

Tecnologia de DNA Recombinante e técnicas de estudo da expressão gênica

- 1- Purificação de DNA/RNA
- 2- Análise de DNA
 - Eletroforese Desnaturante/Não desnaturante
 - Análise de restrição
 - Marcação de sondas de DNA e *Southern blot*
 - Sequenciamento
- 3- Clonagem e Manipulação de DNA
 - Ferramentas de Clonagem: enzimas e vetores
 - Produção de DNA recombinante
 - Amplificação (PCR)
 - Construção e Screening de bibliotecas: - genômica - de cDNA
 - Clonagem em *E. coli*, levedura, células animais e vegetais
 - Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes

4- Estudos de expressão gênica: técnicas de análise e quantificação de RNA

Northern blot
 RT-PCR e *Real Time* RT-PCR
 Técnicas de estudo da regulação da expressão gênica
DNA footprinting
Band shift
 Transfecção com gene reporter
 Duplo-híbrido
 CHIP (*chromatin immunoprecipitation*)
 Técnicas de estudo de expressão gênica em escala genômica
DNA Microarray
 Análise de EST (*expressed sequence tags*)
 SAGE (*serial analysis of gene expression*)

5- Estudos de genoma: técnica de sequenciamento, montagem e análises

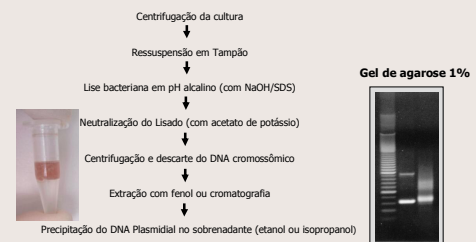
Purificação de DNA/RNA

Lise → Desproteinização → Precipitação

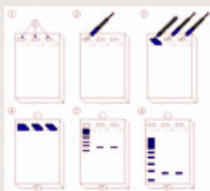
- DNA
 - nuclear ou mitocondrial
 - bactéria, células animais ou vegetais
 - DNA de alto peso molecular
 - DNA plasmidial
- RNA
 - nuclear, citoplasmático ou RNA total
 - cuidadosos para evitar degradação
 - tratamento da vidraria (DEPC, 180° /2hs)
 - uso de inibidores de RNases

Purificação de DNA/RNA

Purificação de DNA plasmidial pela técnica de Mini-prep



Eletroforese de DNA/RNA



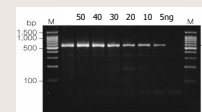
Análise e quantificação de DNA/RNA

- **Gel de agarose:** desnaturante (> 100 pb) não desnaturante
- **Gel de poliacrilamida:** desnaturante (< 1000 pb) não desnaturante
- **Gel em campo pulsátil** (PFGE, agarose) (> 10 kb)

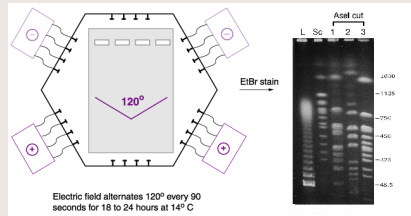


Quantificação por espectrofotometria:

- DNA → 1 UA_{260nm} = ~50 µg/mL
- RNA → 1 UA_{260nm} = ~30 µg/mL

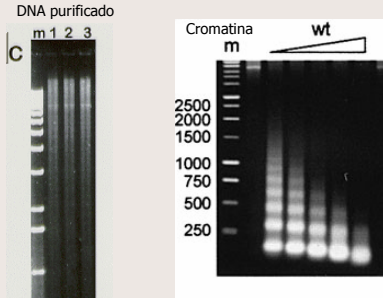


Análise de DNA de alto PM em PFGE

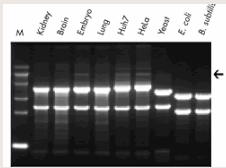


Análise eletroforética de DNA e Cromatina

Perfil de eletroforese após tratamento com DNase



Análise de RNA



3 tipos de RNA na célula:
85% - rRNA (2.000 e 3000 nt)
10% - tRNA (150 nt)
5% - mRNA (variável)

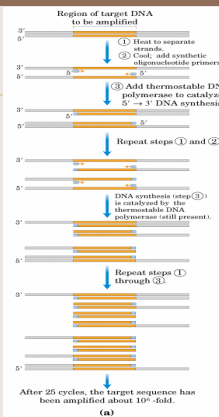
Síntese de DNA "in vitro"

- DNA polimerase de *E. coli*
Sequenciamento
Marcação de sondas com ^{32}P
- Polimerases termo-resistentes (Taq polimerase, Pfu polimerases)
Amplificação de fragmentos (PCR)
Construção de quimeras
Mutagênese sítio dirigida
Marcação de sondas com ^{32}P
Sequenciamento
- Transcriptase Reversa
Produção de cDNA (RT-PCR)

Amplificação de DNA por PCR

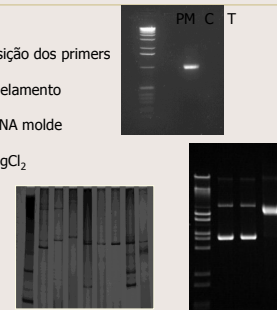
Sistema de reação:
DNA molde (100 ng)
Iniciadores (5 μ M)
dNTPs
Tampão com $MgCl_2$
Taq polimerase

Protocolo de amplificação:
25x { Desnaturação: 95° C
Anelamento: 50° C
Extensão: 72° C

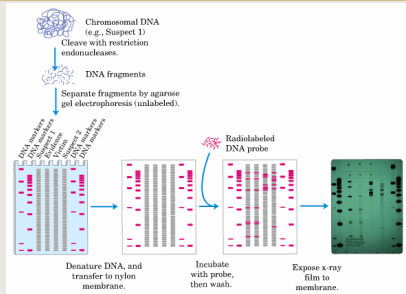


Fatores que influenciam os resultados de PCR

- ✓ Tamanho e composição dos primers
- ✓ Temperatura de anelamento
- ✓ Concentração do DNA molde
- ✓ Concentração de $MgCl_2$

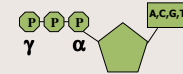


Análise de DNA/RNA por *Southern/northern blot*



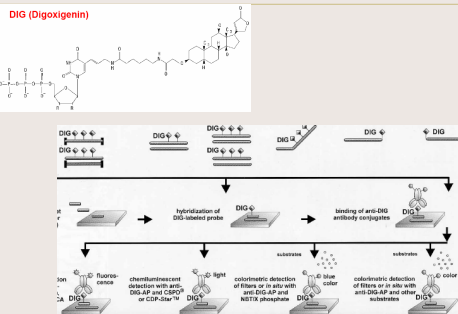
Marcação de sondas

A- com DNA polimerase
DNA molde
primers
dNTPs
 α ^{32}P dCTP

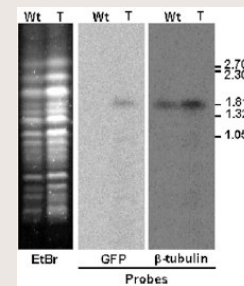


B- com polinucleotídeo cinase
fragmento defosforilado
 γ ^{32}P ATP

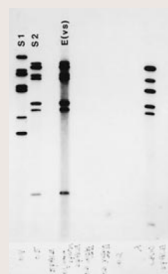
Marcação não radioativa de sondas



Análise de DNA por *Southern blot*: localização de um gene no genoma



Análise de DNA por *Southern blot*: identificação de suspeitos de um crime



Fatores que influenciam a hibridação de sondas de DNA:

- ✓ Tamanho e composição da sonda
- ✓ Temperatura de hibridação
- ✓ Concentração da sonda
- ✓ Concentração de sal

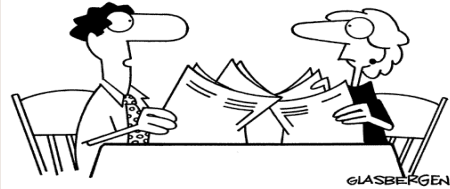
Clonagem de fragmentos de DNA

Ferramentas de clonagem

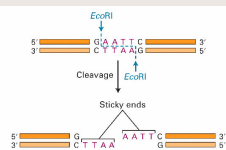
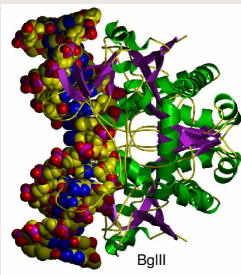
Enzimas:	enzimas de restrição DNA polimerases DNA ligase/Topoisomerases Fosfatases
Vetores:	plasmídios fagos cosmídeos BACS/YACS vírus
Hospedeiros:	<i>E. coli</i> levedura células animais células vegetais

Clonagem de DNA

© 1999 Randy Glasbergen. www.glasbergen.com



Enzimas de Restrição



Sítios de Reconhecimento de Enzimas de Restrição

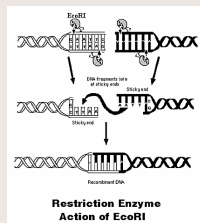
Enzyme	Source	Recognition site	Average cleaved size (kb)
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT TCGA	0.3
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	GGATC C C CTAGG	7.0
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli R factor</i>	GGAAT C C TTAAG	3.1
<i>HaeIII</i>	<i>Hemophilus agglutus</i>	GGCC CCGG	0.6
<i>HindIII</i>	<i>Hemophilus influenzae Rd</i>	AAGCT T T CCGA	3.1
<i>NciI</i>	<i>Norcadia otitidis-cavium</i>	GCAGGC GC CG CCGTGC	< 9700
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	C TGCAG GTACG C	7.0
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TTCG A A GCT	1.4

Produtos de digestão com Enzimas de Restrição

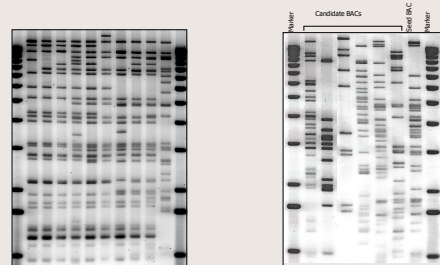
<i>AluI</i>	5' ... R G C T ... 3' 3' ... T C G A ... 5'
<i>HaeIII</i>	5' ... G G C C ... 3' 3' ... C C G G ... 5'
<i>BamHI</i>	5' ... G G A T C C ... 3' 3' ... C C T A G G ... 5'
<i>HindIII</i>	5' ... A A G C T T ... 3' 3' ... T T C G A A ... 5'
<i>EcoRI</i>	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'

Extremidades coesivas

Extremidades abruptas (cegas)



Uso de enzimas de restrição em análises de RFLP



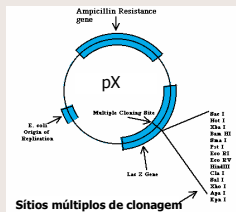
Vetores de clonagem

Vetores de Clonagem Bacterianos

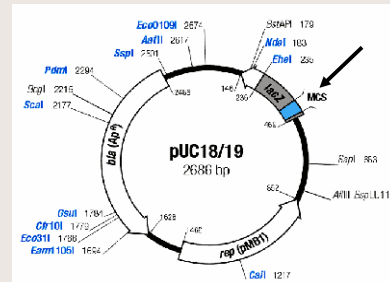
- Plasmídeos: circular, fragmentos até 10 kb
- Bacteriófagos: Linear, fragmentos até 20 kb
- Cosmídeos: circular, fragmentos até 40 kb
- BACs (cromossomo artificial bacteriano): até 300 kb

de levedura:
• YACs: até 1 Mb
(cromossomo artificial de levedura)

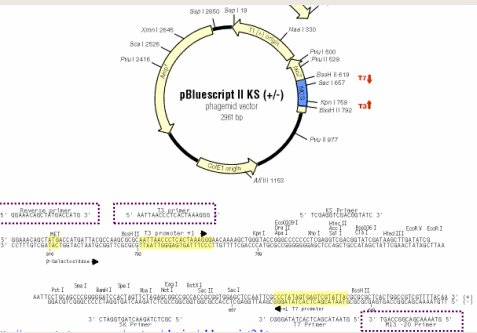
de mamíferos:
pCDNA



Vetores de clonagem: pUC

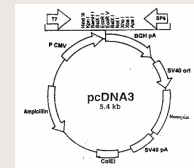
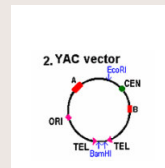
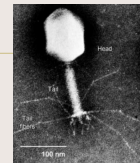


O SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM DO pBluescript

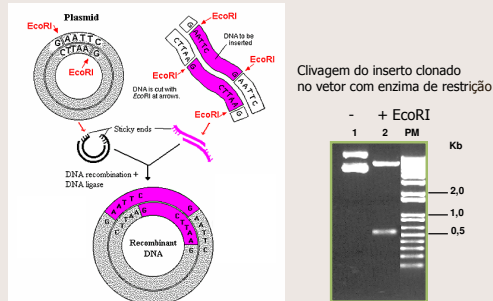


Vetores de clonagem

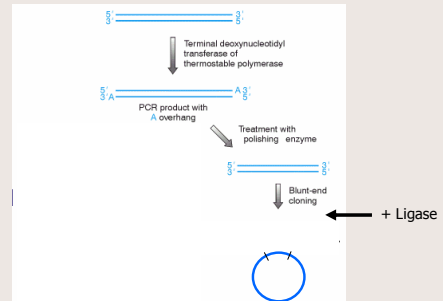
- Bacteriófagos } insertos até 20kb
- Cosmídeos }
- BACs e YACs: } insertos até 1 Mb



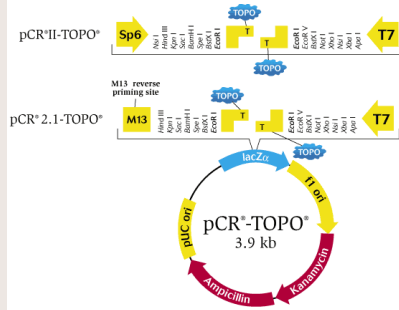
Ligação de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição



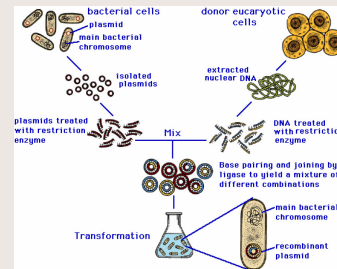
Ligação de Produtos de PCR



Vetores de clonagem de Produtos de PCR

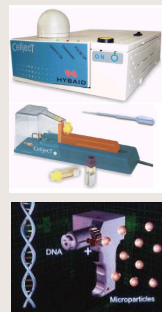


Inserção de plasmídeos em bactérias

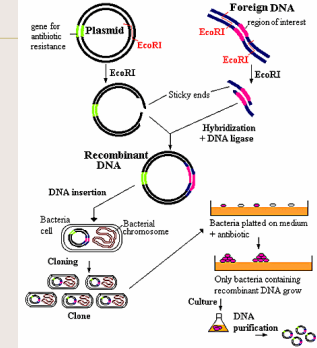


Métodos de introdução de DNA nas células

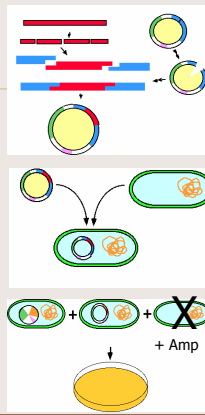
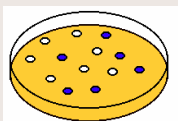
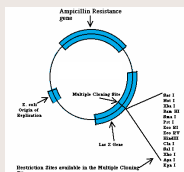
Permeabilização com CaCl_2
Precipitação do DNA
Eletroporação
Gene gun



Seleção de clones recombinantes

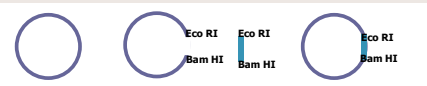
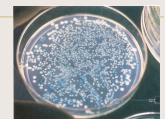


Seleção de clones recombinantes com X-Gal



Estratégias para aumentar a eficiência de clonagem

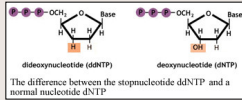
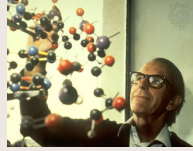
- ✓ Aumentar a relação inserto/vetor
- ✓ Defosforilar o vetor com fosfatase alcalina
- ✓ Utilizar vetores com topoisomerase covalentemente ligada
- ✓ Clivar o vetor e o inserto com duas enzimas de restrição (clonagem unidirecional)



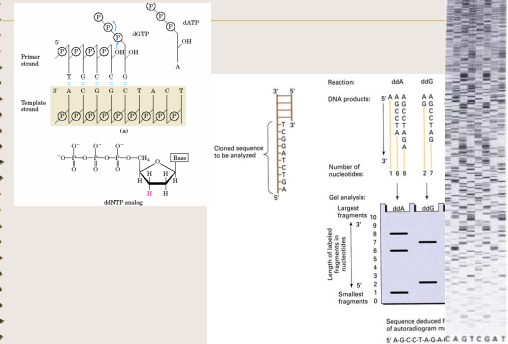
Sequenciamento de DNA: o método de Sanger

Polimerização do DNA a ser sequenciado (molde)
na presença de:

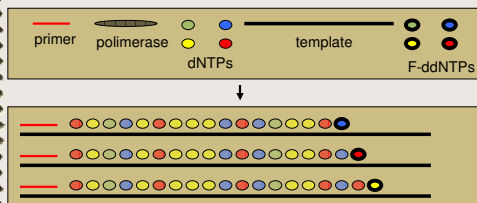
DNA polimerase
primer
dNTPs
ddNTPs



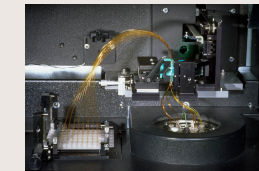
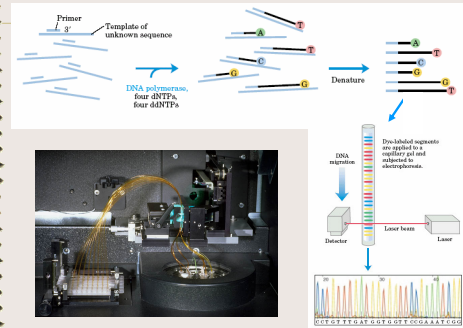
Sequenciamento de DNA: o método de Sanger



SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO



Sequenciamento em capilar



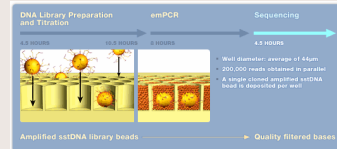
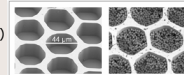
Sequence deduced from the autoradiogram is: T A G C C T A G A C A G T C G A T

Sequenciamento com o sistema 454

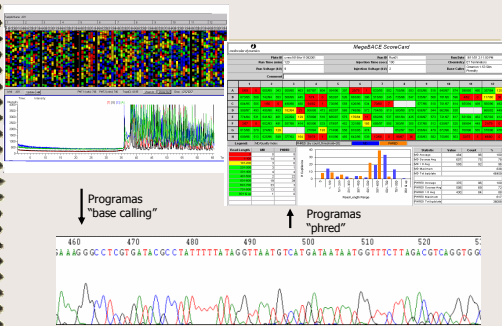
Totalmente automatizado
(construção da biblioteca, amplificação dos
fragmentos, sequenciamento, montagem)

PicoTiter plate
(860 mil ou 1,6 milhões de wells)

20 milhões de bases/corrida

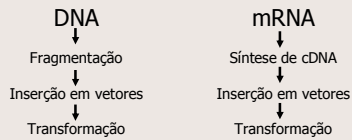


<http://www.454.com>



Construção de bibliotecas de DNA

- bibliotecas genômicas
- bibliotecas de cDNA



Bibliotecas de DNA

Genômica

a partir de DNA genômico fragmentado de qualquer tecido

Frequência do clone independente do nível de expressão

pode conter promotores e introns

não pode ser usada para expressão heteróloga em bactéria

Utilizada para sequenciamento de genoma, mapeamento, estudo de sequências regulatórias, etc

de cDNA

a partir de transcrição reversa de mRNA de um tecido específico

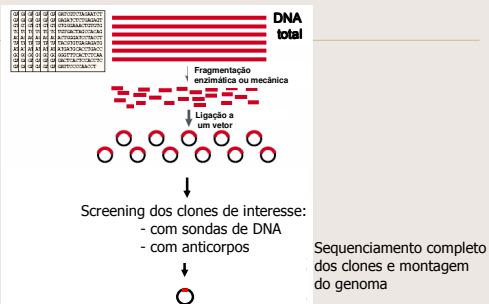
frequência do clone depende da expressão do mRNA no tecido utilizado

não contêm promotores ou introns

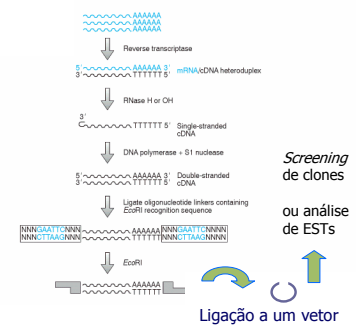
pode ser usada para expressão em bactéria se o vetor tiver promotor e outros sinais adequados

utilizada para sequenciamento de sequências expressas (ESTs), estudos de função do gene, expressão de proteínas em bactérias

Construção de bibliotecas genômicas

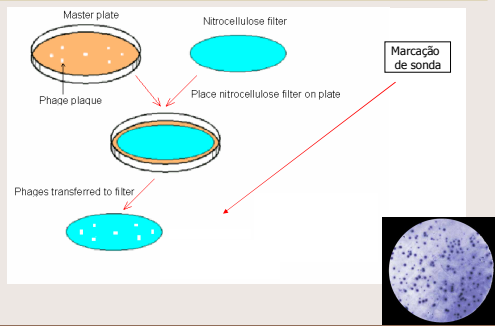


Construção de bibliotecas de cDNA



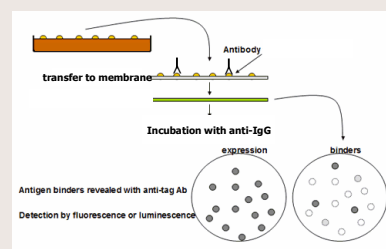
Screening de bibliotecas

com sondas de DNA



Screening de bibliotecas

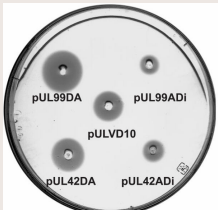
com anticorpos



Screening de bibliotecas

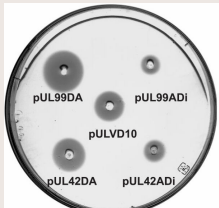
pela atividade da proteína:

- atividade enzimática
- complementação de mutação (em bactéria ou leveduras)



A petri dish containing a spot assay. The dish is divided into six sections, each labeled with a plasmid name. The labels are: pUL99DA (top left), pUL99ADi (top right), pULVD10 (center), pUL42DA (bottom left), pUL42ADi (bottom right), and an unlabeled section at the bottom. Each section shows a series of dilutions of a bacterial culture, with the number of colonies decreasing from left to right and top to bottom. The pUL99DA and pUL99ADi sections show the most colonies, while the pUL42DA and pUL42ADi sections show the fewest.

- atividade enzimática
- complementação de mutação (em bactéria ou leveduras)

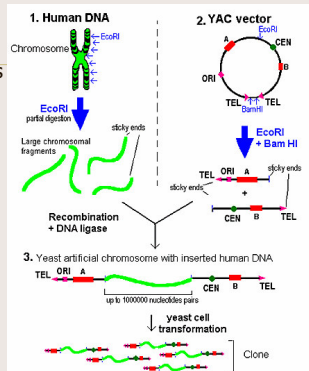


The diagram is divided into three main sections: 1. Human DNA, 2. YAC vector, and 3. Yeast artificial chromosome with inserted human DNA.

1. Human DNA: A chromosome is shown being digested with *EcoRI* (indicated by blue arrows). This results in large chromosomal fragments with sticky ends.

2. YAC vector: A circular plasmid vector is shown with components: *EcoRI* site, CEN (centromere), ORI (origin of replication), TEL (telomere), and a Dantzen site. It is digested with *EcoRI* and *BamHI* to create sticky ends.

3. Yeast artificial chromosome with inserted human DNA: The human DNA fragments are ligated into the YAC vector using Recombination + DNA ligase. The resulting YAC contains the human DNA insert. This is then transformed into yeast cells (yeast cell transformation), resulting in clones containing the YAC with the human DNA insert. The insert is noted to be up to 100,000 nucleotides pairs long.



Construção de bibliotecas de Metagenomas

The diagram illustrates the process of constructing metagenomic libraries and analyzing them. It starts with 'Extracted environmental genomic DNA' (represented by a tangled mass of colored lines). This DNA is inserted into a 'SIGEX GFP plasmid' (a green circle) and a 'Plasmid vector' (a white circle). The resulting constructs are transformed into cells to create a 'Metagenomic library' (a collection of cells containing the plasmids). The library is then analyzed using two main approaches: 'Function-driven analysis' and 'Sequence-driven analysis'. 'Function-driven analysis' involves 'Heterologous gene expression' (a cell with a plasmid) and 'Identify proteins or small molecules' (a cell with a plasmid). 'Sequence-driven analysis' involves 'Identify DNA sequences' (a cell with a plasmid). Both analyses lead to 'Low throughput screens' and 'High throughput screens'. 'Low throughput screens' lead to 'Substrate' and 'FACS sorting' (a cell with a plasmid). 'High throughput screens' lead to 'Intracellular biosensors' (a cell with a plasmid). The final step is 'a' (a cell with a plasmid) and 'b' (a cell with a plasmid), which are used to identify 'GFP+' and 'GFP-' cells.

- ✓ Análise da diversidade biológica
- ✓ Identificação de novos produtos

-
- The diagram illustrates the SigeX workflow for identifying functional genes in environmental DNA. It begins with the extraction of environmental genomic DNA and the SigeX GFP plasmid, which are then combined with a plasmid vector to create a metagenomic library. This library is subjected to two parallel analysis strategies: function-driven analysis (involving metagenomic gene expression and identification of proteins or small molecules) and sequence-driven analysis (involving identification of DNA sequences). Both strategies lead to high-throughput screens, which are further categorized into low-throughput screens and intracellular biosensors. The final step, SigeX, involves substrate addition, FACS sorting, and selection of GFP+ cells.

[illegible]