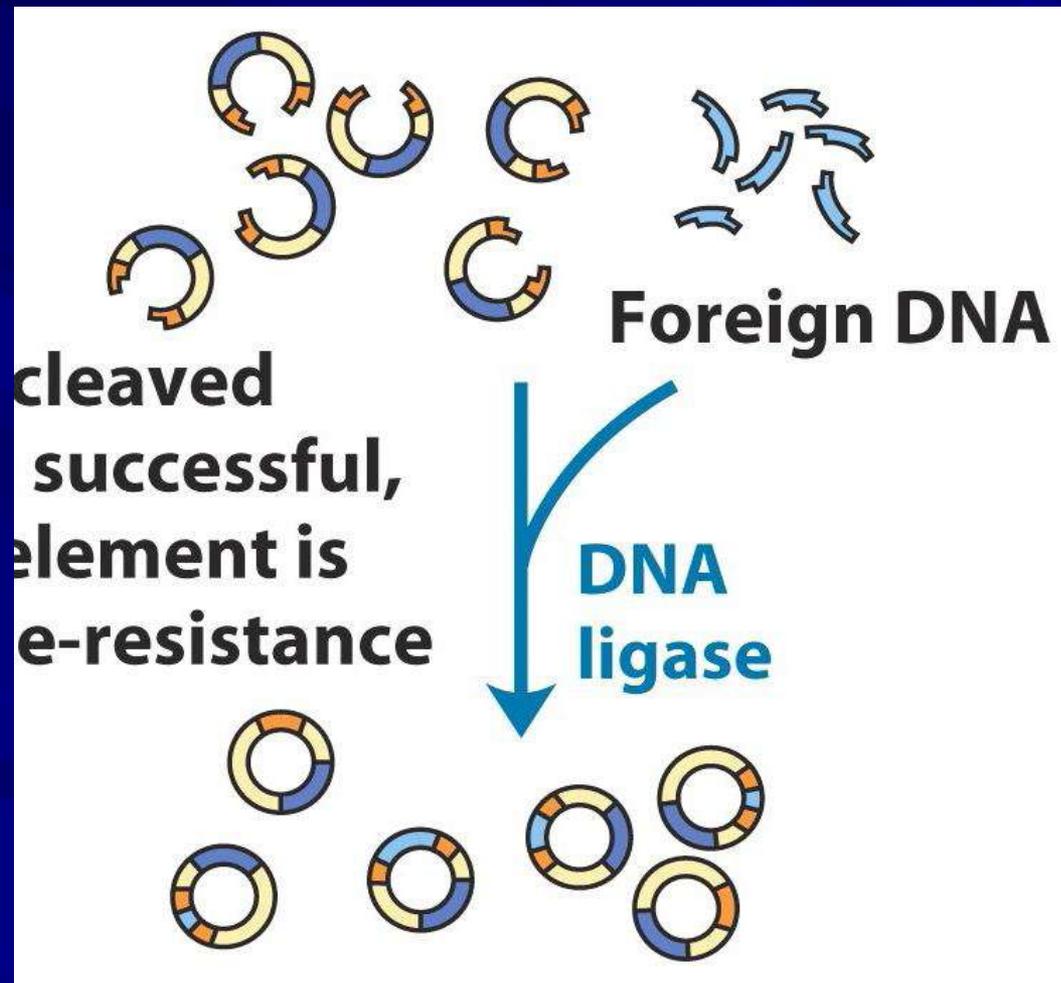
- Permite verificar a banda correspondente ao produto de amplificação por PCR e posterior purificação do inserto



4- Clivar o DNA e o Vetor com as Endonucleases de Restrição adequadas



5-Ligar o DNA e Vetor, digeridos com as mesmas Endonucleases de Restrição



Reação de ligação



Figure 3.3 a) Two DNA molecules with sticky ends generated by cutting with *EcoRI*, the bases making up the *EcoRI* restriction site are indicated in blue. b) Hydrogen bonding between complementary bases causes the molecules, transiently, to stick together. DNA ligase (indicated by gray shading) catalyzes the formation of a phosphodiester bond between the 5' phosphate on one molecule and the 3' hydroxyl on the other. c) The two molecules are now covalently linked by the top strand. The nick in the bottom strand may also be sealed by DNA ligase, or may be repaired by the host bacterium.

Reação de ligação

- **Total de DNA em reação de ligação:**
 - 1 a 10 ng/ml reação (volume de reação 20 μ l)
 - ligações mais difíceis - mais DNA
- **Condições:**
 - balanço entre tempo e temperatura (ótimo 25°C)

Em função tipo de terminação:

- coesivo = 15 -20°C por 3 a 16 horas
- abrupto = 4 -16°C por 4 a 18 horas

Reação de ligação

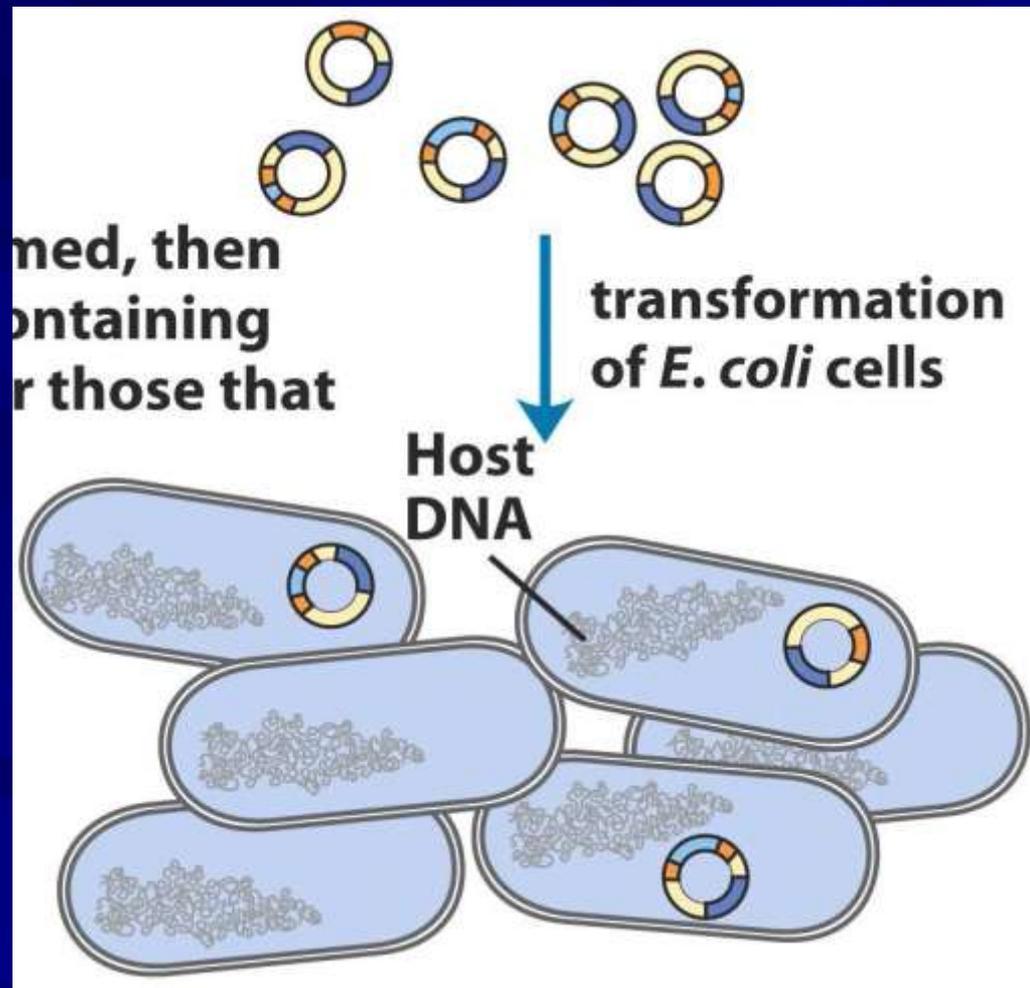
■ Condições:

- relação molar
- inserto: vetor (3:1)
 - $\frac{(\text{ng de vetor} \times \text{tamanho inserto em kb}) \times (\text{inserto:veto})}{\text{tamanho vetor kb}}$
- total de DNA
- tamanho do inserto
- tempo e temperatura de incubação
- requer [ATP] = 0,01 a 1 mM
- requer 10 mM MgCl₂

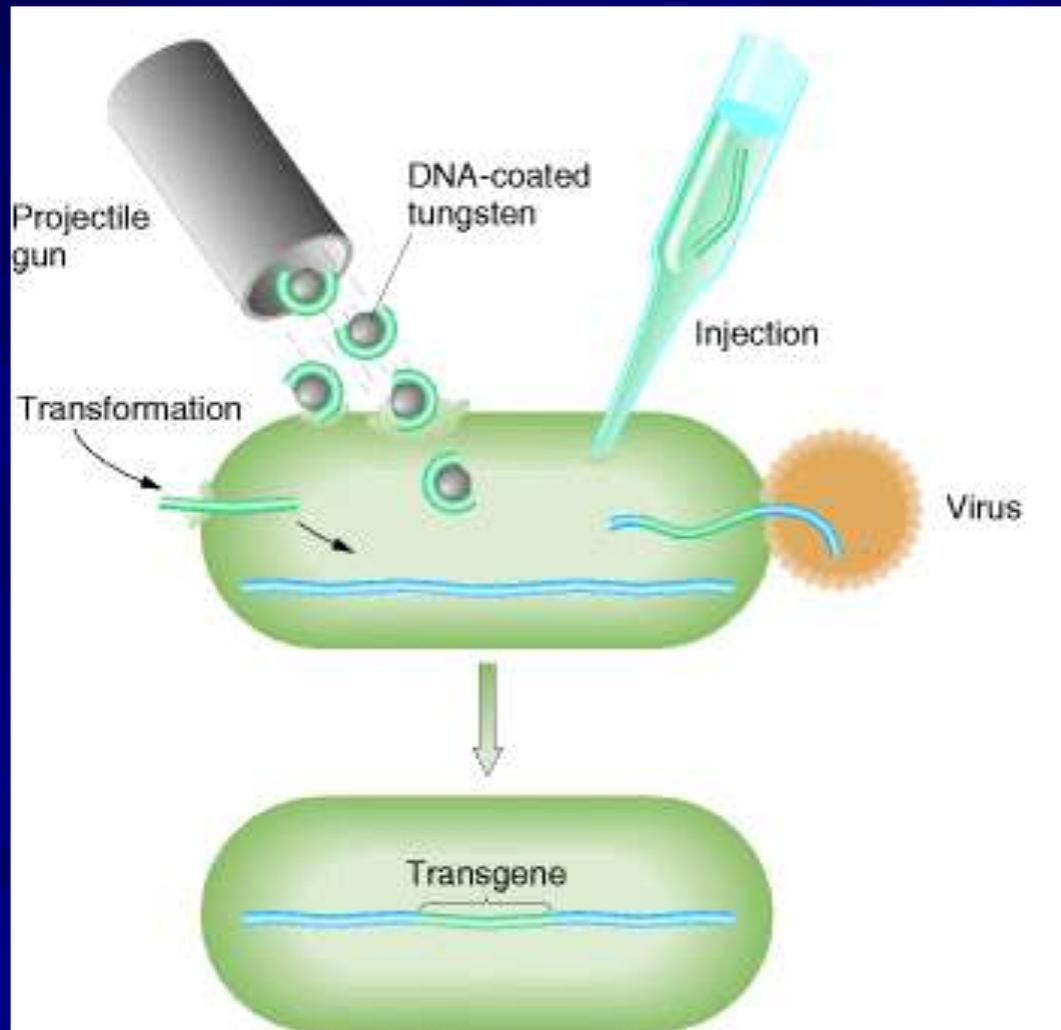
6- Transformação de células:

Etapa crucial para a criação de um clone:

A transformação pode ser por eletroporação - Choque térmico - Cálcio



6- Transformação de células:



Inserção de vetores recombinantes em uma células hospedeiras

- **Transformação** - a célula hospedeira é tornada competente para o vetor de clonagem ser introduzido
- **Transfecção** - quando o vetor de clonagem tem características de vírus, a célula hospedeira pode ser transfectada para inserir a molécula recombinante
- **Microprojéteis** - partículas cobertas com DNA são projetadas contra uma célula e penetram em sua membrana

Transformação

O passo final requerido na clonagem de um gene é introduzir o novo plasmídeo recombinante em células de *E.coli*.

Este processo é chamado transformação e envolve dois processos:

1- Colocar o DNA na célula bacteriana

2- A célula que vai receber o DNA recombinante precisa ser competente

Transformação

As células de *E.coli* precisam se tornar competentes. Isto é, precisam ser tratadas para se tornar aptas a receber o DNA. Há dois tipos de tratamento:

1- Tratamento químico

2- Eletroporação

Transformação por choque térmico utilizando células cálcio competentes

1- Tratamento químico da célula para torná-la competente:

A cultura deve crescer até a fase log, as células são centrifugadas e lavadas com tampão contendo cátions divalentes (CaCl_2) e suspensas em pequeno volume de tampão

Para introduzir o DNA nestas células, uma pequena amostra da suspensão bacteriana é misturada em um tubo com a reação de ligação e a mistura é submetida a choque térmico de $42\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto.

Transformação por choque térmico utilizando células cálcio competentes

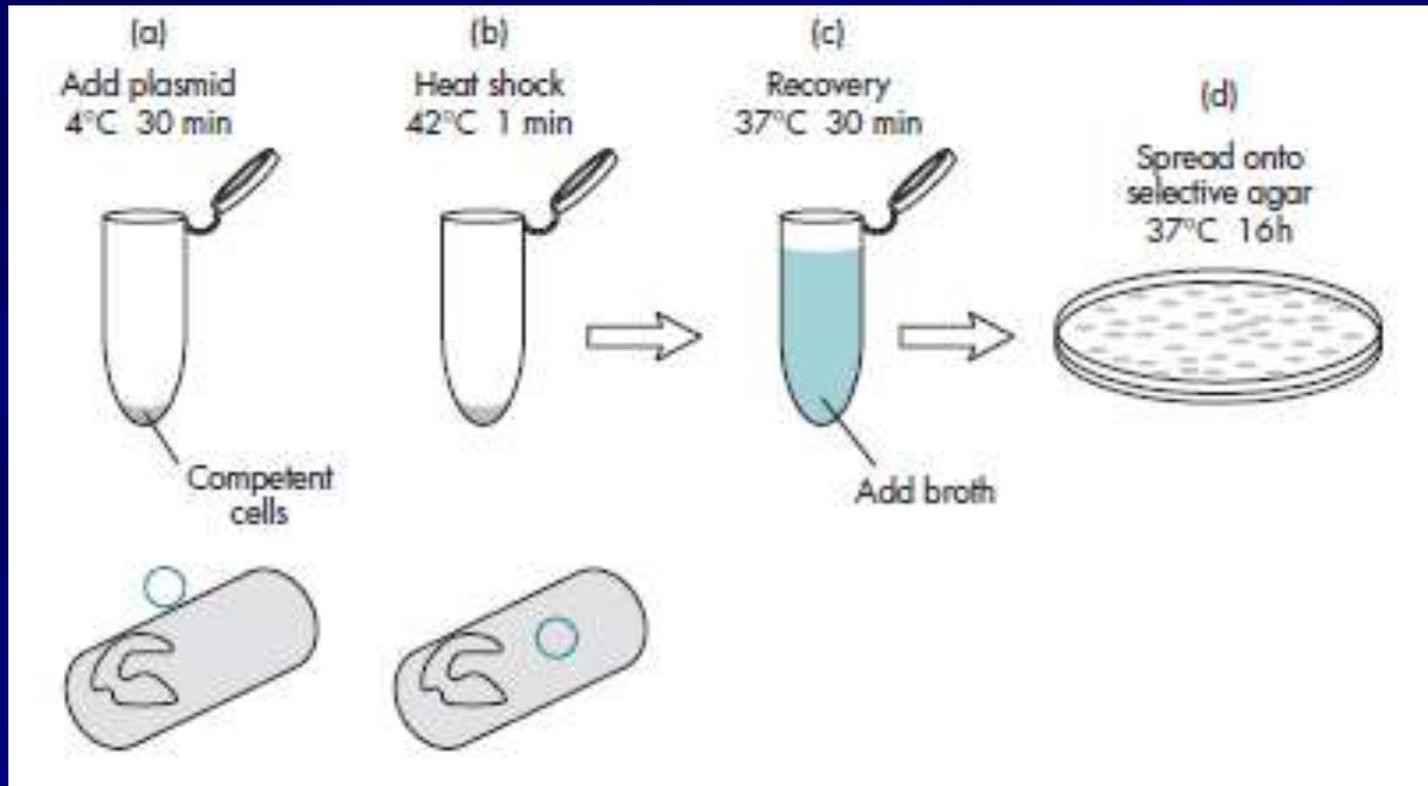


Figure 3.5 Bacteria can be made competent to take up DNA by washing in ice cold CaCl_2 . a) A very dense suspension of competent bacteria is then mixed with plasmid DNA, during this stage the plasmids become attached to the outer surface of the bacteria. b) After heat shock the plasmids are taken up by some of the bacteria. c) Broth is added to the suspension and the bacteria are allowed to recover before d) being plated onto selective agar to detect those which have taken up the plasmid.

Transformação por eletroporação utilizando células competentes

Uma alternativa ao tratamento químico de *E.coli* é preparar células competentes por eletroporação.

Neste processo a bactéria cresce em meio de cultura até a fase *log* e é centrifugada e lavada com água gelada. Uma pequena suspensão bacteriana é misturada com a reação de ligação em uma cubeta de eletroporação e um curto pulso elétrico sob uma corrente de alta voltagem faz a membrana bacteriana se tornar permeável e mover o DNA para dentro da célula.

Células
Competentes
+
Reação de
ligação



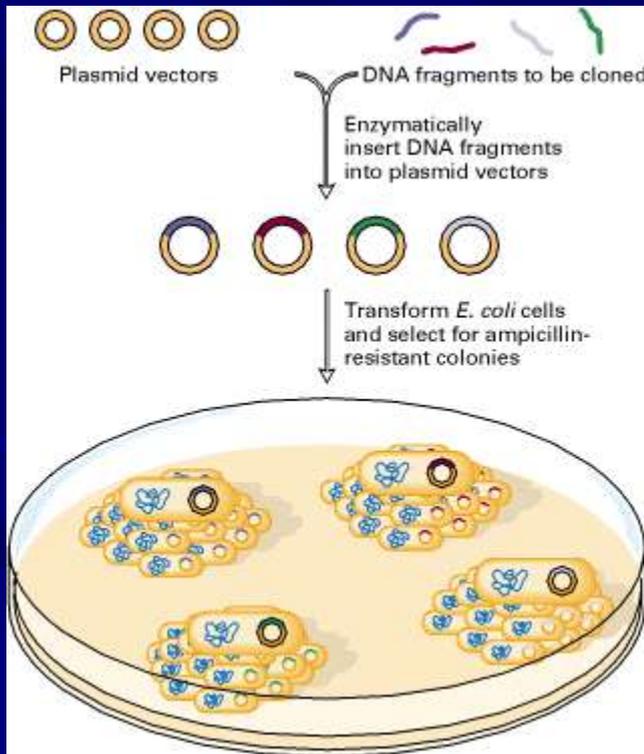
Cubeta



Eletroporador



2008.05.12



Transformação

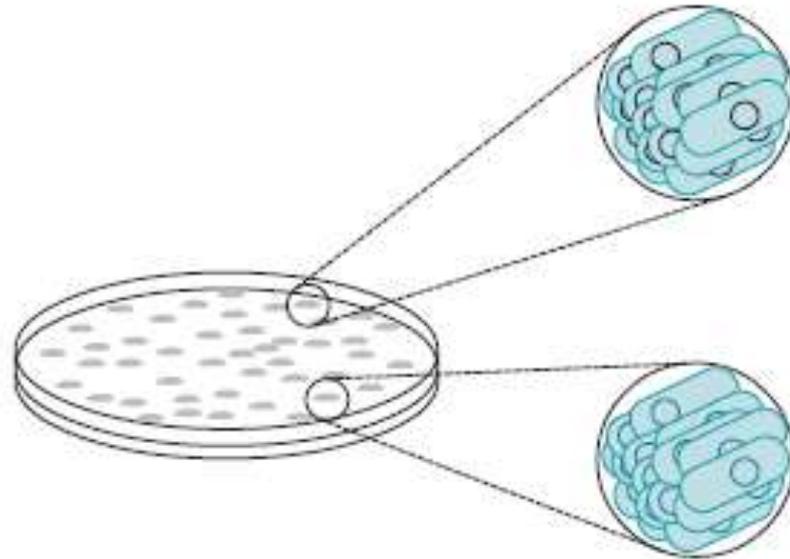
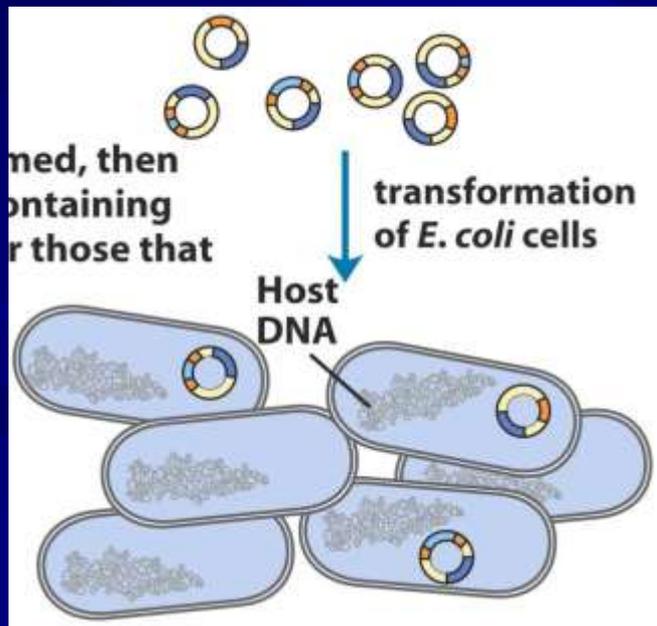


Figure 3.6 Each colony growing on an agar plate is derived from a single bacterium that has grown and divided many times. Each bacterium within a single colony is a clone because, barring mutation, it has exactly the same genetic makeup as the other members of the colony. If a mixed population of plasmids are introduced into bacteria, and the resulting transformants are plated onto agar, all of the cells in a single colony will contain the same plasmid, but this may be different from the plasmids contained in the cells in another colony.

7- 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

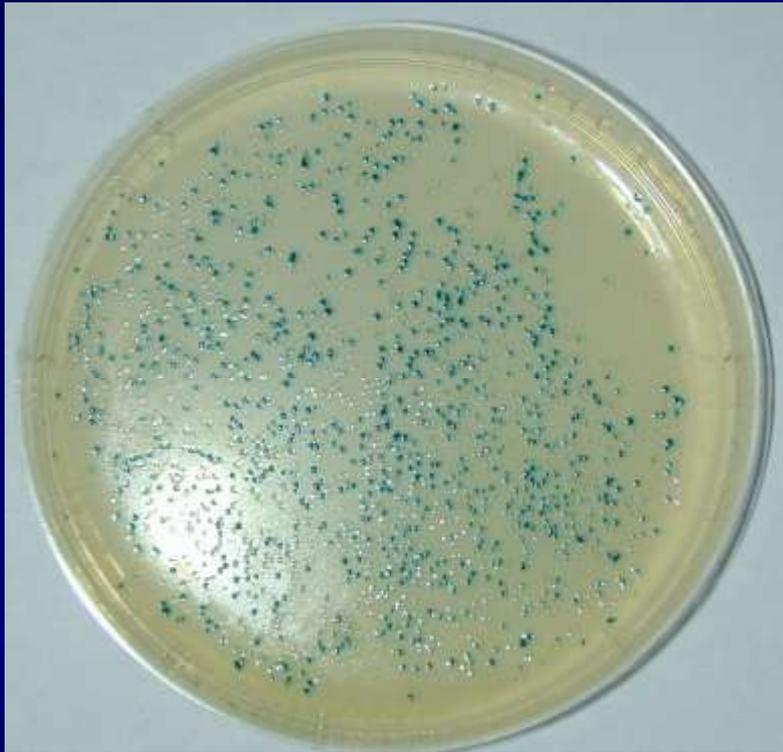


Plaqueamento em meio seletivo



Meio de cultura contendo ampicilina

7- Seleção de clones transformantes



8. Verificar presença de recombinantes

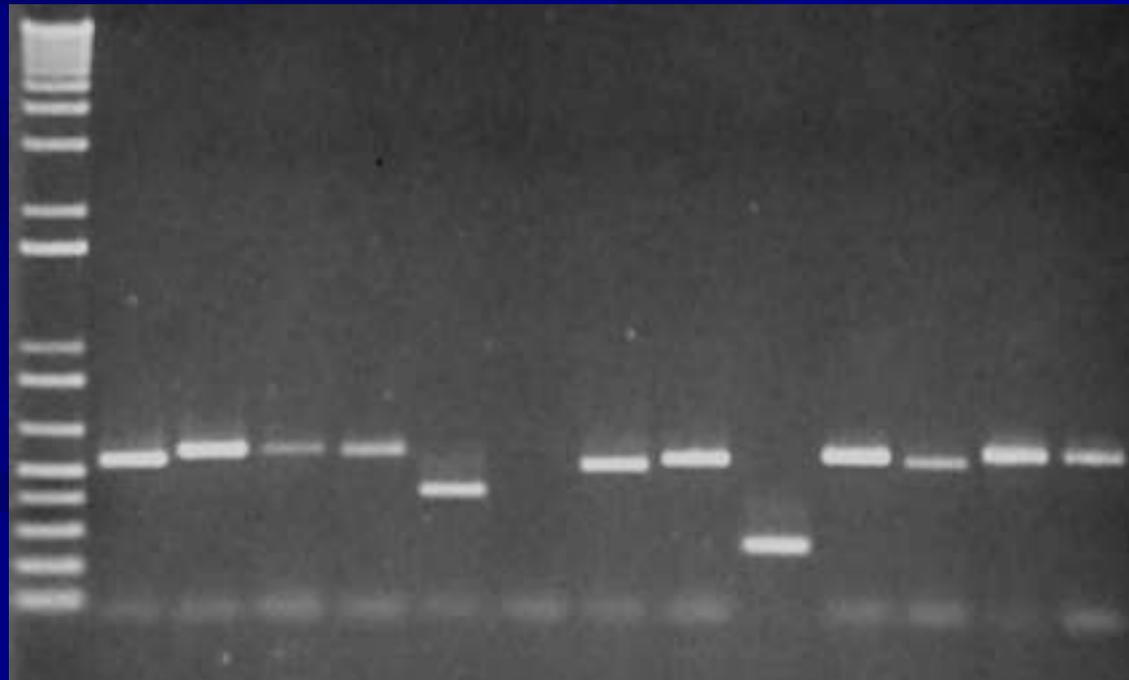
- 1- PCR das colônias recombinantes
- 2- Mini-Preps: retirar plasmídios das bactérias
- 3-Clivagem da ligação inserto-plasmídio com enzimas de restrição específicas
- 4- Sequenciamento do clone

Verificar presença de recombinantes

1- PCR das colônias recombinantes

Utilizar *primers* específicos para o gene inserido no plasmídeo.

Objetivo: amplificação do fragmento correspondente ao gene



Verificar presença de recombinantes

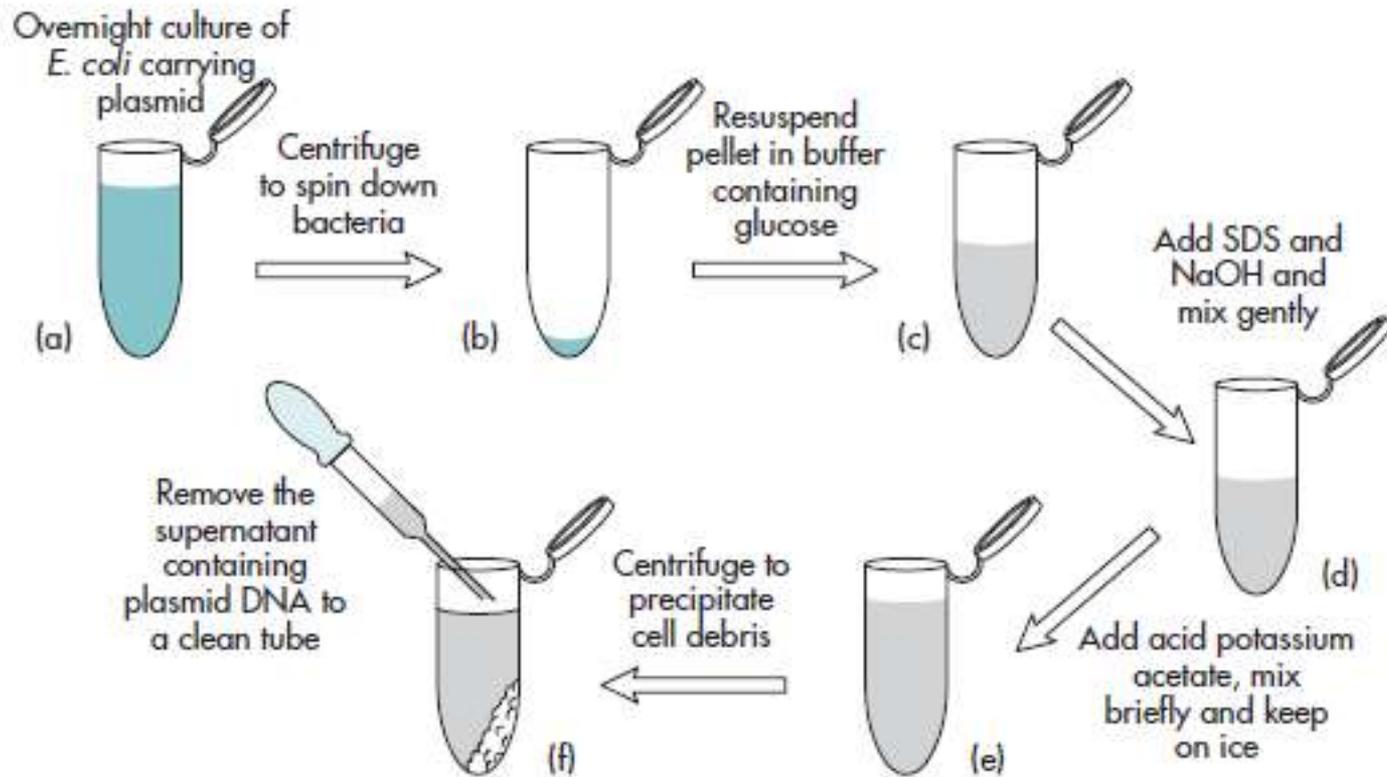
2- Mini-Preps: retirar plasmídios das bactérias

Extração de DNA plasmidial.

È necessário checar se o plasmídeo contém o fragmento de interesse

O procedimento é baseado no cultivo de uma colônia da placa de *E.coli* transformada com a molécula recombinante e remoção do DNA destas células.

2- Mini-Preps: retirar plasmídios das bactérias



Verificar presença de recombinantes:

3- Clivagem do clone obtido com enzimas de restrição específicas:

Após extração do DNA plasmidial: o possível clone recombinante será submetido a uma reação de clivagem com as mesmas enzimas de restrição que foram utilizadas na clonagem:

Resultado esperado: uma banda correspondente ao tamanho do fragmento clonado.

Verificar presença de recombinantes:

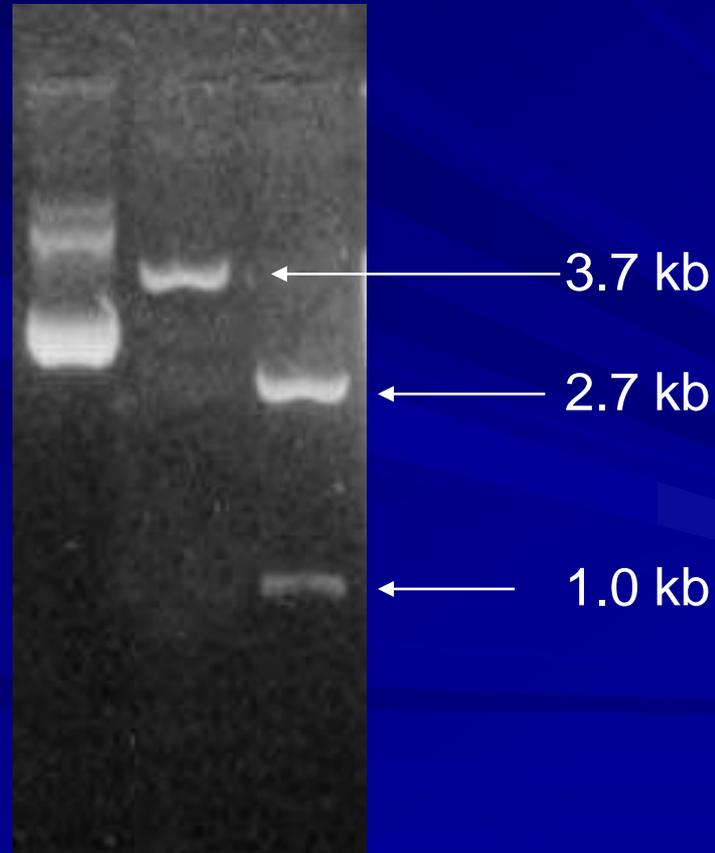
3- Clivagem do clone obtido com enzimas de restrição específicas:

Exemplo: Se você colocar um fragmento de DNA de 1 Kb no sítio de múltipla clonagem do vetor PUC 18 no sítio para *Eco* RI você espera clones que sejam resistentes a ampicilina e lac negativos

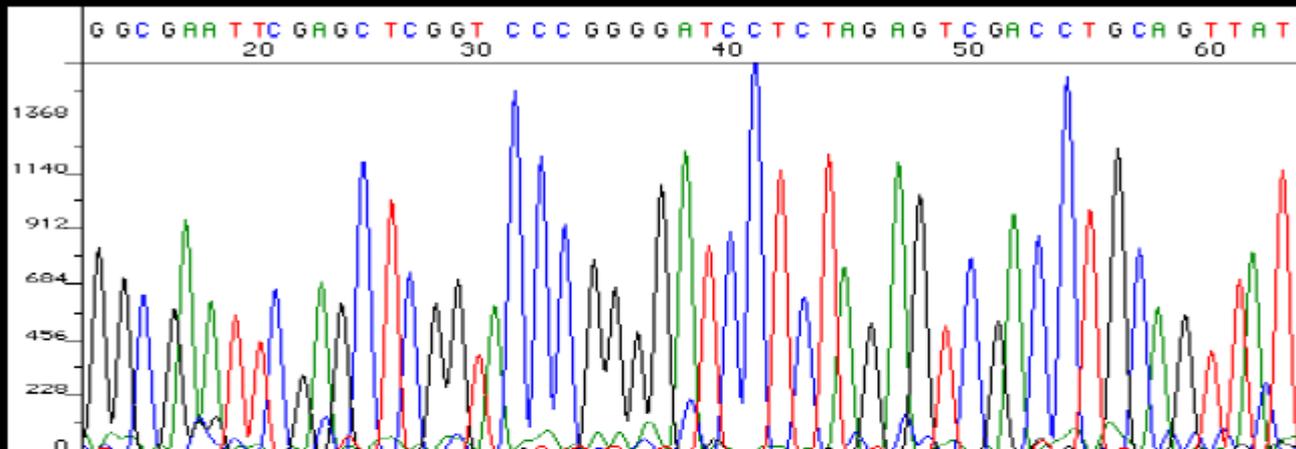
Se você clivar o plasmídeo recombinante com *Eco* RI:

- Verificar a presença de 2 fragmentos de 2.7 Kb representando o vetor e outra banda de 1 kb representando o inserto.
- Se clivar com a enzima *Hind* III, verificar a presença da banda de 3,7 Kb

3- Clivagem do clone obtido com enzimas de restrição específicas:



4- Sequenciamento dos clones



PHRED

```
gaattcggcaccgagagattctcccggagacgctccgtgccaagattatggaggccgtcaatgtggtcggttc
cgccactttgctcgcctgcgcacgatgtaacagtcctggtgacgaagtcataccgtaagtattacgt
tttgttgctcgttggtgcagcaatagtagaggacgggcgctttttttttgtcaagagaaaggggagggg
cgtactaccgctttatcgaggttggtattatttcttatatataaagggaaagagcaacgtgaagcgggtaa
gggaagagtgaaagtcgag
```