

Aula de **Bioquímica II**

Tema:

Tecnologia do DNA Recombinante

Prof. Dr. Júlio César Borges

Depto. de Química e Física Molecular – DQFM

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Universidade de São Paulo – USP

E-mail: borgesjc@iqsc.usp.br

Tecnologia do DNA Recombinante

Conjunto de técnicas que permitem a manipulação de moléculas de DNA específicas, considerando as propriedades do DNA.

→ Tecnologia desenvolvida a partir da década de 1970 com o acúmulo do conhecimento sobre DNA, RNA e vírus.

Baseia-se nas propriedades do DNA

→ **Repositório da informação genética**

→ **Formada por duas cadeias de Ácido Deoxiribonucleotídico;**

→ **As duas cadeias são complementares;**

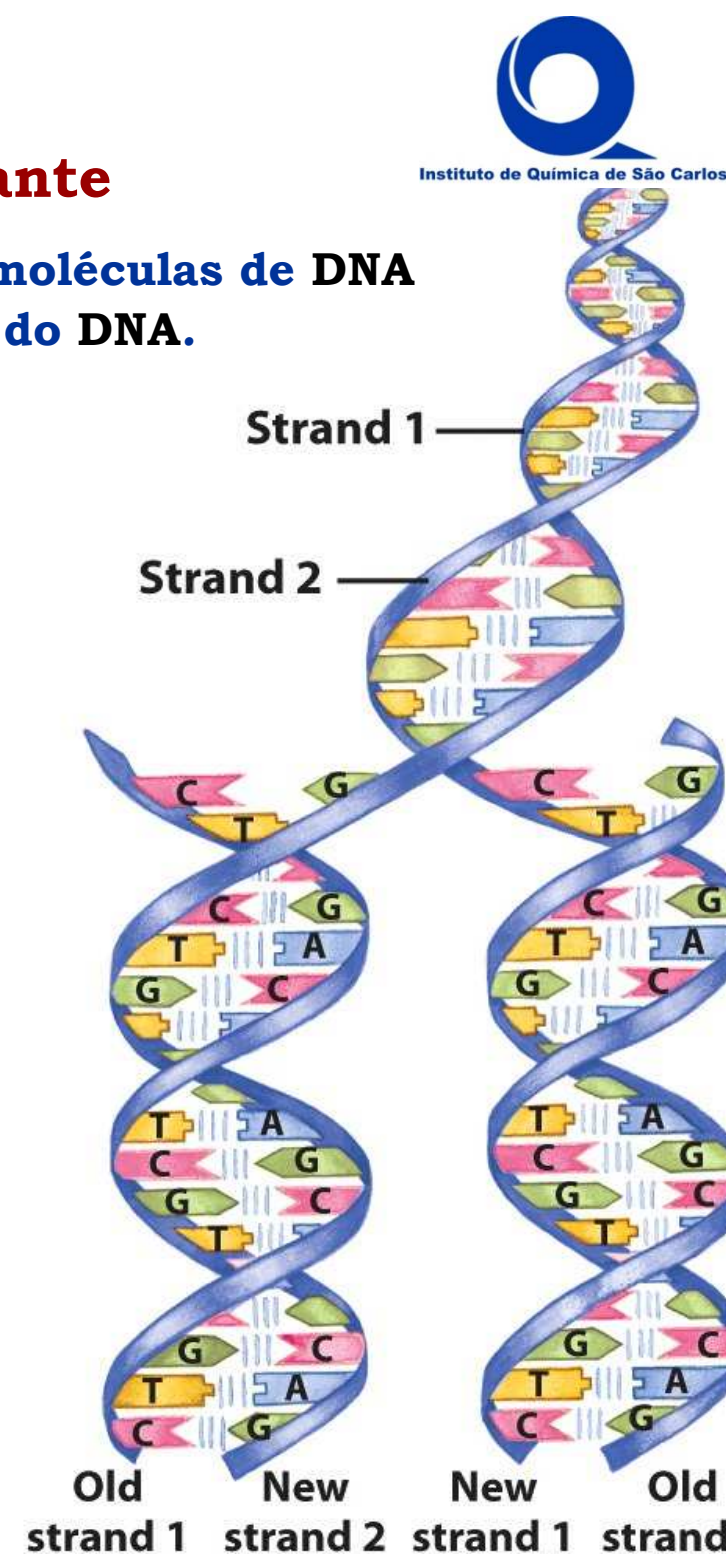
→ **Orientam-se em direções opostas;**

→ **É “estável” em meio alcalino;**

→ **Pode ser desnaturado e renaturado;**

→ **Pode ser sintetizado quimicamente com marcações;**

→ **As propriedades do DNA são universais.**



Tecnologia do DNA Recombinante ou Biologia Molecular

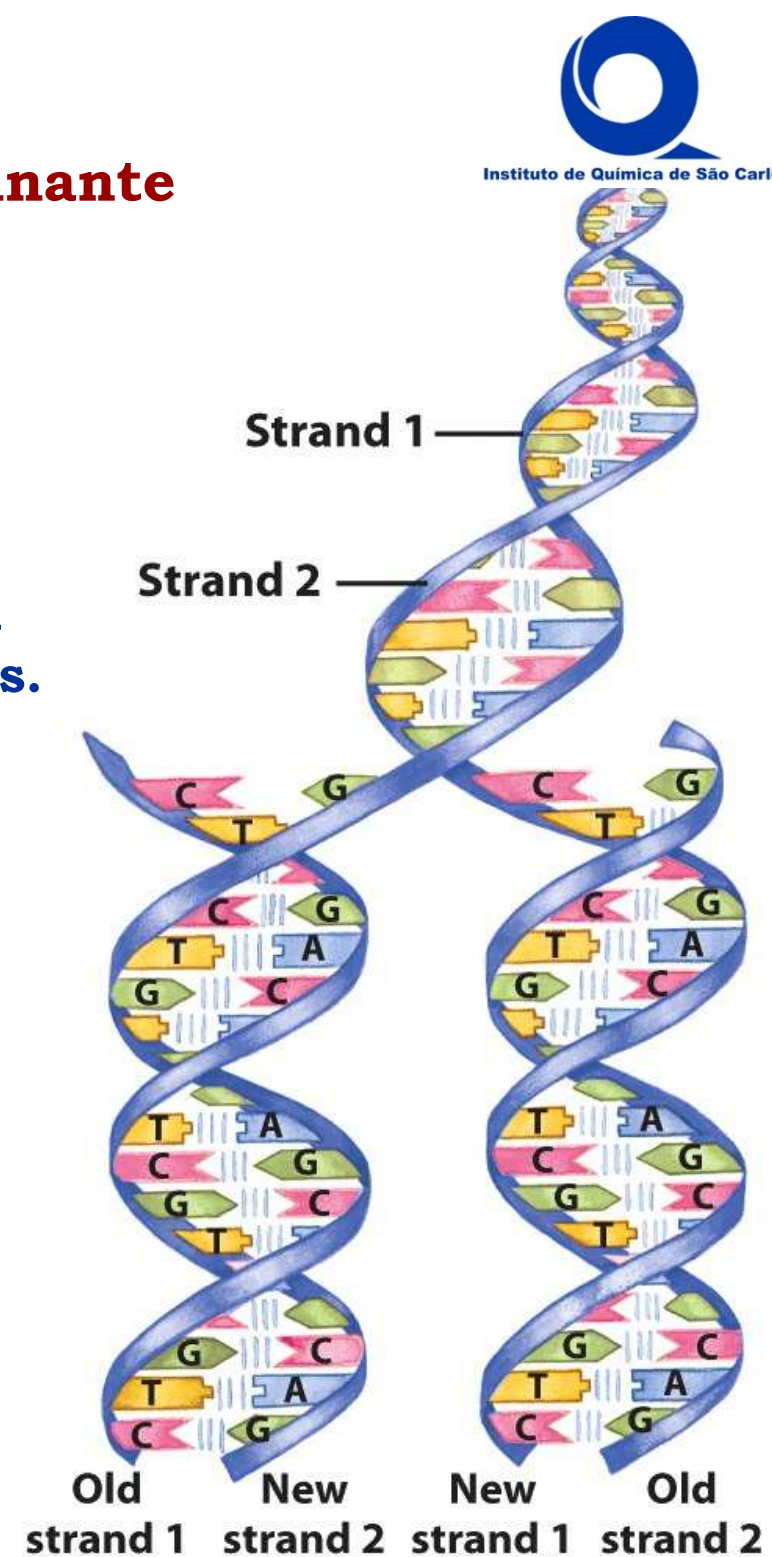
**DNA → Fita dupla complementar
→ Permite auto-replicação**

→ Baseia-se no uso de uma maquinaria enzimática celular específica e comum de diferentes organismos.

Alta multidisciplinaridade

- Genética
- Genômica e afins
- Biologia Molecular
- Bioquímica
- **Química Biológica**
- Biologia de Sistemas
- Biologia Celular
- Microbiologia

- Medicina
- Agronomia
- Engenharia Química
- Bioinformática
- Robótica
- Nanotecnologia
- Materiais
- Etc.



Tecnologia do DNA Recombinante

→ **Clonagem:** produção de organismos idênticos derivados de um ancestral comum

→ **Clonagem Molecular:** Perpetuação de uma **MOLÉCULA DE DNA** de sequência específica

Organismo Geneticamente Modificado: OGM = Transgênico

Organismo portador de material genético – um gene, parte de um gene, ou um conjunto de genes – oriundo de um ou mais organismos diferentes.

Transgene

Gene ou fragmento de DNA que foi transportado artificialmente de um organismo Doador para um organismo Receptor criando o OGM.

Tecnologia do DNA Recombinante: Aplicações

- **Estudo dos genes de um organismo = Estudos genômicos;**
- **Estudo da regulação de um gene ou conjunto de genes;**
- **Desenvolvimento de Vacinas e de Vacinas de DNA;**
- **Desenvolvimento de Terapias gênicas;**
- **Obtenção de transgênicos;**
 - **Vegetais ou animais resistentes a pragas;**
 - **Vegetais ou animais mais produtivos;**
 - **Vegetais ou animais que produzem medicamentos ou vacinas;**
- **Produção de produtos biotecnológicos/medicamentos/enzimas;**
- **Diagnóstico médico;**
- **Tecnologia forense (crimes, paternidade, controle se qualidade);**
- **Estudo do produto final do gene: RNA/Proteína.**

Estudos funcionais e estruturais de proteínas

Depende da obtenção da proteína-alvo pura, estável e em larga escala para estudos da relação estrutura-função da proteína-alvo e sua interação com ligantes → Inibidores → Fármacos

Se torna o fator limitante do processo!!!

Solução: Produção heteróloga de proteínas

Produção de uma Proteína do Organismo X em microorganismos (*Escherichia coli* - principal), leveduras, vegetais ou animais.

Obtenção de proteínas em larga escala

→ Para aplicação farmacológica:

- Insulina, anticorpos, imunotoxinas (quimeras proteicas entre a cadeia leve de anticorpo monoclonal e alguma toxina), vacinas, etc.;

→ Para aplicação biotecnológica:

- Uso comercial de enzimas específicas;
- Catálise de reações orgânicas específicas;
- Produção de enzimas para degradar celulose do bagaço de cana;

→ Para estudos científicos:

- Estrutura/função/regulação de proteínas/enzimas.
 - Deleções, mutagênese sítio dirigida, proteínas quiméricas, etc

Tecnologia do DNA Recombinante

Uso de diversas enzimas para executar passos específicos de manipulação do segmento de DNA alvo

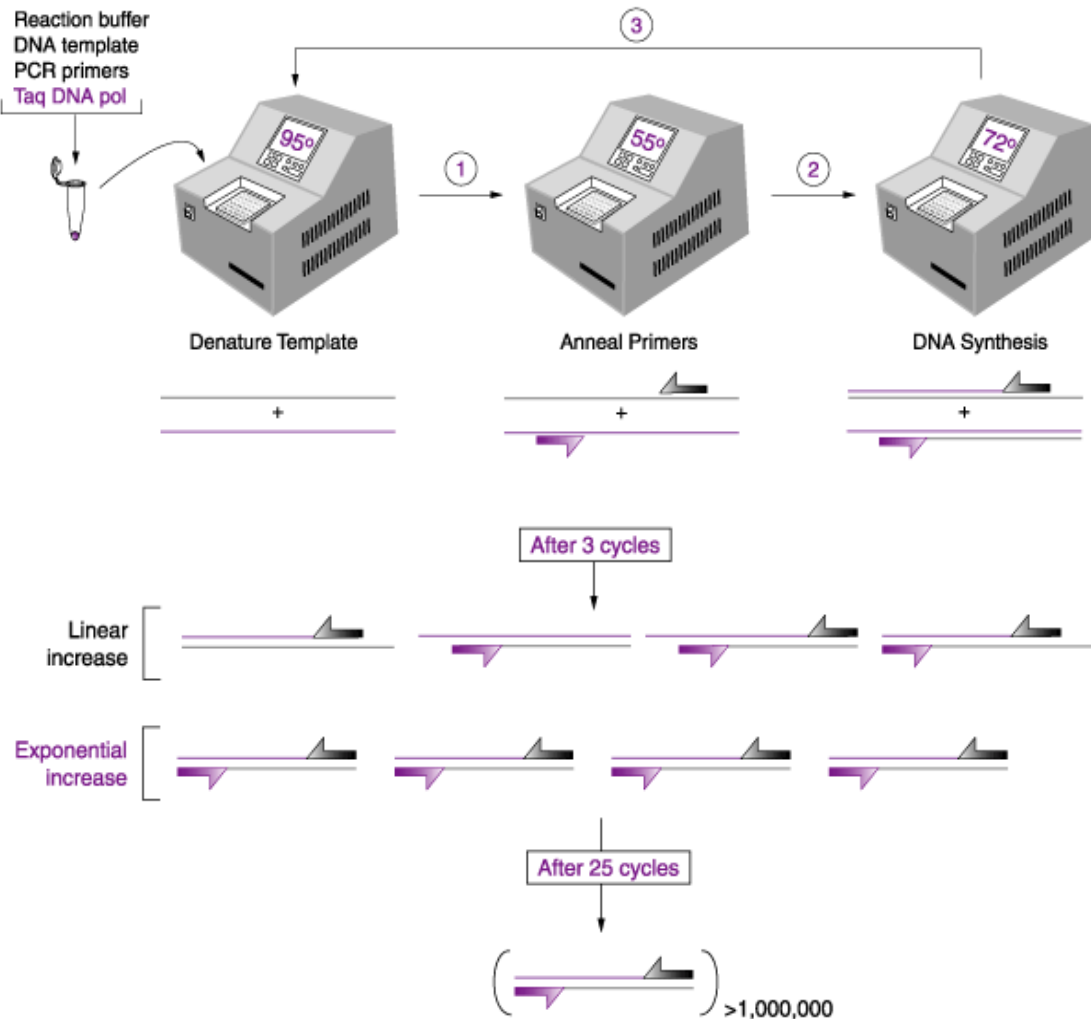
- 1 – Moléculas específicas de DNA podem ser amplificadas**
 - **Reação em cadeia da polimerase - PCR**
- 2 – O DNA pode ser cortado em posições específicas**
 - **Endonucleases de restrição**
- 3 – Seleção de pequenas moléculas de DNA capazes de auto-replicação**
 - **Vetores contendo marcas de seleção**
- 4 – Diferentes moléculas de DNA podem ser ligadas covalentemente**
 - **DNA-Ligase → DNA recombinante**
- 5 – Moléculas de DNA sintéticas podem ser inseridas em células vivas**
 - **Transformação de células → Geração de OGMs**
- 6 – Células contendo o DNA recombinante pode ser selecionada**
 - **Seleção do clone de interesse**

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Ciclo térmico de síntese *in vitro* de DNA pela DNA pol

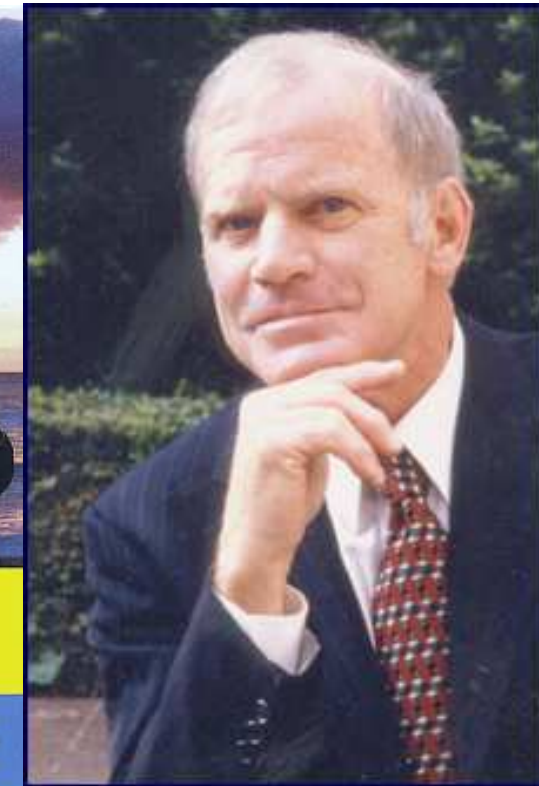
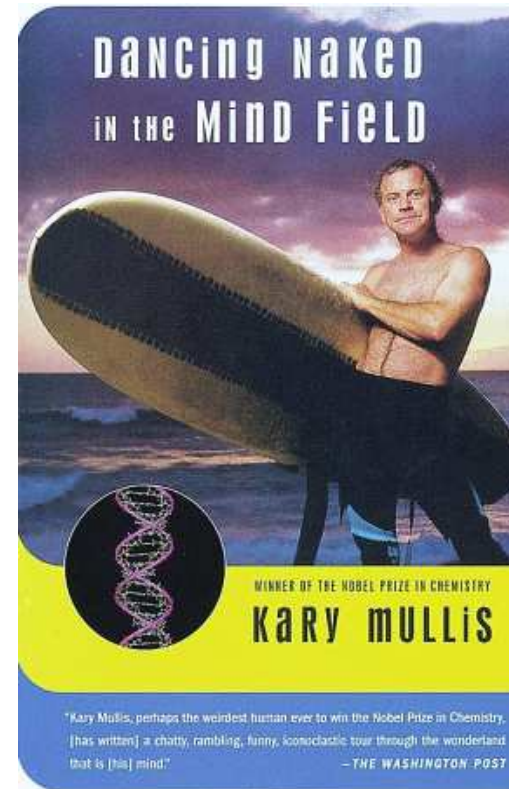
Permite a amplificação de um fragmento de DNA específico $> 1e6$

Necessita de Primer = iniciador = oligonucleotídeo sintético específico



Kary Mullis

Nobel Prize winner Chemistry (1993)



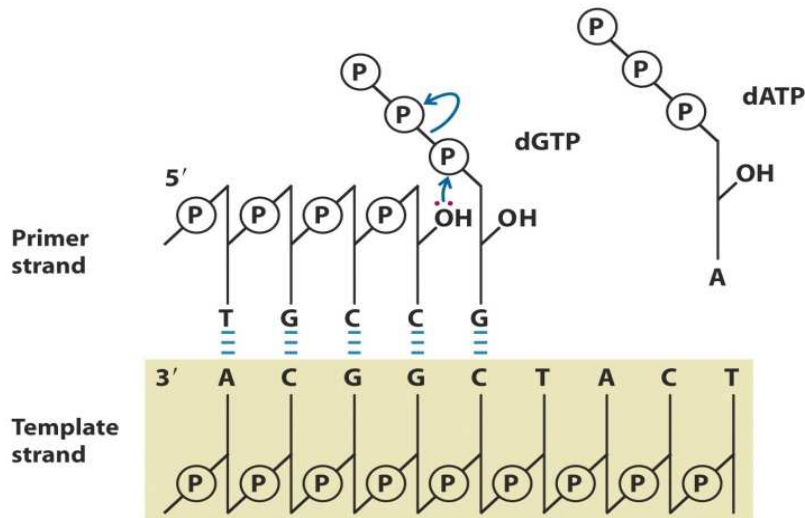
Clonagem Molecular

→ Desenho do Primer

→ Usa o fato da DNAPol necessitar de um iniciador para a polimerização

- Deve Flanquear a sequência de DNA de interesse

- Pode carregar modificações na sequência para introduzir sítios de restrição para endonucleases



São oligonucleotídeos de DNA complementares ao DNA de interesse

Known amino acid sequence H_3N^+ --- Gly --- Leu --- Pro --- Trp --- Glu --- Asp --- Met --- Trp --- Phe --- Val --- Arg --- COO^-

Possible codons (5') G G A U U A C C A U G G G A A G A C A U G U G G U U C G U A A G A (3')

G G C U U G C C C G A G G A U U U G U C A G G

G G U C U A C C U G U U G U U C G A

G G G C U C C C G G U G C G C

C U U C U U C G U C G U

C U G C U G C G G

Region of minimal degeneracy

Synthetic probes U G G G A A G G A C A U G U G G U U C U G U

20 nucleotides long, 8 possible sequences

Podem ser desenhados a partir da sequência de uma proteína
→ Primer degenerados

Clonagem Molecular

→ Síntese química do Primer

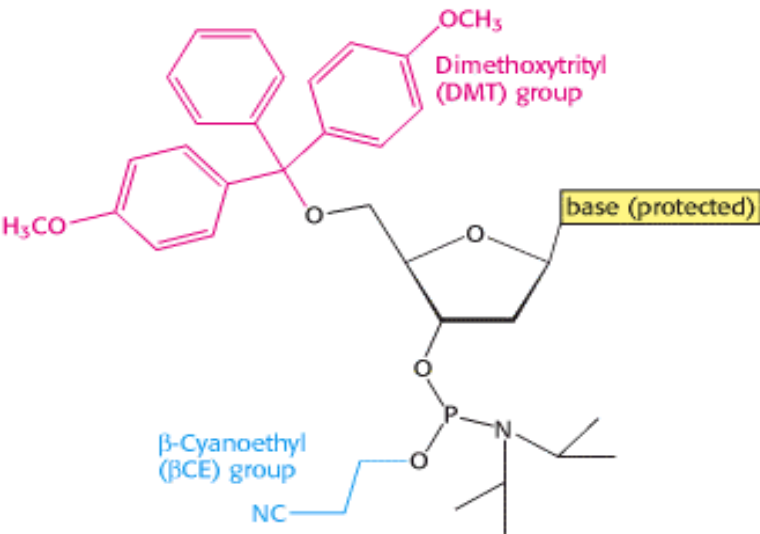
→ Síntese em fase sólida

1- Acoplamento

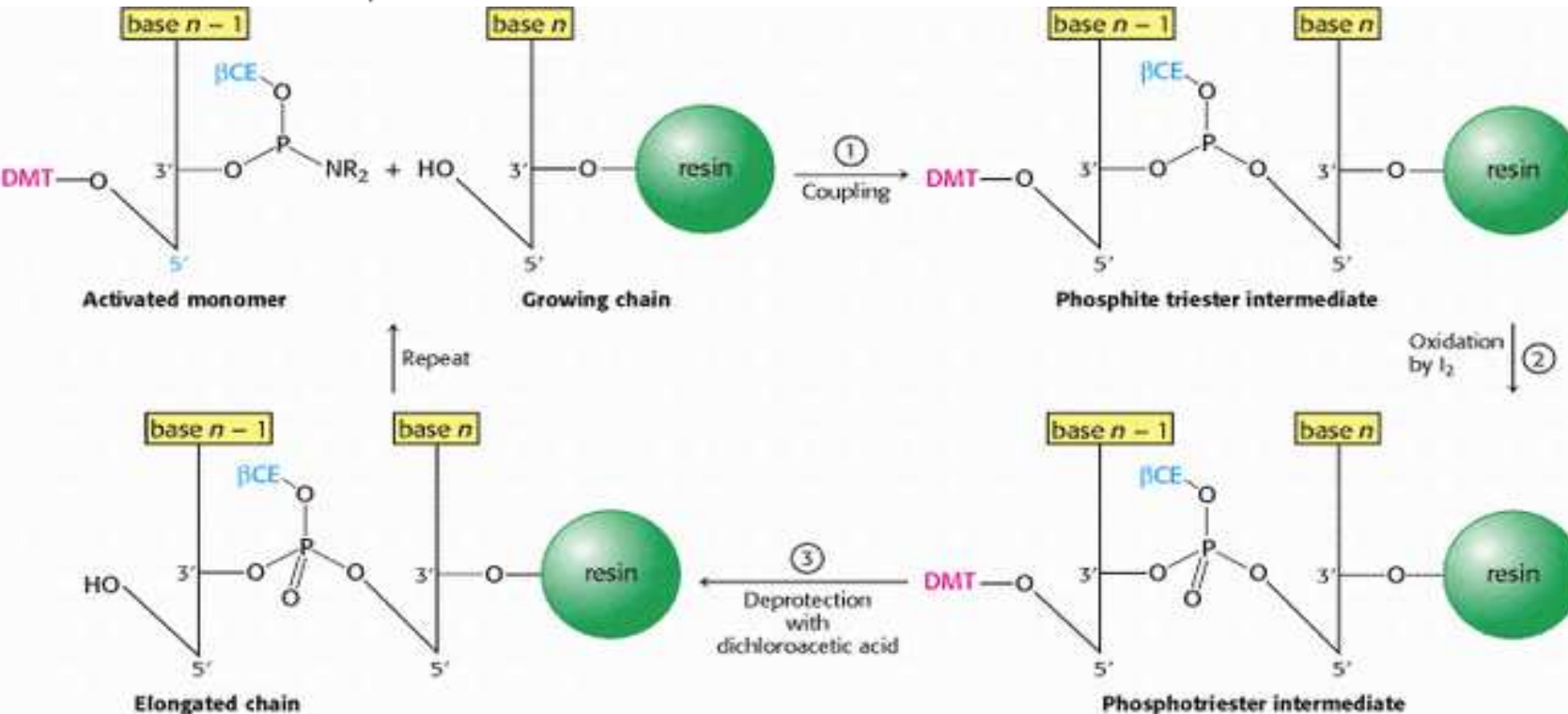
2- Oxidação

3- Desproteção

n vezes



A deoxyribonucleoside 3'-phosphoramidite with DMT and βCE attached



→ Finalização da síntese:
NH₃ desprotege todos os grupos e retira o oligonucleotídeo da fase sólida

- Purificação por HPLC

Clonagem molecular

→ Reação em Cadeia da Polimerase

Polymerase Chain Reaction - PCR

Reação cíclica que se baseia em 3 etapas:

1° - Desnaturação do DNA

- ~95 °C

2° - Anelamento do Primer

- ~45-65 °C

3° - Polimerização

- 72 °C

→ Depende de DNA pol termoestável:

- *Thermus aquaticus* polimerase: **Taq polimerase**

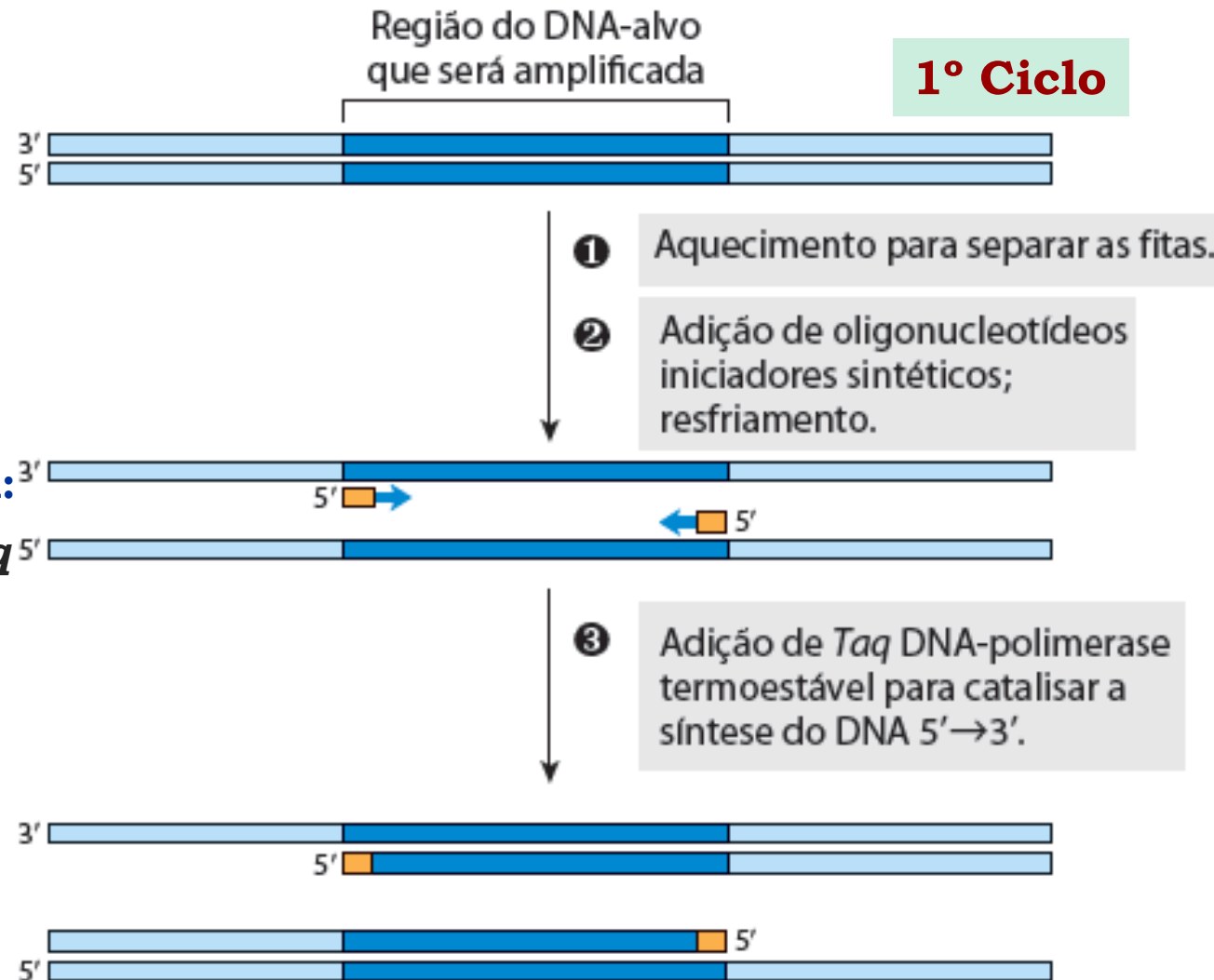
Requer:

- DNA molde

- Par de primers flanqueando o DNA molde

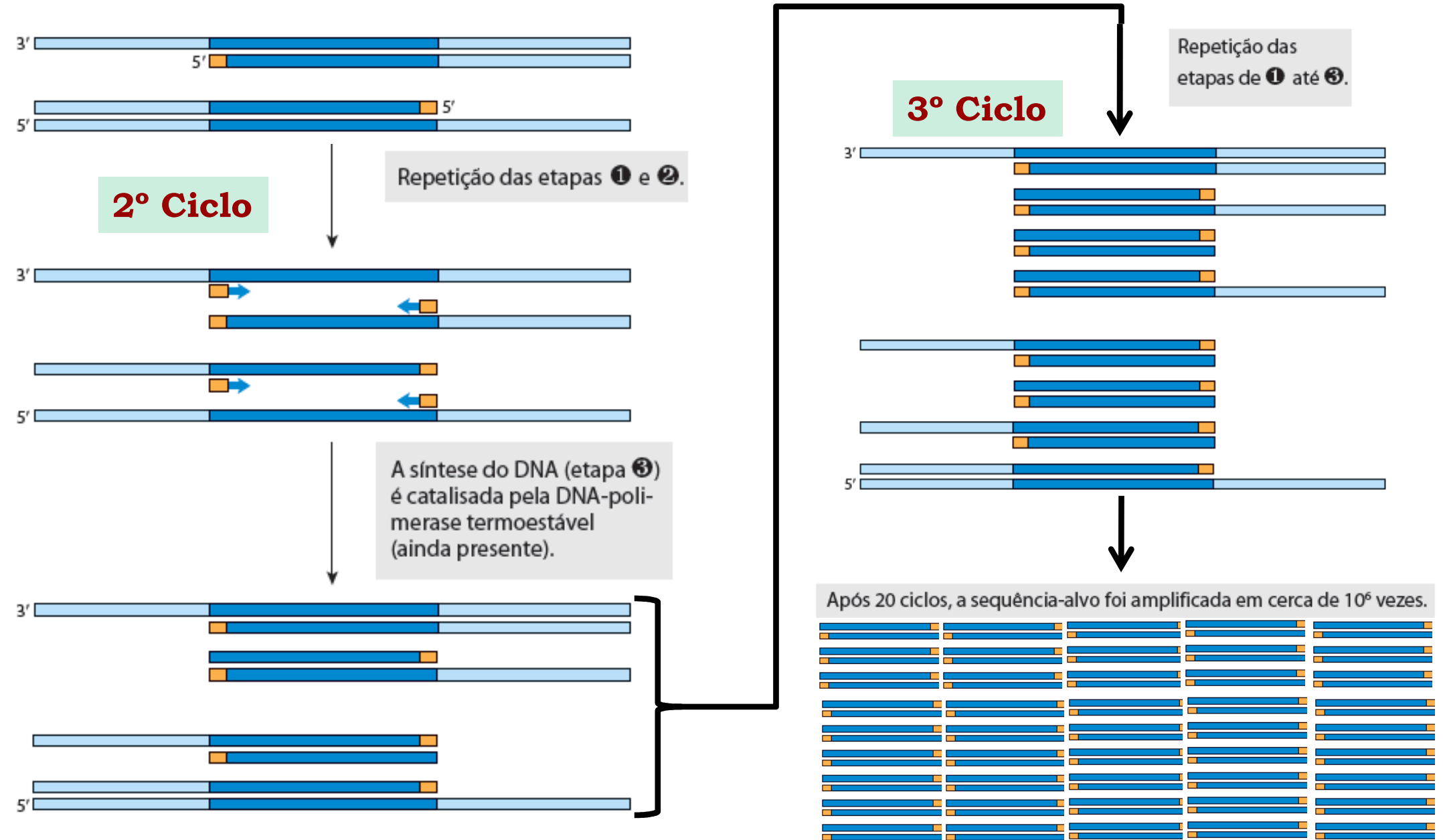
- Os 4 dNTPs

- Mg²⁺



Clonagem molecular

→ PCR (Continuação)

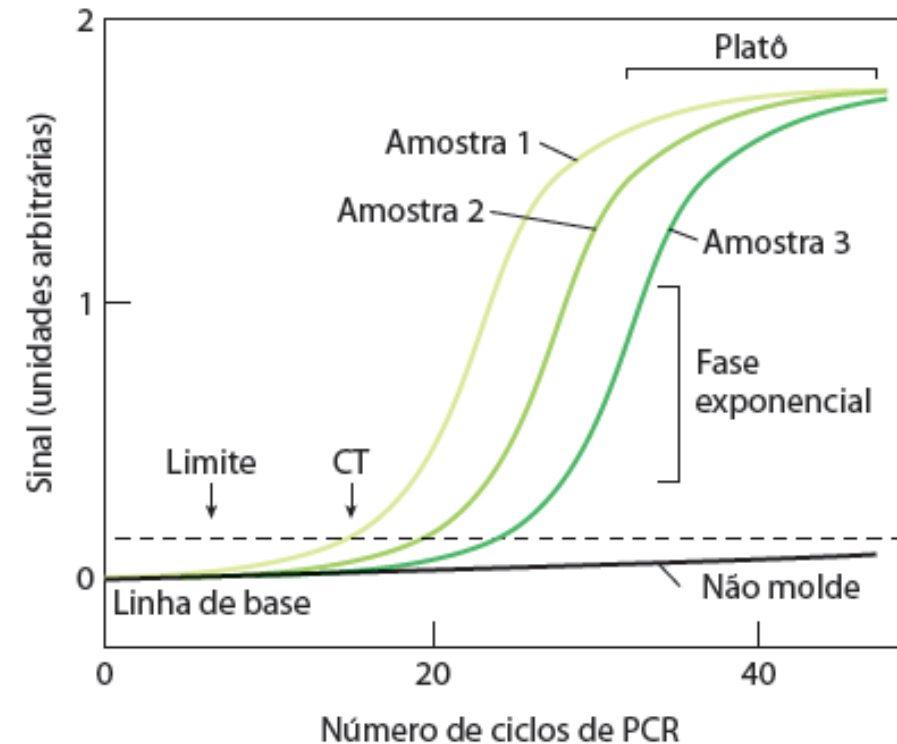
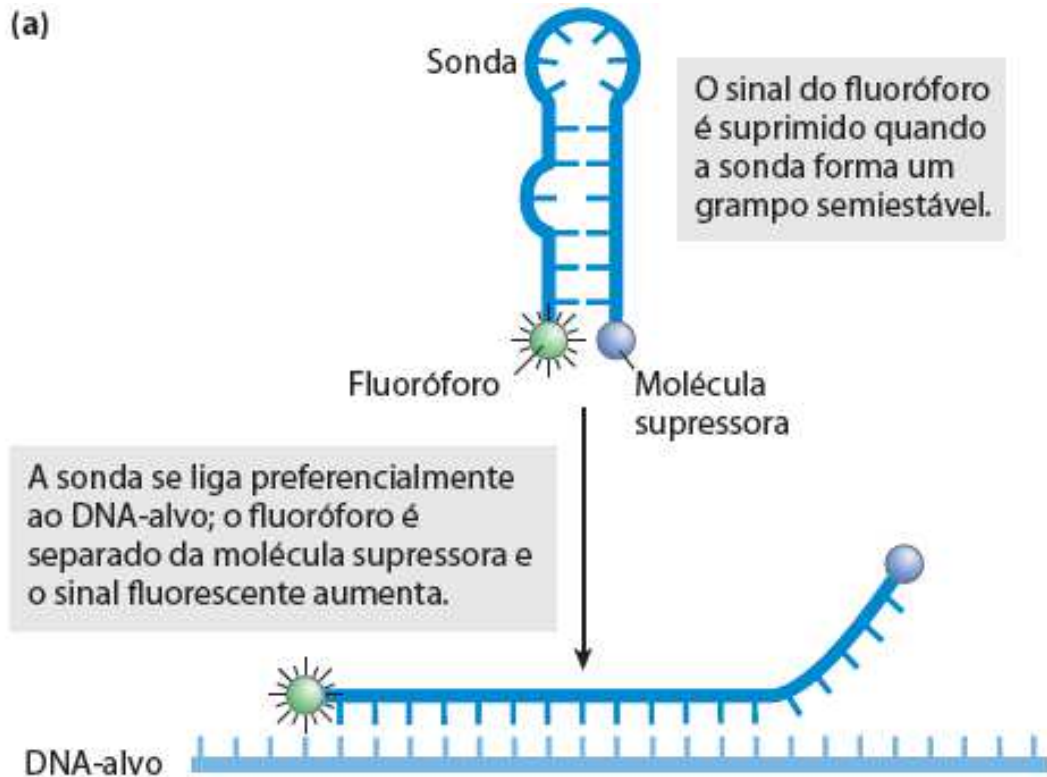


Clonagem molecular

→ PCR quantitativa

→ Permite quantificar analiticamente a quantidade de DNA/cDNA numa amostra

- Aplicações em diagnóstico clínico laboratorial, forense, criminalística, monitoramento ambiental, controle de qualidade, avaliação de transgênicos, etc.
- Usa sonda fluorescente suprimida num oligonucleotídeo específico



Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Características e vantagens

1) Sequência alvo não precisa ser conhecida

→ apenas os flancos para o desenho dos primers de DNA

2) A sequência alvo pode ser muito maior do que os primers

3) Os primers não precisam anelar perfeitamente com a sequência alvo

→ Permite amplificar conjunto de sequências similares

→ Permite introduzir mudanças/mutações na sequência alvo

4) A PCR é altamente específica

→ Pode ser modulado pela temperatura de anelamento

5) Altamente sensível

→ Uma única molécula de DNA pode ser amplificada e detectada

→ Amplifica 1 bilhão de vezes após 30 ciclos (2^n , sendo n o número de ciclos)

6) Inúmeras aplicações tecnológicas, em diagnóstico, forense e até

paleontológicas

Endonucleases de Restrição

Enzimas de Restrição

- Enzimas Especializadas em degradar DNA exógeno em bactérias
- Mecanismo de defesa contra infecção viral

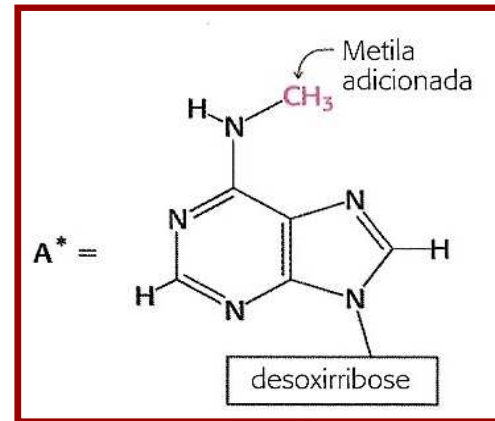
Altíssima especificidade

- Reconhecem sequências específicas – Sítios de restrição

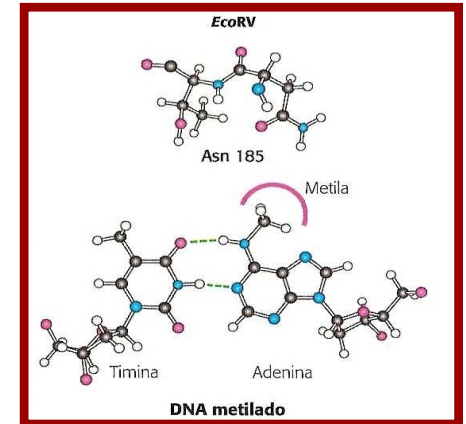
→ Reconhecem apenas o DNA Exógeno

→ Metilases marcam o DNA Endógeno

Clivada	Não clivada
5' ~~~~~ GATATC ~~~~~ 3' 3' ~~~~~ CTATAG ~~~~~ 5'	5' ~~~~~ G*ATATC ~~~~~ 3' 3' ~~~~~ CTATAG* ~~~~~ 5'



Metilação no DNA endógeno



Impedimento estérico

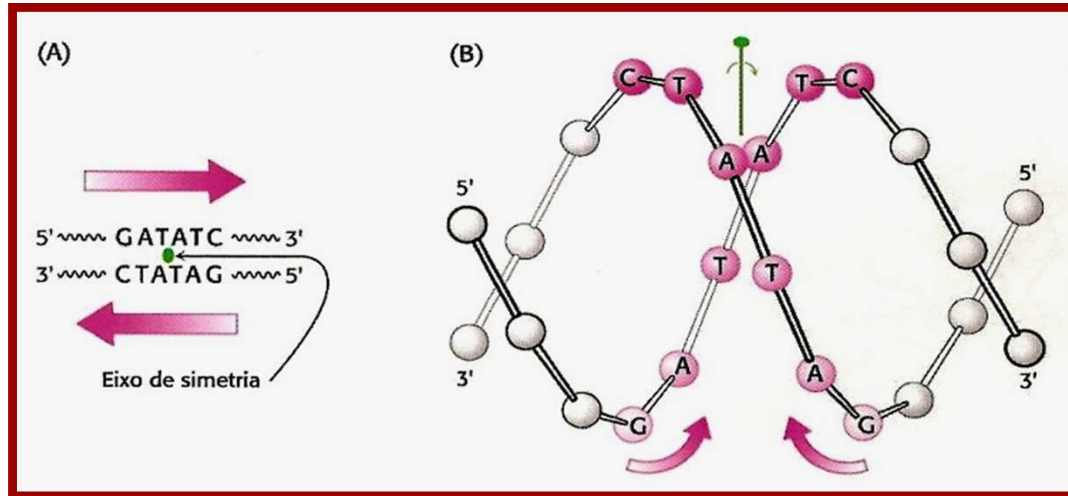
- Reconhecem Sequências palindrômicas de DNA
- Sequências lidas da mesma forma em ambos os sentidos, ou seja, em ambas as fitas de DNA

Palindrome

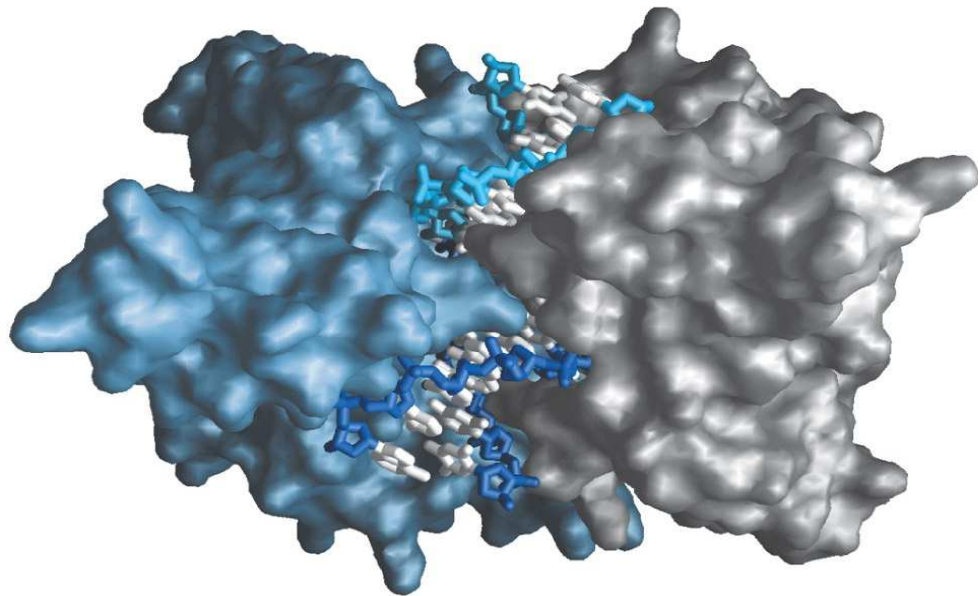


Endonucleases de Restrição

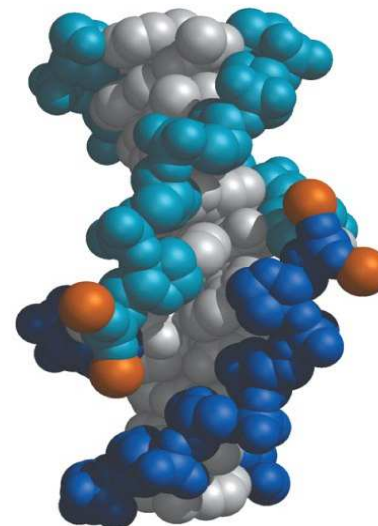
Enzimas de Restrição



→ Enzima dimérica age nas duas fitas do DNA



(a)



(b)

Endonucleases de Restrição

- Tipo I → Clivagem em sítios aleatórios em até 1000 pb do sítio de reconhecimento
- Tipo II → Clivagem dentro do sítio de reconhecimento
- Tipo III → Clivagem em sítios aleatórios em ~25 pb do sítio de reconhecimento
- Clivagem em extremidades **coesivas/adesivas** ou **cegas**

TABLE 9-2 Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases

<i>Bam</i> HI	<p>(5') G G A T C C (3') C C T A G G</p>	<i>Hind</i> III	<p>(5') A A G C T T (3') T T C G A A</p>
<i>Cla</i> I	<p>(5') A T C G A T (3') T A G C T A</p>	<i>Not</i> I	<p>(5') G C G G C C G C (3') C G C C G G C G</p>
<i>Eco</i> RI	<p>(5') G A A T T C (3') C T T A A G</p>	<i>Pst</i> I	<p>(5') C T G C A G (3') G A C G T C</p>
<i>Eco</i> RV	<p>(5') G A T A T C (3') C T A T A G</p>	<i>Pvu</i> II	<p>(5') C A G C T G (3') G T C G A C</p>
<i>Hae</i> III	<p>(5') G G C C (3') C C G G</p>	<i>Tth</i> 111I	<p>(5') G A C N N N G T C (3') C T G N N N C A G</p>

Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by each restriction endonuclease. Asterisks indicate bases that are methylated by the corresponding methylase (where known). N denotes any base. Note that the name of each enzyme consists of a three-letter abbreviation (in italics) of the bacterial species from which it is derived, sometimes followed by a strain designation and Roman numerals to distinguish different restriction endonucleases isolated from the same bacterial species. Thus *Bam*HI is the first (I) restriction endonuclease characterized from *Bacillus amyloliquefaciens*, strain H.

Vetores

Plasmídios e bacteriófagos

→ Moléculas de DNA capazes de auto-replicação -

- Diferentes de cromossomas bacterianos

- Tamanho: 1 a 200 kbp

- Diferentes vetores para diferentes objetivos

→ Carregam vantagens para o hospedeiro → marcas de seleção

→ Contém sistemas de Origem de auto-replicação – sequência *Ori*

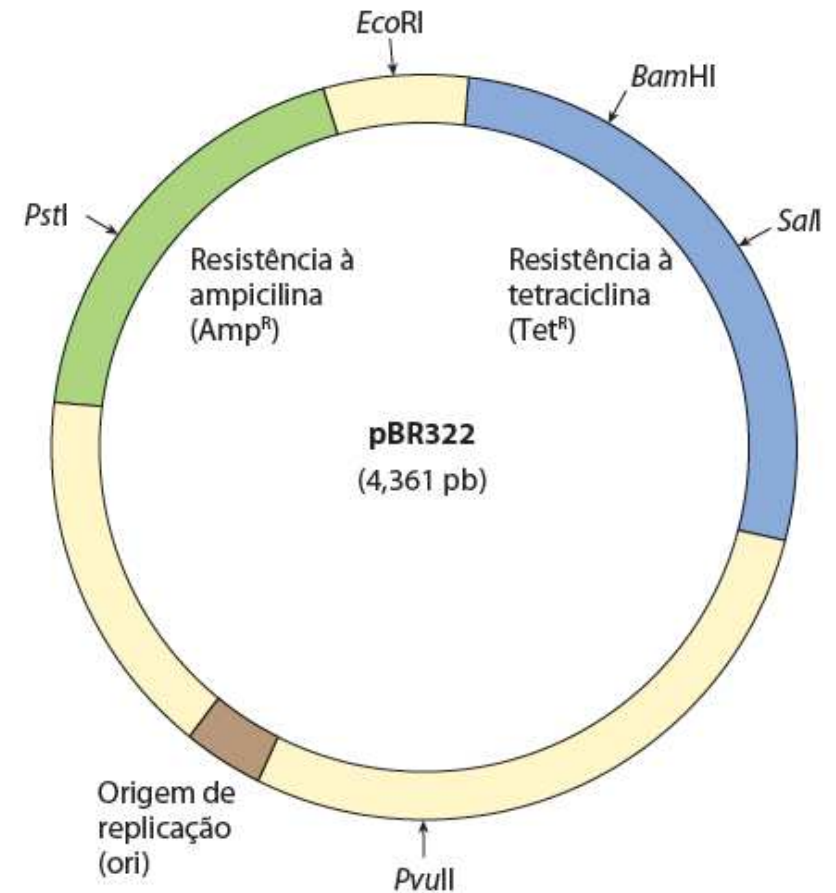
→ Codificam Proteínas

- Resistência a antibióticos

Plasmídeos

→ 1 a 100-1000 cópias por bactéria

→ Parasitas moleculares



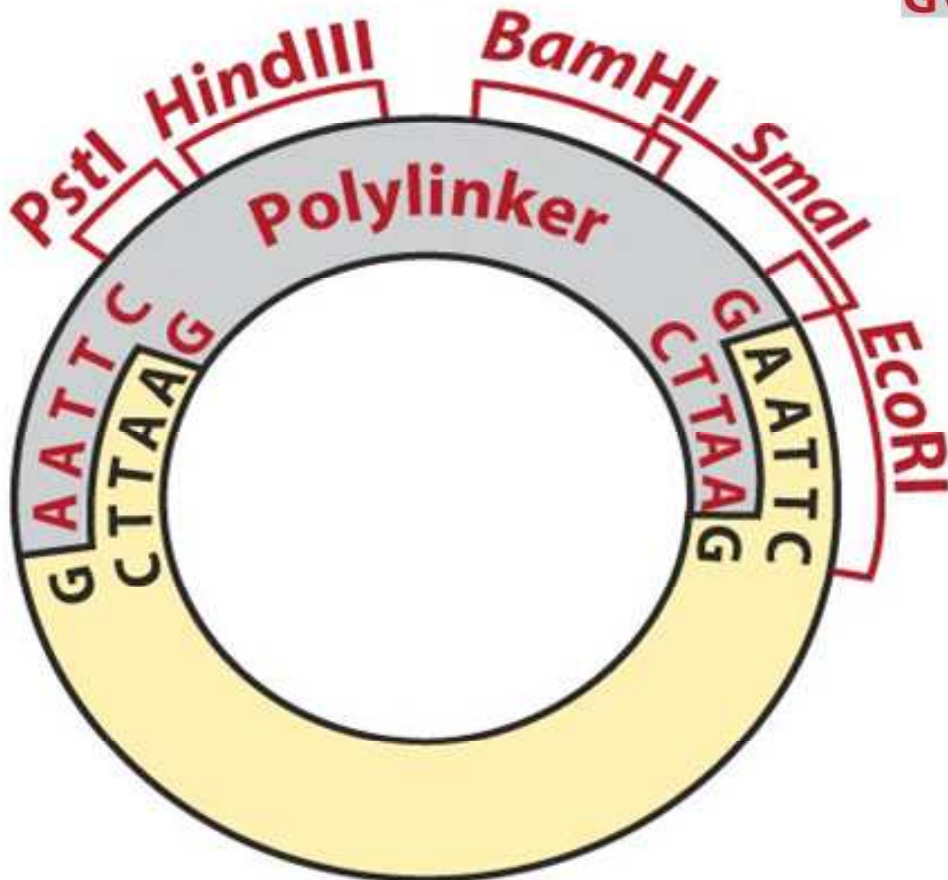
Vetores de clonagem

- Permite a propagação de moléculas de DNA de interesse
- Possuem sítios múltiplos de clonagem
- Permitem a inserção de sequências de DNA



Synthetic polylinker (Sítio Múltiplo de Clonagem)

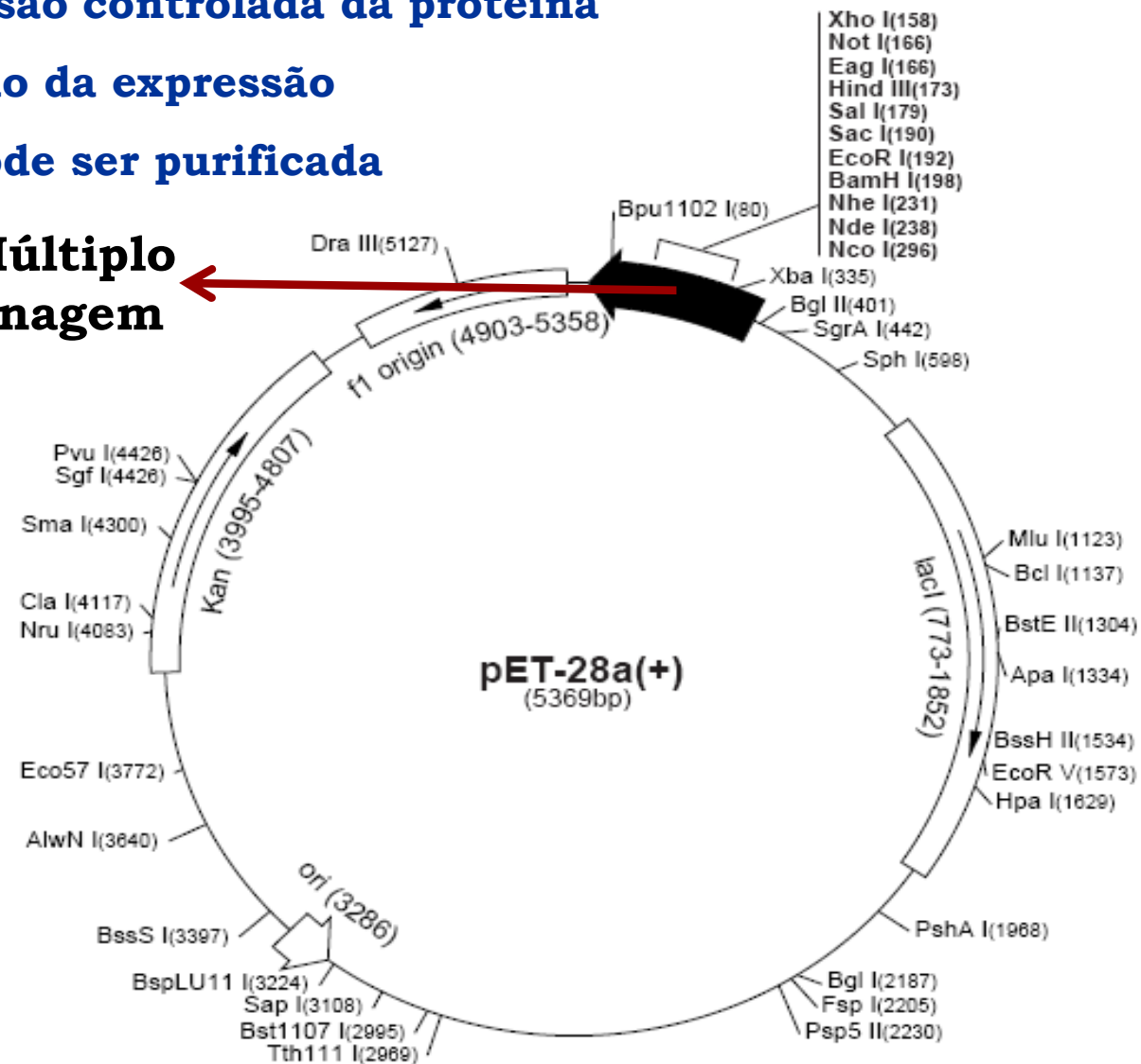
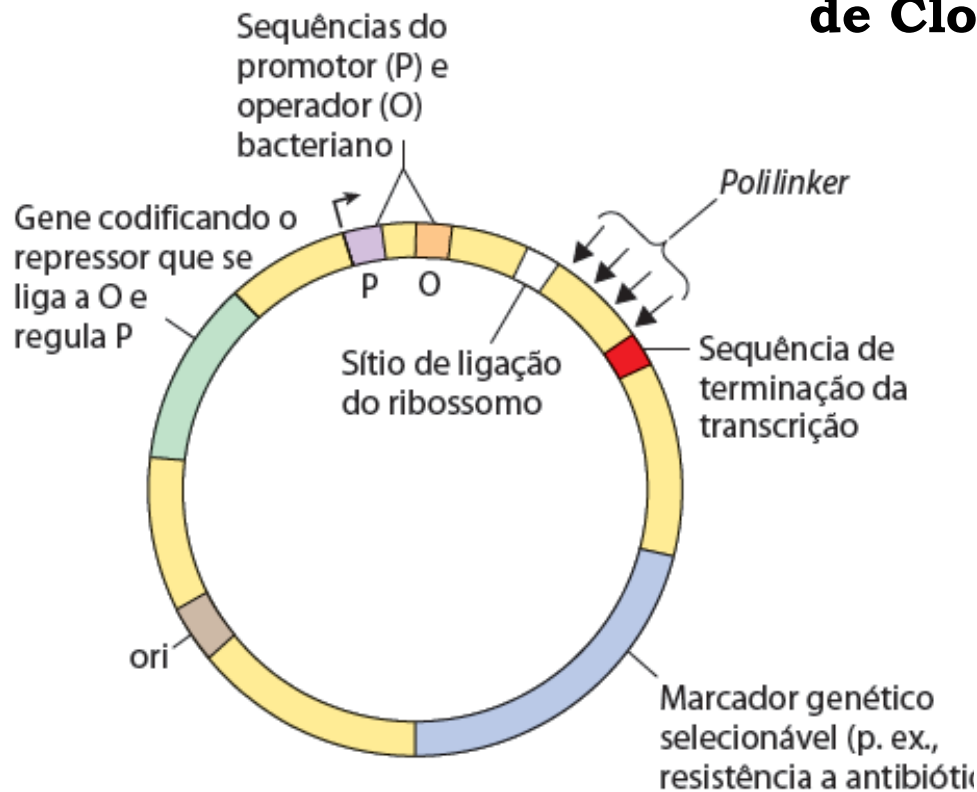
- O Sítio Múltiplo de Clonagem pode ser aberto por Endonucleases de restrição.
- Uma sequência de DNA pode ser inserida – As sequências de DNA podem ser seladas nas extremidades por uma DNA ligase.



Vetores de Expressão

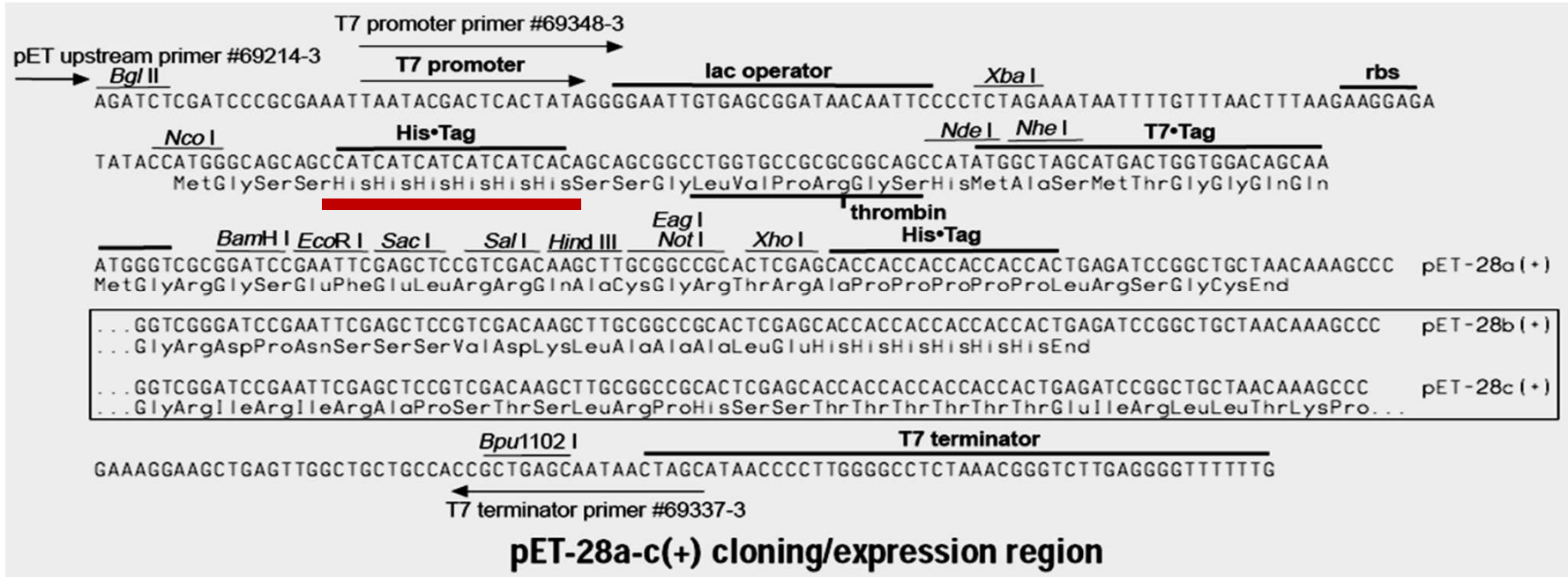
- Permite expressar uma proteína
- Fragmento de DNA deve ser inserido em fase de leitura
- Permite a expressão controlada da proteína
 - Indução da expressão
- Proteína pode ser purificada

Sítio Múltiplo de Clonagem



Vetores de Expressão

Sítio Múltiplo de Clonagem pET28a

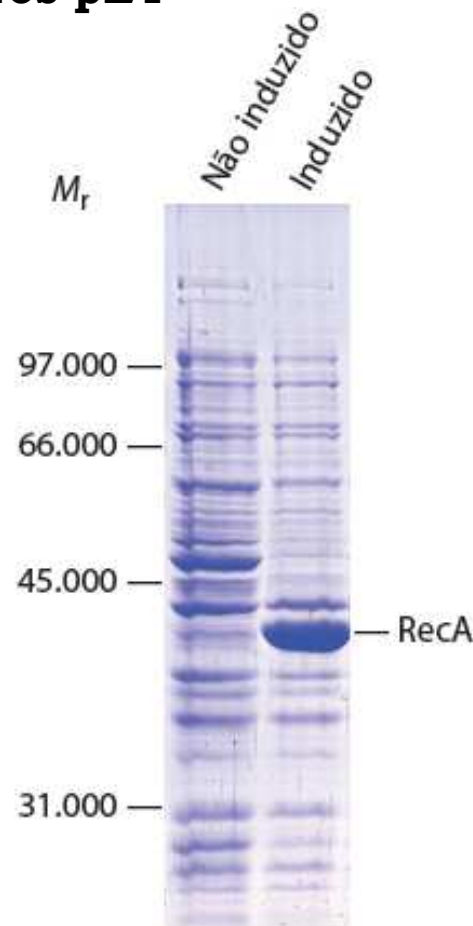
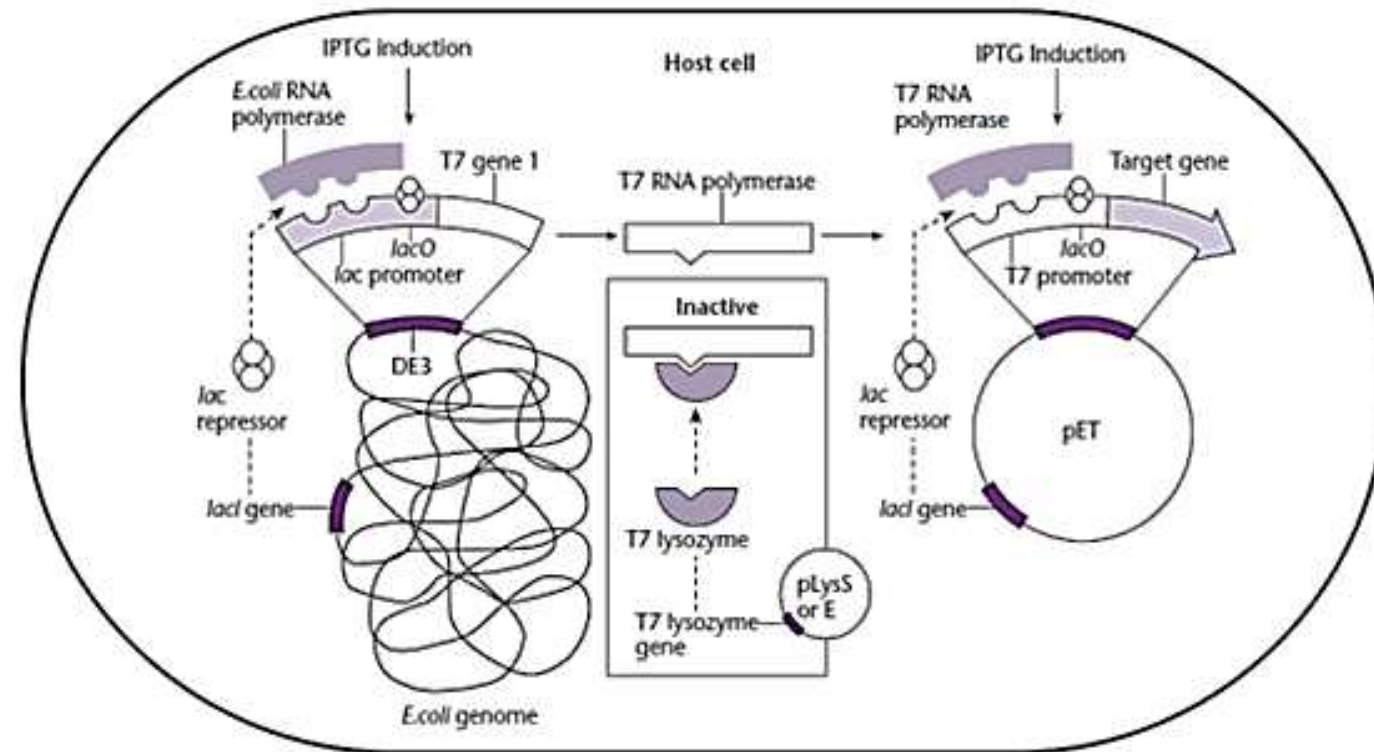


**Marcadores de fusão
usados para a purificação
da proteínas por
cromatografia de afinidade**

Marcadores proteicos/ peptídicos	Massa molecular (kDa)	Ligante imobilizado
Proteína A	59	Porção Fc da IgG
(His) ₆	0,8	Ni ²⁺
Glutaciona-S-transferase (GST)	26	Glutaciona
Proteína ligante de maltose	41	Maltose

Vetores de Expressão

Indução de proteínas pelos Vetores pET



IPTG = indutor

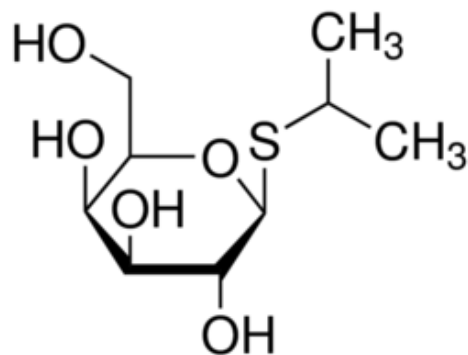
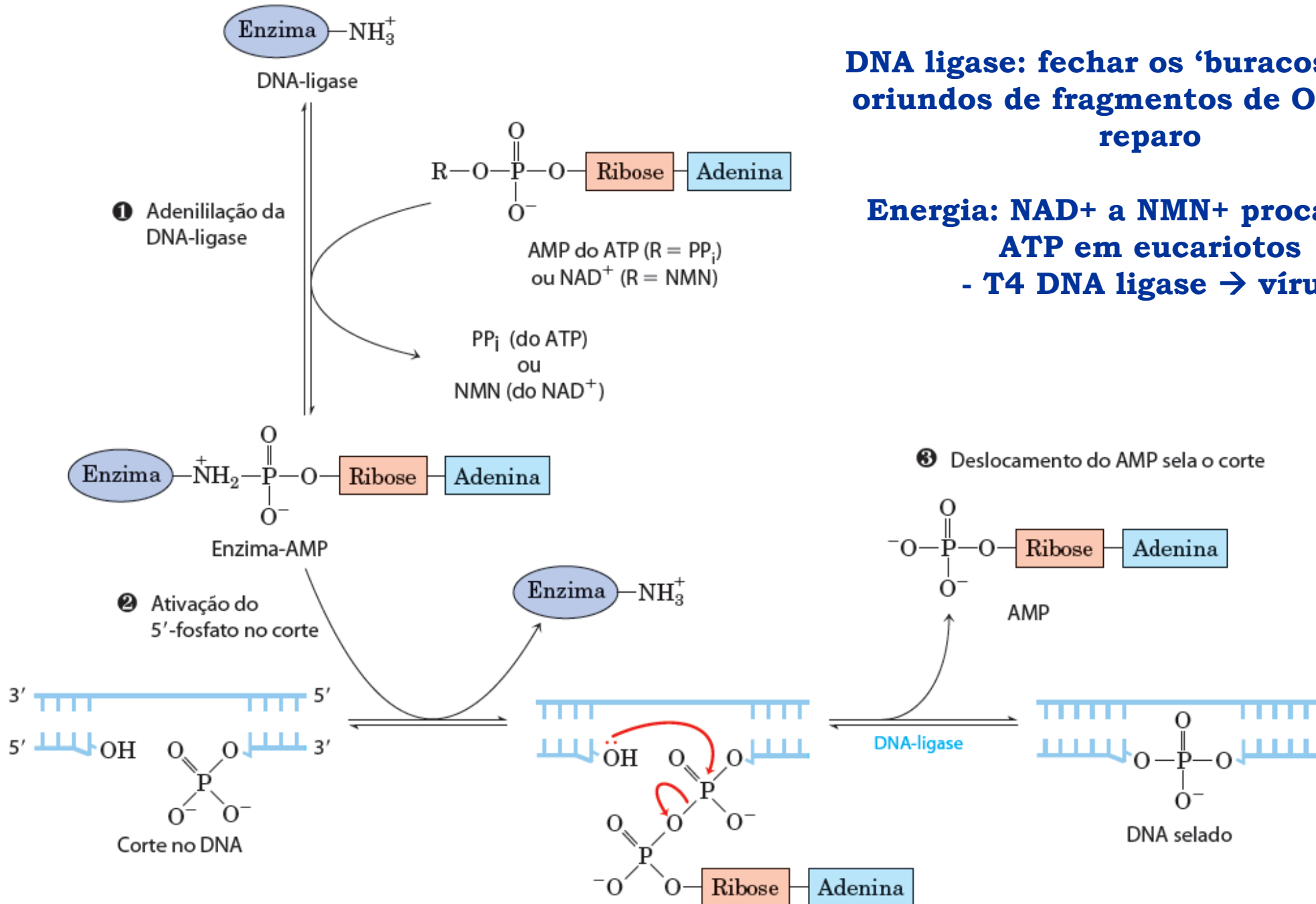


FIGURA 9-8 Expressão regulada da proteína RecA em uma célula bacteriana. O gene que codifica a proteína RecA, fusionado com o promotor T7 do bacteriófago, é clonado em um vetor de expressão. Em condições normais de crescimento (não induzido), nenhuma proteína RecA aparece. Quando a RNA-polimerase de T7 é induzida na célula, o gene *recA* é expresso e grandes quantidades da proteína RecA são produzidas. As posições dos marcadores de peso molecular padrão que correm no mesmo gel são indicadas.

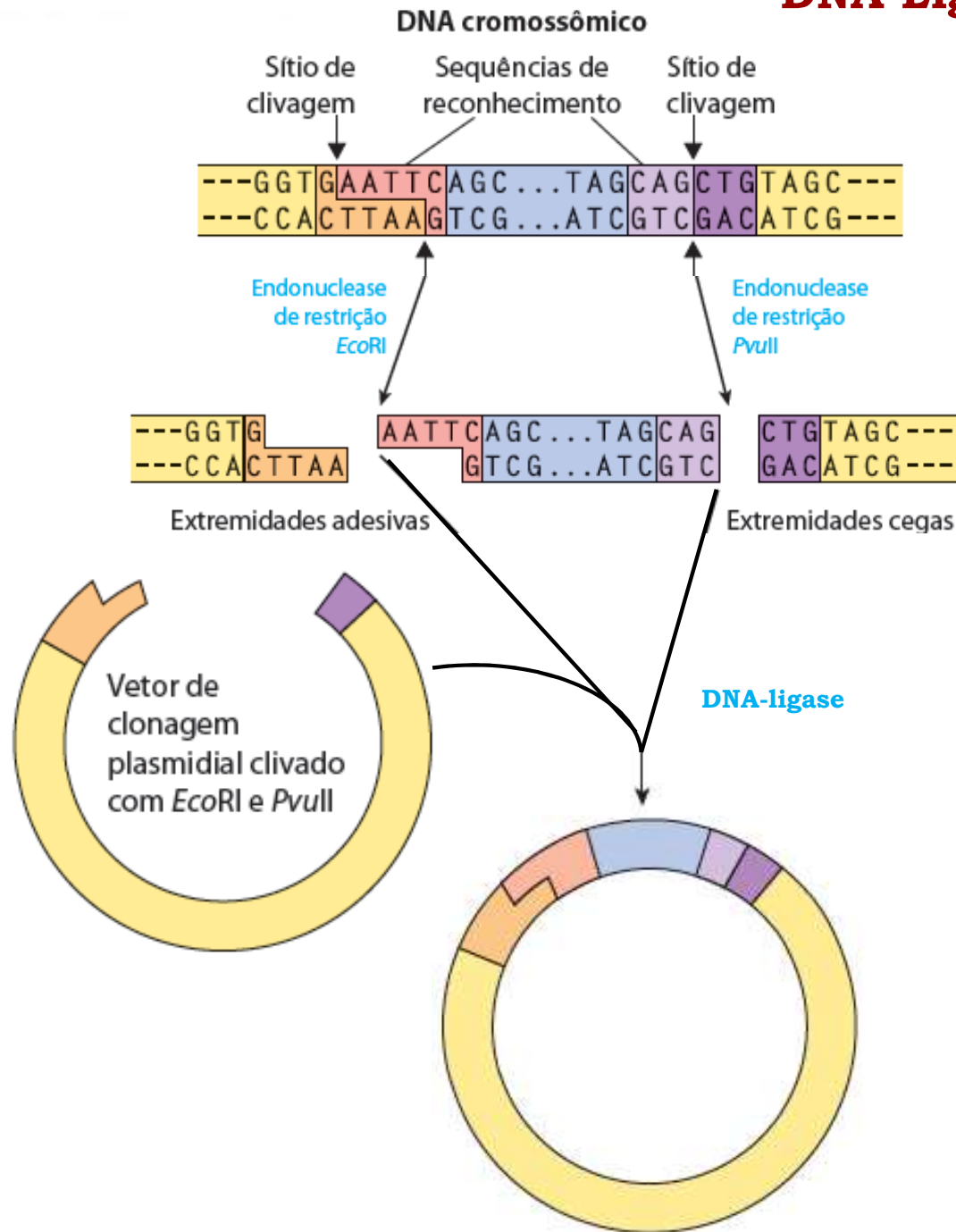
DNA-Ligases

DNA ligase: fechar os 'buracos' (nicks) oriundos de fragmentos de Okasaki e reparo

**Energia: NAD⁺ a NMN⁺ procaríotos;
ATP em eucariotos
- T4 DNA ligase → vírus**



DNA-Ligasas



→ Permitem a ligação de diferentes moléculas de DNA

Ligam fragmentos de DNA clivados com pares de Endonucleases de restrição

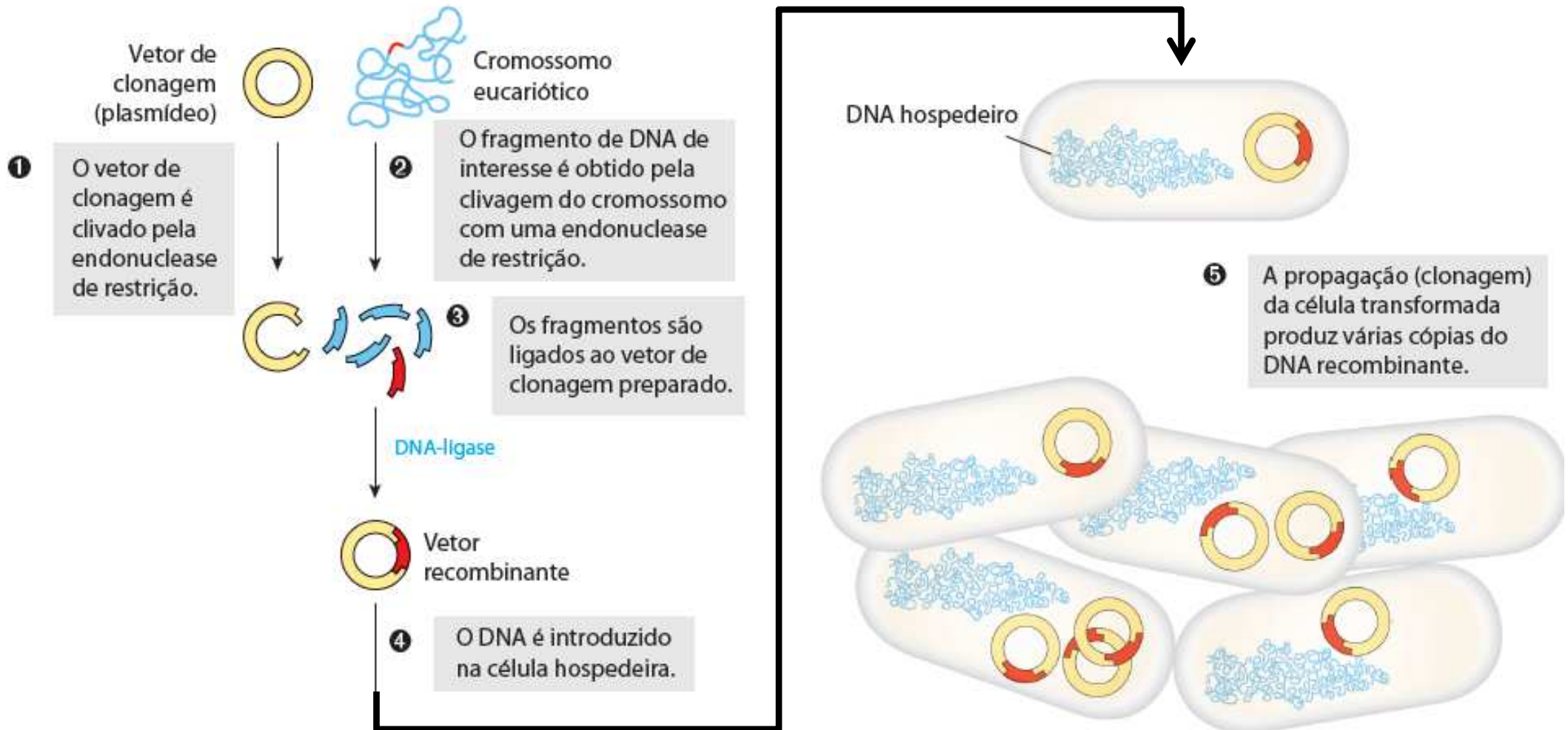
- Ligação de extremidades produzidas por pelo 1 Endonuclease de restrição que produza pelo menos 1 extremidade ocasiona ligação na orientação adequada

Bibliotecas

→ Bibliotecas de DNA → a partir de DNA genômico

- DNA genômico pode ser fragmentado mecanicamente ou enzimaticamente em pedaços menores

- Clonados em fagos e plasmídios



Bibliotecas genômicas

→ Bibliotecas de DNA → a partir de DNA genômico

- Permite o sequenciamento genômico

Permite o estudo do potencial gênico do organismo e sua regulação

- Função predita por comparação

Genômico comparativa

Identificação de genes:

Homólogos: ancestral comum na espécie

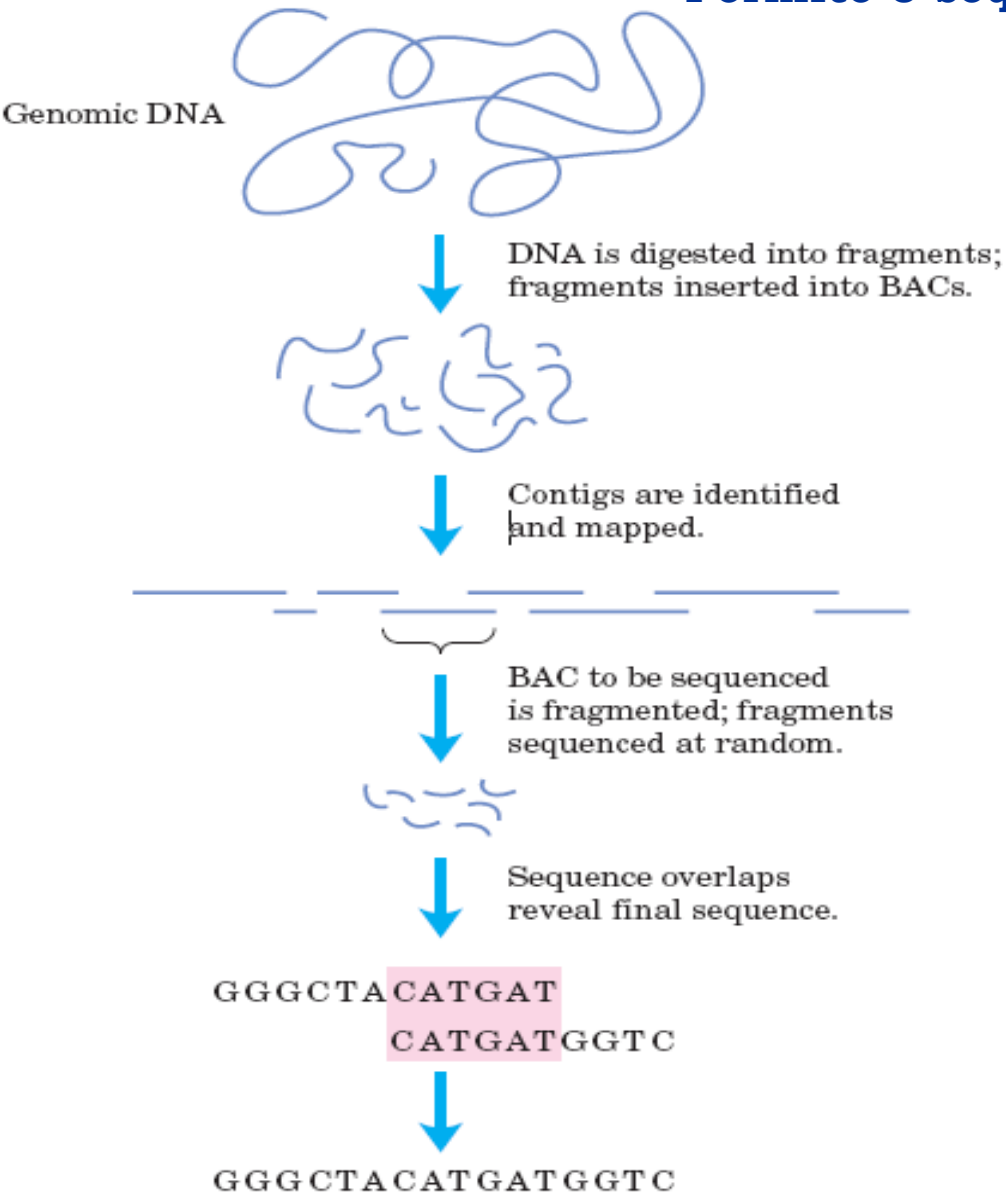
Ortólogos: ancestral comum em #s espécies

Parálogos: genes semelhantes na espécie

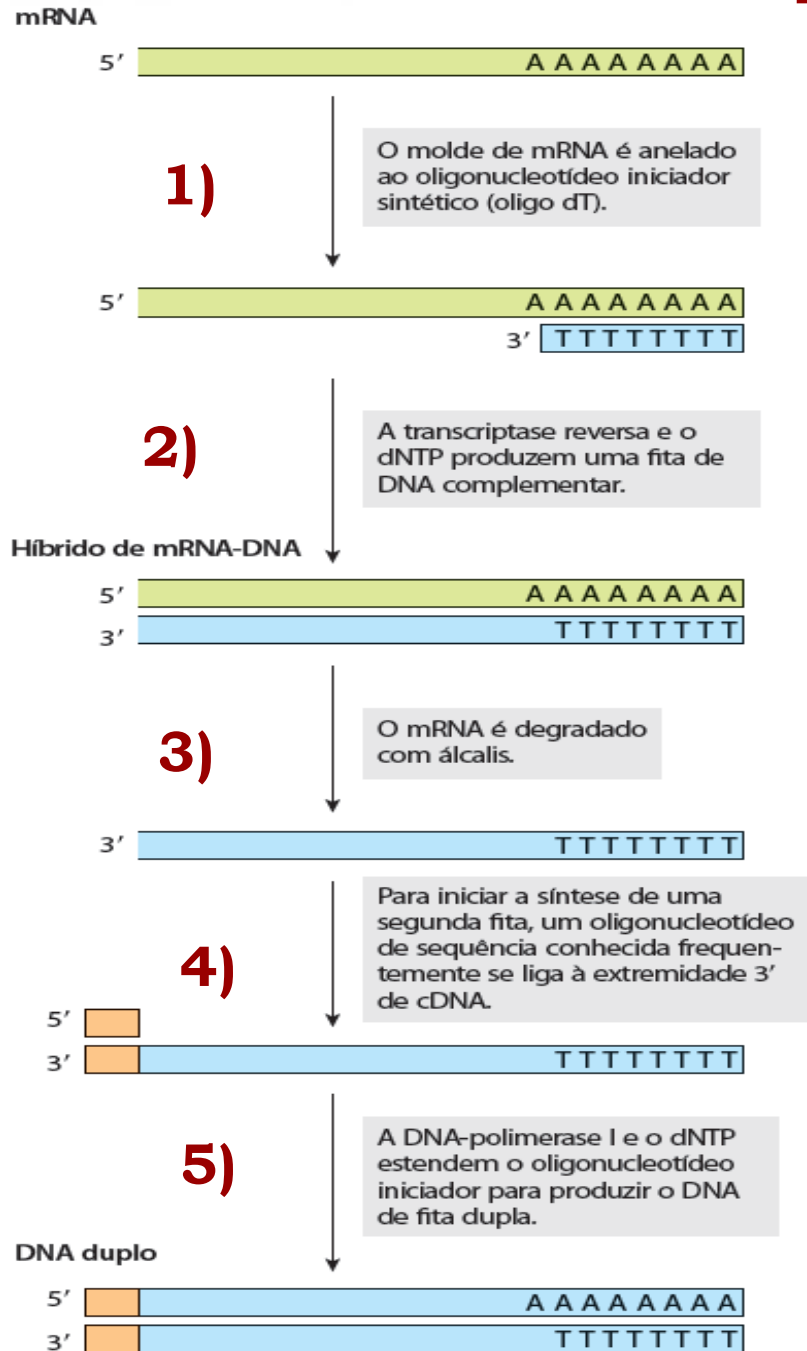
Pseudogenes: genes não funcionais no genoma

Sintenia: conservação da organização gênica em #s espécies

Cromossomo 9 humano	Cromossomo 2 de camundongo
<i>EPB72</i>	<i>Epb7.2</i>
<i>PSMB7</i>	<i>Psmb7</i>
<i>DNM1</i>	<i>Dnm</i>
<i>LMX1B</i>	<i>Lmx1b</i>
<i>CDK9</i>	<i>Cdk9</i>
<i>STXBP1</i>	<i>Stxbp1</i>
<i>AK1</i>	<i>Ak1</i>
<i>LCN2</i>	<i>Lcn2</i>



Bibliotecas de cDNA



→ Bibliotecas de cDNA → a partir de moléculas de mRNA

1) mRNA podem ser purificados usando resina contendo Oligo-dT fixado

2) Necessita da Transcriptase Reversa → converte mRNA em cDNA

3) mRNA pode ser degradado quimicamente ou enzimaticamente (RNase H)

4) DNAPol I duplica fita simples usando oligo-dA como primer (pode conter sítios de restrição)

5) Clonagem num vetor adequado

→ cDNA = DNA complementar a um mRNA

→ Representa o conteúdo de mRNA de uma célula/tecido → Transcriptoma

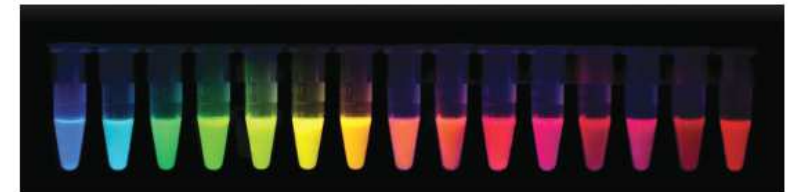
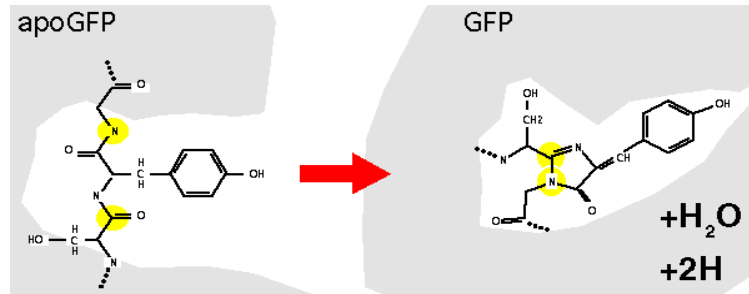
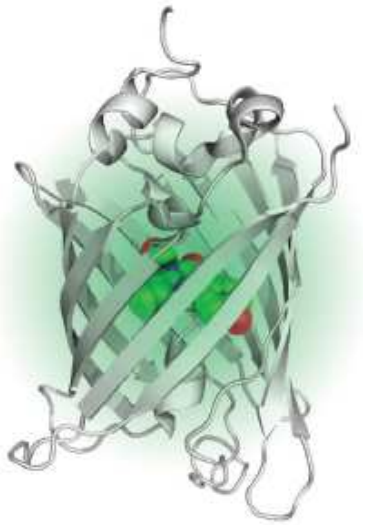
Bibliotecas especializadas de cDNA

Permitem estudar localização e função por interação do produto gênico

→ Requer: 1) gene repórter; 2) seleção; 3) identificação

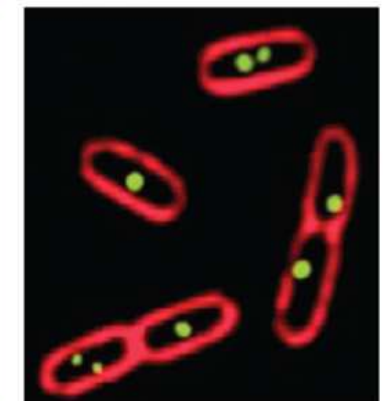
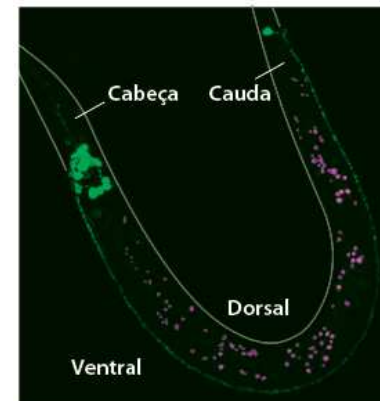
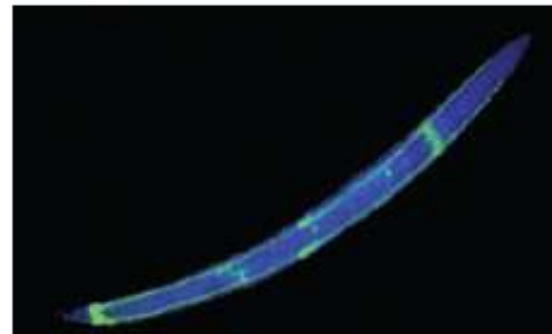
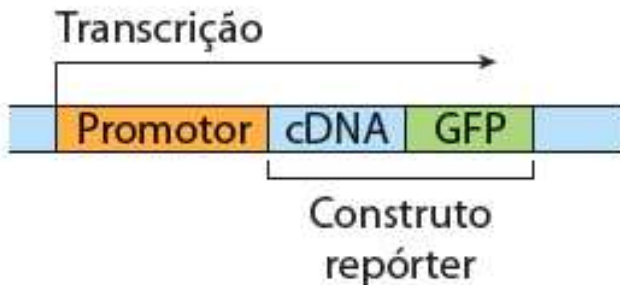
→ Ex: β -galactosidade

→ Green Fluorescent protein: GFP



→ Estudo de promotores

→ Estudo da localização celular/tecidual



Bibliotecas especializadas de cDNA

Permitem estudar localização e função por interação do produto gênico

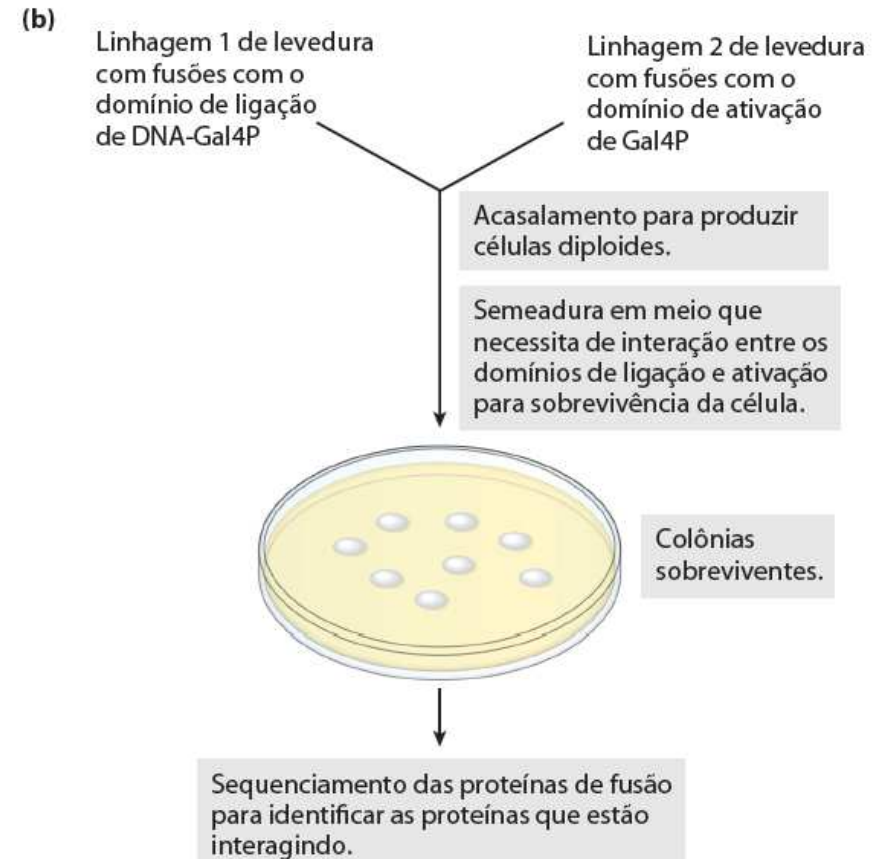
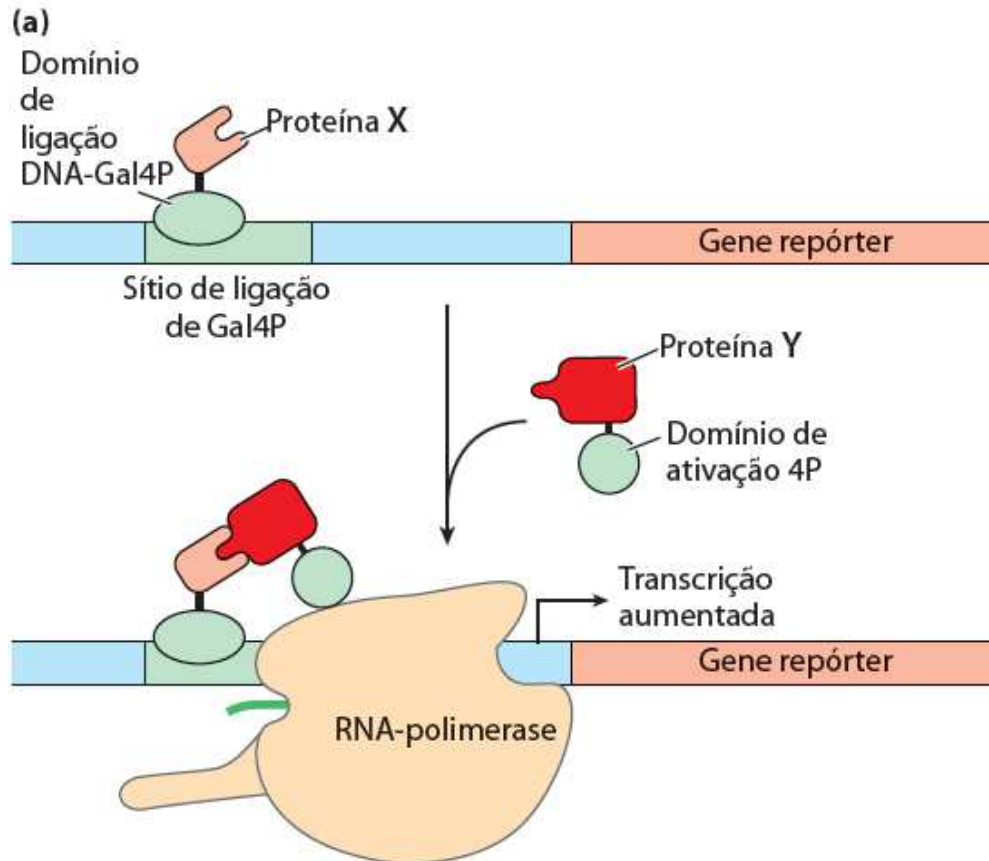
Experimento de duplo híbrido

- Análise em larga escala de interação proteína-proteína ou proteína-RNA *in vivo*

“A culpa por associação”

Usa proteína modular ou multi-domínio

Cada domínio é clonado em fusão com o DNA da proteína alvo (isca) e uma biblioteca de cDNA (presa)



Clonagem Molecular

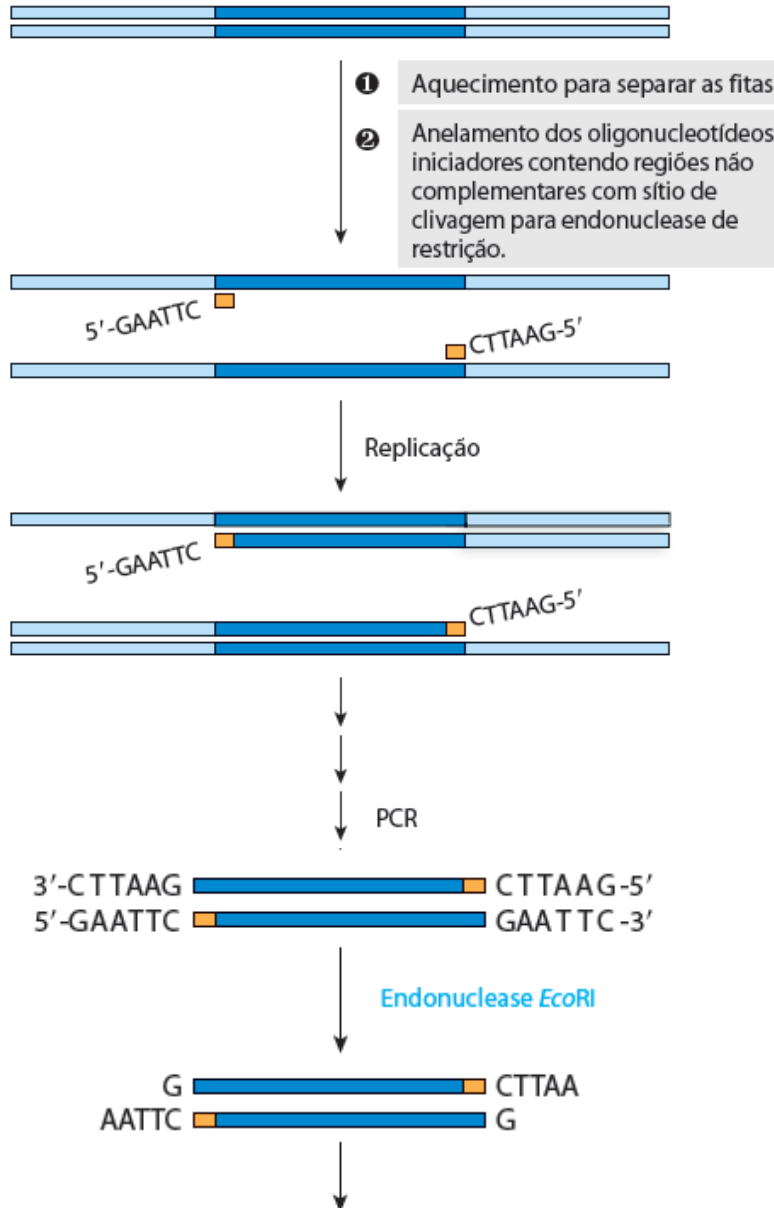
Construção de uma molécula de DNA de interesse = Engenharia Genética

Protocolo básico para a clonagem envolve:

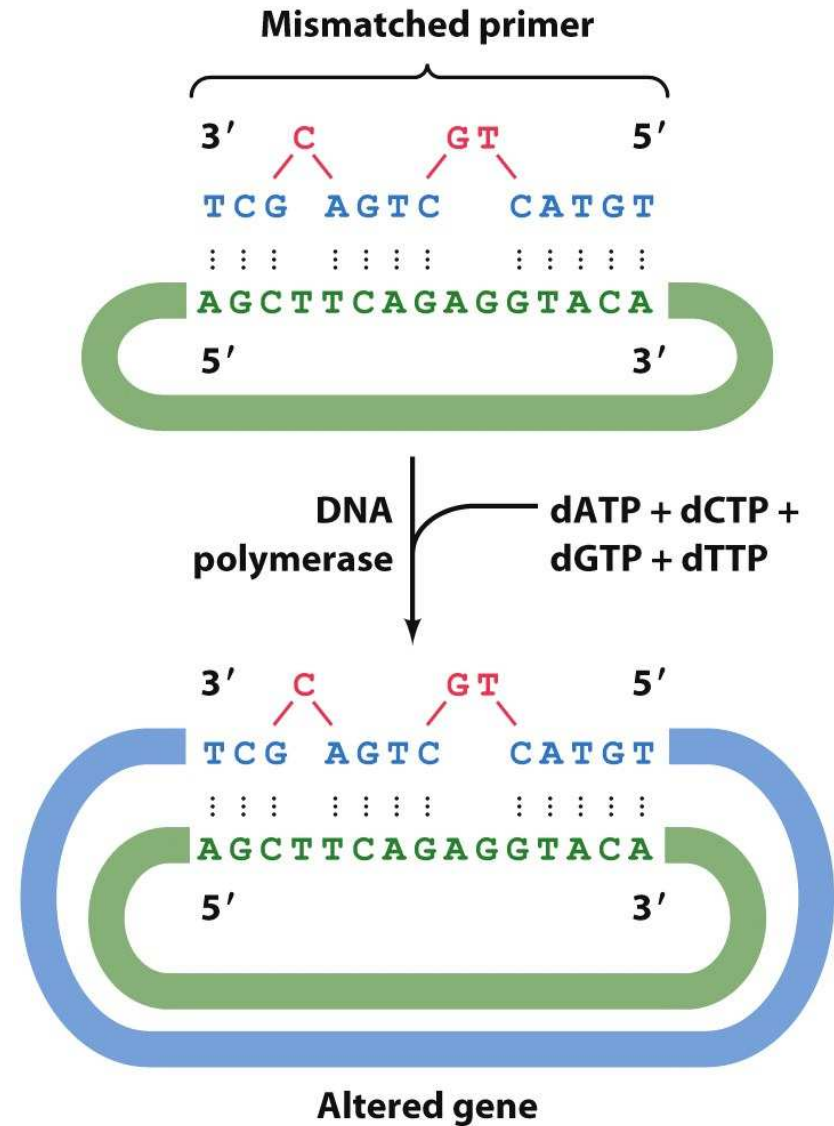
1. Escolher um gene de interesse → Desenhar *Primer* → **Bioinformática**
2. Amplificar o fragmento de DNA → **PCR**
3. Isolar o fragmento de interesse no gel de agarose → **Eletroforese**
4. “Cortar” DNA em posição definida → **Enzima de restrição**
5. Ligar com vetor de clonagem → **DNA ligase**
6. Inserir o DNA-recombinante numa célula competente → **Transformação**
7. Selecionar as células com DNA modificado → **Seleção dos clones de interesse**
8. Sequenciamento do DNA → **Confirmação**

Clonagem molecular

→ PCR → **Tolera modificações pontuais nos primers**



Clonagem por inserção em um sítio de *EcoRI* em um vetor de clonagem.

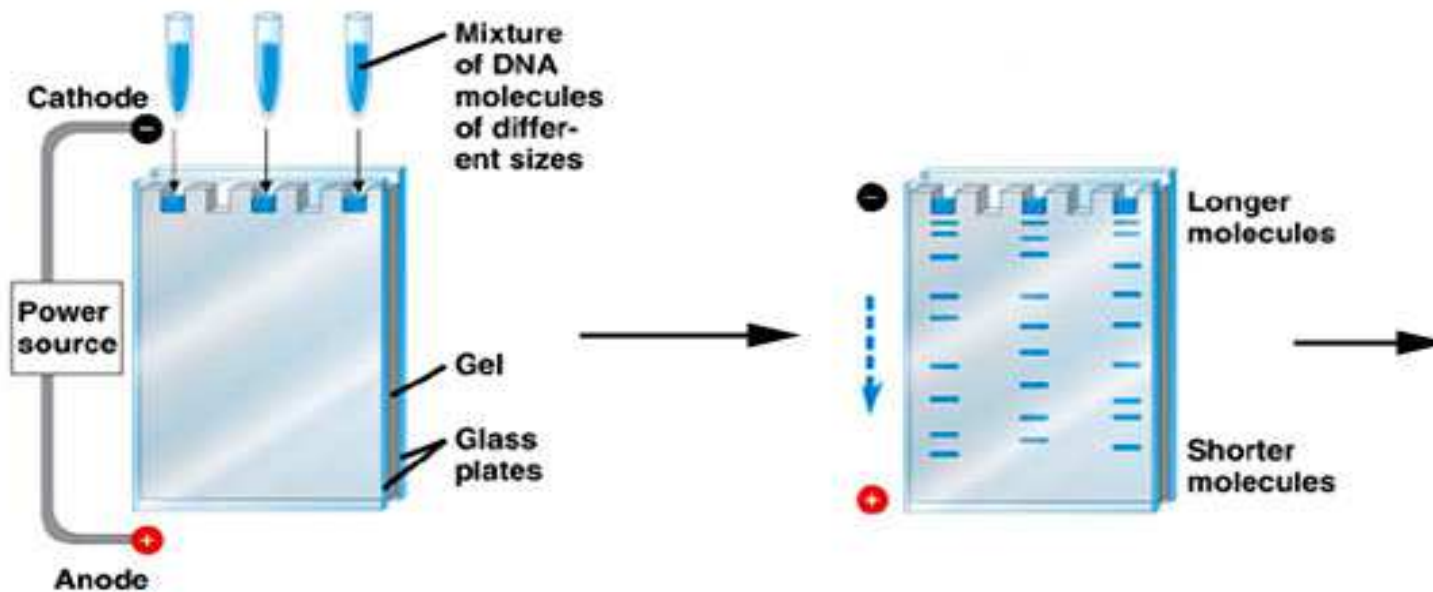
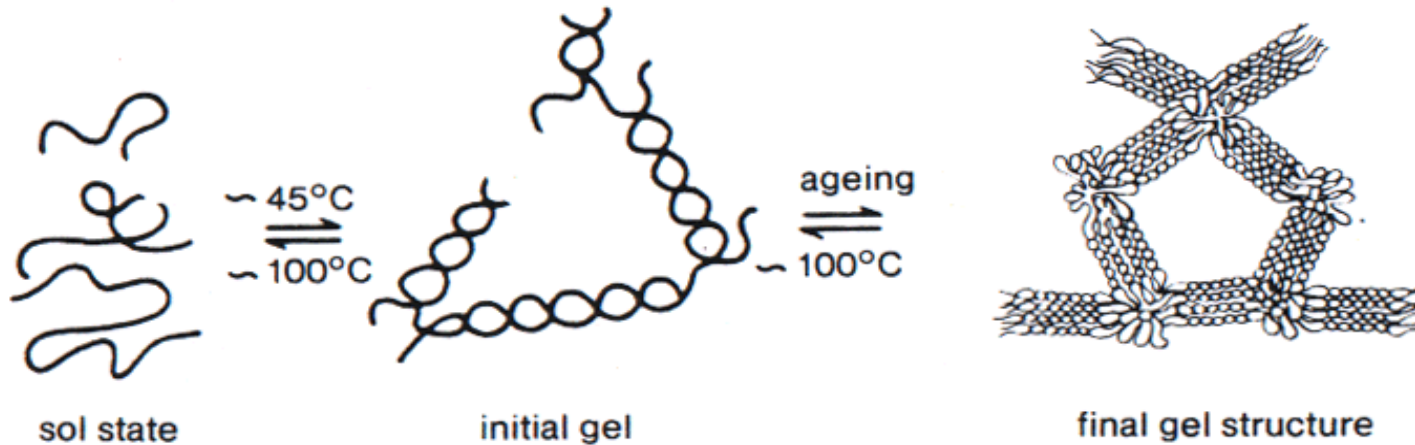


Eletroforese de DNA

Fase estacionária → Agarose

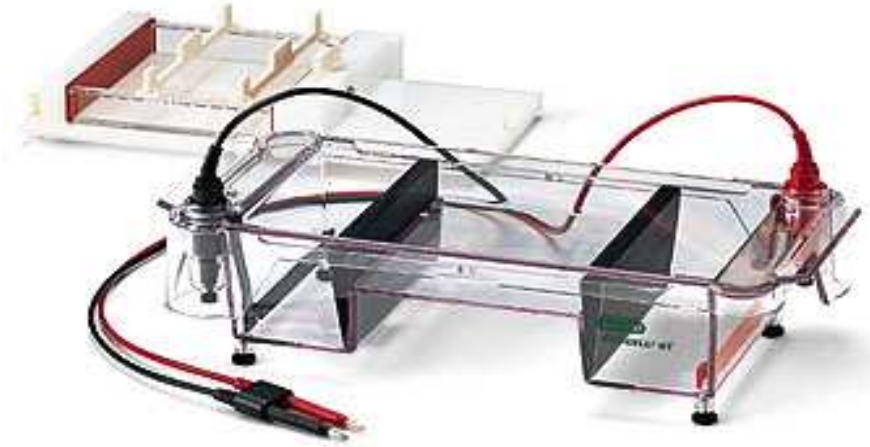
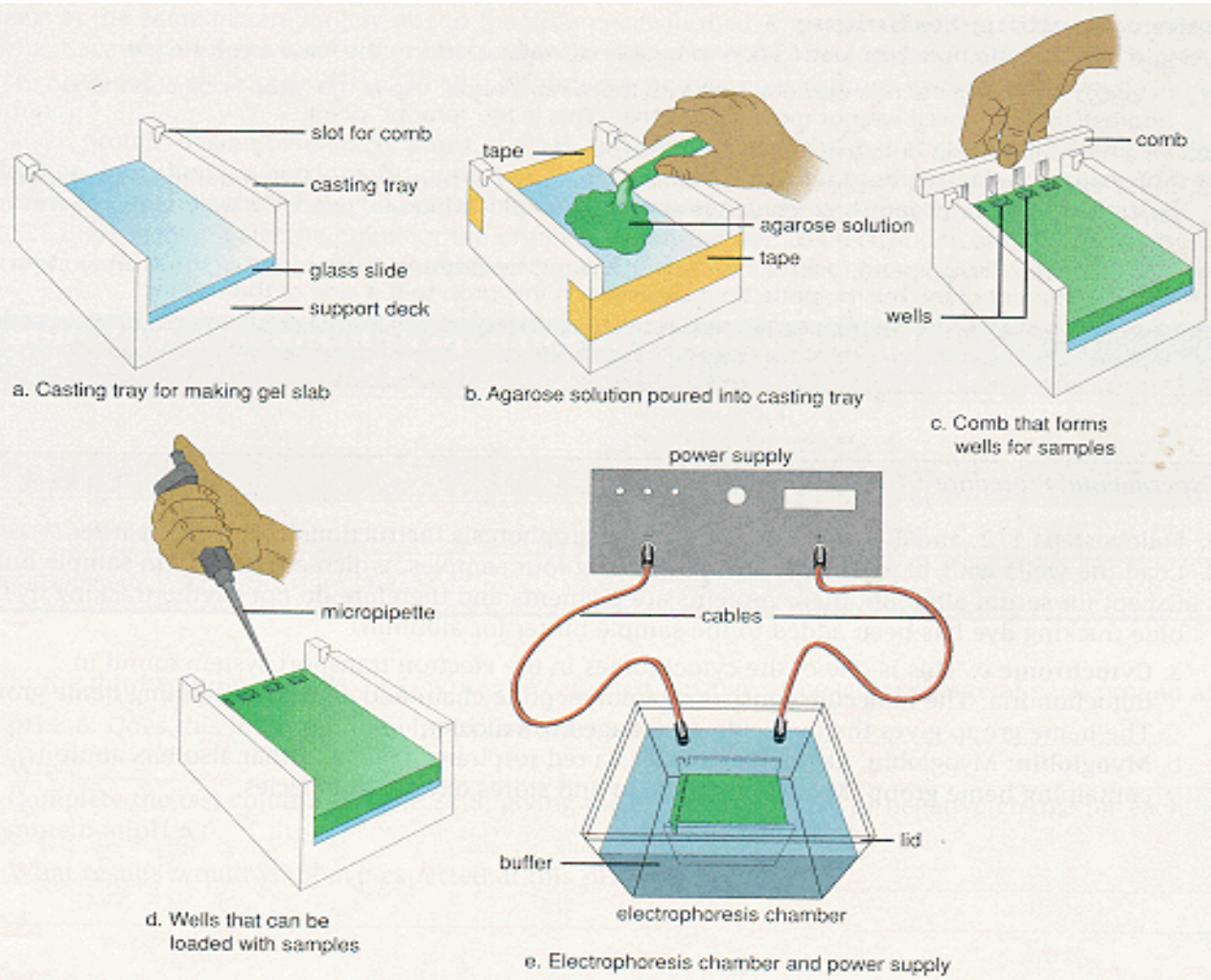
Grande aplicação em técnicas de Biologia Molecular

→ **Permite purificar fragmento de DNA de interesse para clonagem**



Eletróforese de DNA

Montagem do gel na cuba horizontal

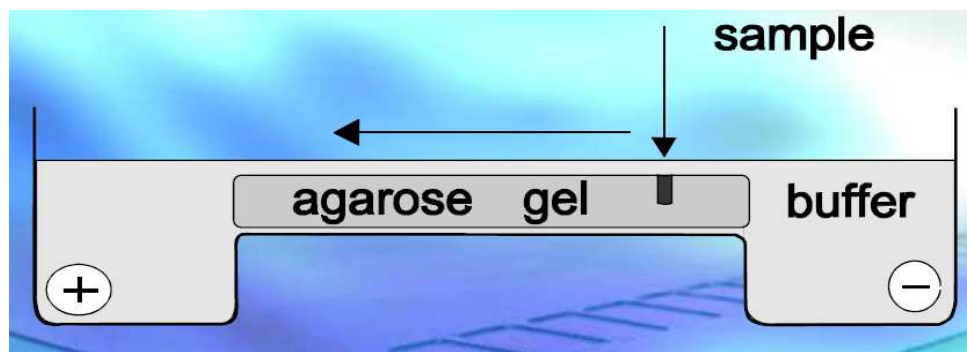


Eletroforese de DNA

Fase estacionária → Agarose

Eletroforese horizontal

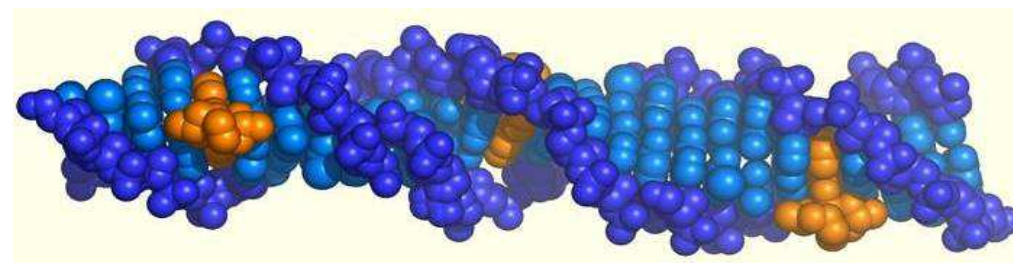
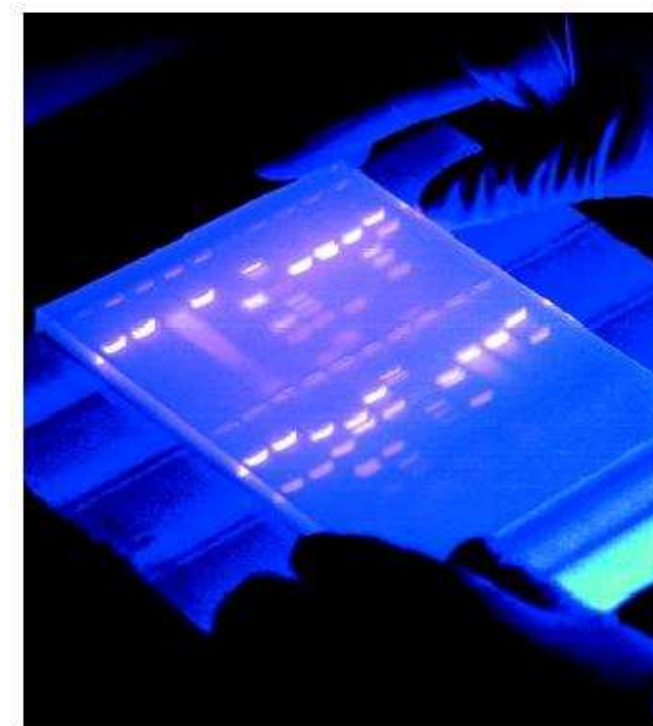
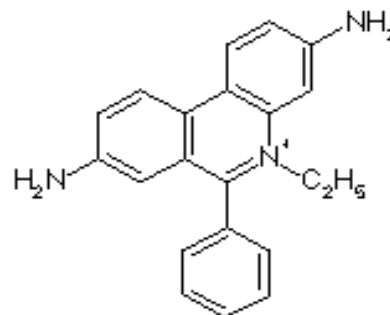
Permite quantificar a concentração de DNA numa amostra



Sistema tampão contínuo

Excisão da banda de interesse do gel para posterior purificação

Incubação com brometo de Etídio

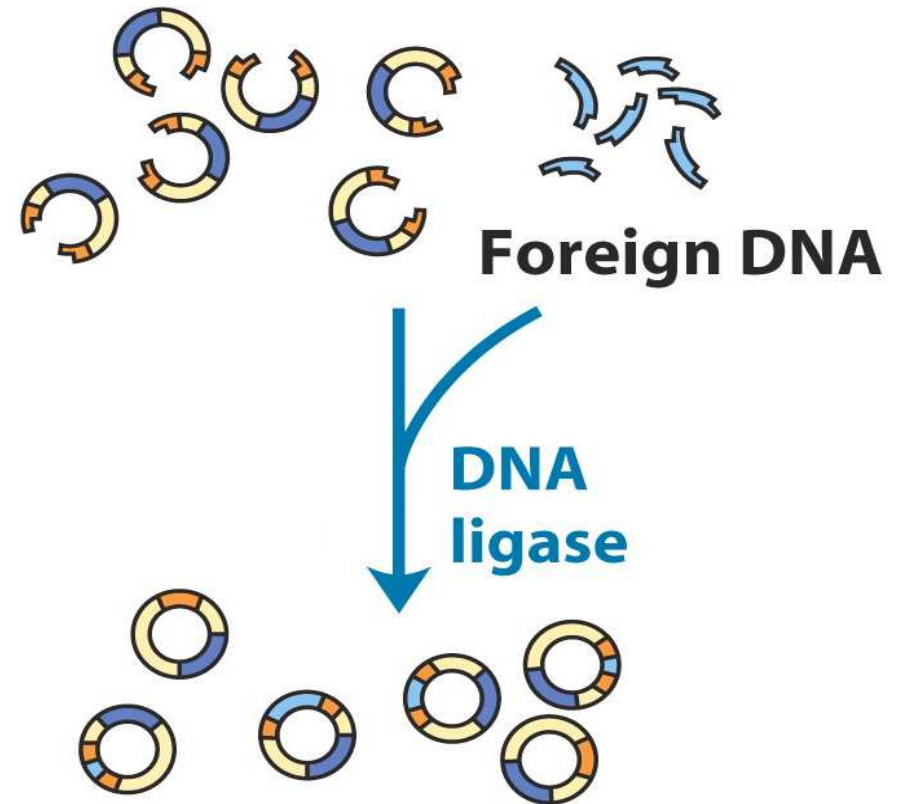
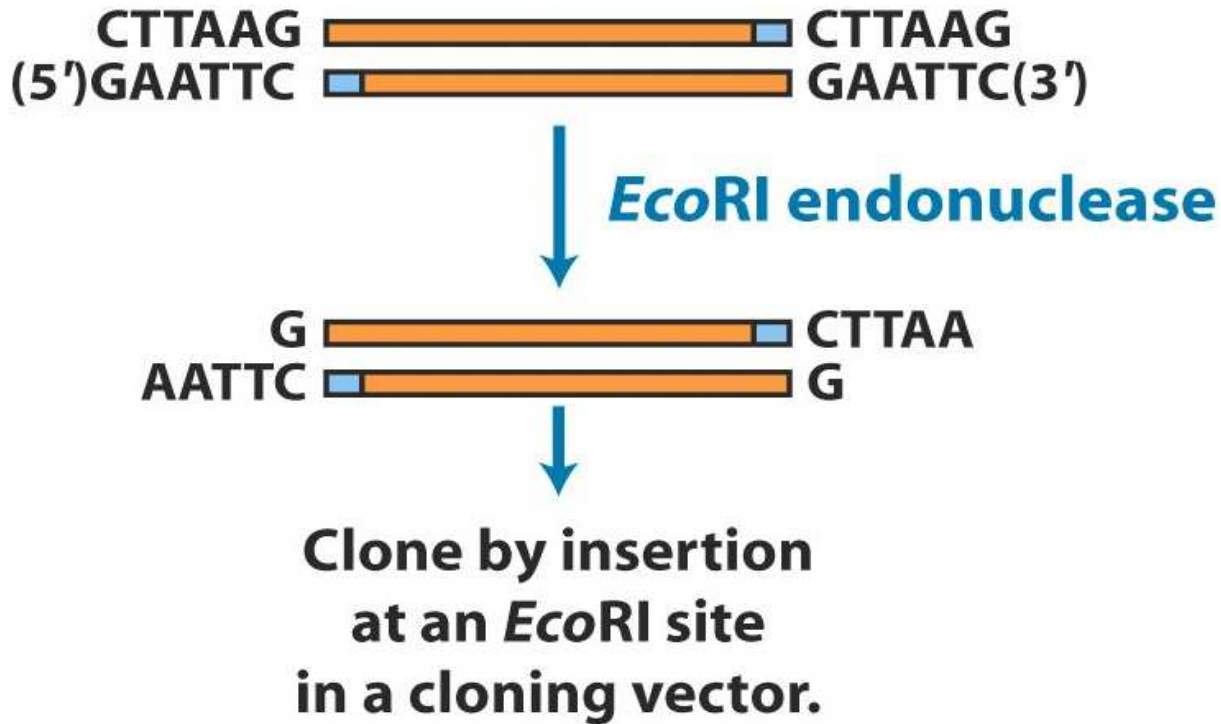


Clonagem Molecular

Estratégia geral

→ Clivar DNA e Vetor com as Endonucleases de Restrição adequadas

→ Ligar DNA e Vetor, digeridos com as Endonucleases de Restrição, com a DNA ligase



Clonagem Molecular

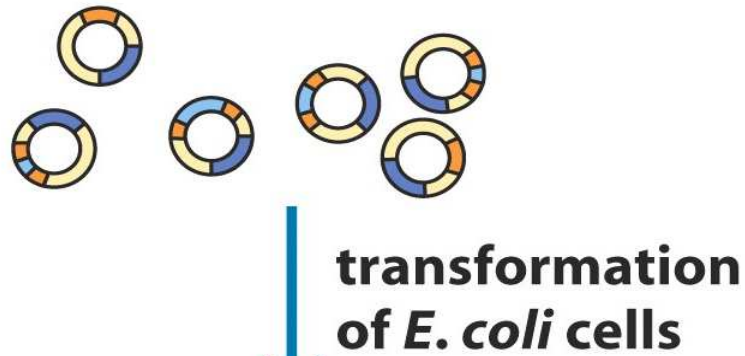
Transformação de células

→ Permite a introdução de DNA exógeno em células adequadas
- etapa crucial para a criação de um clone

- Eletroporação

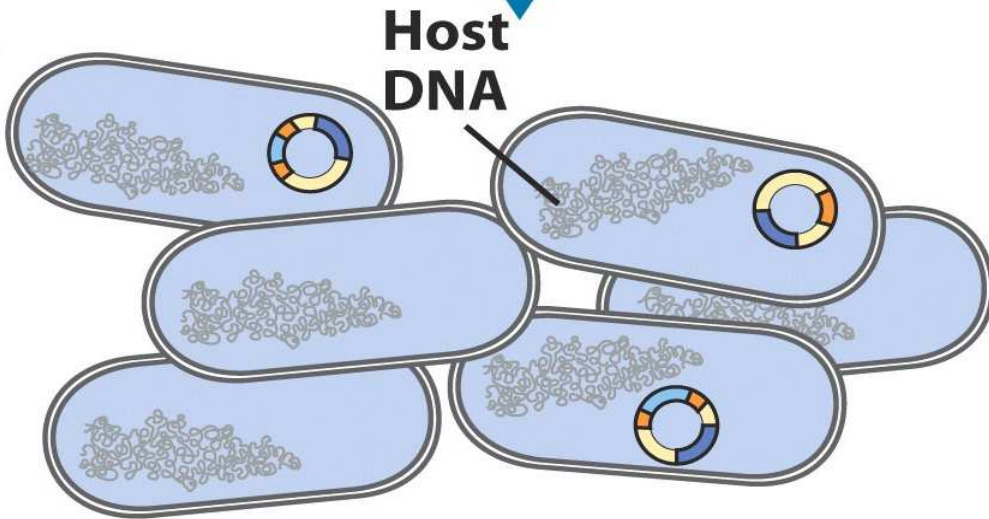
- Choque térmico

- Cálcio



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



Agar containing
ampicillin +
tetracycline

Clonagem Molecular

Algumas estratégias de seleção

- Uso conjunto de diferentes estratégias

→ Marcador de seleção

- O vetor oferece à célula transformante alguma vantagem seletiva
- Seleção positiva → permite crescimento da célula transformada no meio
- Seleção negativa → mata a célula crescimento da transformada no meio

→ Marcador de triagem

- Célula transformada positivamente muda de cor ou fluoresce

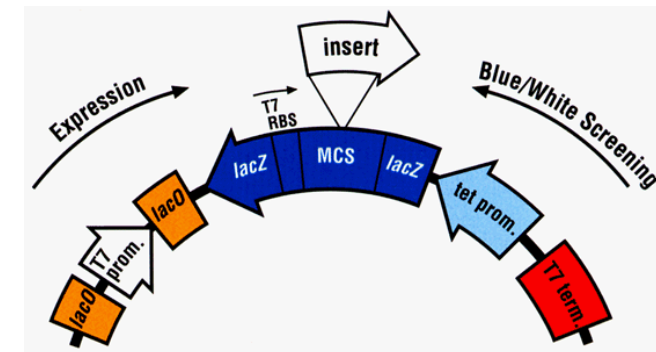
→ PCR de colônia

- Averiguação se a colônia transformante que cresceu no meio contendo o marcador de seleção apresenta o DNA alvo

→ Análise com Enzimas de restrição

- O vetor selecionado deve liberar o inserto do tamanho esperado

→ Confirmação por sequenciamento do inserto de DNA



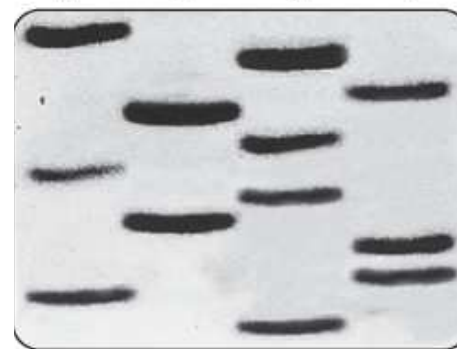
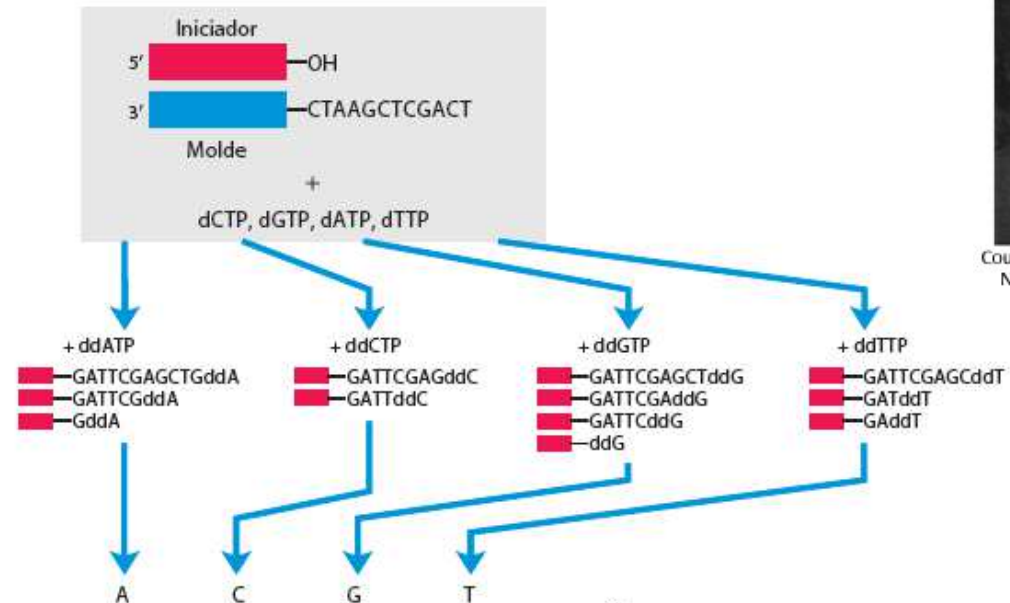
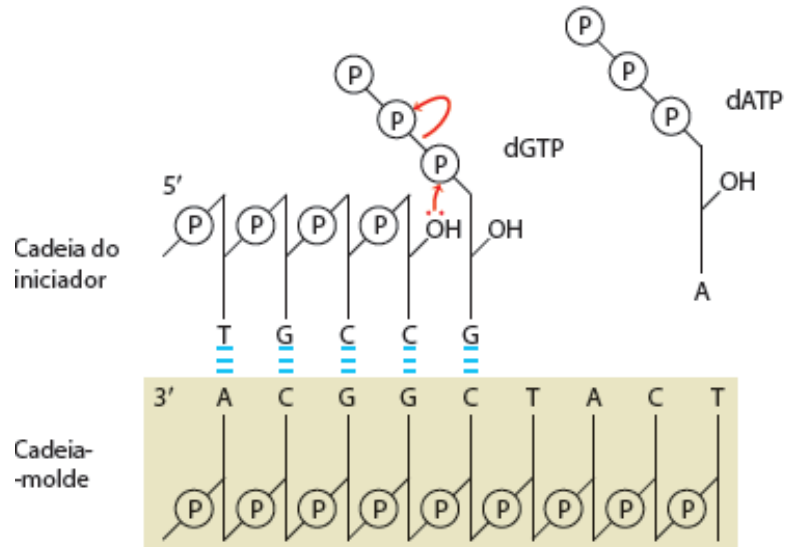
Sequenciamento de DNA

→ Derivação indireta da função de proteínas → rápido e confiável

→ Método de Dideoxi-Ribonucleotídeos

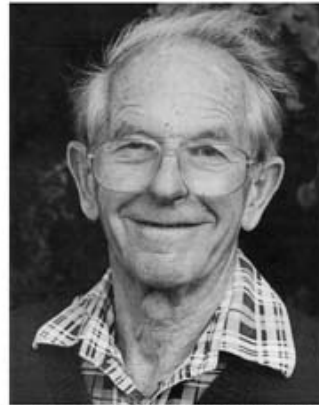
- “Envenenamento” da reação de PCR

- usa-se 1 único primer



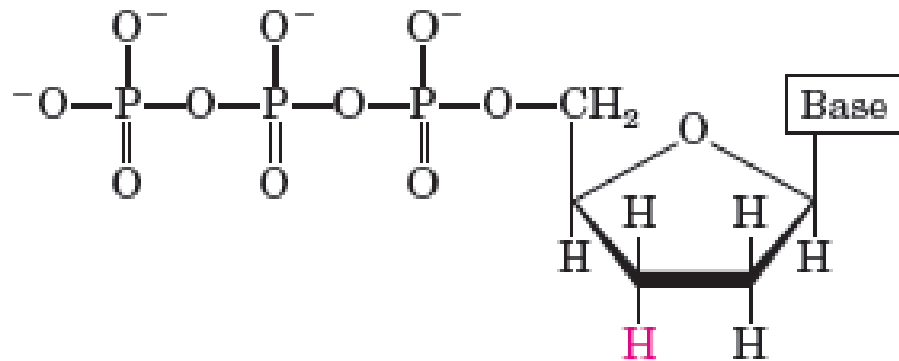
Autorradiograma da eletroforese em gel

Sequência da cadeia complementar



Courtesy of Dr. F. Sanger, MRC, Cambridge. Noncommercial, educational use only.

Frederick Sanger
Nobel Prize winner
Chemistry
(1958 e 1980)



Análogo ddNTP

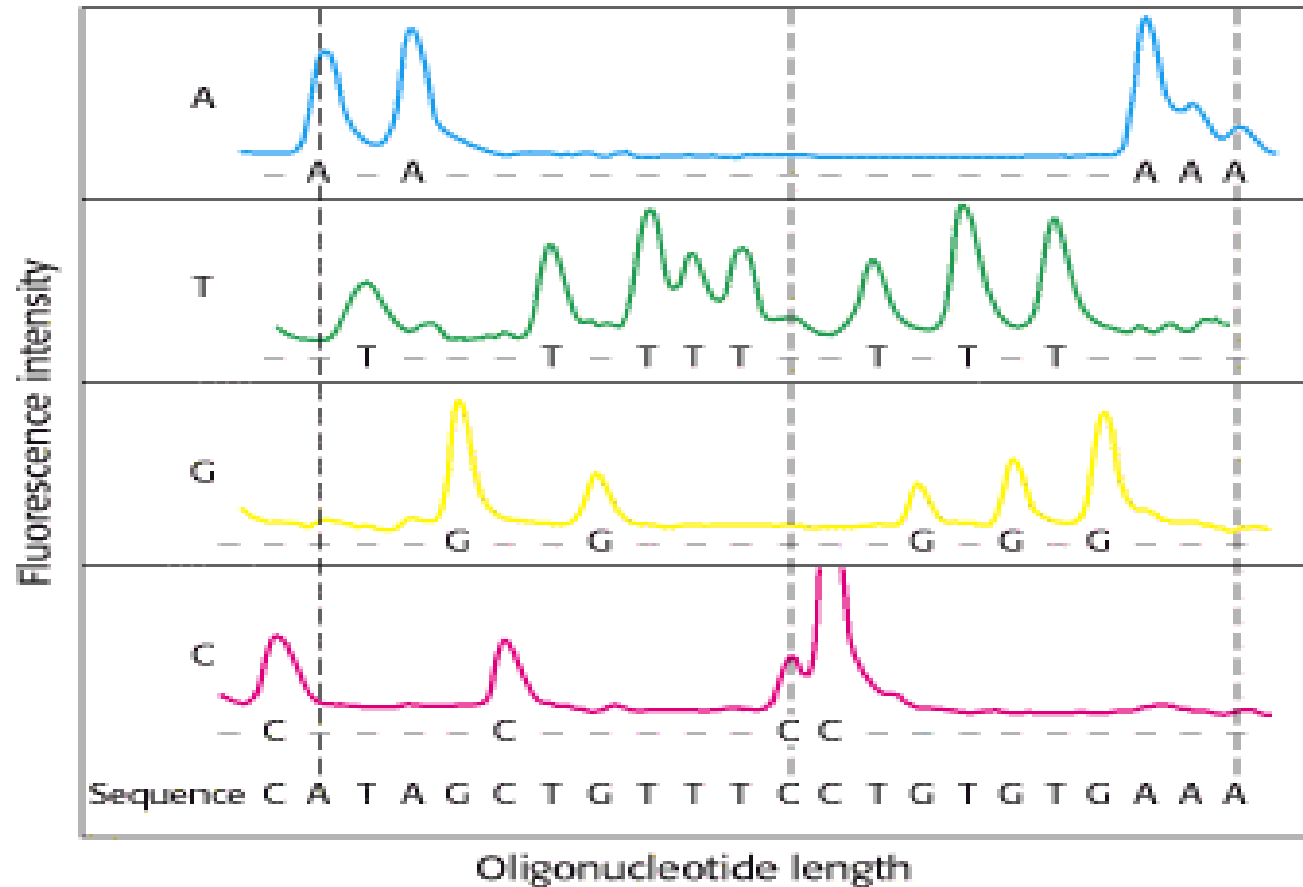
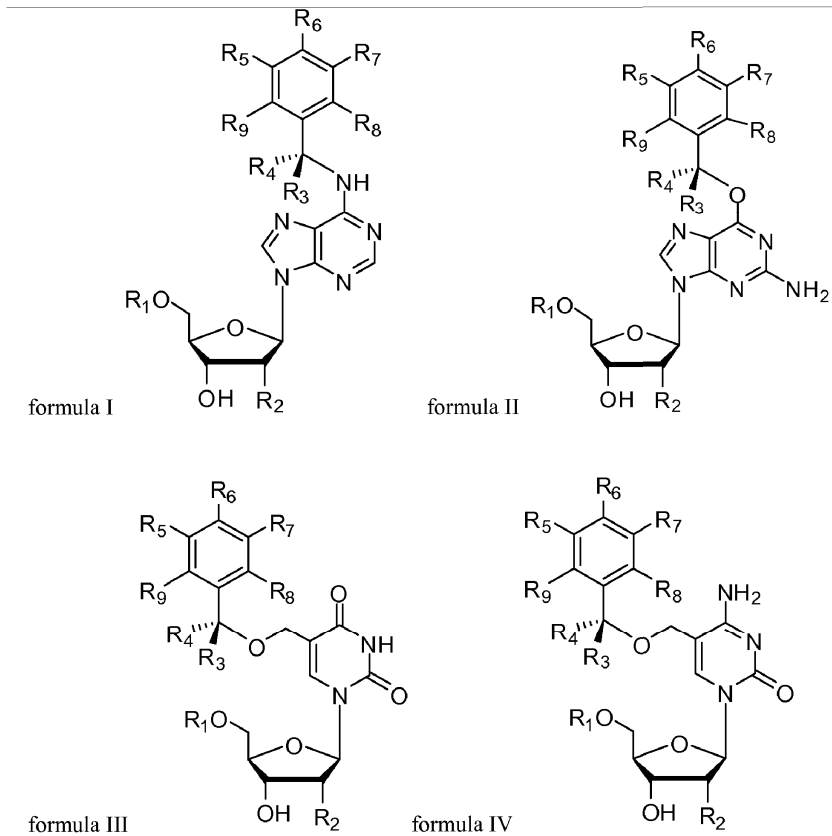
Sequenciamento de DNA

→ Método de dideoxi-ribonucleotídeos

Envenenamento da reação de PCR

→ **Fluorescência** – Necessita de um fluoróforo ligado à molécula

→ **Fluoriceínas** ligadas aos diferentes ddNTP

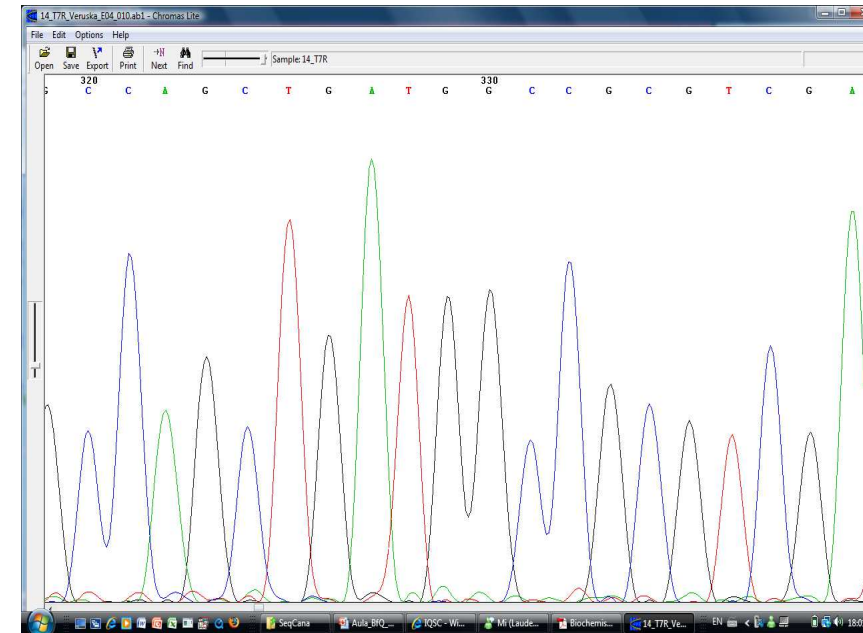
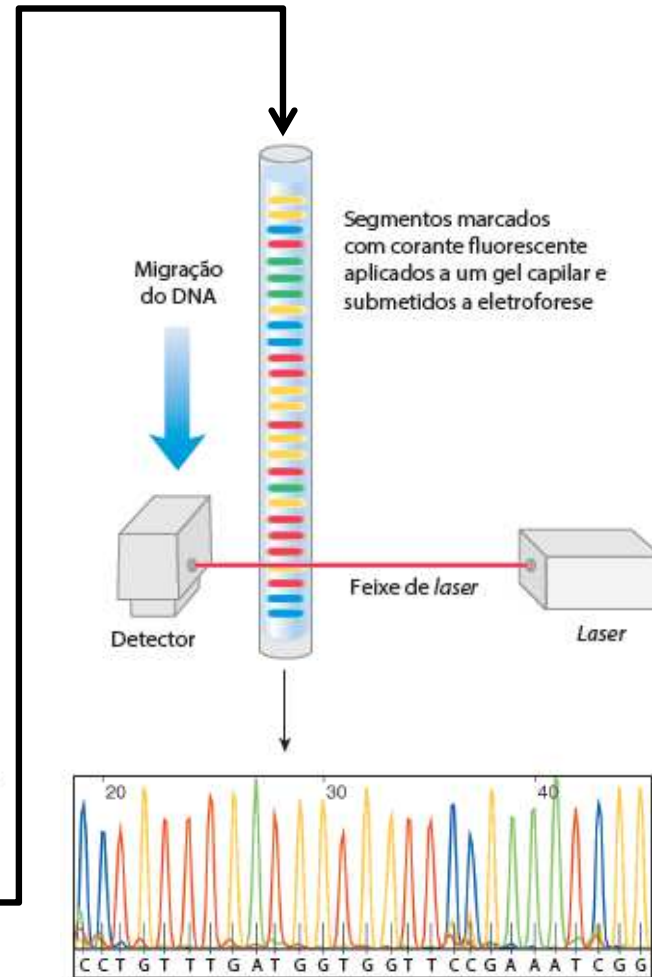
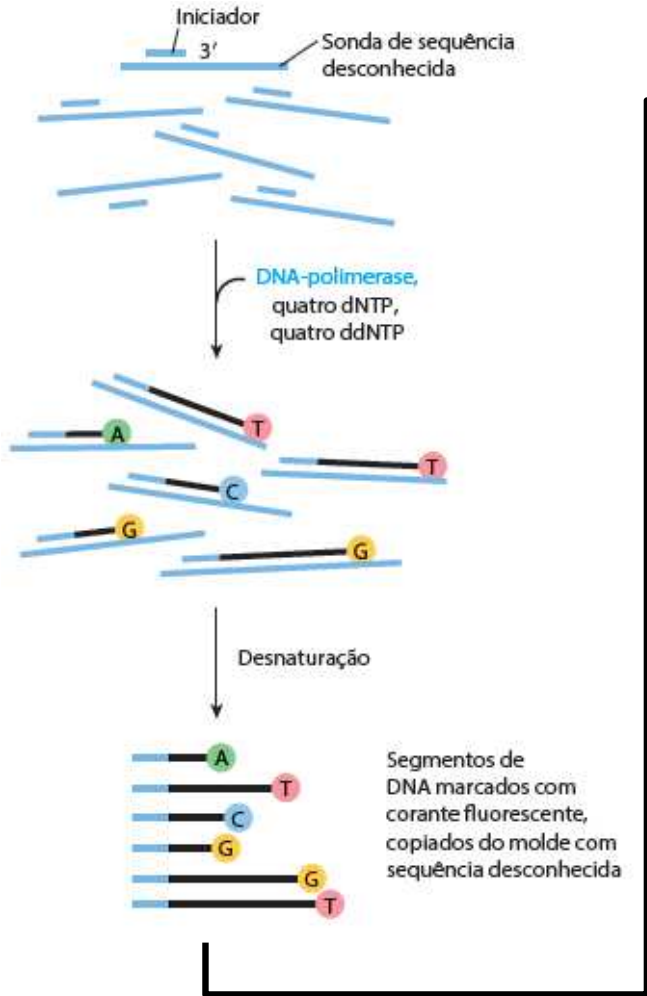


Sequenciamento de DNA

→ Método de Dideoxi-ribonucleotídeos

→ Fluoriceínas específicas ligadas aos diferentes ddNTP que emitem luz em λ diferentes

→ Separação por eletroforese capilar



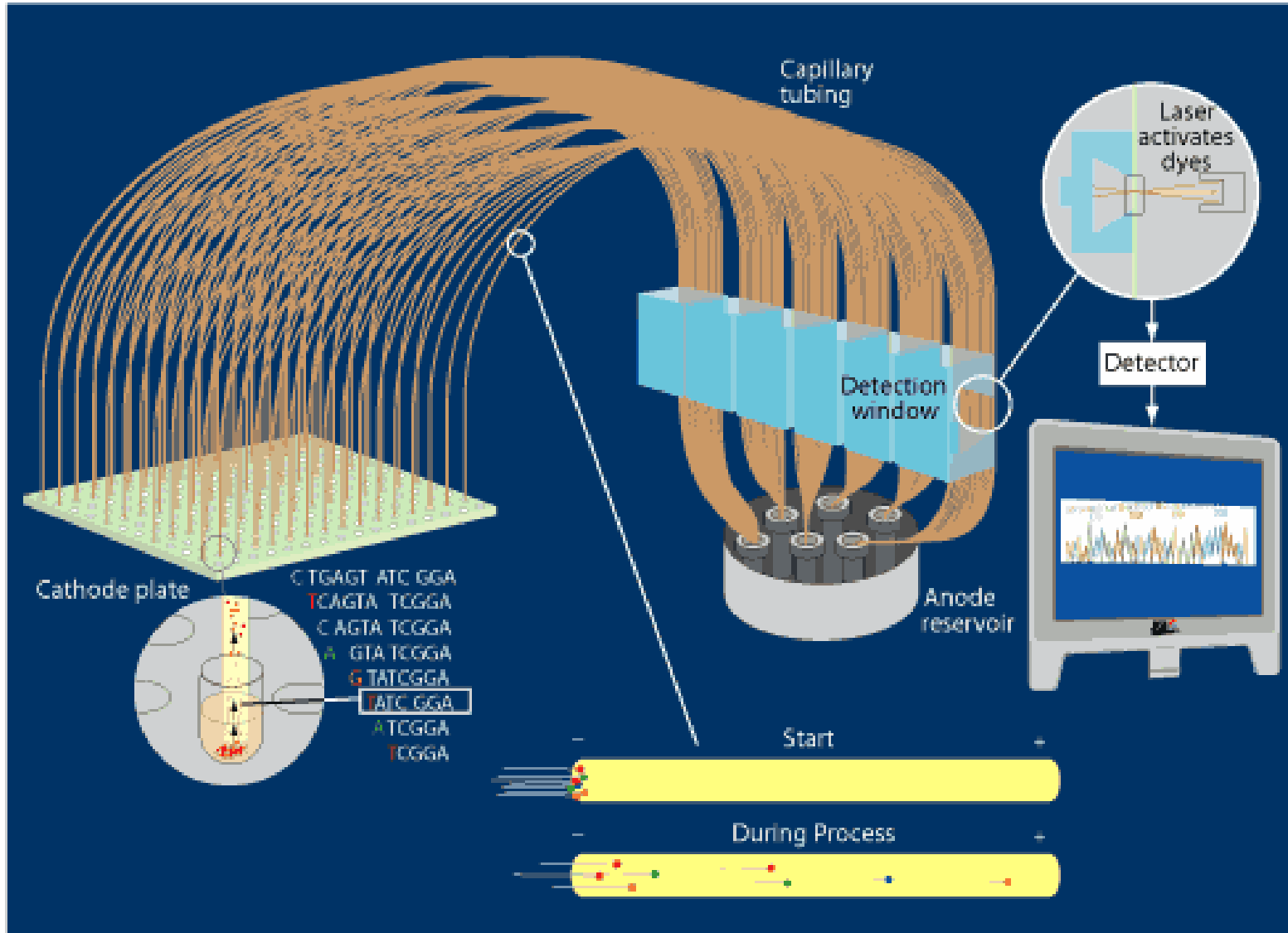
Resultado gerado por computador após a passagem das bandas pelo detector

Sequenciamento de DNA

→ Método de Dideoxi-ribonucleotídeos

→ Fluorocéínas específicas ligadas aos diferentes ddNTP que emitem luz em λ diferentes

→ Separação por eletroforese capilar



Sequenciamento de DNA

→ Método de Dideoxi-ribonucleotídeos → Sanger

→ Sequenciamento *shotgun*

- Permite o sequenciamento de grandes fragmentos de DNA

- Genomas

→ Envolve ciclos de:

- Fragmentação aleatória;

- Clonagem dos fragmentos;

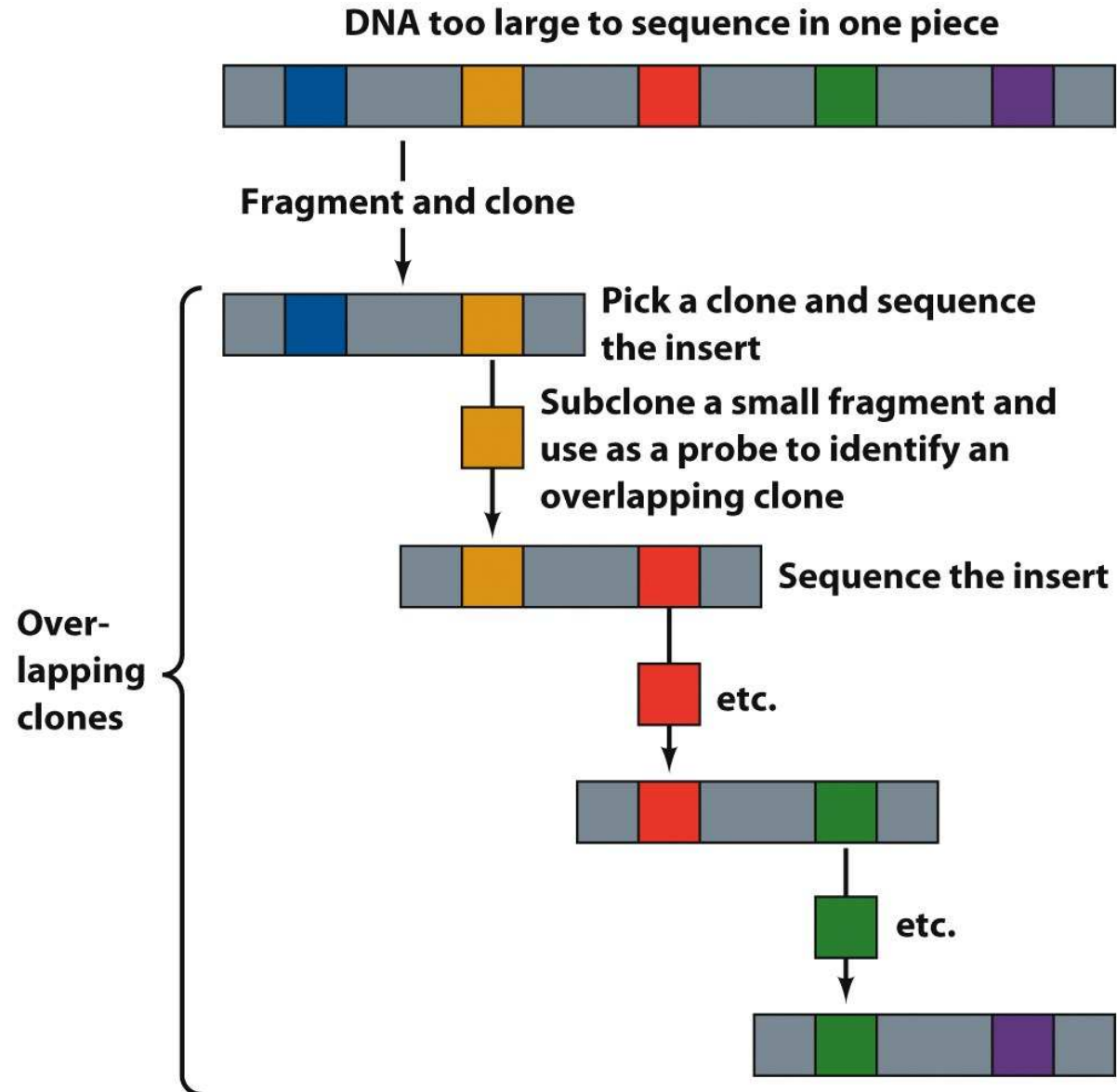
- Separação dos clones, nova

fragmentação e clonagem, se necessário;

- Sequenciamento dos clones gerados

99% de cobertura com 15 x de

redundância.



Sequenciamento de DNA

→ Pirosequenciamento de última geração: “nextgen”

Custo do sequenciamento genômico

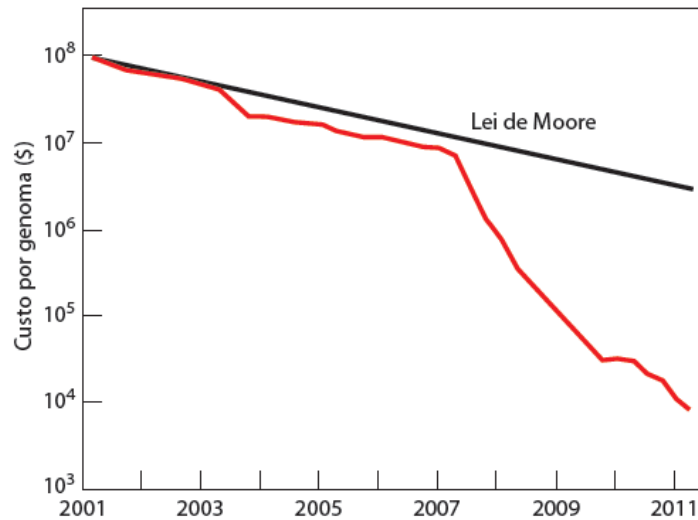
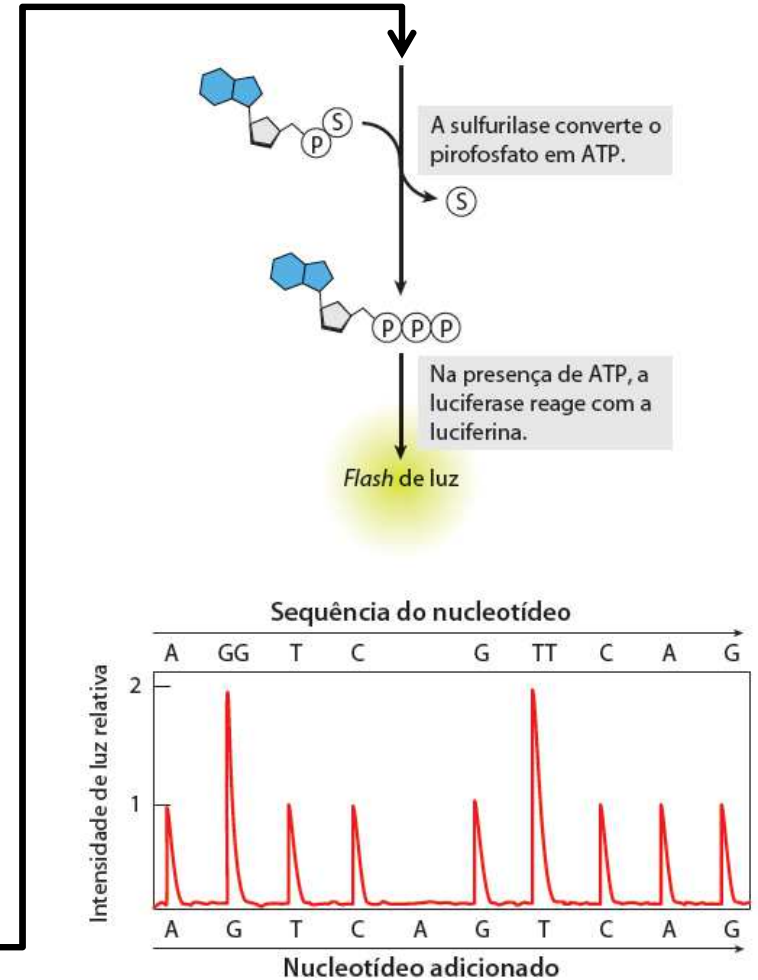
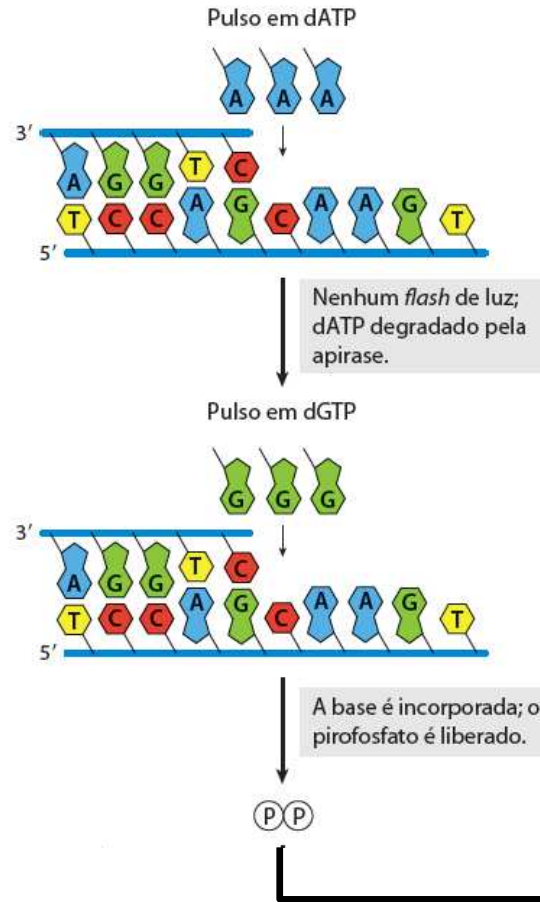


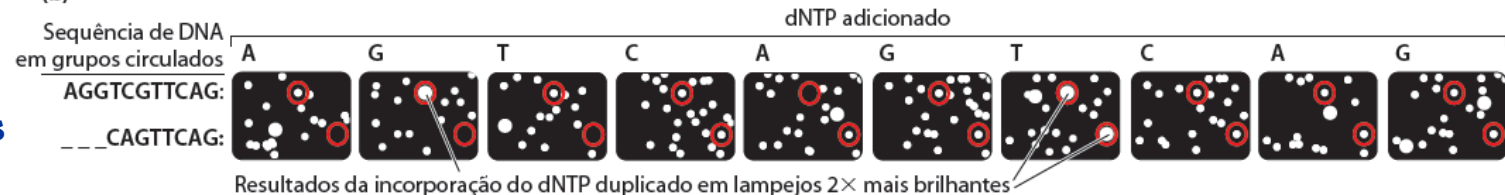
FIGURA Q-1 Desde janeiro de 2008, o custo do sequenciamento do genoma humano tem diminuído mais rápido do que o declínio projetado no custo do processamento de dados pelo computador (Lei de Moore).

- Sequenciamento *shotgun*
- Fragmentos acoplados a adaptadores de DNA e beads
- Diluição em nanopços
- PCR com primers específicos nos nanopços para enriquecimento dos fragmentos
- Pirosequenciamento por PCR nos nanopços

(a)



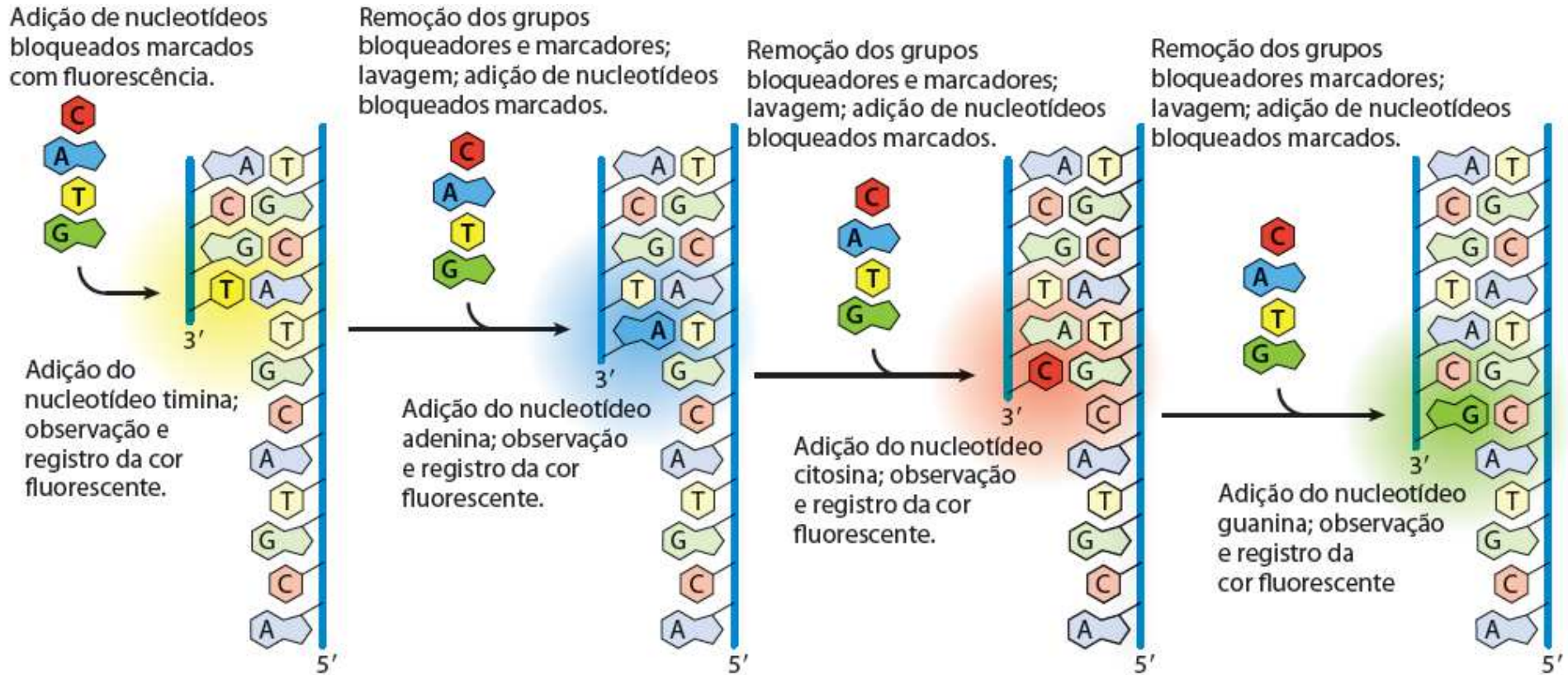
(b)



Sequenciamento de DNA

→ Sequenciamento de terminação reversível da cadeia de última geração: “nextgen”

→ **Ciclo de adição, identificação, desproteção, lavagem**



(b) dNTP incorporado

TACGGTCTC:

CCCCCAGT:



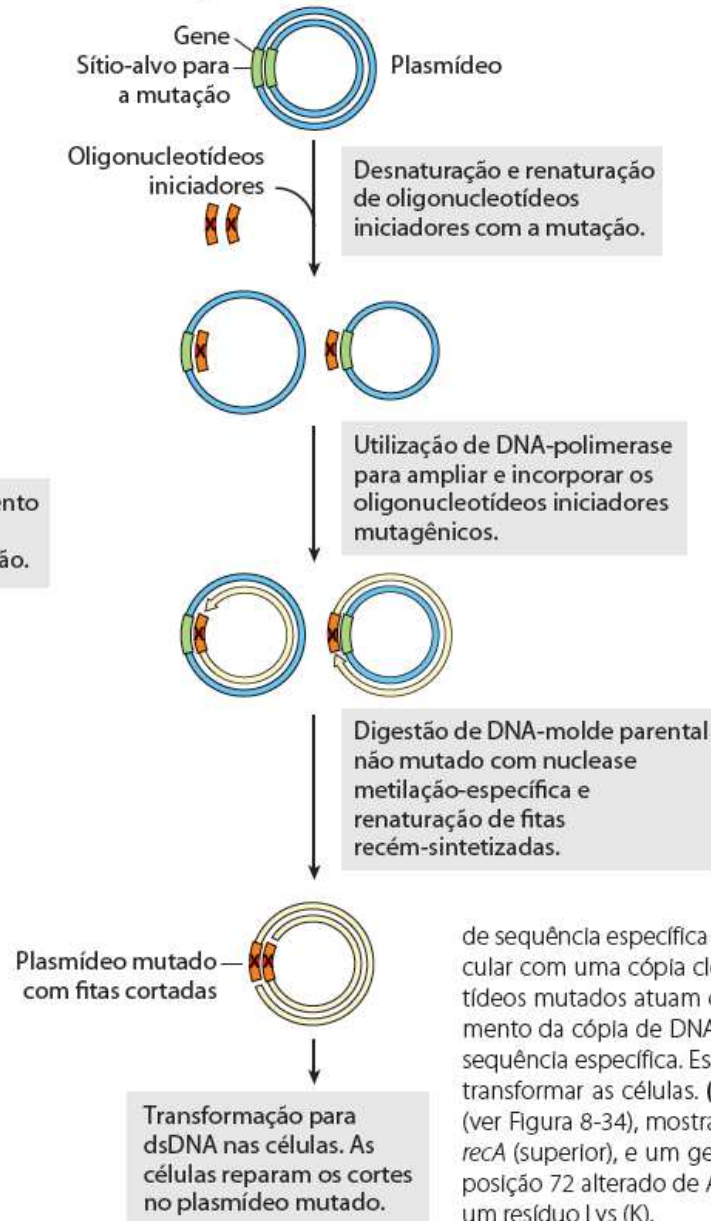
Mutação sítio dirigidas

Proteínas “mutantes” podem ser construídas utilizando a clonagem molecular e PCR

(a) Mutagênese sítio-direcionada



(b) Mutagênese oligonucleotídeo-direcionada



(c)

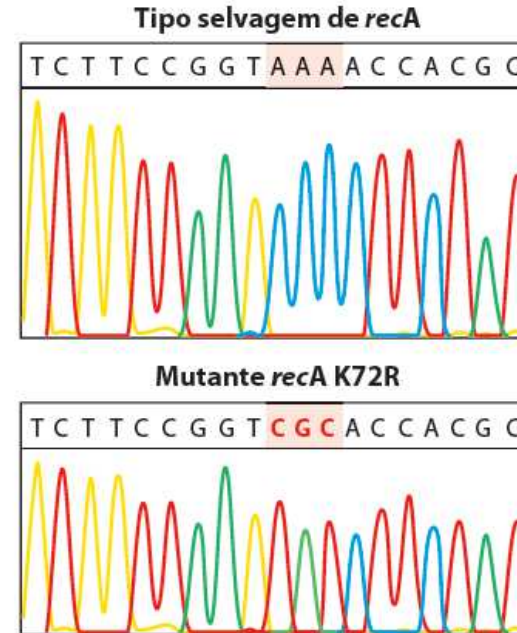


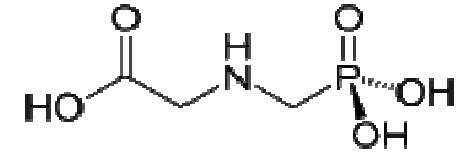
FIGURA 9-10 Duas abordagens para a mutagênese sítio-direcionada. (a) Um segmento sintético de DNA substitui um fragmento removido por uma endonuclease de restrição. (b) Um par de oligonucleotídeos sintéticos e complementares com uma mudança

de sequência específica em uma posição é hibridizado a um plasmídeo circular com uma cópia clonada do gene que será alterado. Os oligonucleotídeos mutados atuam como iniciadores para a síntese de todo o comprimento da cópia de DNA duplex do plasmídeo que contém a mudança de sequência específica. Essas cópias de plasmídeos são então utilizadas para transformar as células. (c) Resultados de um sequenciador automatizado (ver Figura 8-34), mostrando as sequências de um tipo selvagem de gene *recA* (superior), e um gene *recA* alterado (inferior) com o triplo (códon) na posição 72 alterado de AAA para CGC, especificando um Arg (R) em vez de um resíduo Lys (K).

Soja sem herbicida

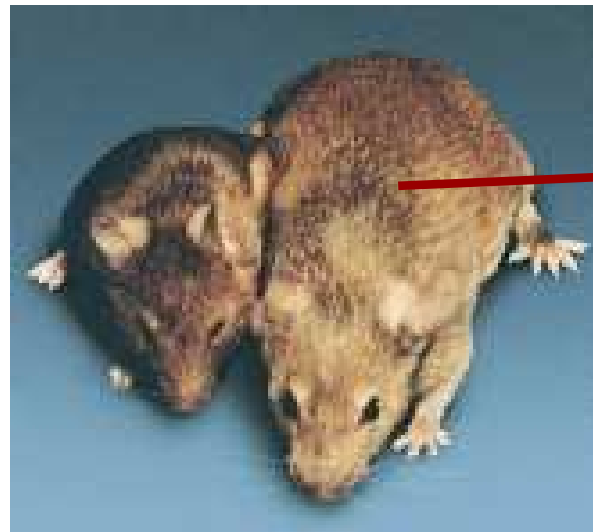


Soja Transgênica + Glifosato



Glifosato
Inibidor da
EPSP Sintase
- Via do ácido
chiquímico

Planta
transgênica
super-
expressando a
luciferase



Rato transgênico
superexpressando o
hormônio de
crescimento
humano

Produção da Proteína de Interesse

- A síntese da proteína de interesse é feita pelo OGMs.

→ Proteína alvo pode ser extraída e purificada para uso posterior.

Proteína produzida é comumente chamada de *Proteína recombinante*.

A Proteína recombinante pura poderá ser estudada por um conjunto de Técnicas Bioquímicas, Biofísicas e de Biologia Molecular

- Dicroísmo Circular → Estrutura secundária

- Fluorescência intrínseca de triptofano → Estrutura Terciária

- Ultracentrifugação analítica → Determinar MM e estados associativos

- Calorimetria → estabilidade e interação com ligantes

- Espalhamento de raios X a baixo ângulo → Tamanho e forma da proteína

- Cristalografia de proteínas → Determinar a estrutura da proteína em nível molecular

- Ressonância Magnética Nuclear de proteínas → Estrutura Tridimensional