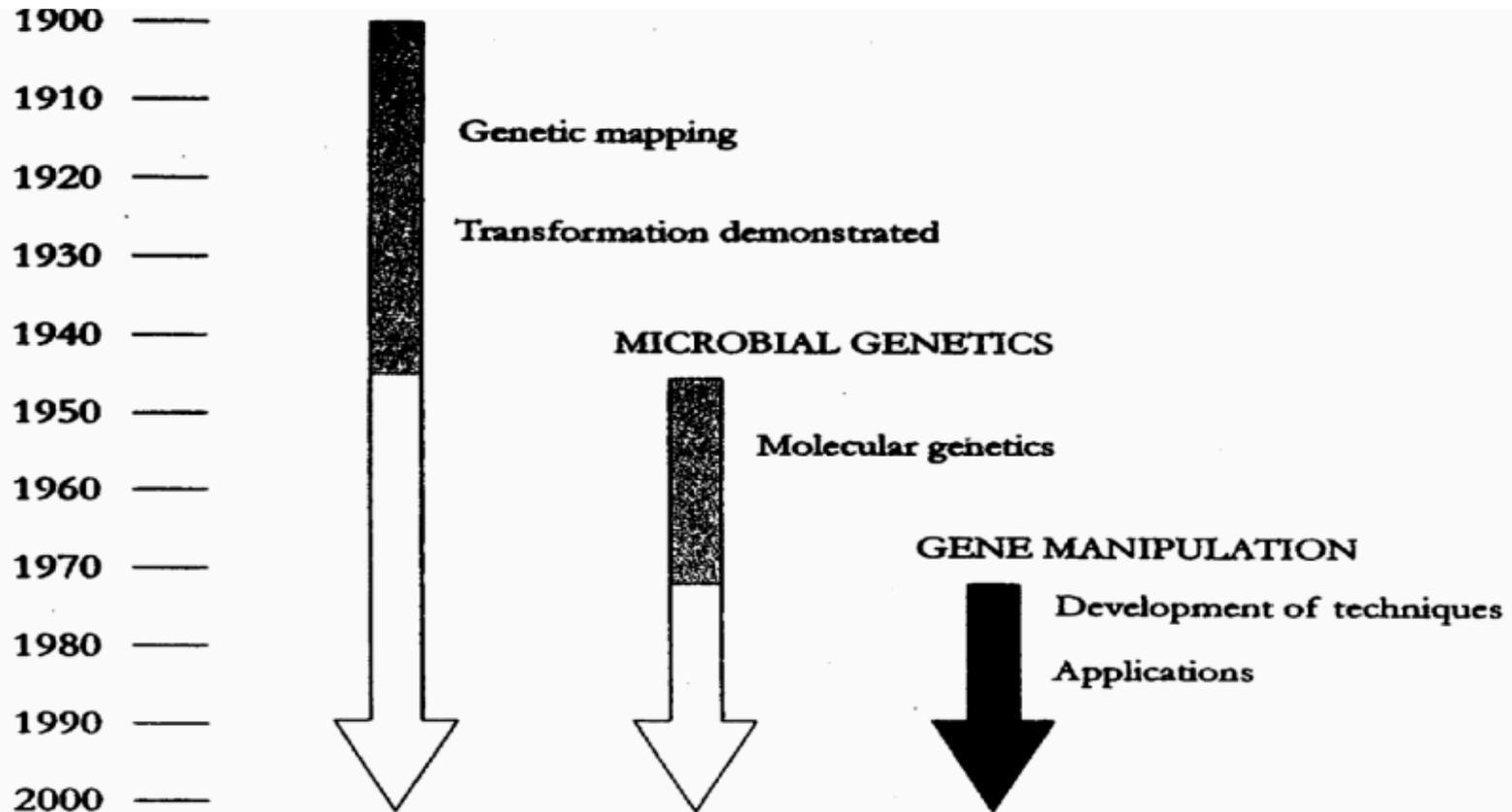


# Clonagem Molecular



**Patricia H. Stoco**  
**Edmundo C. Grisard**

# Desenvolvimento da Clonagem molecular



**Fig. 1.2.** The history of genetics since 1900. Shaded areas represent the periods of



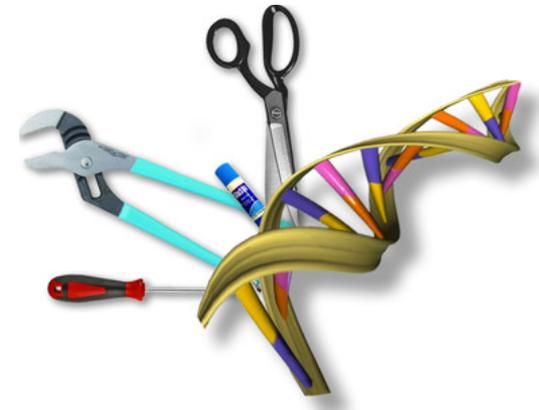
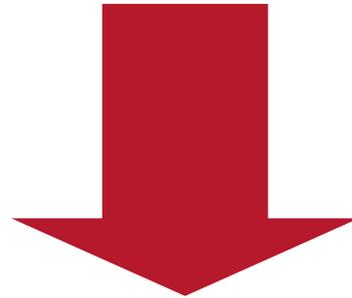
# Definição: Clonagem molecular

- Processo de construção de moléculas de DNA recombinante e da sua propagação em hospedeiros apropriados que possibilitam a seleção do DNA recombinante.
- Expressões utilizadas com o mesmo significado:
- clonagem molecular
- engenharia genética
- manipulação gênica
- clonagem gênica
- tecnologia do DNA recombinante
- modificação genética



# Clonagem molecular

- Isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas
- Origem do termo: cada colônia bacteriana é um clone
- **Tecnologia do DNA recombinante**



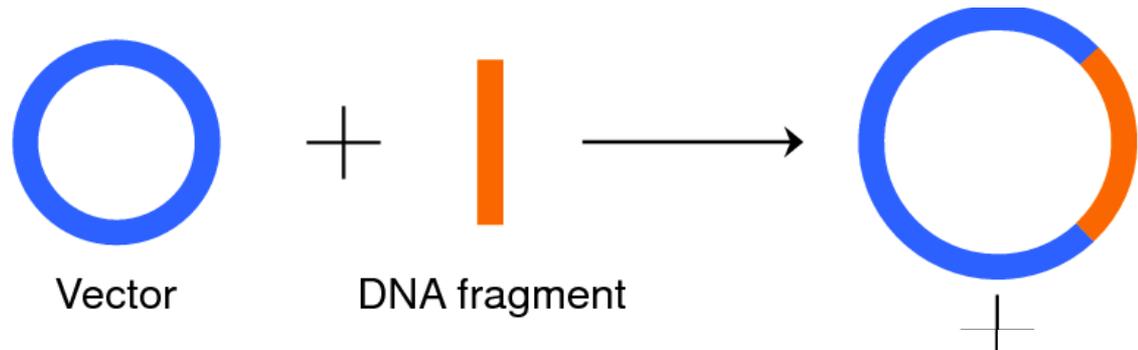
Produção de proteínas em larga escala  
Construção de bibliotecas genômicas e de cDNA



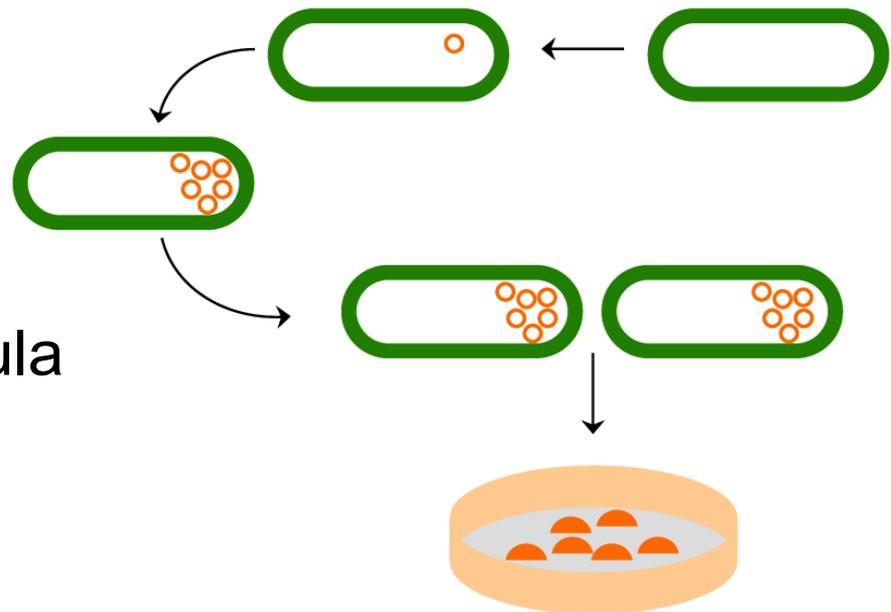
**INSERTO**

**VETOR**

1. Ligação do **fragmento de DNA** em um **plasmídeo** → DNA recombinante

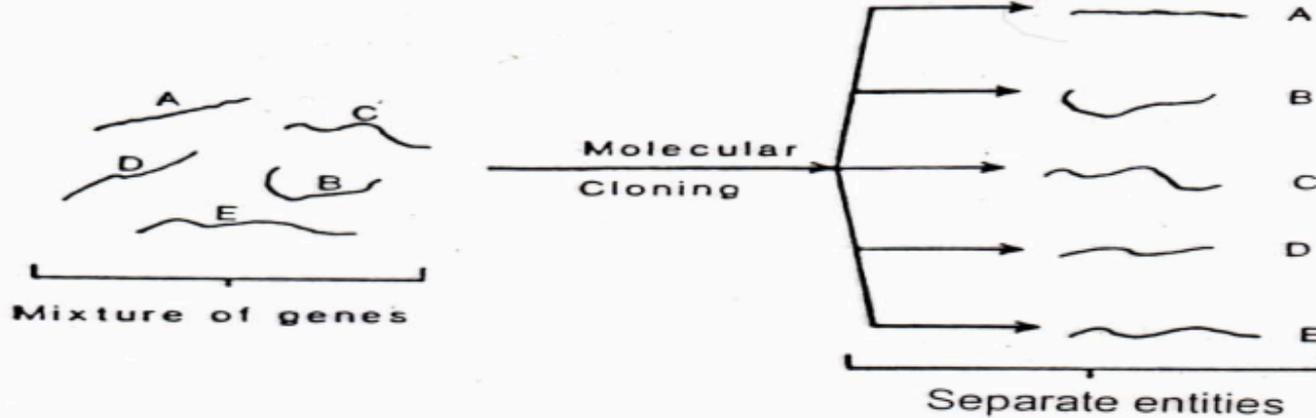


2. Introdução do DNA recombinante em uma célula hospedeira compatível



# Objetivos gerais da clonagem molecular

**A**



**B**

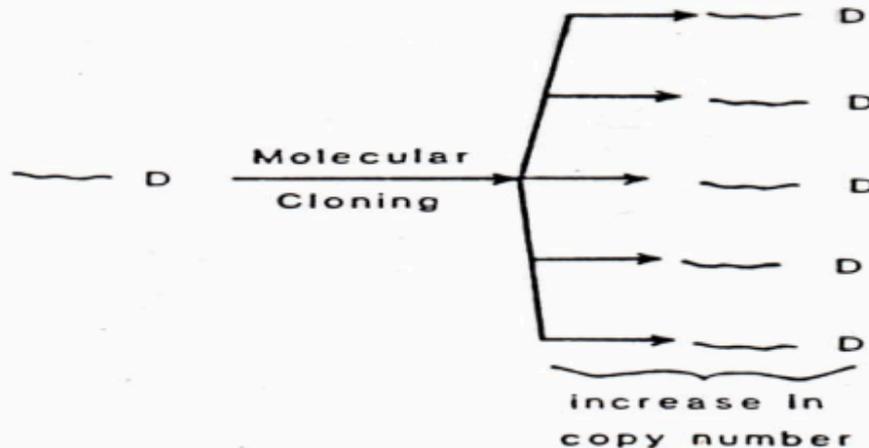


Figure 1 The two basic capabilities of molecular cloning. **(A)** Through molecular cloning, a heterogenous mixture of genes can be separated into discrete entities. **(B)** Molecular cloning can be utilized to increase the copy number or "amplify" a pure DNA sequence.



# Etapas da clonagem molecular

1. Preparação do DNA → vetor
2. Preparação do DNA ou cDNA → inserto
3. Ligação do inserto no vetor
4. Seleção do sistema vetor/hospedeiro
5. Introdução de DNA recombinante no hospedeiro
6. Seleção de clones recombinantes
7. Identificação de clones recombinantes



# Preparação do DNA: vetor e inserto

- **Preparação de DNA: vetor**

- Digestão com enzima(s) de restrição
- Sistemas TA

- **Métodos de produção de fragmentos de DNA: inserto**

- Digestão com enzimas de restrição
- Digestão parcial com DNase I
- Quebra mecânica controlada
- Síntese enzimática (cDNA, PCR)
- Síntese química de oligodesoxirribonucleótidos

- **Métodos de modificação das extremidades do DNA**

- Preenchimento parcial de extremidades 3'
- Preenchimento total de extremidades 3'
- Remoção de extremidades 3'
- Adição de linkers
- Adição de adaptadores
- Desfosforilação



- **Métodos de produção de fragmentos de DNA: inserto**
  - **Digestão com enzimas de restrição**
  - Digestão parcial com DNase
  - Quebra mecânica controlada
  - **Síntese enzimática (cDNA, PCR)**
  - Síntese química de oligonucleotídeos

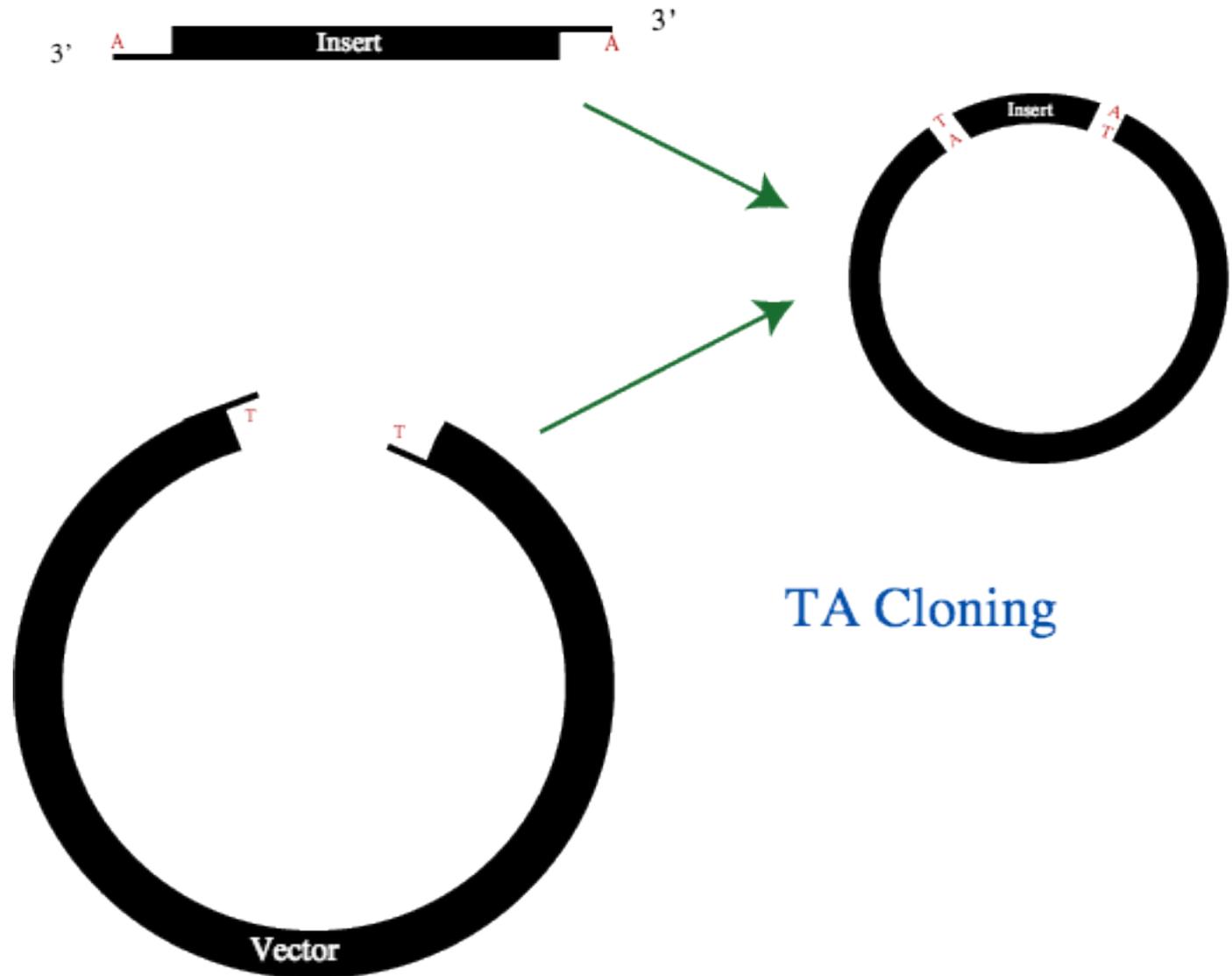


- **O que eu quero clonar?**
- **Pra que eu quero clonar?**

**Gene Específico**

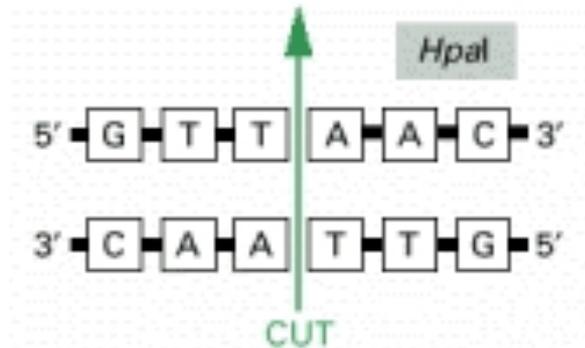
**Genoma**

# Sistemas T-A

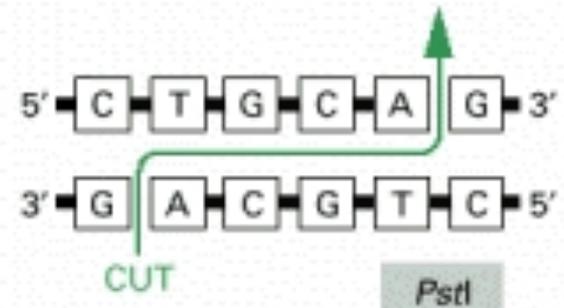
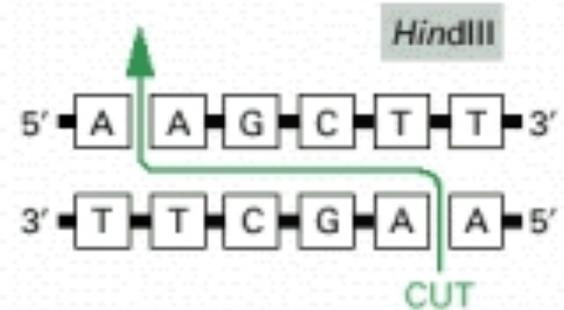
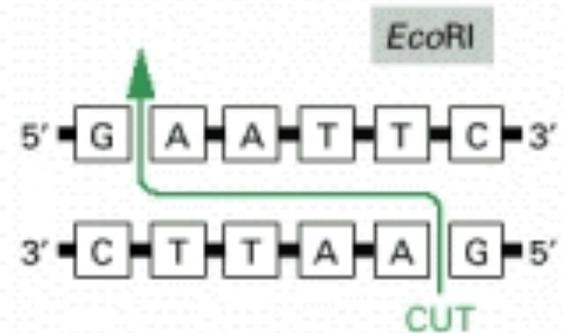


# Enzimas de restrição

- Capacidade de clivar DNA em regiões específicas
- Palindrômicas

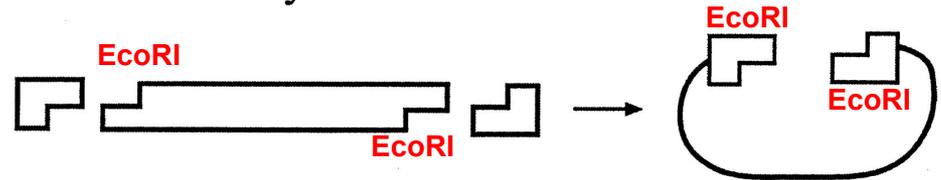


- 1973 → enzimas com extremidades coesivas

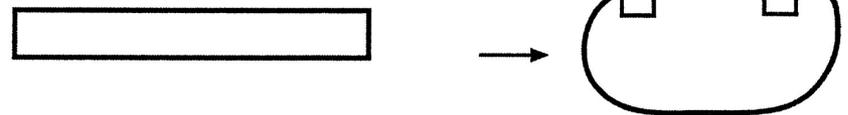


## Construção do DNA recombinante

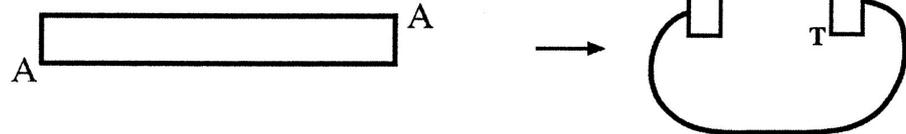
Restriction enzyme "cut back"



blunt-end

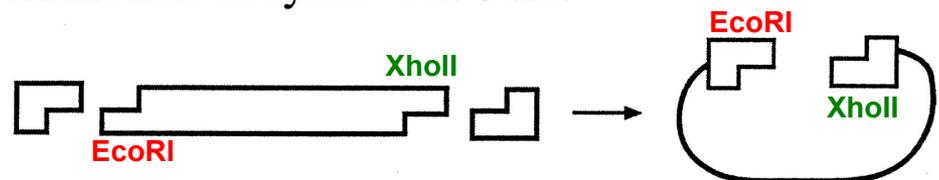


T/A



- Clonagem não dirigida

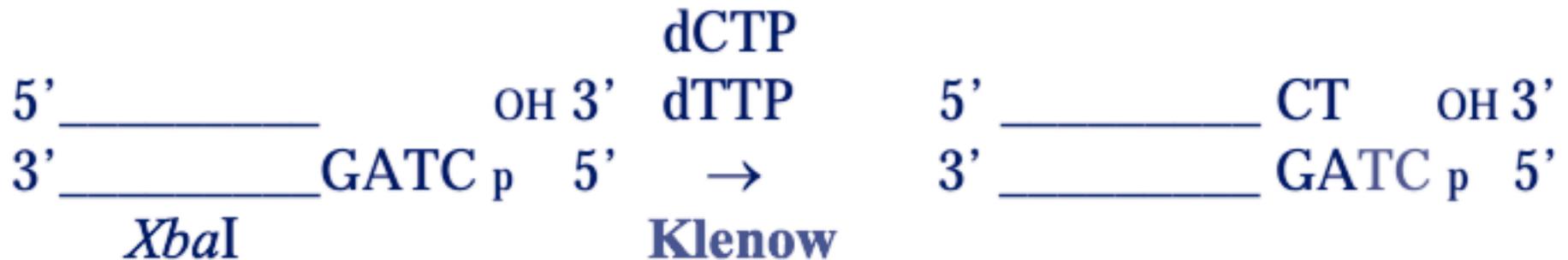
Restriction enzyme "cut back"



- Clonagem dirigida  
(Duas enzimas)

- **Métodos de modificação das extremidades do DNA**

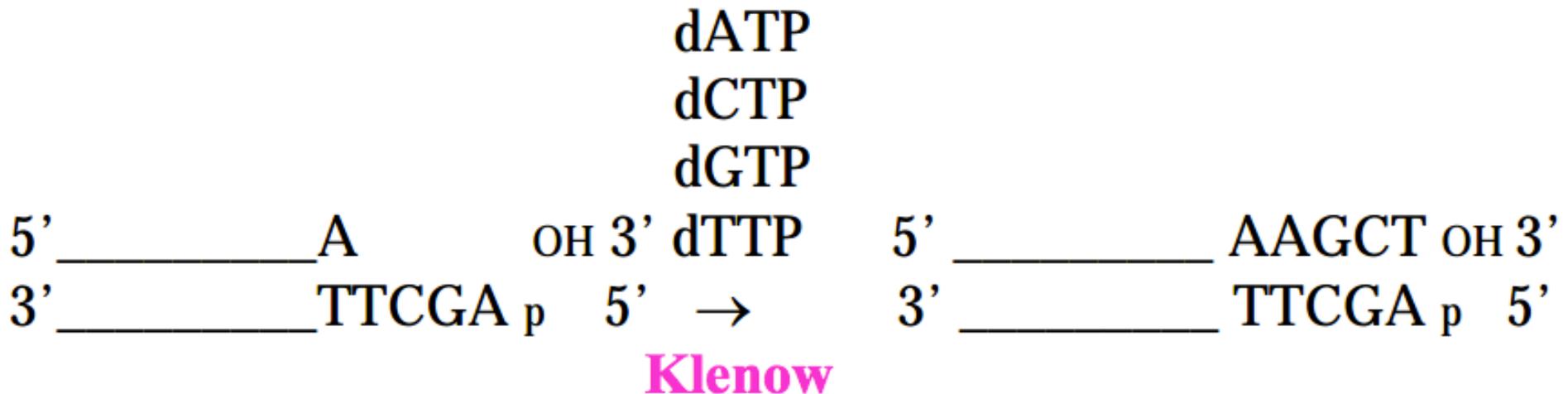
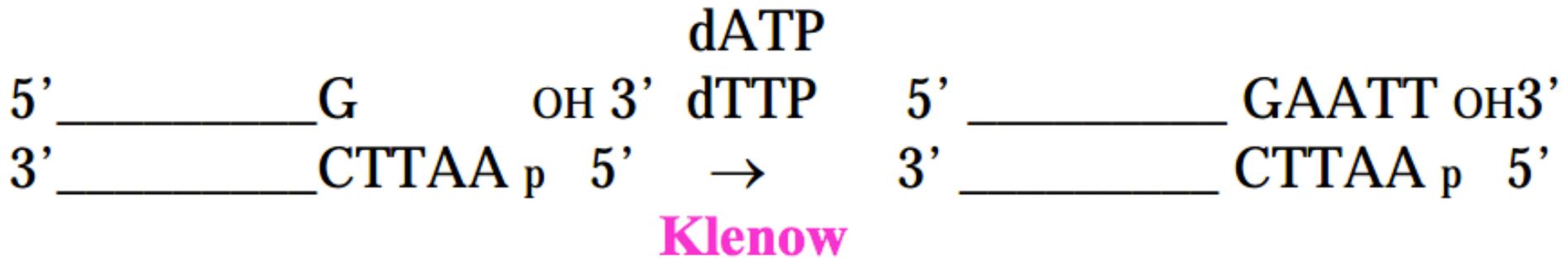
- Preenchimento parcial de extremidades 3'



A extremidade *Hind III* modificada é compatível com a extremidade *XbaI* modificada

- Métodos de modificação das extremidades do DNA

- Preenchimento total de extremidades 3'



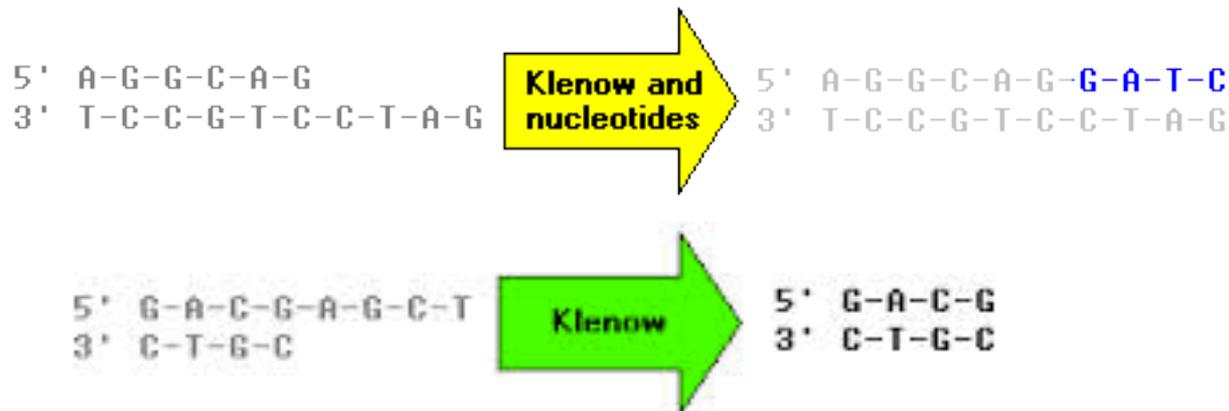
As extremidades coesivas são convertidas em extremidades cegas

- Métodos de modificação das extremidades do DNA
  - Remoção de extremidades 3'

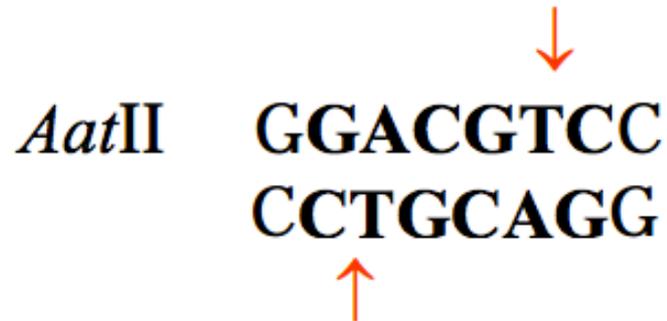
As enzimas utilizadas são:

- T4 DNA Polimerase
- Polimerase Klenow
- Nuclease S1
- Nuclease *mung bean*

As extremidades coesivas são convertidas em extremidades cegas



- Métodos de modificação das extremidades do DNA
  - Adição de linkers



*Linker* fosforilado            5'-d (pGGACGTCC) -3'

*Linker* não fosforilado    5'-d (GGACGTCC) -3'

**As extremidades cegas são convertidas em extremidades coesivas**

- Métodos de modificação das extremidades do DNA
  - Adição de adaptadores

- Adaptador com extremidades coesivas:

*XmnI*

5' .....AATTCGAACCCCTTCG.....3'

3' .....GCTTGGGGAAGCCTAG.....5'

*EcoRI*

*BamHI*

Uma extremidade coesiva é convertida numa extremidade coesiva diferente

- Adaptador com uma extremidade cega:

*XmnI*

5' .....AATTCGAACCCCTTCG.....3'

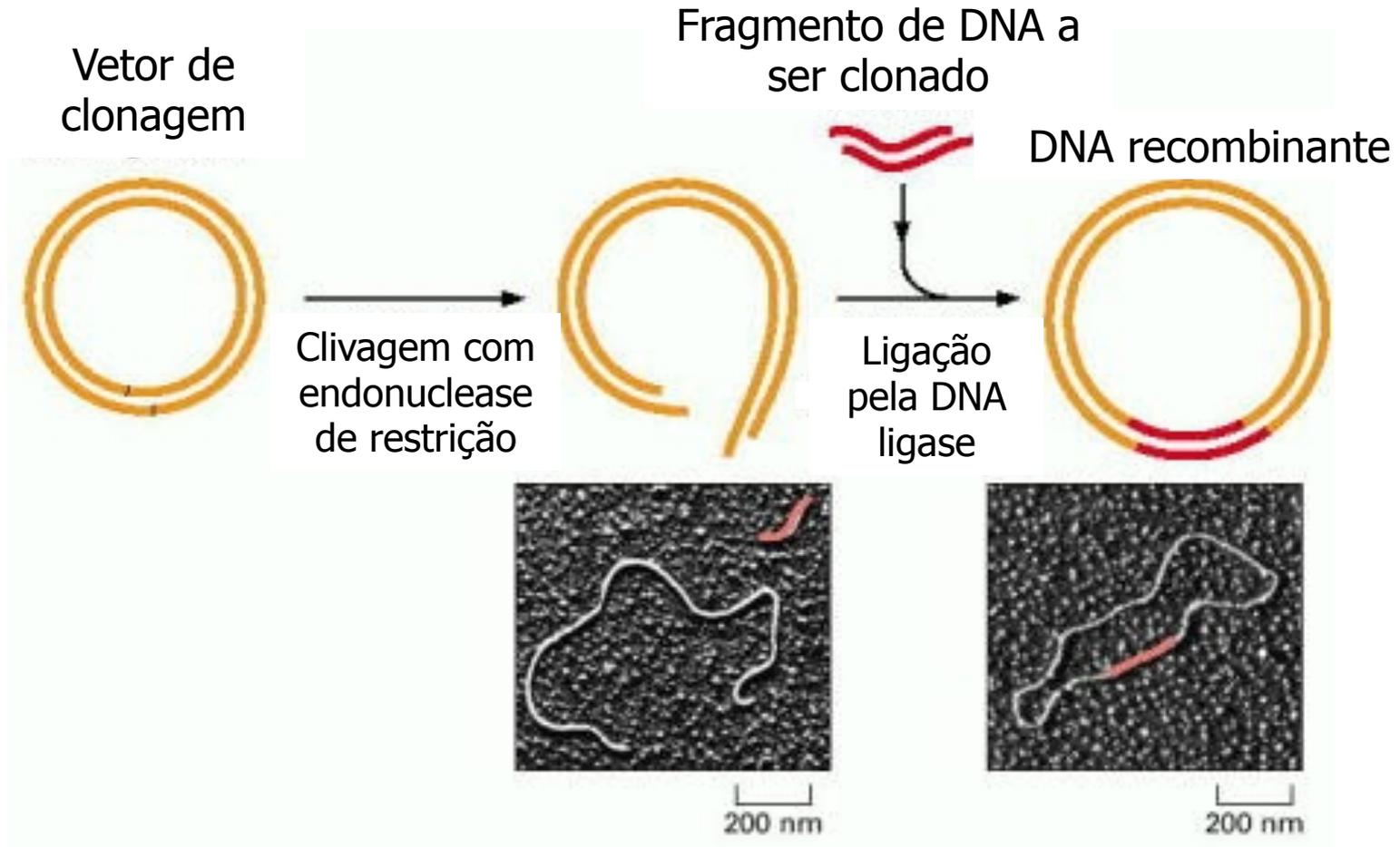
3' .....GCTTGGGGAAGC<sub>p</sub>.....5'

*EcoRI*

Uma extremidade coesiva é convertida em extremidade cega ou vice-versa

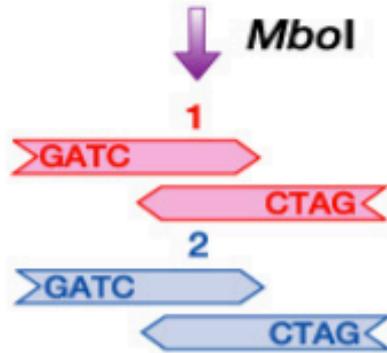


# Digestão e ligação



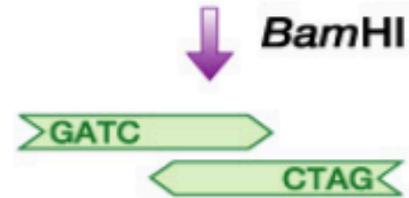
## Ligação intermolecular e intramolecular

Target DNA  
cut with *Mbo*I

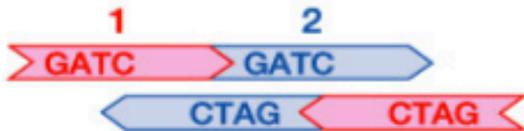


A tendência para a circularização de moléculas individuais é mais acentuada quando a concentração de DNA é baixa e as possibilidades de colisão entre diferentes moléculas com extremidades coesivas complementares é reduzida.

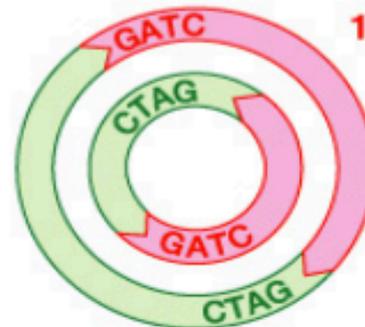
Vector DNA with  
single *Bam*HI site



Target–target  
e.g. intermolecular;  
concatemers



Vector–target

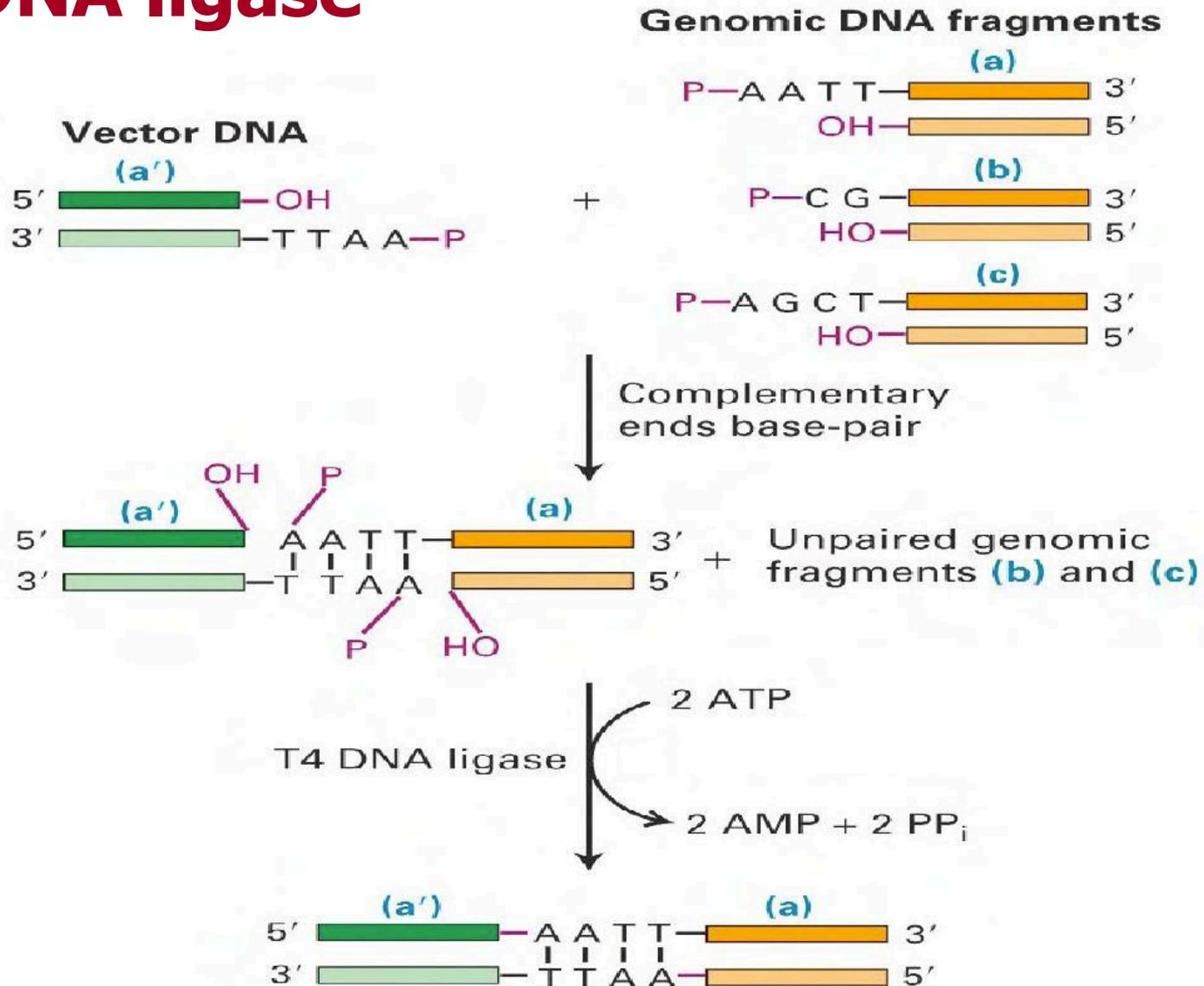


Recombinant DNA

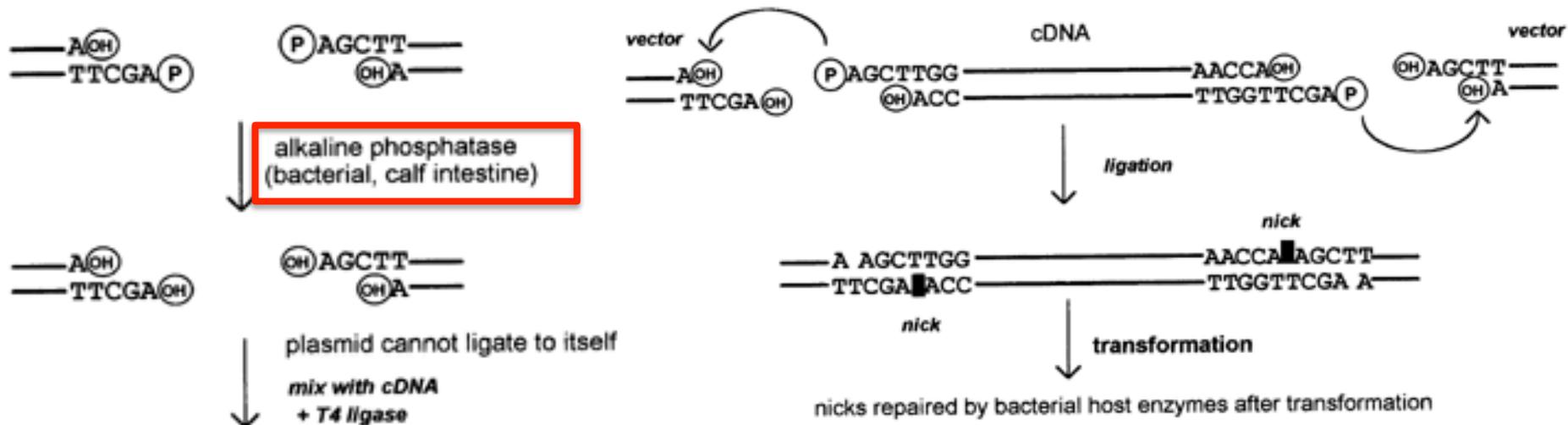
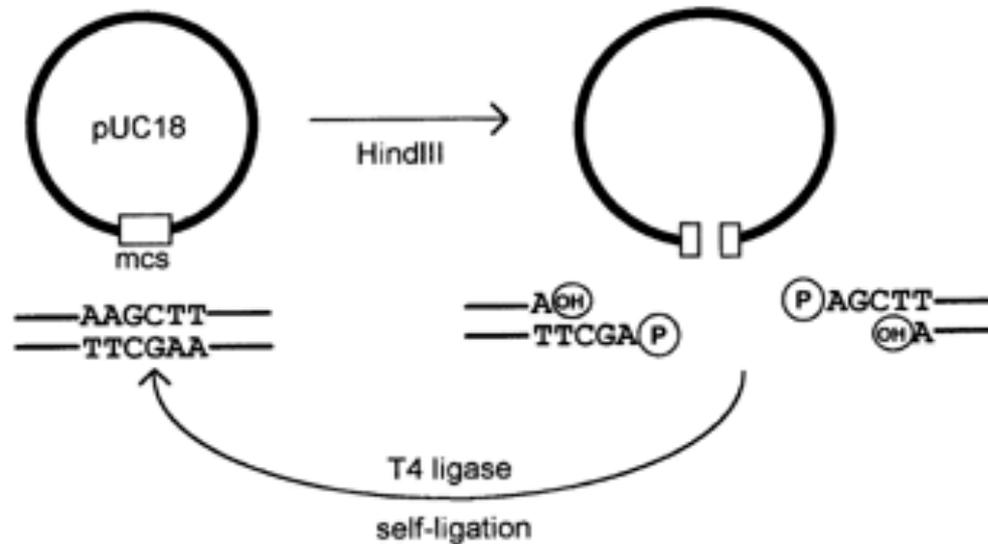
Vector only  
e.g. intramolecular;  
cyclization



# T4 DNA ligase



- Desfosforilação



## Plasmídeos

- Propagação/ Expressão

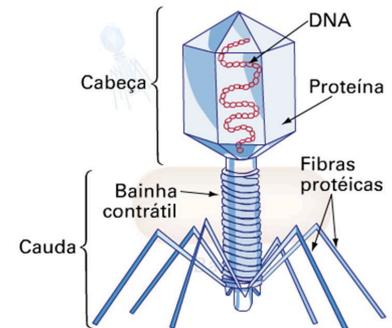
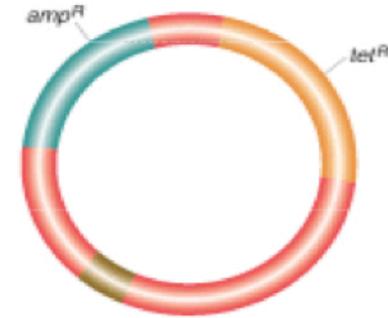
## Cosmídeos

## Vetores derivados do fago lambda/ M13

## Cromossomos artificiais derivados do fago P1 (PACs)

## Cromossomos artificiais bacterianos (BACs)

## Cromossomos artificiais de levedura (YACs)



### Tipo de vector

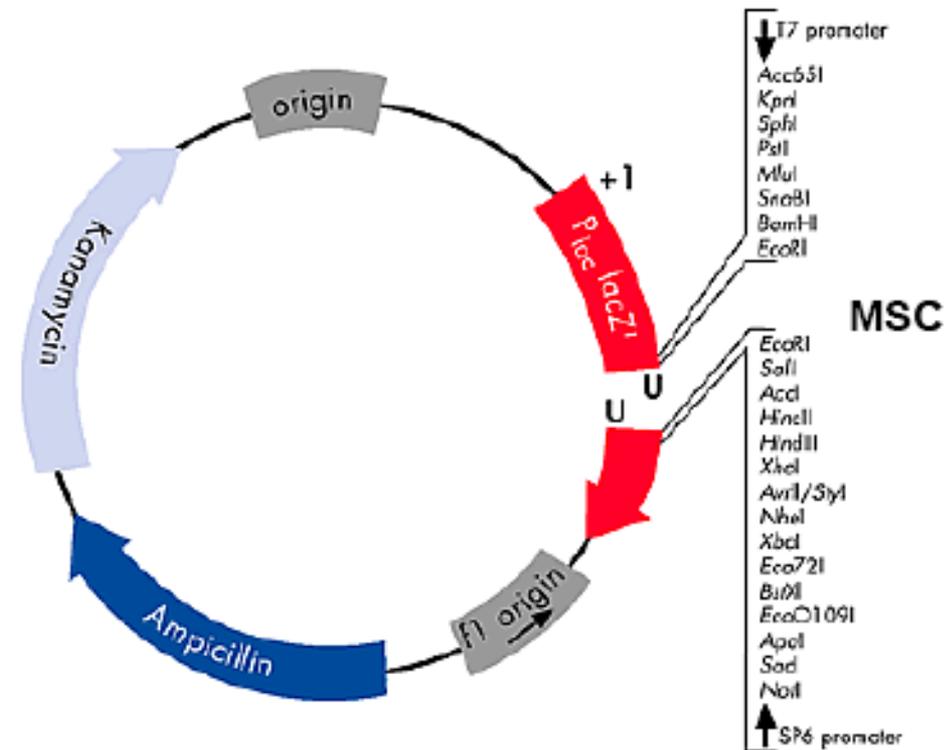
### DNA clonado (kb)

Plasmídeo	10
Fago $\lambda$	25
Cosmídeo	45
PAC (cromossoma artificial derivado do fago P1)	100
BAC (cromossoma artificial bacteriano)	300

# Plasmídeo

Todo plasmídeo para ser um **bom vetor** deve ter:

- **Origem de replicação (Ori)**
- **Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC)**
- **Resistência a antibiótico (Neo, Kan, etc.)**
- **Promotor**



## Promotor



- Controla o primeiro estágio de expressão gênica → a ligação da RNA-polimerase ao DNA;
- Determina o momento e a frequência na qual o mRNA é sintetizado.

### PROMOTORES FRACOS E FORTES

- Possibilidade de regulação do **promotor/operador** (Indução e Repressão)

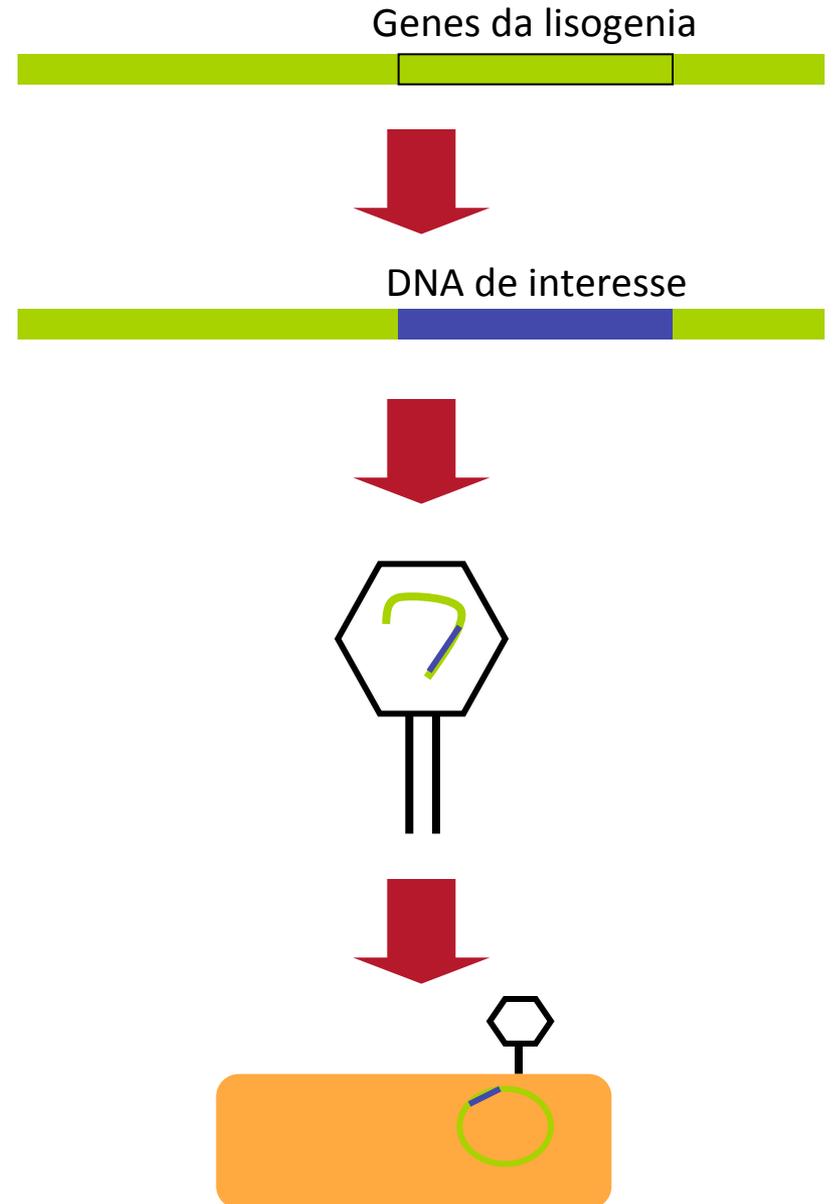
# Fago $\lambda$

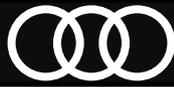
- Empacotamento *in vitro*  $\rightarrow$  eficiência 10%  $\rightarrow$  sítio *cos*



- Infecção *E. coli*  $\rightarrow$  eficiência 100%

Vetores de substituição  
Vetores de inserção





# Cosmídeos

- Plasmídeos com um fragmento de DNA do fago  $\lambda$   $\rightarrow$  sítio *cos*



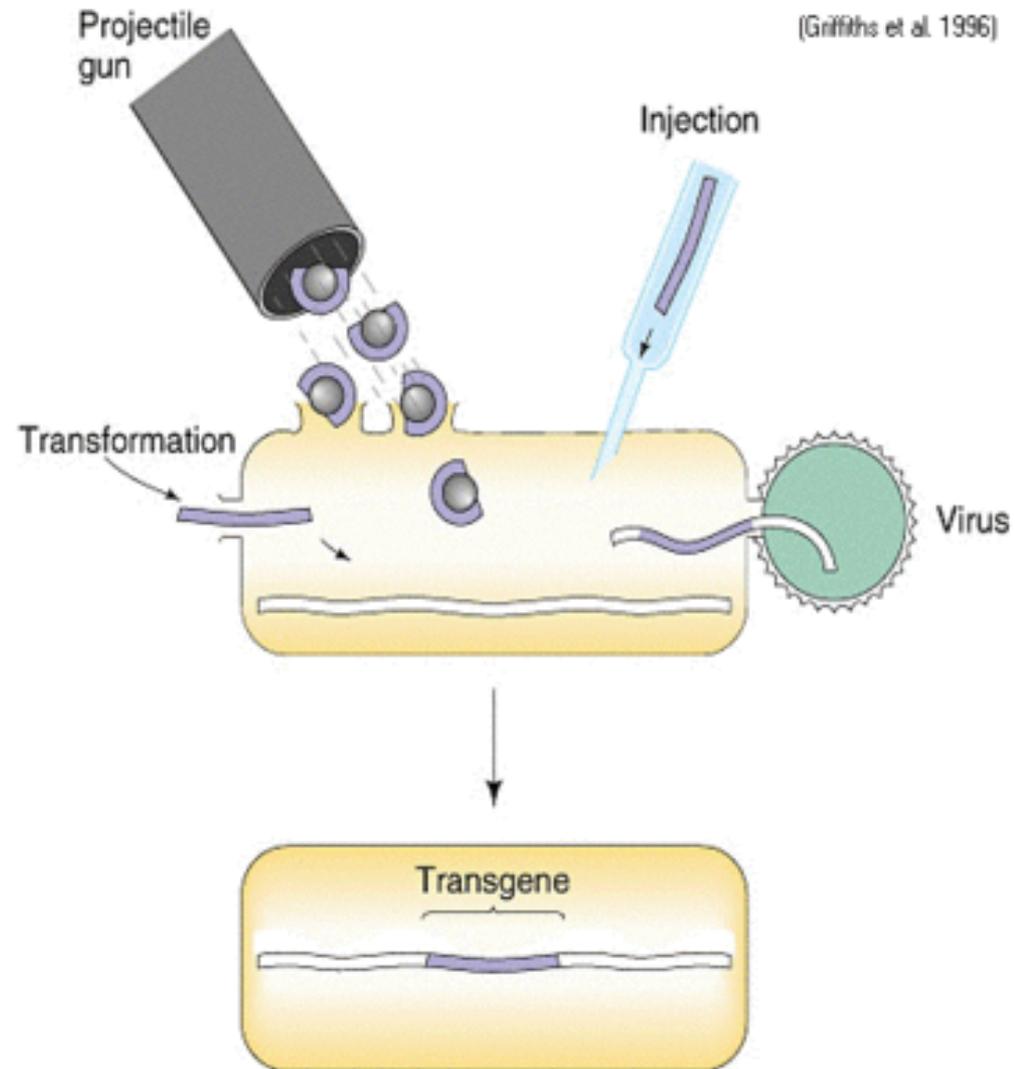
- Utilizam sistema de empacotamento *in vitro* do fago  $\lambda$
- Tornam-se circulares na célula hospedeira
- Permitem clonagem de genes maiores – 35 a 45kb





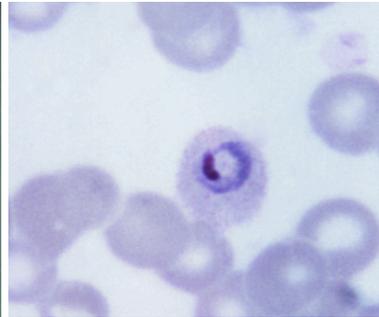
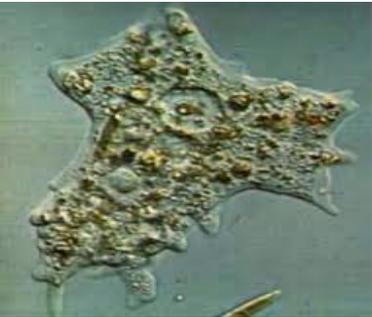
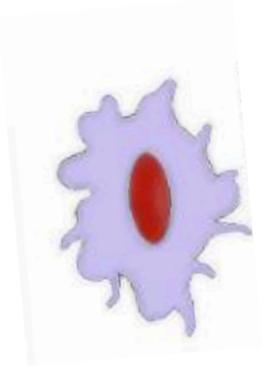
# Métodos de introdução de DNA no hospedeiro

- Transformação
- Transfecção
- Eletroporação
- Microinjecção
- Bombardeamento
- Infecção viral





## Células isoladas

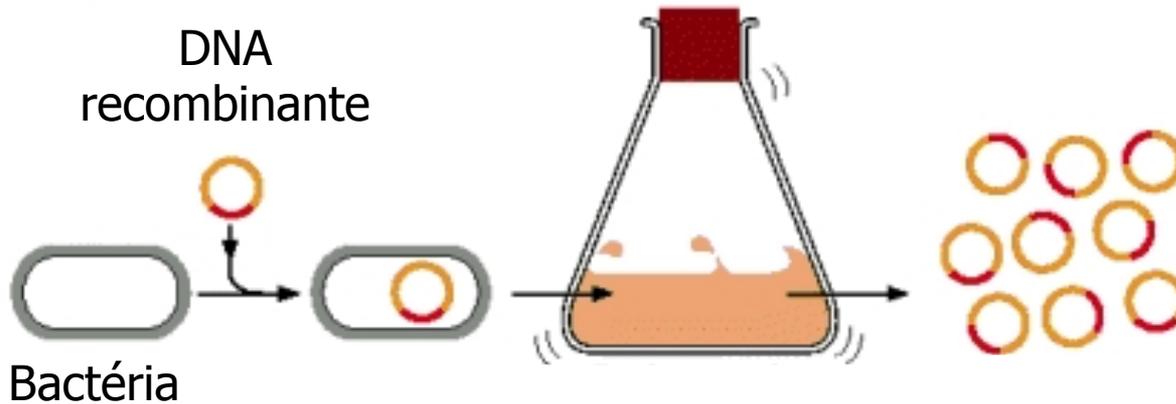


- Transformação
- Transfecção
- Eletroporação
- Microinjecção
- Bombardeamento
- Infecção viral

## Organismos multicelulares

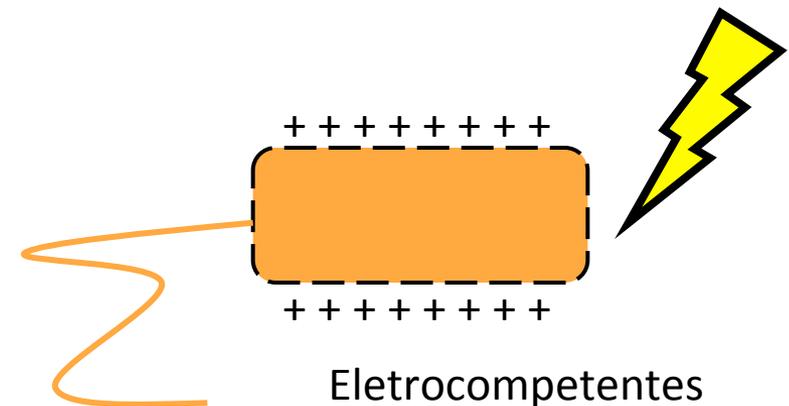
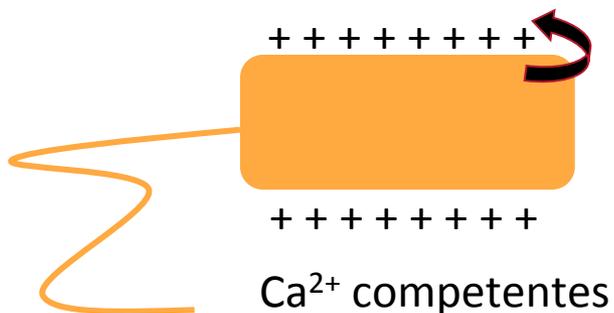


# Transformação em células competentes



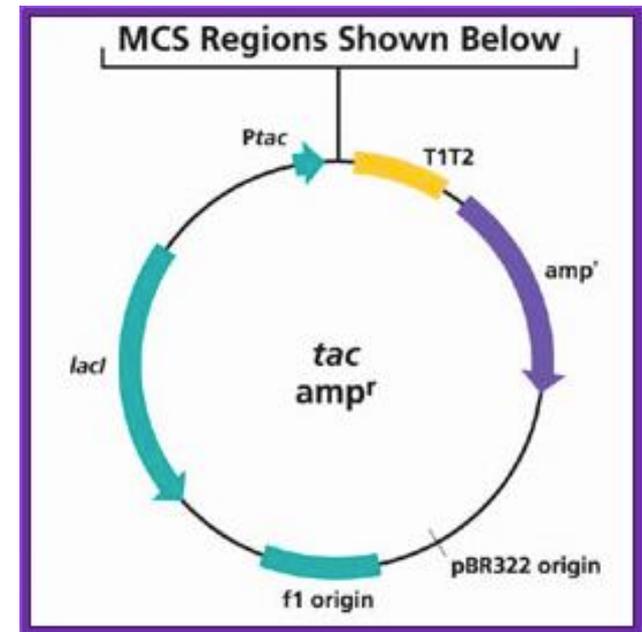
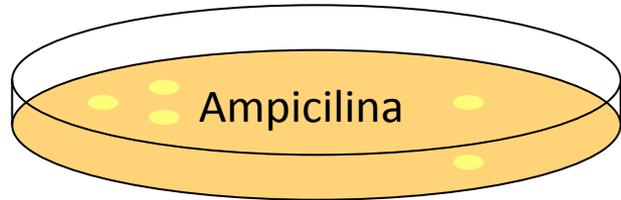
## Células competentes

- Células bacterianas quimicamente modificadas para receberem o DNA recombinante



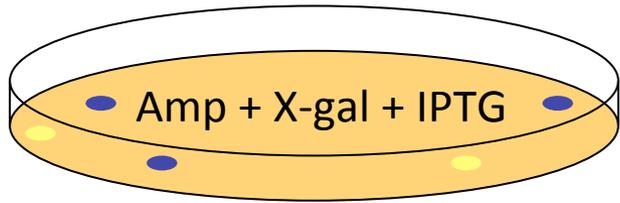
# Seleção de colônias

## Resistência a antibiótico



# Expressão de $\beta$ -galactosidase

- Fragmento de DNA é inserido no meio do gene *lacZ*



**$\beta$ -gal**: degrada polissacarídeos

**X-gal**: substrato cromogênico  $\rightarrow$  forma precipitado azul quando há atividade de  $\beta$ -gal

**IPTG**: indutor da expressão de  $\beta$ -gal



functional enzyme

X-gal  $\longrightarrow$  product



nonfunctional enzyme

X-gal  $\longrightarrow$  ~~product~~





# Métodos de identificação de clones recombinantes

- Análise do padrão de restrição
- Sequenciamento de DNA
- Hibridização de ácidos nucleicos
- PCR
- Análise de produtos gênicos (reconhecimento imunológico)

## PCR

Iniciador F



Inserto



Iniciador R

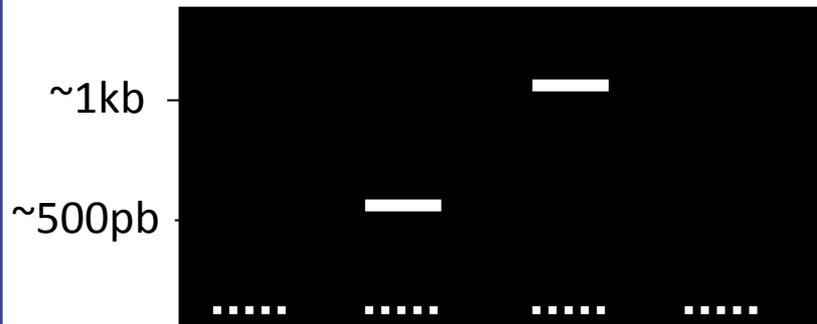


Controle negativo

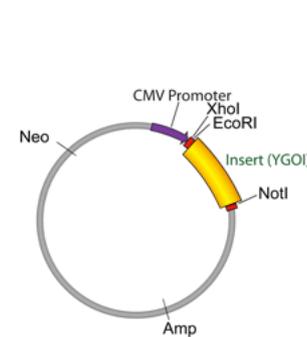
Plasmídeo + DNA 500pb

Plasmídeo + DNA 1kb

Plasmídeo vazio

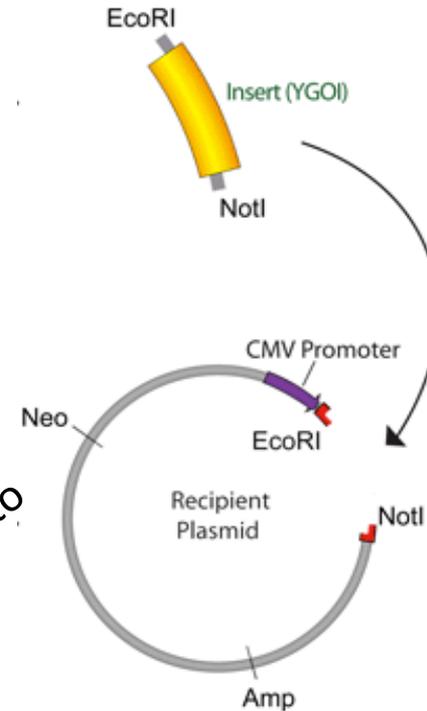


## Perfil de restrição



Plasmídeo vazio

Plasmídeo + inserto



3000pb

500pb

**DNA  
plasmidial  
após  
digestão com  
*EcoRI* e *NotI***