
Tecnologia do DNA recombinante

- Conceito de Tecnologia do DNA recombinante;
- Clonagem do DNA;
- Ferramentas e aplicações da Tecnologia do DNA recombinante

Tecnologia do DNA recombinante

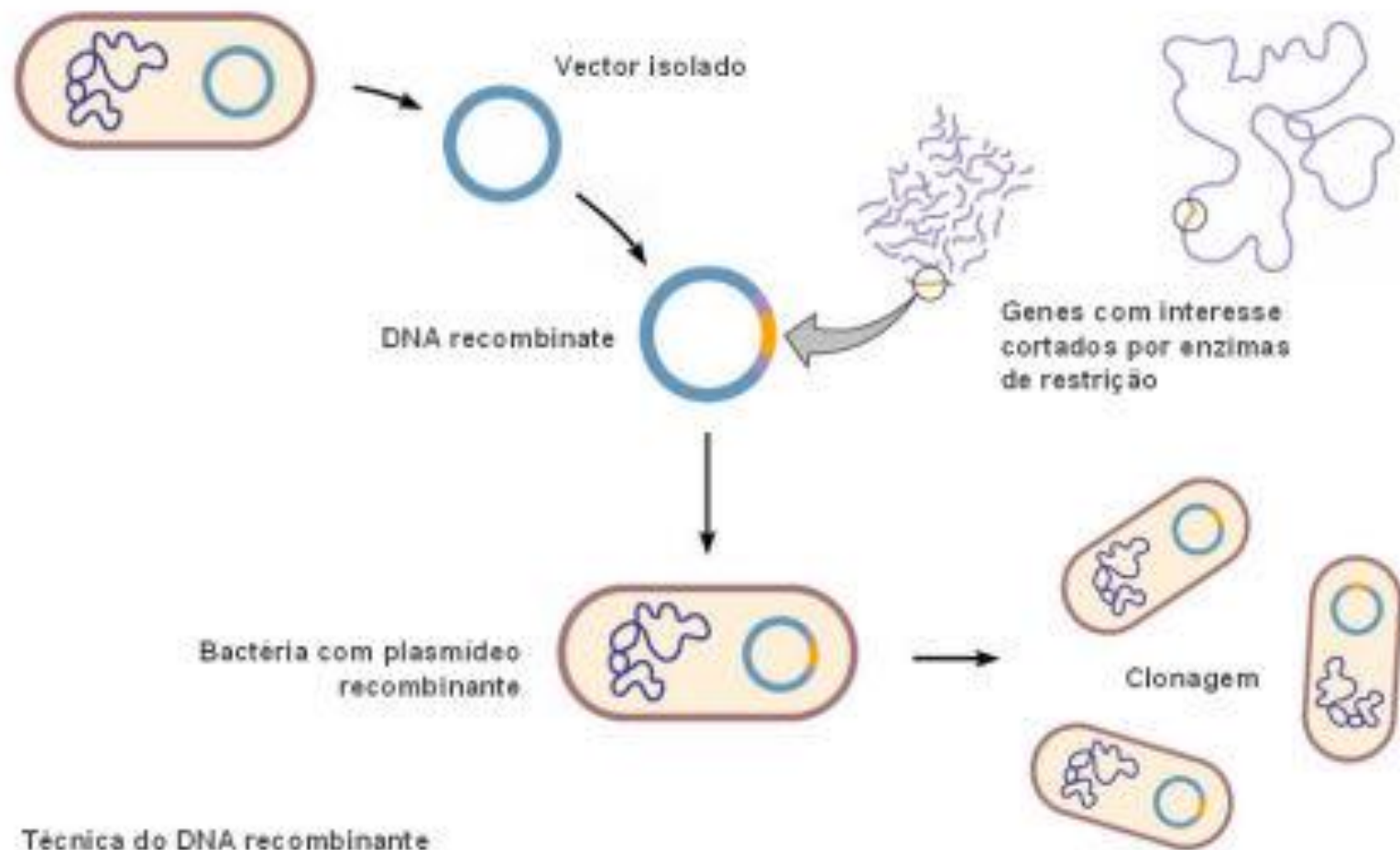
- Técnicas que visam o isolamento de genes e a introdução de genoma exógeno em outros organismos.
- São produzidos organismos transgênicos, com diversas finalidades.
- Ampla aplicação comercial e tecnológica.

Clonagem do DNA

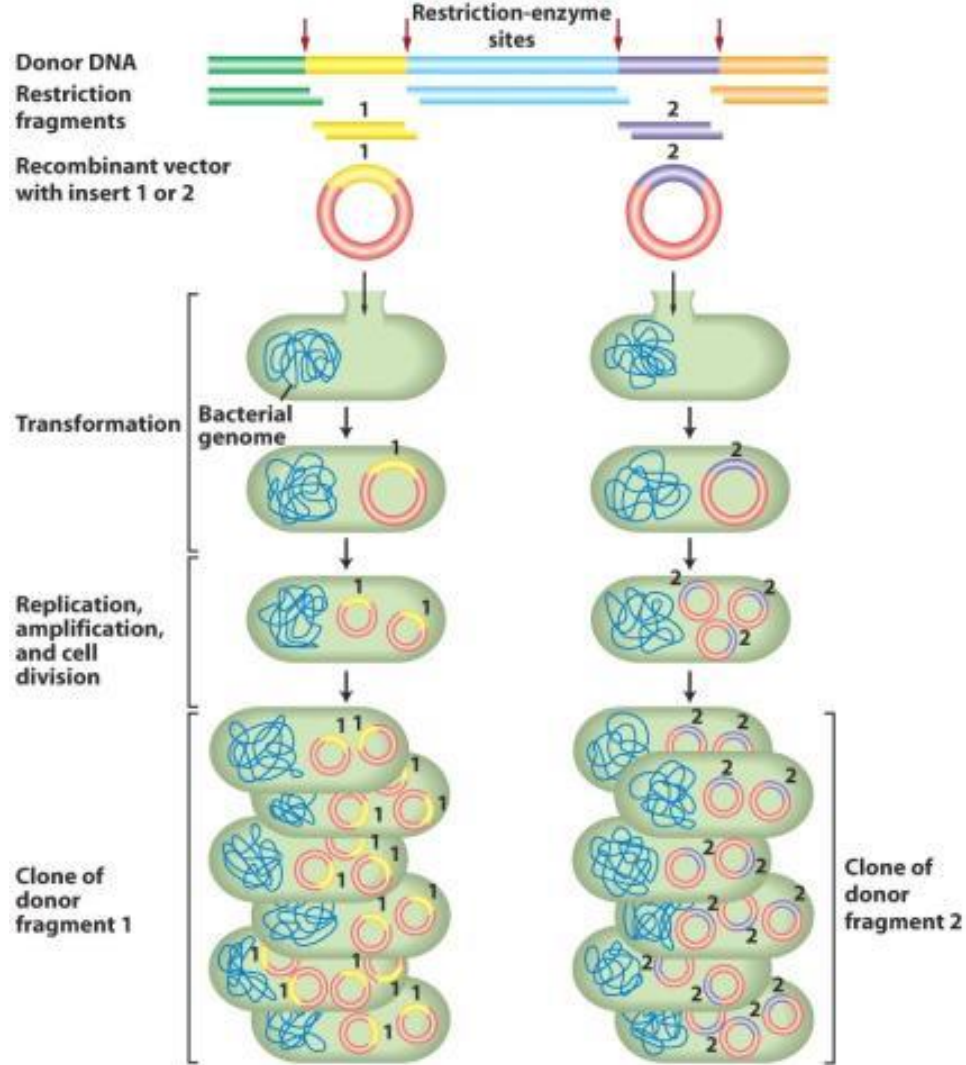
- Um clone é uma cópia idêntica.
- A clonagem do DNA é o principal processo da Tecnologia do DNA recombinante.
- Envolve a separação de um gene ou um segmento de DNA específico, que se liga a uma pequena molécula de DNA-transportador e depois replica este DNA recombinante milhões de vezes.

Etapas da clonagem do DNA

- Escolher o gene ou segmento do DNA que será clonado;
- Cortar o DNA em um local específico, isolando o gene;
- Obter uma molécula de DNA com capacidade de autorreplicação, chamada de **vetor**.
- Unir os dois pedaços de DNA (vetor e segmento de interesse), formando um DNA recombinante;
- Transferir o DNA recombinante para uma célula;
- Identificar e selecionar as células recombinantes.



Técnica do DNA recombinante



Ferramentas da Tecnologia do DNA recombinante

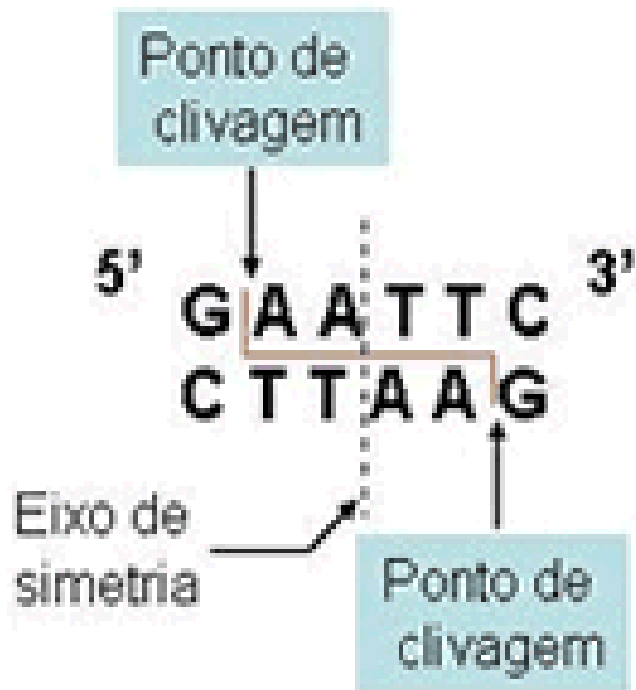
- Para a realização da Tecnologia do DNA recombinante podemos contar com diversas ferramentas que nos auxiliam em cada uma das etapas do processo.

Enzimas de restrição

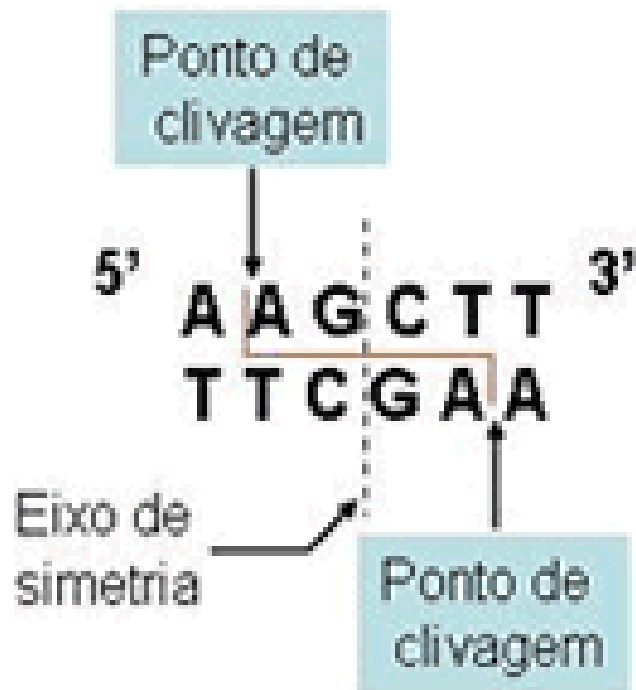
- São enzimas encontradas em bactérias, utilizadas para realizar cortes no DNA.
- Cada enzima de restrição corta o material genético em um sítio específico, que são **palíndromas**.
- As extremidades das partes cortadas recebem o nome de **extremidades de ligação**, pois se encaixam perfeitamente.
- Elas atuam como tesouras de DNA, cortando o DNA invasor em diversos fragmentos sem função. As enzimas de restrição reconhecem e cortam posições específicas ao longo da molécula de DNA, nos chamados sítios de restrição.

Enzimas de restrição

Eco RI



Hind III



Enzimas de restrição

O nome da enzima *EcoRI* vem da bactéria na qual esta enzima foi descoberta: *Escherichia coli* cepa RY 12 (*EcoR*), e o I, porque esta foi a primeira enzima de restrição encontrada neste organismo.

Esta enzima cliva cada fita de DNA, no sítio de restrição, entre as bases G e A.

Depois que as clivagens são feitas, o DNA permanece unido apenas por pontes de hidrogênio entre as quatro bases do meio.

Como as pontes de hidrogênio são ligações fracas, o DNA se separa.

A enzima corta ambas as fitas de DNA no mesmo ponto

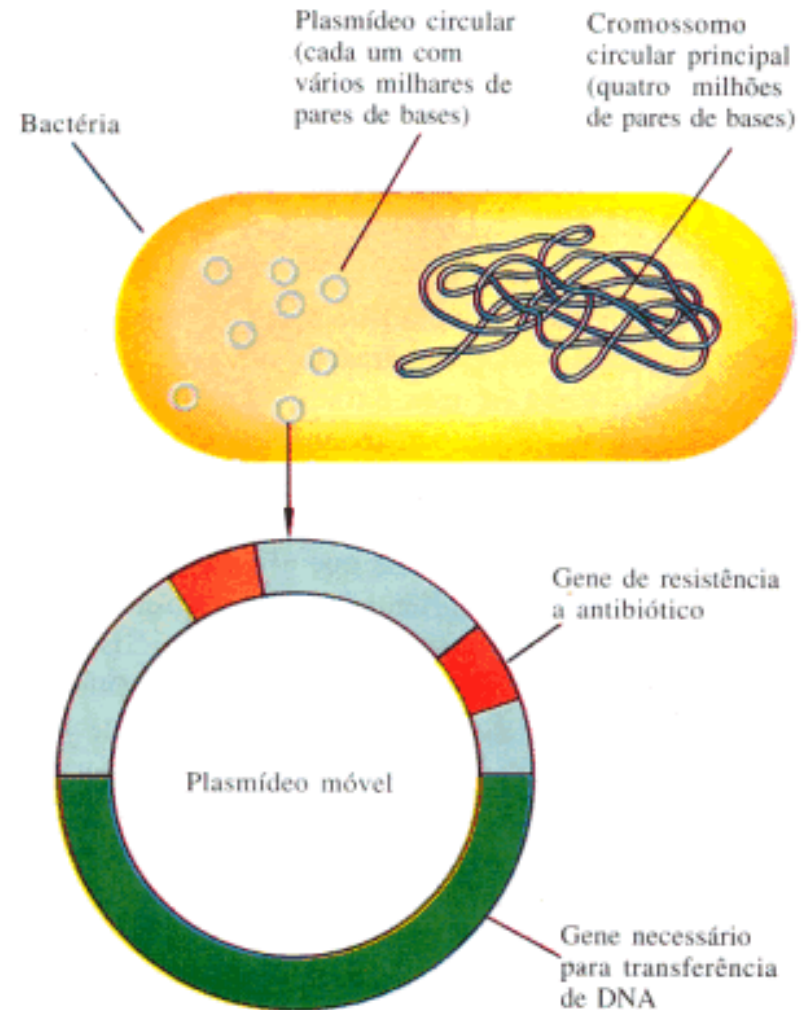


Vetores de Clonagem

- Funcionam como um veículo que transporta o gene para o interior da célula hospedeira, que é normalmente uma bactéria, embora outras células vivas possam ser utilizadas.
- Os **plasmídeos**, **bacteriófagos** e **cosmídeos** são frequentemente utilizados como vetores de clonagem.

Plasmídeos

- São moléculas de DNA circular, presentes em bactérias, que se replicam separadamente do cromossomo bacteriano.
- São extraídos de bactérias e utilizados como vetores de clonagem.



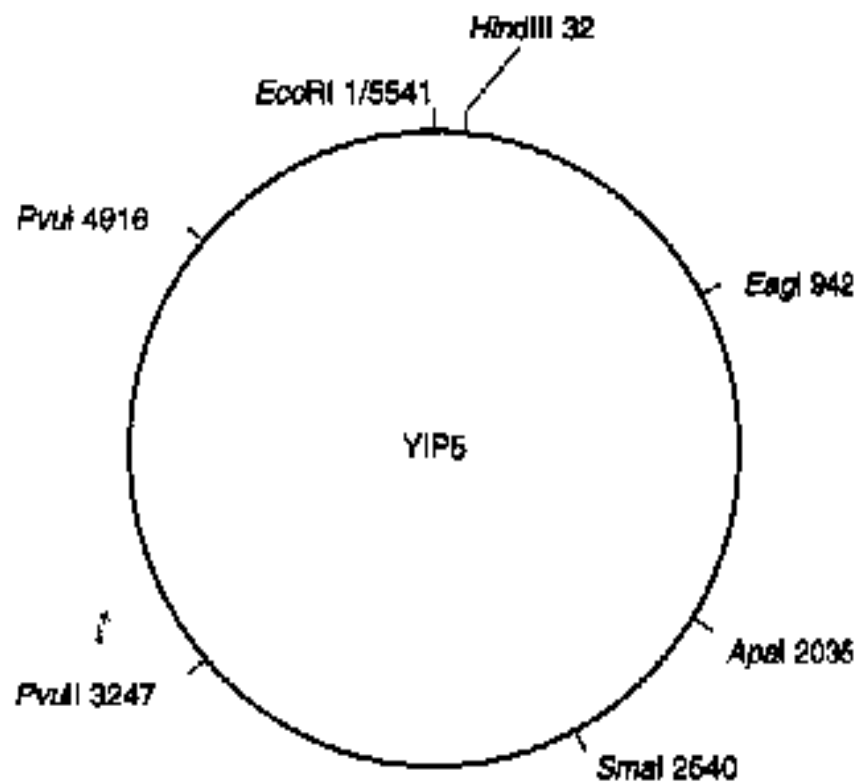
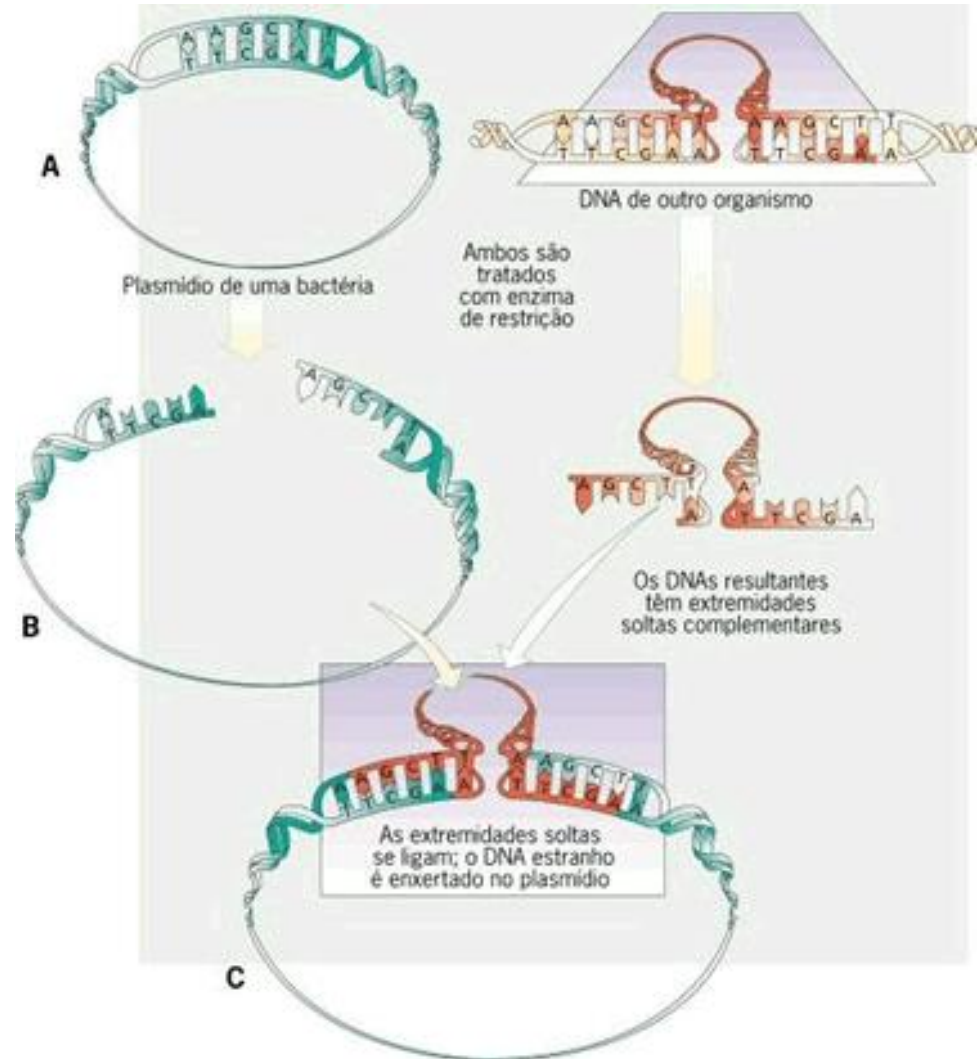
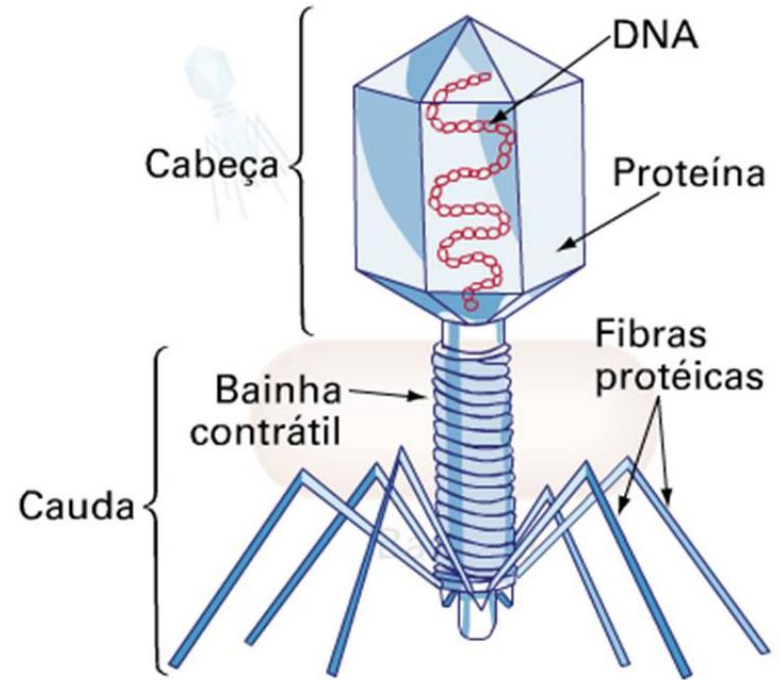


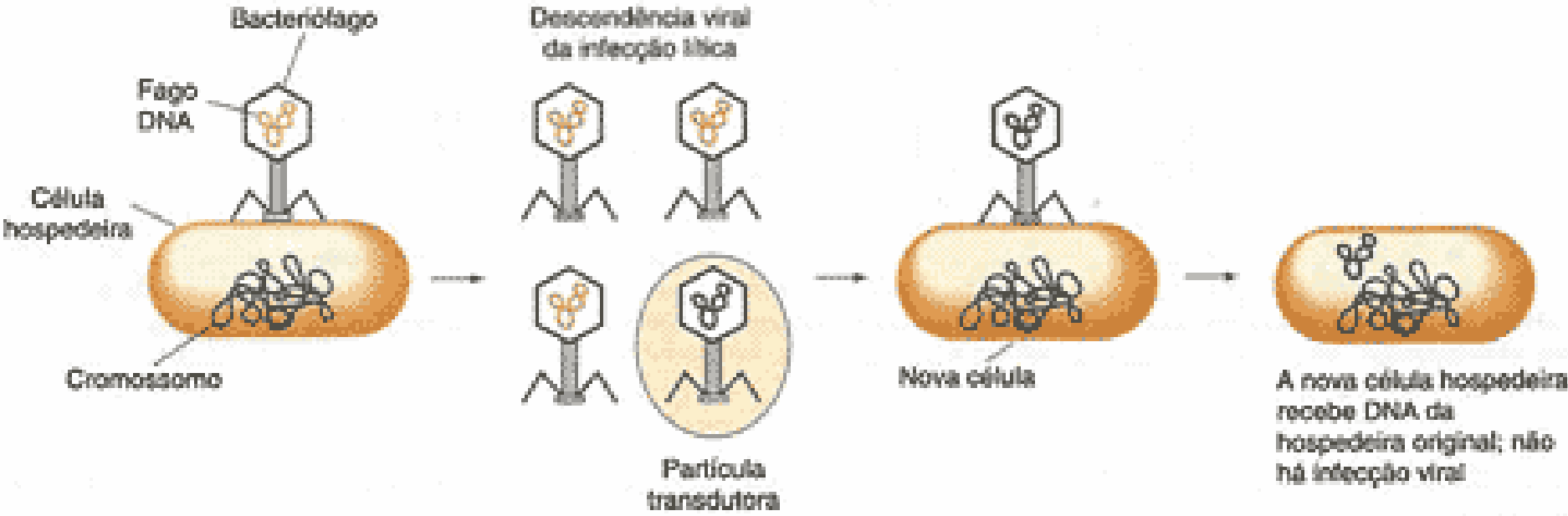
FIGURA 11.1 Mapa de restrição do YIP5, um plasmídeo de 5.541 pares de bases. O número após cada nome de enzima de restrição indica em qual par de base o DNA é cortado pela enzima.



Bacteriófagos

- São vírus que infectam especificamente as bactérias.
- Os fagos têm uma estrutura muito simples, consistindo numa molécula de DNA, que transporta determinado número de genes, nos quais se incluem vários para a replicação do fago.





Métodos para introdução de DNA exógeno em células

Durante o processo de transformação, os genes são transferidos de uma bactéria para outra como DNA `nu` em solução. Uma célula receptora com uma nova combinação de genes é um híbrido ou célula recombinante.

✓ **Transferência Indireta de Genes**

- Intermediada pelas bactérias
Agrobacterium tumefaciens e *Agrobacterium rhizogenes*

✓ **Transferência Direta de Genes**

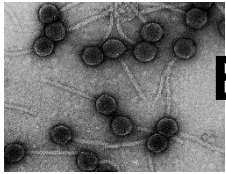
- Baseada em métodos físicos/químicos
(Eletroporação e Biobalística)

Vetores

Plasmídeos

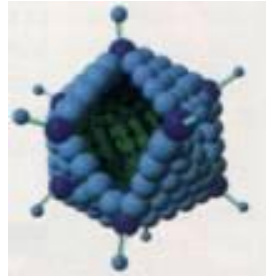
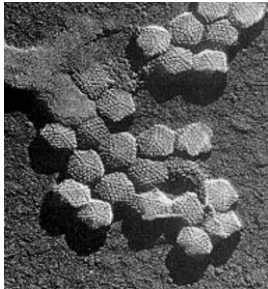


Cosmídeos



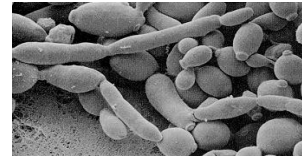
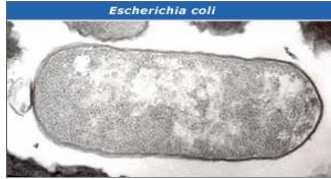
Bacteriófagos

Virus

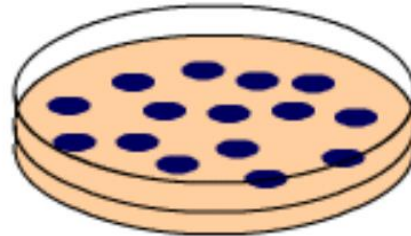


Hospedeiros

Bactérias / leveduras

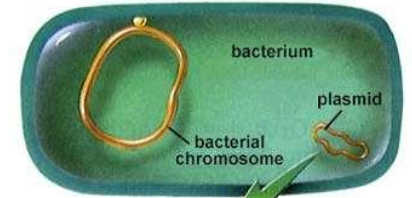


Células eucarióticas



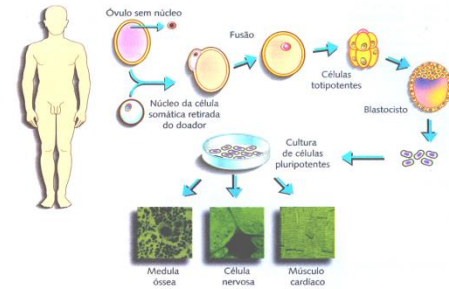
Utilização

clonagem



Terapia gênica

Clonagem terapêutica





Cortar o DNA com enzimas de restrição

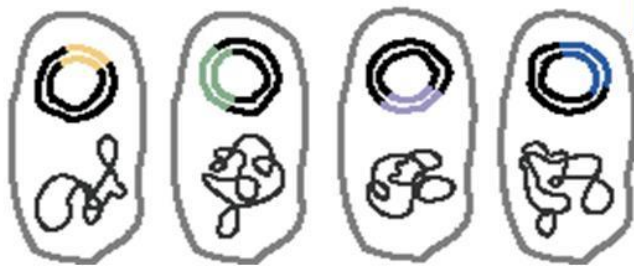


Fragmento 1 Fragmento 2 Fragmento 3 Fragmento 4

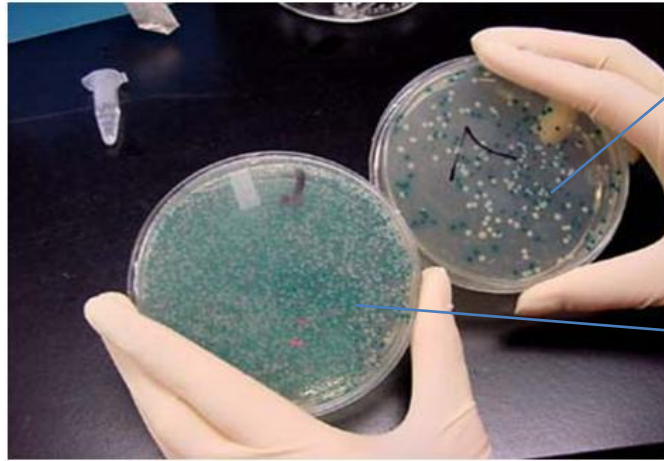
Inserir fragmentos em vetores



Introduzir vetores em bactérias por:
eletroporação ou choque térmico



Plaqueamento



Meio seletivo

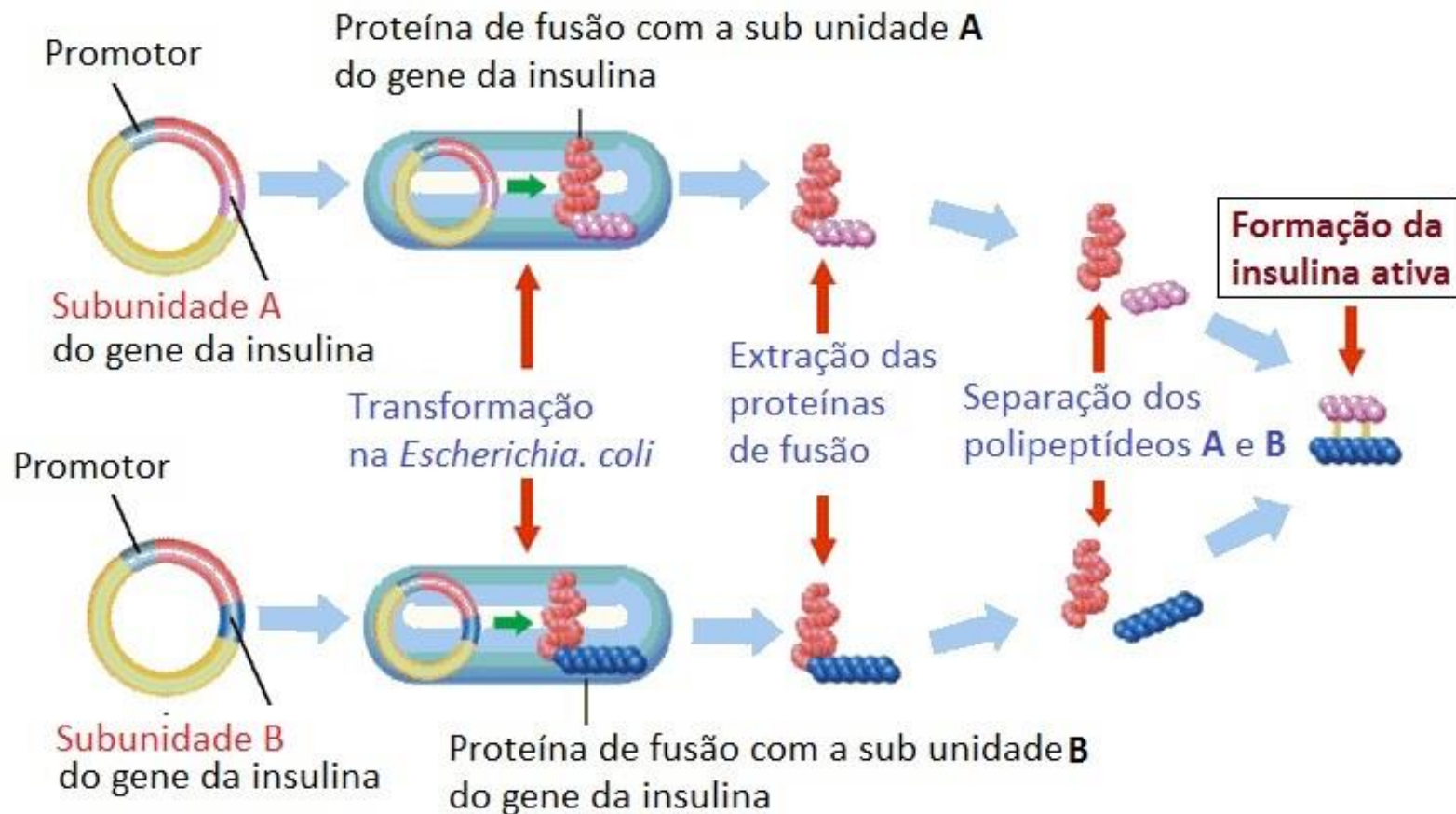
Meio não seletivo

Aplicações da Tecnologia do DNA recombinante

- Produção de hormônios humanos para tratamento de doenças, como insulina e hormônio do crescimento.



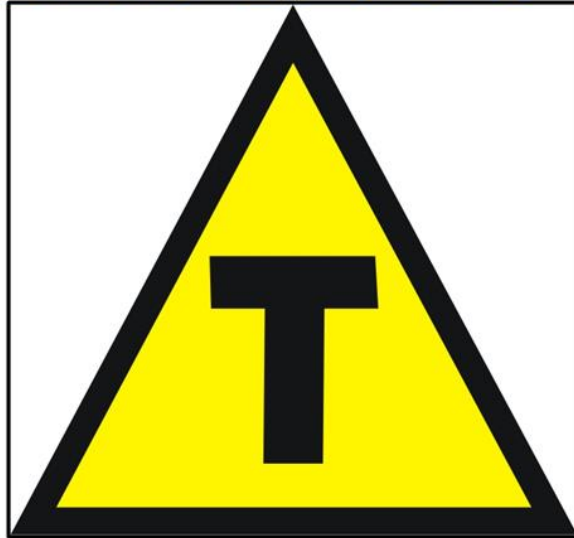
PRODUÇÃO DA INSULINA HUMANA



Aplicações da Tecnologia do DNA recombinante

Produção de alimentos e animais transgênicos

TRANSGÊNICOS



1. As células do paciente são retiradas

2. Um vírus é modificado em laboratório para receber outro DNA.

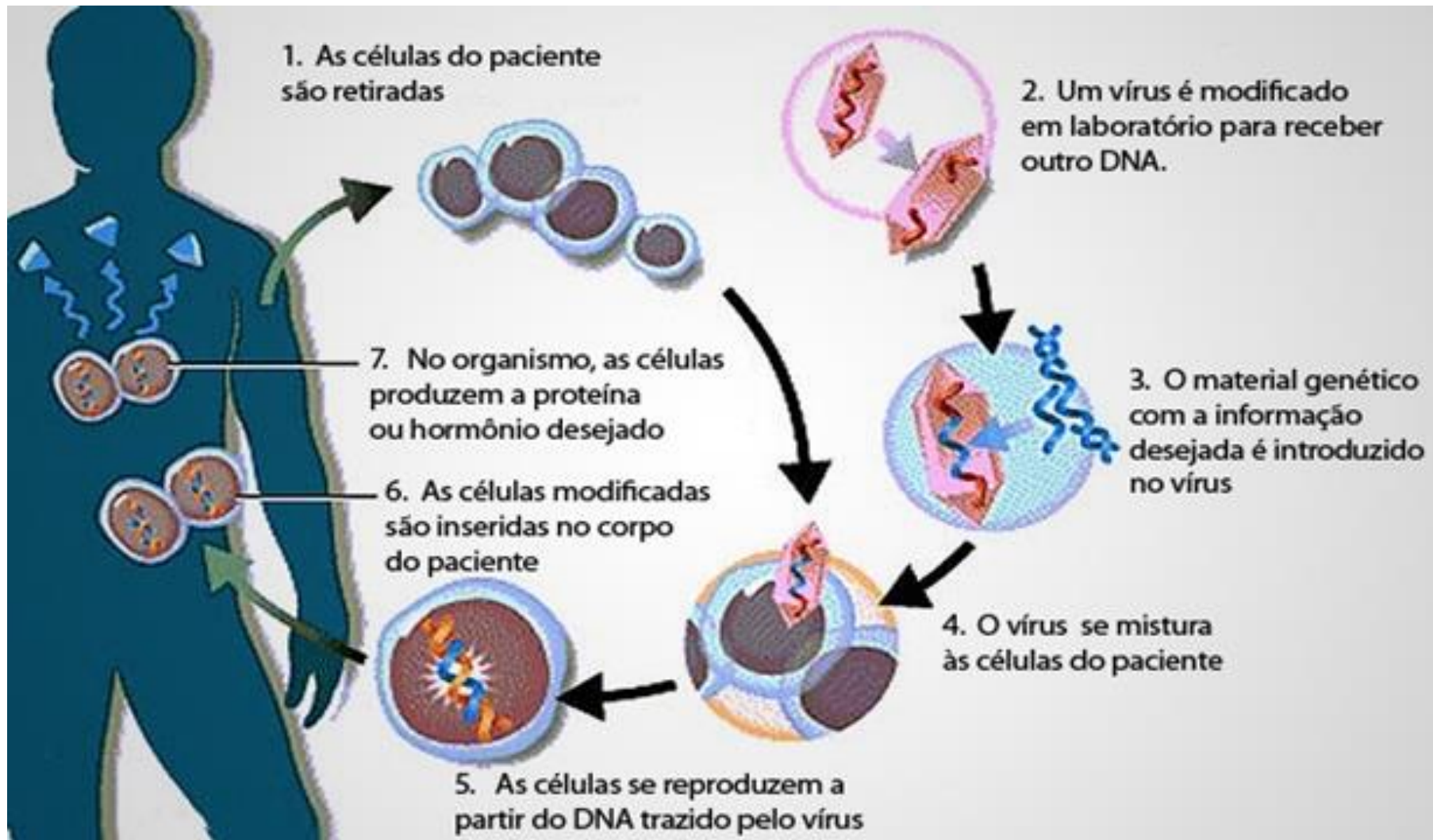
3. O material genético com a informação desejada é introduzido no vírus

4. O vírus se mistura às células do paciente

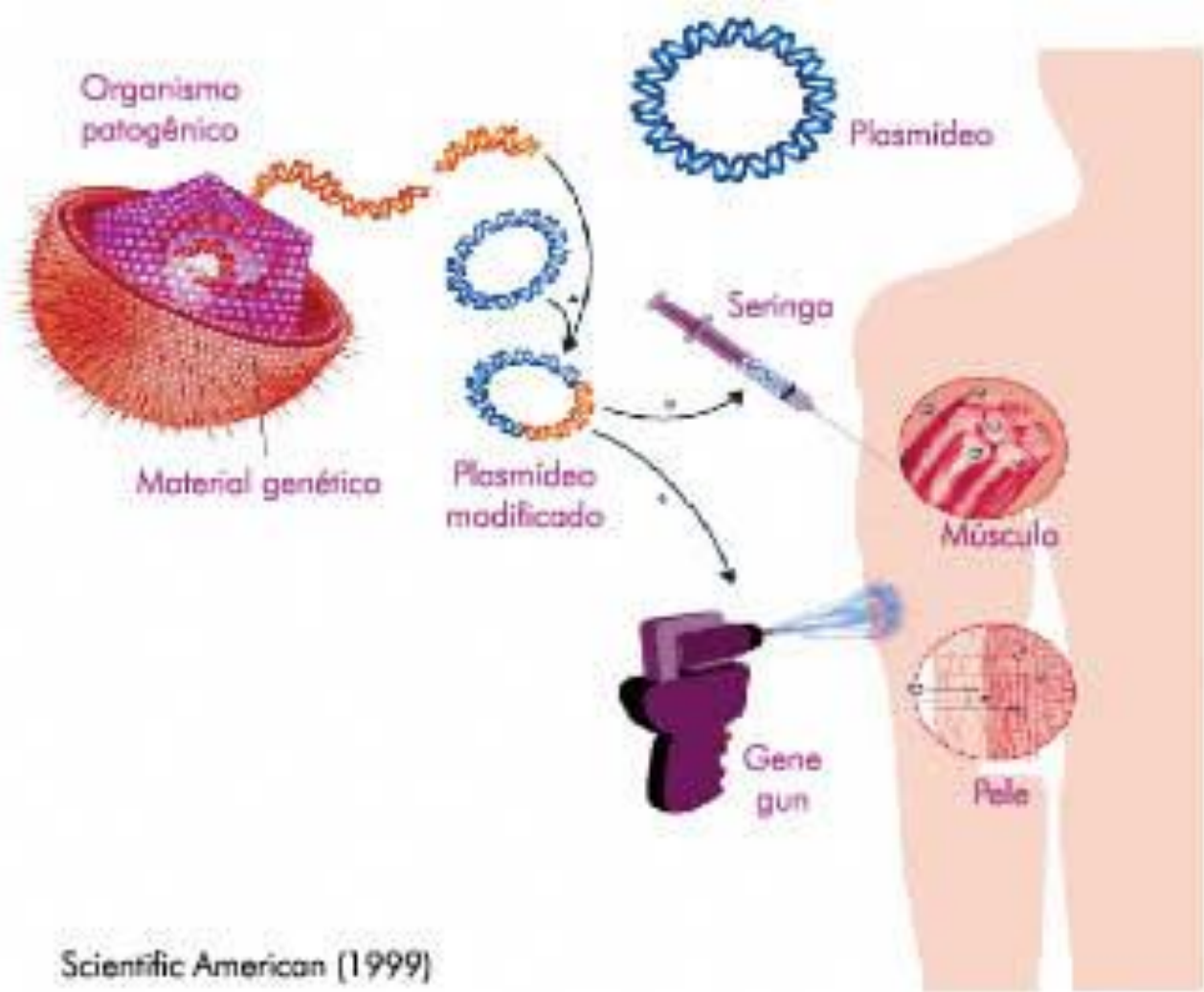
5. As células se reproduzem a partir do DNA trazido pelo vírus

7. No organismo, as células produzem a proteína ou hormônio desejado

6. As células modificadas são inseridas no corpo do paciente



Vacina de DNA



Scientific American (1999)

Aplicações da Tecnologia do DNA recombinante

- Produção de enzimas industriais;
- Produção de suplementos alimentares;
- Produção de flavorizantes para alimentos;
- Produção de organismos para biorremediação.

Baseado em:

estacio.webaula.com.br/cursos/DIS013/conteudo_aula.../_ppt/arg/Aula_07.ppt

Aula sobre Tecnologia de DNA recombinante