

RECOMBINAÇÃO GENÉTICA

Recombinação genética é a troca de genes entre duas moléculas de DNA, para formar novas combinações de genes.

Assim como a mutação, a recombinação genética contribui para a diversidade genética de uma população, que é a fonte da variação evolutiva.



-TRANSFORMAÇÃO

-CONJUGAÇÃO

-TRANSDUÇÃO

-TRANSFORMAÇÃO

Processo pelo qual um DNA extraído de uma célula doadora, chamado de DNA exógeno, consegue penetrar em uma célula receptora, de forma que, carregando informações genéticas diferentes daquelas da célula receptora ou hospedeira, consegue transferir essas informações para a mesma.

O fenômeno, descoberto em *Pneumococcus* (*Streptococcus*) *pneumoniae*, foi descrito em seguida para *Haemophylus*, *Neisseria*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* e em condições apropriadas, pode ser realizada em praticamente todas as bactérias. Também os eucariotos podem apresentar este tipo de recombinação.

Importância da transformação

- mostrar a existência de uma alternativa de sexo,
- provar que o DNA é o material genético,

- constituir em um sistema genético que permite estudos em bactérias de conjugação inexistente,**
- possibilidade de transferência intergenérica e interespecífica (estudo de correlação entre espécies e gêneros, mostrando homologias entre os DNAs),**
- um dos passos principais da Engenharia Genética.**

FASES DA TRANSFORMAÇÃO

1. Interação bactéria – DNA de células doadoras.

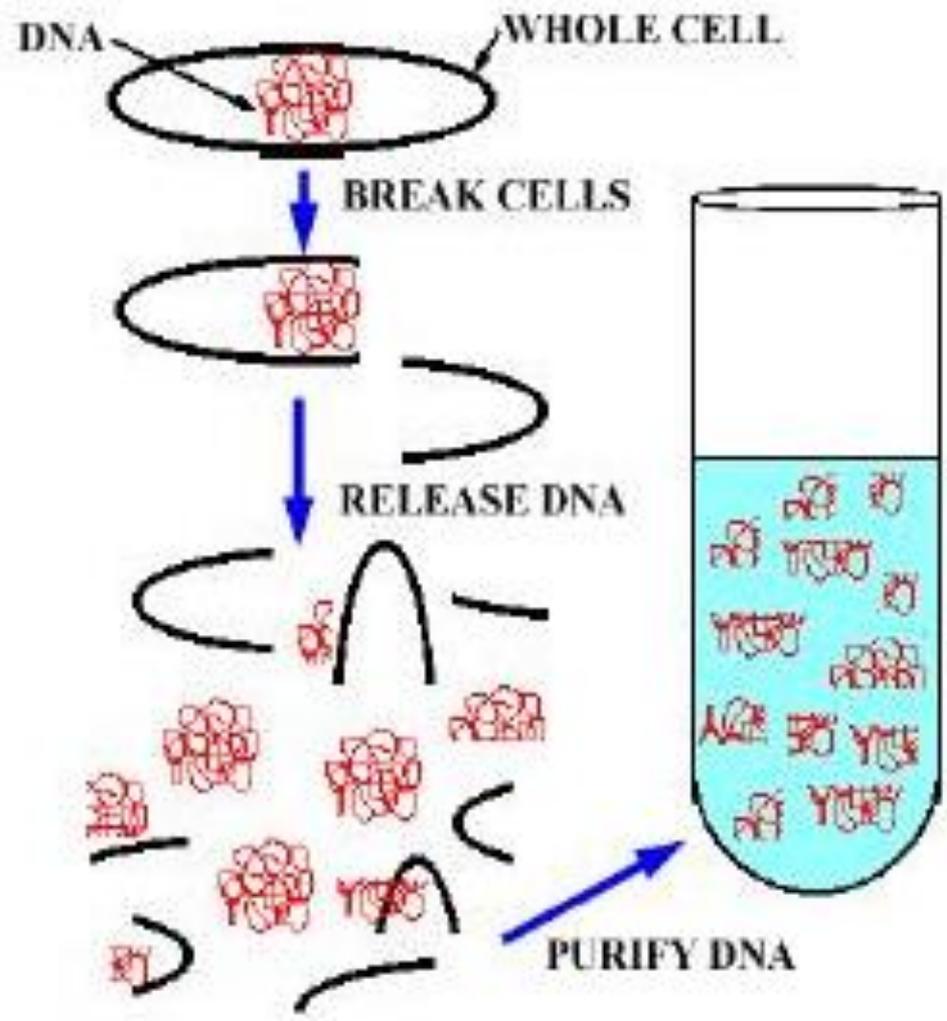
Competência refere-se à capacidade da célula de receber o DNA exógeno e ser transformada. Depende de muitos fatores e varia com a espécie bacteriana.

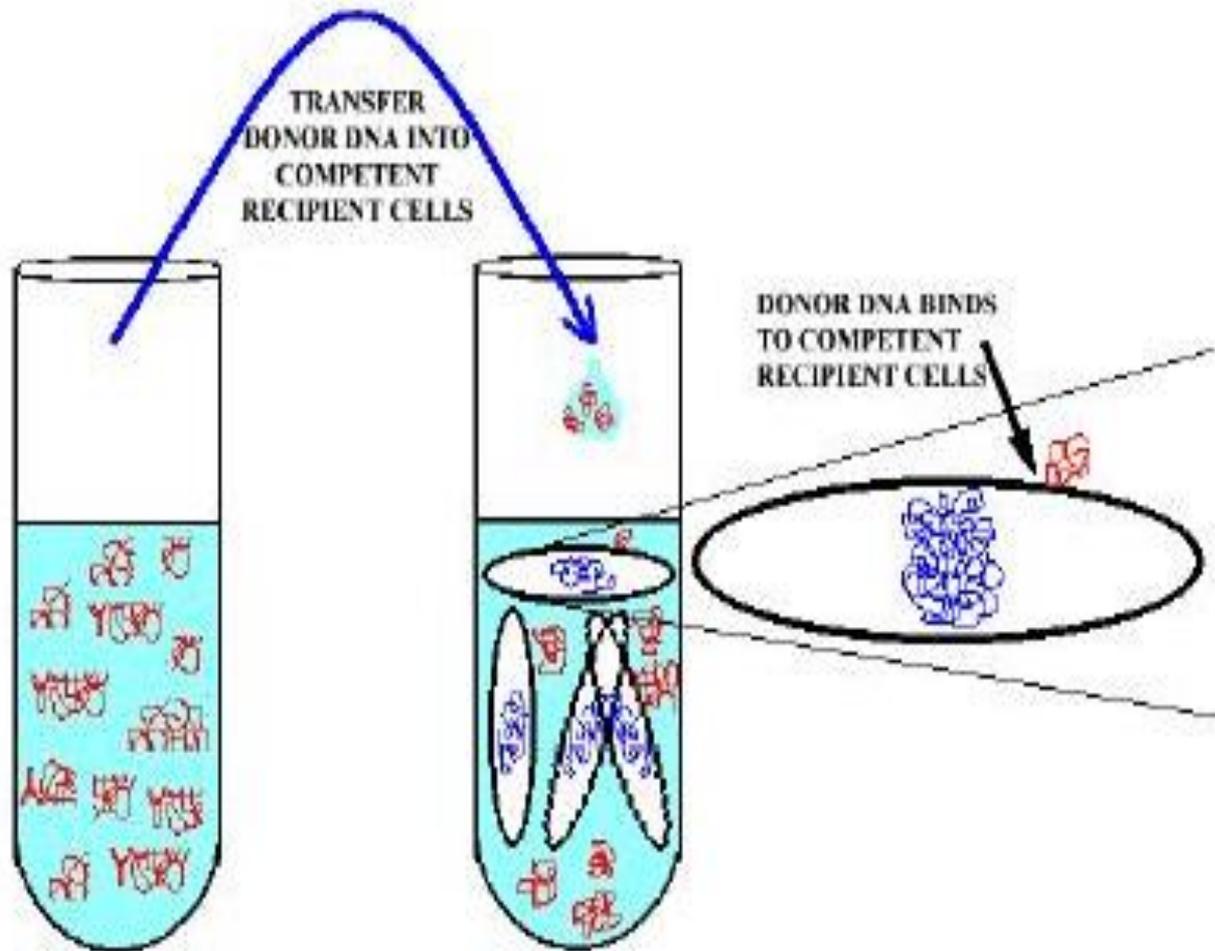
Quando uma célula receptora está em um estado fisiológico em que pode captar o DNA doador, é descrita como competente. A competência resulta de alterações na parede celular que torna permeável as moléculas grandes de DNA.

O processo de transformação em *E.coli* é eficiente, por incubação de células a 0°C em presença de Ca^{++} , antes de efetuar a transformação.

A competência depende do número de células na cultura (cerca de 10^7 mL) e do meio de cultura (em *H. influenzae*, a cultura é crescida em meio complexo e então, transferida para meio mínimo da alta competência).

Com concentrações reduzidas de Cu, ou inibidores de esporulação, como o alfa-picolínico, a competência é reduzida.





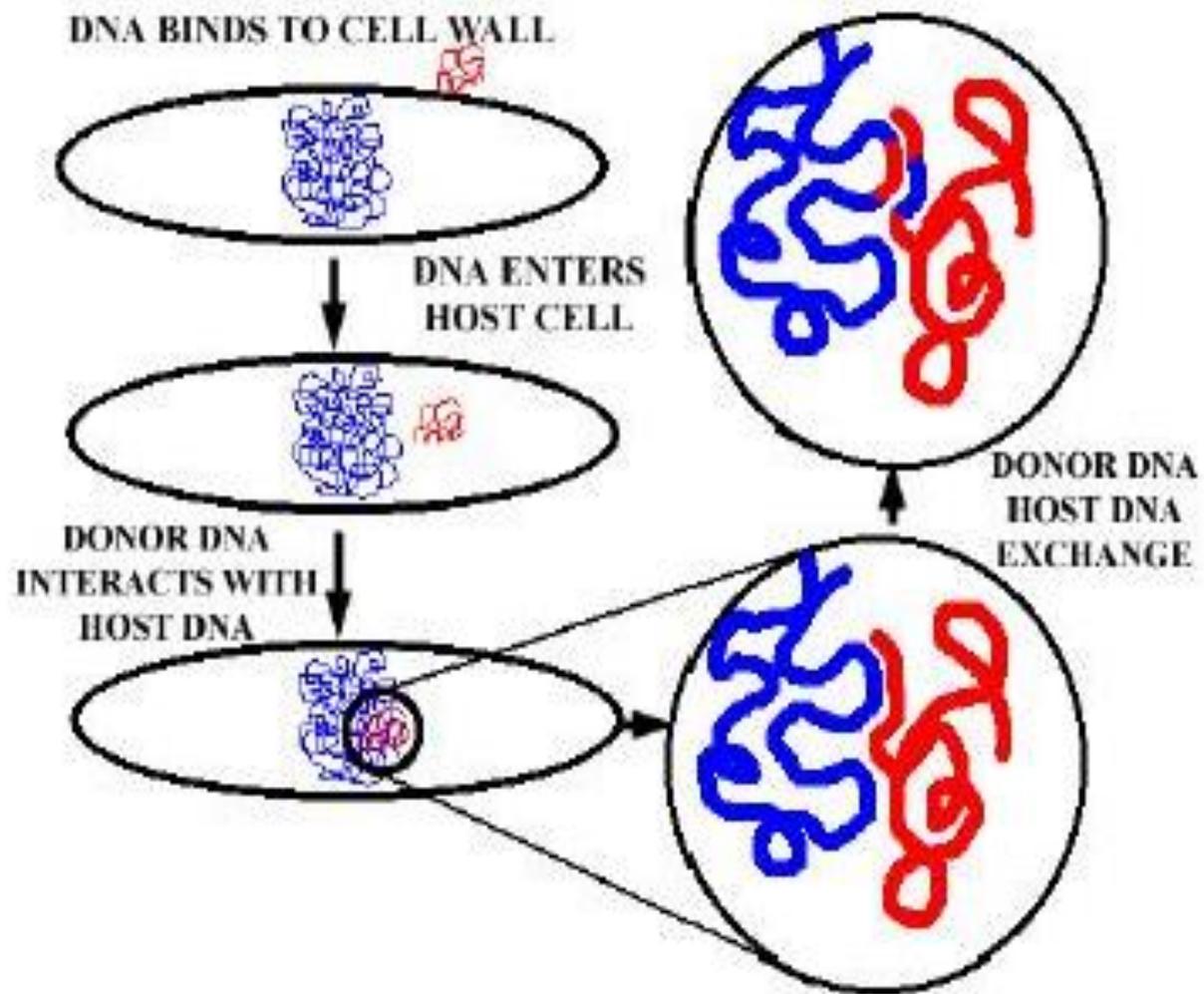
2. Incorporação do DNA exógeno

Uma vez dentro da bactéria, o DNA exógeno tem que se incorporar ao genoma da mesma para que haja transformação.

Assim que o DNA entra na bactéria, segue-se um período de eclipse que, nas Gram+ é explicado como o tempo necessário para que a molécula dupla de DNA torne-se um fio único, um deles sendo degradado a oligonucleotídeos.

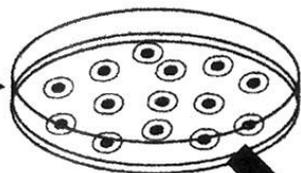
O fio simples é protegido da ação da nuclease por uma proteína. Esse fio único deve agora se parear à região homóloga existente no genoma da bactéria receptora.

Pareando-se o DNA exógeno com o DNA correspondente da bactéria receptora, vai haver a incorporação do DNA exógeno. Há um mecanismo de quebra e reunião, para haver integração.



Eletroporação: Níveis de 200 a 400 mV ocasionam áreas de desorganização da membrana celular, as quais ficam então permeáveis a moléculas e macromoléculas em virtude da formação de poros na célula, causados pela descarga elétrica.

Cultura de células



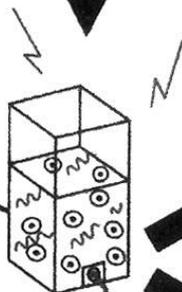
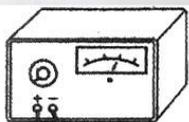
DNA a ser transferido



Mistura das células-alvo com o DNA



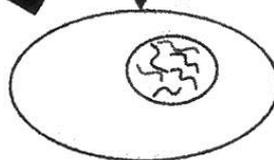
Aplicação de voltagem



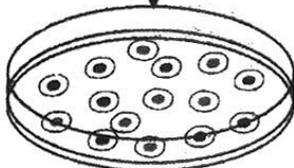
Formação de poros



Entrada do DNA



Absorção do DNA pelas células



Biobalística: micropartículas de tungstênio ou outros materiais, de poucos micra de diâmetro ou ainda menores, cujo DNA que se que introduzir nas células hospedeiras foi adsorvido a essas partículas, funcionam como verdadeiros projéteis.

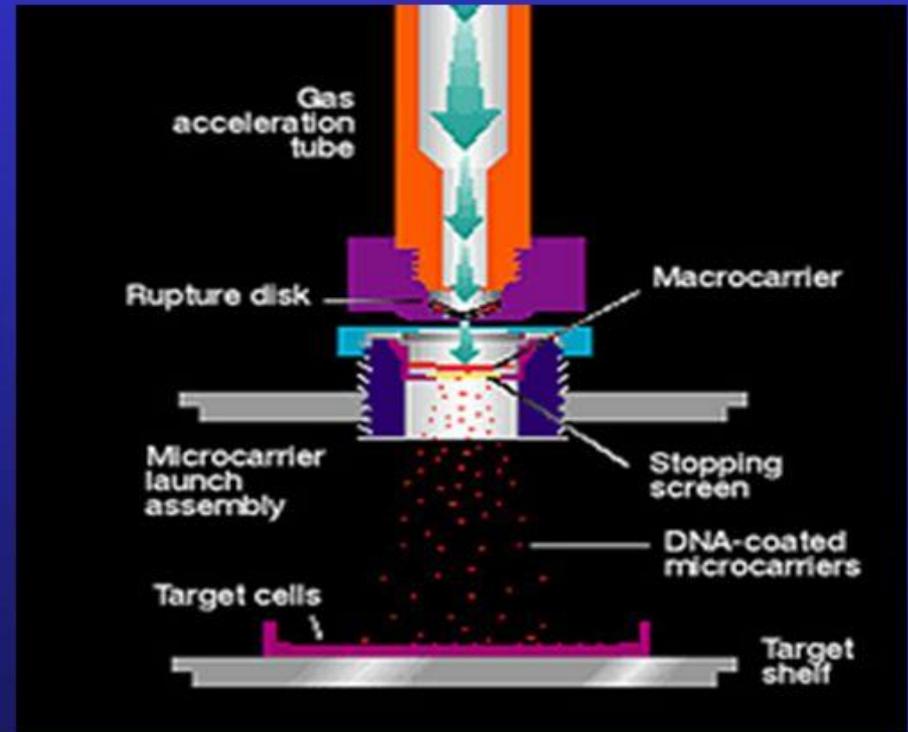
Impulsionadas por um equipamento especial, que funciona como um revólver, elas perfuram as células e introduzem o DNA nas mesmas.

Células atingidas por uma ou poucas esferas de tungstênio sobrevivem e podem ser transformadas.

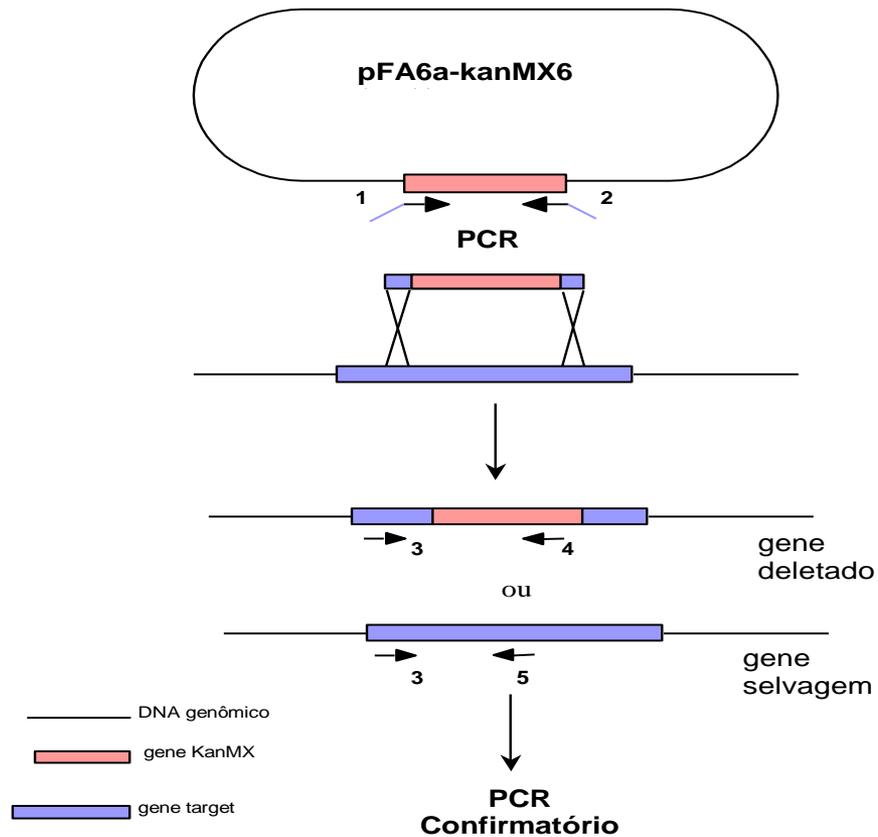


➤ Biolística

Hélio em alta pressão + vácuo
aceleram DNA + micropartículas
de ouro ou tungstênio para o alvo



Um exemplo de transformação em leveduras: utilização da técnica de *knock-out* gênico para estudo da função do gene



As deleções nos genes foram realizadas por substituição de parte dos ORFs do gene alvo com o gene *KanMX*

*Inicialmente, a seqüência kanMX foi amplificada a partir do plasmídio *pFA6a* por PCR, usando 2 ‘primers’ contendo seqüências homólogas ao gene alvo (1 e 2).

*O produto PCR de 1,6 kb foi concentrado e transformado em células de leveduras para a ocorrência de recombinação homóloga.

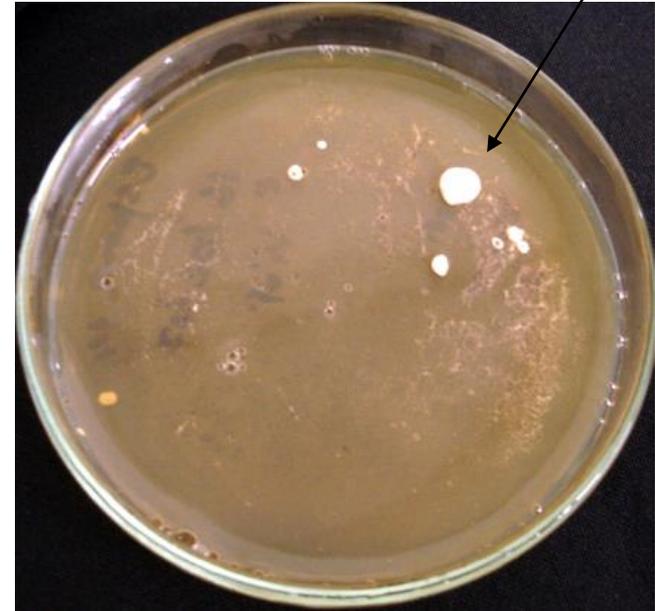
*Os mutantes recombinantes foram selecionados pela resistência à droga G418, devido à presença do gene *KanMX*.

*A correta inserção do DNA transformante foi então confirmada por uma reação PCR utilizando-se uma mistura de 3 primers (3, 4, 5), possibilitando a distinção entre o gene selvagem e o gene deletado



YEPD

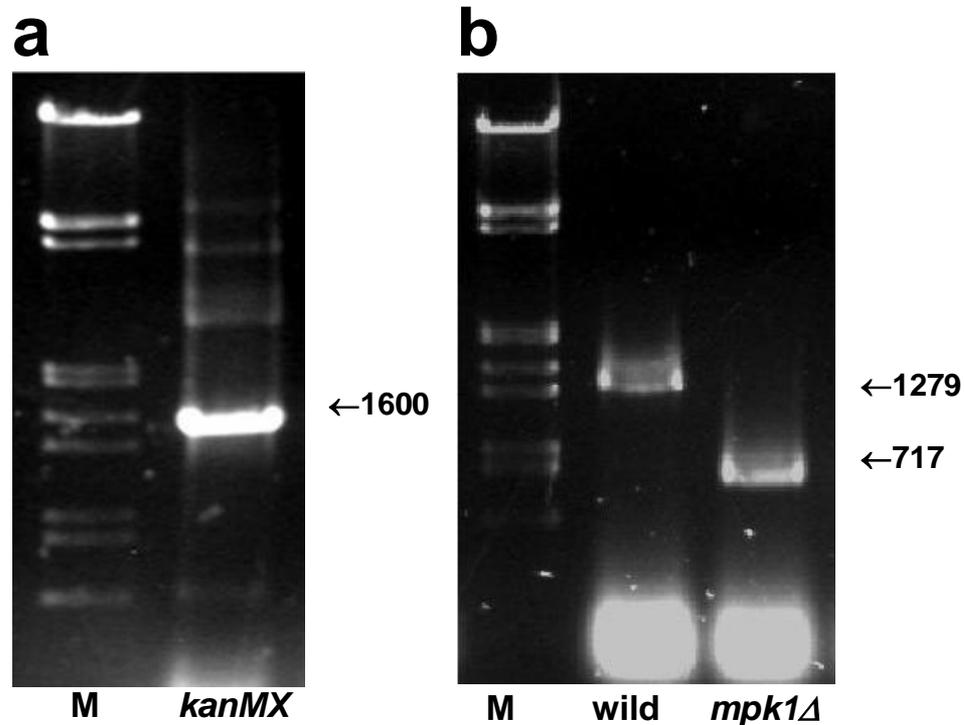
Replica-
plating



YEPD + G418

Recombinante ?

Plaqueamento das colônias de leveduras após transformação com Acetato de lítio e choque térmico



Gene deletion was performed and selected by PCR. **A.** The 1.6 kb PCR product was amplified from the *pFA6a-kanMX6* plasmid and then purified and concentrated 10X. **B.** The *MPK1* deleted PCR product produced a 717 bp band, compared with the wild strain, whose band was 1279 bp. The fragments were separated through 1% agarose gel electrophoresis in TAE buffer. **M**= λ /EcoRI+HindIII.