

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

APOSTILA DA DISCIPLINA DE BIOLOGIA
MOLECULAR



Prof^a Lídia Maria da Fonte de Amorim
1^a edição, 2016

ATIVIDADE I - MODELOS DE ESTRUTURA DE DNA EM PAPEL

OBJETIVOS: Ao final da atividade os estudantes devem ser capazes de:

1. Apontar a composição da molécula de DNA;
2. Explicar como a molécula de DNA se mantém;
3. Construir 2 modelos de DNA dupla-hélice utilizando moldes de papel.

I) Construindo o DNA de papel:

Imaginem a estrutura do DNA como uma escada do tipo caracol, compostas por unidades chamadas de nucleotídeos ligadas entre si por ligações do tipo fosfodiéster. Neste modelo, os degraus podem ser comparados aos pares de bases nitrogenadas e o corrimão aos açúcares e grupamentos fosfato. Existem quatro tipos de bases nitrogenadas que compõe o DNA: Adenina e Timina, Citosina e Guanina, que pareiam entre si de maneira complementar.

- a) Imprima uma folha da **página 3**.
- b) Corte as bases nitrogenadas, fosfatos e açúcares pela linha externa;
- c) Reúna as bases, fosfatos e açúcares usando os símbolos (quadrados, círculos e estrelas) como guias,
- d) Cole os recortes formando os nucleotídeos de maneira que os símbolos se encaixem;

- e) Cole os 6 nucleotídeos, uns aos outros, simulando as ligações fosfodiéster e construindo uma das fitas do DNA;
- f) Para a construção da dupla hélice, construir outra fita com a adição de nucleotídeos complementares a primeira fita;
- g) **EM SALA:** Após a construção do seu fragmento de DNA, juntar ao fragmento dos outros grupos, formando uma longa molécula de DNA;
- h) Torça, cuidadosamente, a molécula de DNA simulando a dupla hélice.

II - Construindo o DNA com modelo em estrutura beta:

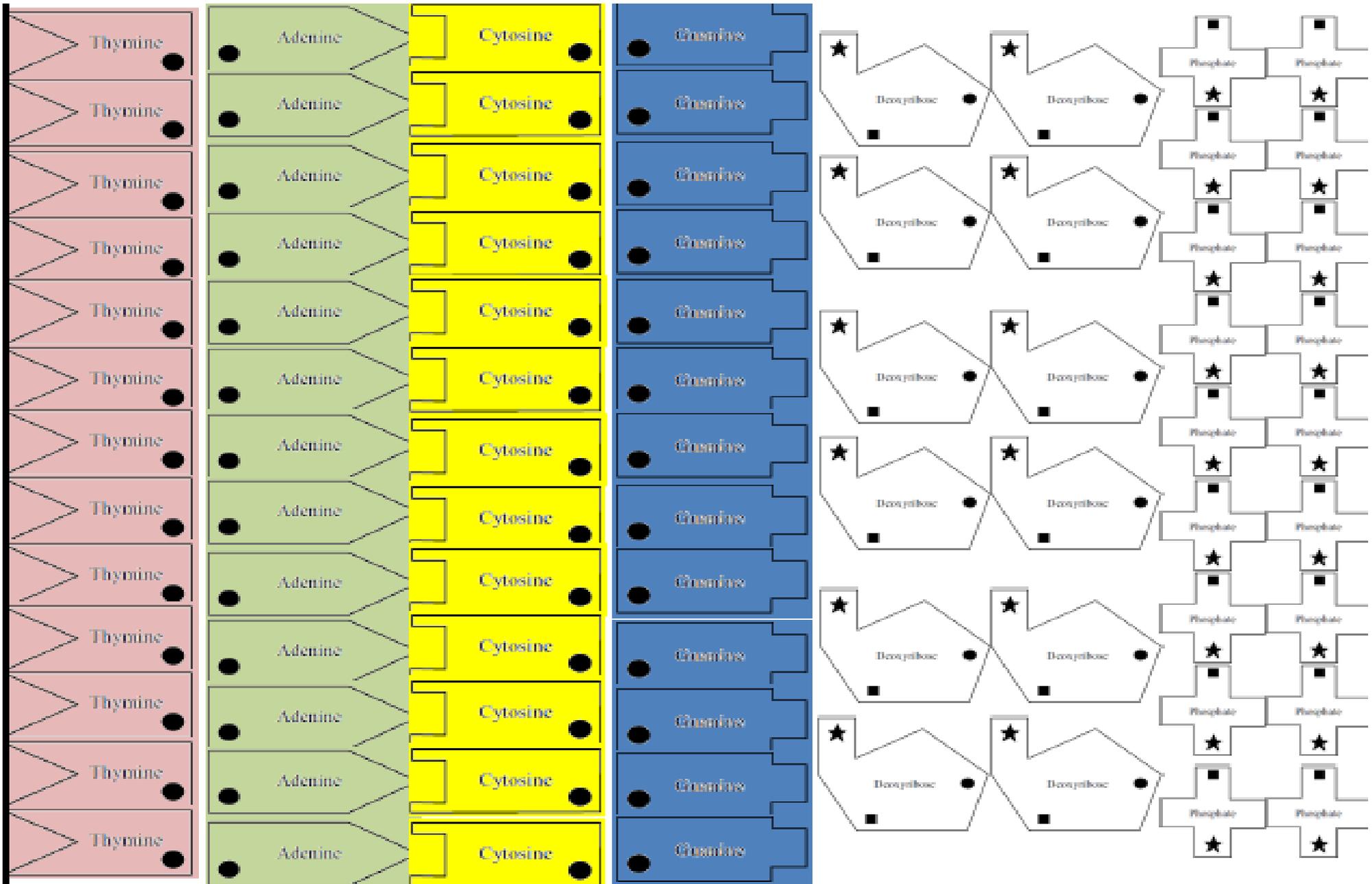
(Fonte: John Schollar, Modelling the helix: A cut-out 3-D model of DNA, Bioscience explained, Vol 1 No 1)

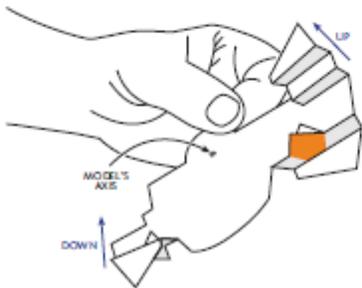
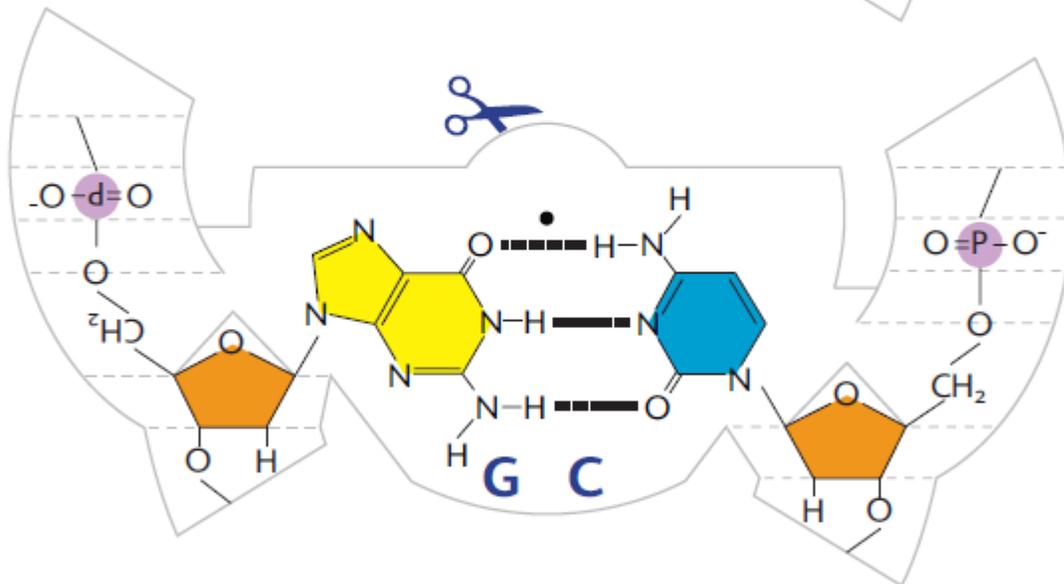
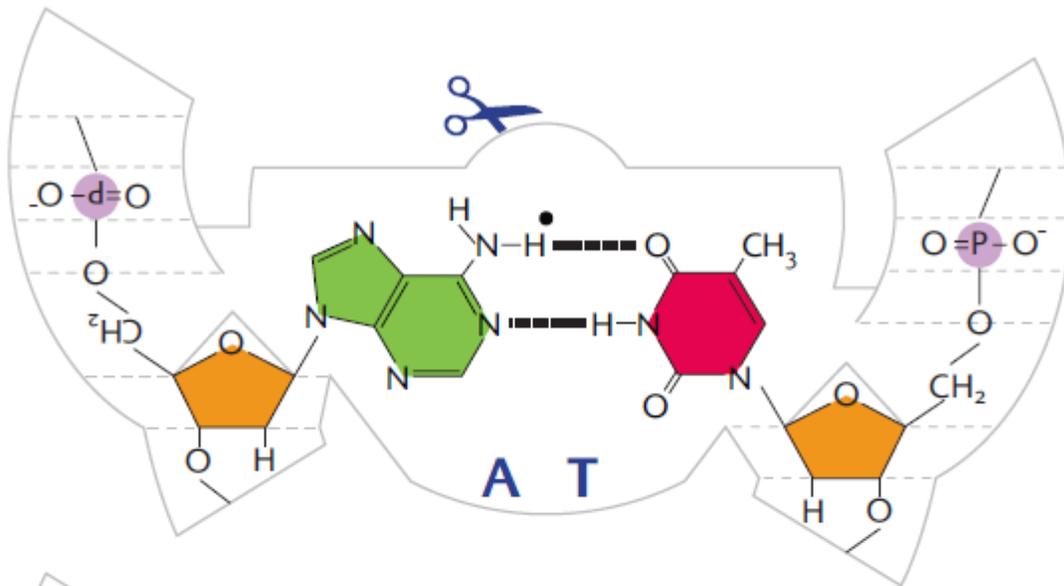
PROCEDIMENTO

- a) Imprima 2 cópias das páginas 4 e 5 dos modelos de nucleotídeos.
OBS: Dez pares de nucleotídeos são necessários para uma volta completa da dupla hélice. Para ver os sulcos maiores e menores o modelo tem de ter, pelo menos, 16 pares de nucleotídeos. Se não tiverem sido utilizadas cópias coloridas, os nucleotídeos deverão ser coloridos apropriadamente. As cores frequentemente utilizadas em sequenciamento do DNA são: Citosina = Azul; Guanina = amarelo; Adenina = Verde; Timina = vermelho.
- b) Corte os pares de nucleotídeos, em torno das linhas exteriores.
- c) Faça dois pequenos cortes próximo aos grupos fosfato e acima das moléculas de desoxirribose.
- d) Perfure o cartão no centro onde irá passar um canudo. Não faça buracos muito grandes.
- e) Dobre no local indicado. Estas dobras devem ser feitas nas direções mostradas no modelo.
- i) Cole os nucleotídeos entre si e coloque os canudos para manter a estrutura em pé.
- j) **EM SALA:** Após a construção do seu fragmento de DNA, juntar ao fragmento dos outros grupos, formando uma longa molécula de DNA;

ATIVIDADE I - Perguntas (Cada grupo deverá entregar suas respostas ao professor):

- 1) Quais são as ligações que mantêm a estrutura do DNA?
- 2) O que você observa sobre a orientação das cadeias do DNA?
- 3) Como ocorre o pareamento de bases?
- 4) Descreva a replicação do DNA e aponte suas propriedades.

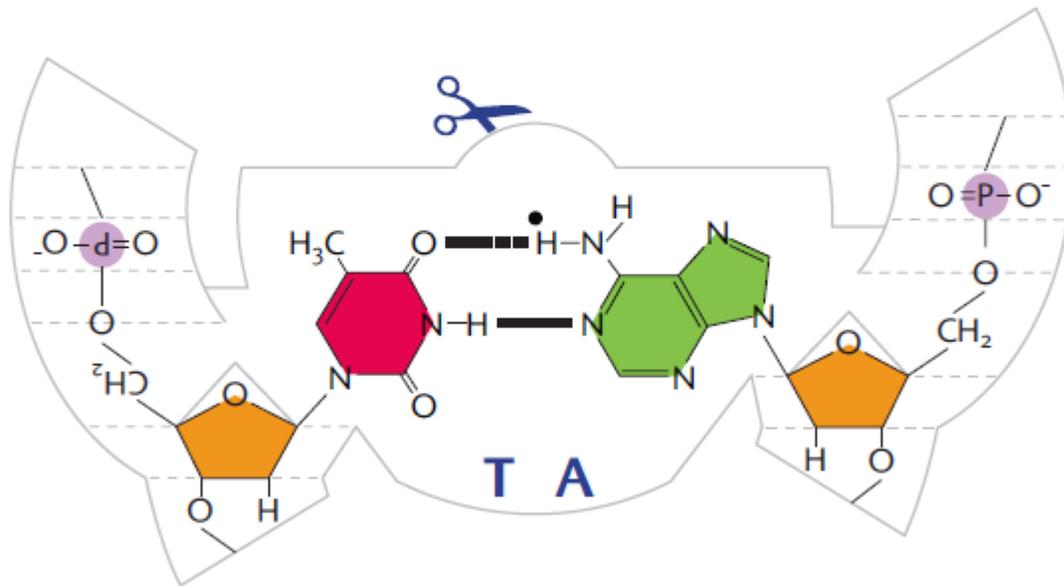
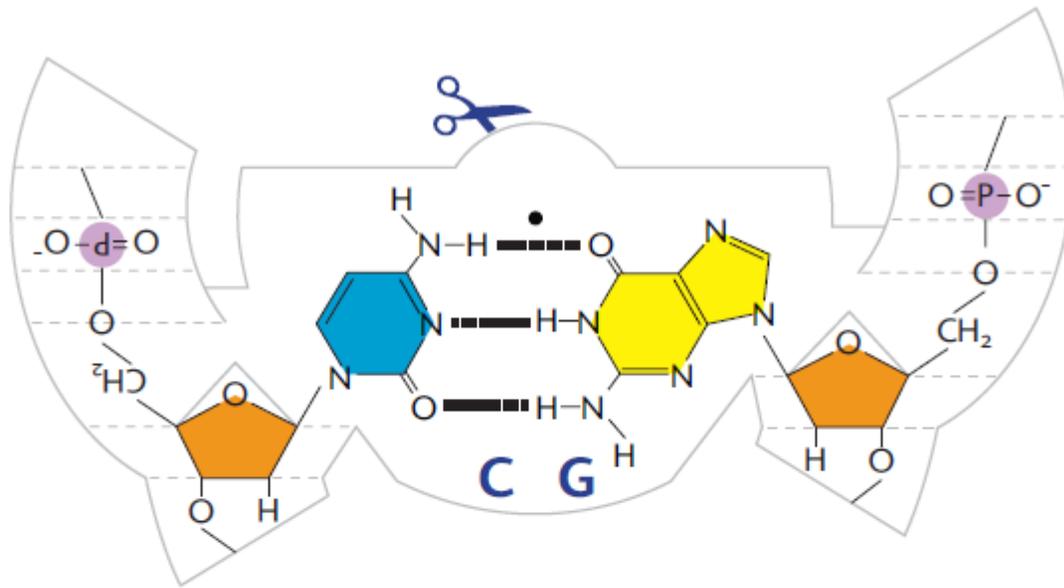




IMPORTANT!

Take care not to make left-handed DNA.

Phosphate groups on the left side fold DOWN, phosphates on the right fold UP.



ATIVIDADE II - ENZIMAS DE RESTRIÇÃO: AS TESOURAS DO DNA

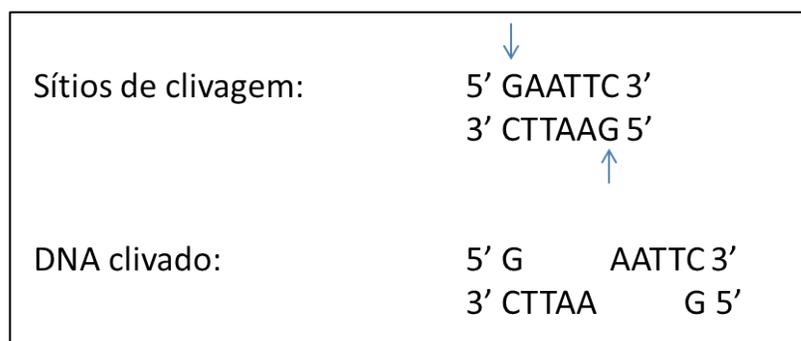
OBJETIVO: Ao final da atividade os estudantes devem ser capazes de:

1. Identificar sequências palindrômica na sequência de uma molécula de DNA;
2. Reconhecer os tipos de sítios de clivagens das enzimas de restrição na molécula de DNA;
3. Explicar as funções das enzimas de restrição;
4. Distinguir cortes cegos ou coesivos na molécula de DNA.

I) Que são as enzimas de restrição?

Enzimas de restrição ou endonucleases de restrição pertencem a uma classe especial de enzimas que possuem a função de cortar o DNA em diferentes pontos (sítios). São proteínas produzidas por bactérias para prevenir ou restringir a invasão de um DNA estranho. 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. Cada enzima de restrição tem seu próprio sítio de reconhecimento. Em geral, um sítio de restrição é formado por uma sequência de 4 a 6 pares de bases, chamados de palíndrome (ou sequência palindrômica). Uma palíndrome de DNA é uma sequência na qual a fita superior, lida da extremidade 5' para a extremidade 3', é igual à sequência da fita inferior, também lida da extremidade 5' para a extremidade 3' como por exemplo o sítio de clivagem da enzima *EcoRI*:



O nome *EcoRI* vem da bactéria na qual esta enzima foi descoberta: *Escherichia coli* cepa RY 13 (*EcoR*), e o I, porque esta foi a primeira enzima de restrição encontrada neste organismo.

A *EcoRI* cliva cada fita do DNA 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 então, se separa.

a) Agora, você simulará a atividade da enzima *EcoRI*. Procure ao longo da sequência da fita de DNA (tira 1) o sítio de restrição da *EcoRI*. Faça cortes no esqueleto fosfodiéster, cortando exatamente entre o G e o primeiro A do sítio de restrição em ambas as fitas. **Não corte toda a fita!** Lembre-se de que a *EcoRI* corta o esqueleto de cada fita do DNA em um ponto diferente.

b) Agora, separe as pontes de hidrogênio entre os sítios de clivagem, cortando as linhas verticais. Separe as duas porções de DNA. Observe os novos terminais de DNA produzidos pela *EcoRI*. Eles são coesivos ou cegos? Escreva *EcoRI* nos terminais. Guarde os fragmentos cortados.

c) Repita o procedimento com a tira 2, desta vez simulando a atividade da *SmaI*. Encontre o sítio da *SmaI* e corte o esqueleto fosfodiéster nos sítios de clivagem antes indicados. Há alguma ponte de hidrogênio entre os fragmentos cortados? As novas extremidades são cegas ou coesivas? Marque os novos terminais da clivagem com *SmaI* e guarde os fragmentos.

d) Simule a atividade da *HindIII* com a tira 3. Estas extremidades são cegas ou coesivas? Marque as novas extremidades geradas pela clivagem com *HindIII* e guarde os fragmentos.

e) Repita o procedimento mais uma vez com a tira 4 de DNA, simulando novamente a clivagem com *EcoRI*.

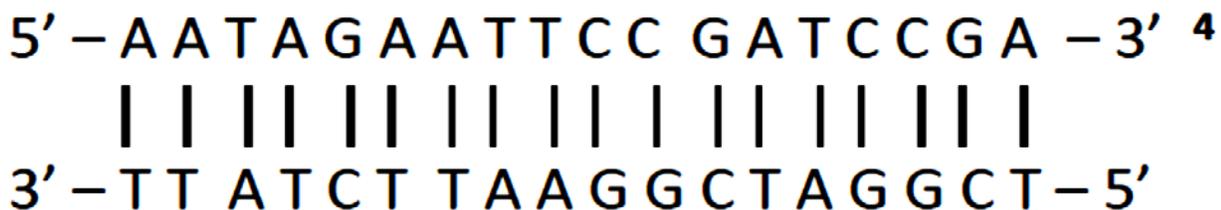
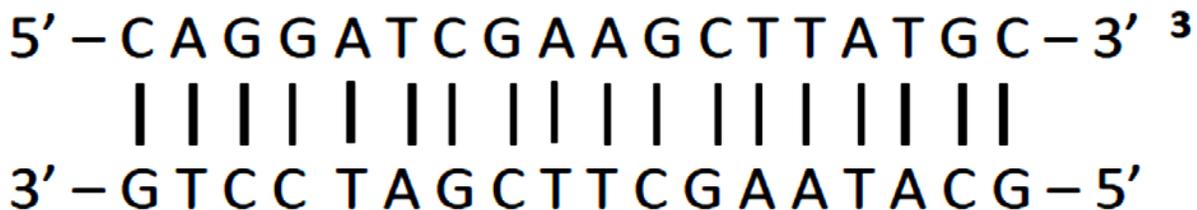
f) Pegue a "extremidade inicial" do fragmento de DNA da tira 4 (um fragmento de *EcoRI*) e a "extremidade final" do fragmento obtido pela enzima *HindIII* a partir da tira 3. Ambos os fragmentos têm caudas de fita simples de quatro bases. Escreva as sequências de bases das duas extremidades, identifique-as como *EcoRI* e *HindIII*. Identifique as extremidades 5' e 3'. As sequências de bases de *HindIII* e *EcoRI* têm caudas complementares?

g) Deixe de lado o fragmento de *HindIII* e pegue a extremidade final do fragmento de DNA da tira 1 (cortada com *EcoRI*). Compare as caudas de fita simples do fragmento de *EcoRI* da tira 1 e do fragmento de *EcoRI* da tira 4. Escreva as sequências de bases das caudas de fita simples e identifique as extremidades 5' e 3'. Elas são complementares?

h) Imagine que você cortou um fragmento de DNA completamente desconhecido com *EcoRI*. Você acha que as caudas de fita simples desses fragmentos poderiam ser complementares às caudas de fita simples dos fragmentos da tira 1 e da tira 4?

i) Uma enzima chamada **DNA ligase** refaz as ligações fosfodiéster e entre nucleotídeos. Para a DNA ligase agir, dois nucleotídeos precisam aproximar-se na orientação apropriada para a ligação

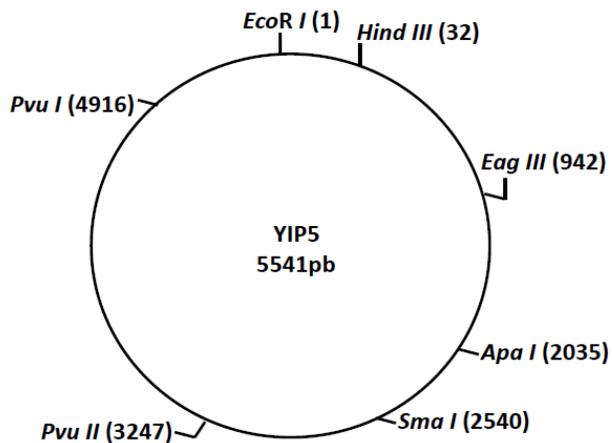
(a extremidade 5' deve estar próxima à extremidade 3' do outro). Você acha que seria mais fácil para a DNA ligase religar dois fragmentos cortados por *EcoRI* ou um fragmento cortado por *EcoRI* e outro cortado por *HindIII*? Justifique sua resposta.



II) Cortando um plasmídeo:

A figura abaixo mostra o mapa de restrição do plasmídeo circular YIP5. Esse plasmídeo contém 5.541 pares de bases. Existe um sítio para *EcoRI* no par de base 1. A localização dos outros sítios de restrição é mostrada no mapa. Os números após os nomes das enzimas indicam em qual par de base

aquela enzima cliva o DNA. Se você digerir o YIP5 com *EcoRI*, você obterá um fragmento de DNA linear de 5.541 pares de bases de comprimento.



Responda:

- Quais seriam os produtos de uma digestão com as enzimas *EcoRI* e *EagIII*?
- Quais seriam os produtos de uma digestão com as enzimas *HindIII* e *ApaI*?
- Quais seriam os produtos de uma digestão com as enzimas *HindIII*, *ApaI* e *PvuI*?
- Se você digerir os produtos da digestão da **questão a** com *PvuII*, que produtos serão obtidos?

ATIVIDADE III: ELETROFORESE - MIGRAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE

I) Leitura Básica

Quando uma digestão com enzimas de restrição é realizada, o DNA e a enzima são colocados em um pequeno tubo com tampão adequado. Para verificar se a digestão aconteceu é necessário avaliar os tamanhos dos fragmentos de DNA produzidos. No laboratório, utiliza-se um processo chamado de **eletroforese em gel** para separar os fragmentos de DNA de modo que eles possam ver os resultados da digestão.

Na eletroforese em gel, as moléculas de DNA são colocadas em um campo elétrico (que tem um polo positivo e um polo negativo) e a eletroforese em gel tira proveito de uma característica química do DNA, para separar seus fragmentos. Os grupos fosfato do esqueleto de DNA são carregados negativamente, desta forma as moléculas de DNA são fortemente atraídas pelo polo positivo fazendo a separação dos fragmentos que serão separados mais tarde.

O gel assemelha-se a gelatina e, vários materiais gelatinosos podem ser usados para a separação de DNA. Um material gelatinoso frequentemente utilizado para a eletroforese de DNA é chamado de *agarose*. Para fazer um gel de DNA a agarose é dissolvida em água fervente, e a mistura é colocada para esfriar em um suporte ate ficar rígido.

Como normalmente pretende-se aplicar o DNA nos géis de agarose, os cientistas criaram um separador de amostras (*penete*), que é colocado na agarose líquida após ela ter sido vertida no suporte adequado. A agarose resfria geleifica com esse pente. Mais tarde ,quando o pente for tirado, há a formação de uma série orifícios onde a amostra é aplicada (**figura 1**).

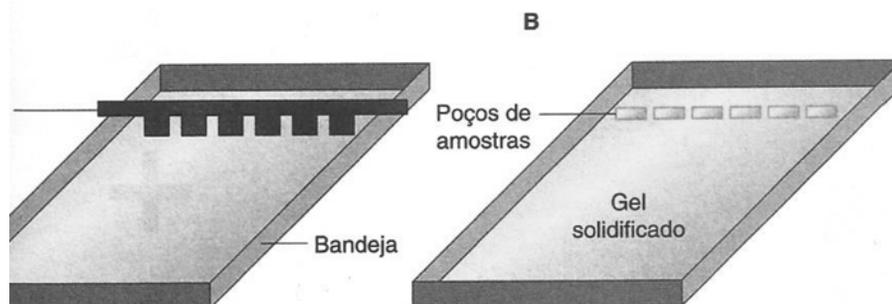


Figura 1: Fazendo um gel de agarose. A solução de agarose é vertida em um molde onde o pente é colocado no lugar adequado. Depois que a agarose esfria, o pente é removido, deixando poços onde as amostras são aplicadas para a eletroforese.

O gel solidificado é então colocado em uma cuba com tampão e a corrente elétrica é aplicada entre as duas extremidades da cuba para que as moléculas de DNA comecem a migrar, através da malha do gel, para o polo positivo do campo elétrico (**figura 2**).



Figura 2: Cuba de Eletroforese horizontal. O gel é colocado em uma cuba com solução salina e uma corrente elétrica é aplicada. O DNA migra para o polo positivo.

Todos os DNAs migram para o polo positivo através do gel, mas as moléculas de DNA maiores movem-se com mais dificuldade do que as menores. Assim, em um mesmo intervalo de tempo, quanto menor a molécula, mais rápido ela corre.

Após um certo tempo, a corrente elétrica é desligada e o gel é colocado em uma solução corante de DNA. Após corado, o DNA pode ser visualizado. Observa-se então uma série de bandas no gel. Cada banda separada é composta por um tamanho de moléculas de DNA. Há milhões de moléculas em uma banda, mas elas são todas do mesmo tamanho.

Após a digestão do DNA com enzimas de restrição deve existir uma banda no gel para cada tamanho diferente de fragmento produzido pela digestão. O fragmento menor será o que migrou para mais longe do poço da amostra e o maior, o que ficou mais perto (**figura 3**).

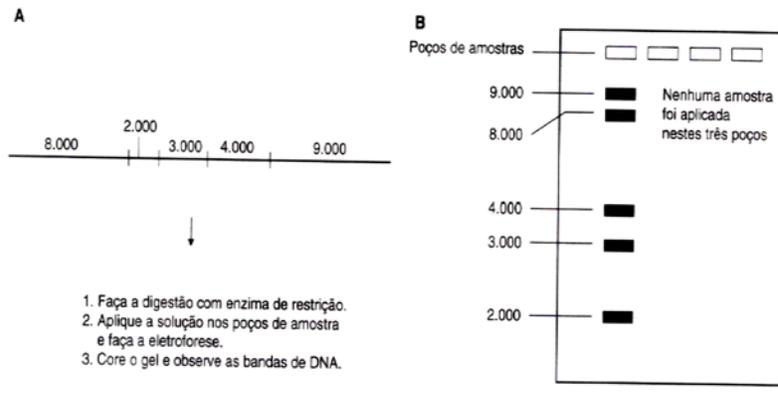


Figura 3: Eletroforese de produtos de digestão com enzima de restrição. O gel de eletroforese é usado para separar produtos da digestão por enzimas de restrição. (A) Mapa de restrição com os tamanhos dos fragmentos em pares de bases. (B) Resultado do gel após eletroforese.

II) Mapas de Restrição e eletroforese em Gel de agarose: Migração de fragmentos de DNA

Nesta atividade, você tem a representação de uma molécula de DNA com os sítios de clivagem por três enzimas de restrição e um esquema para representar os fragmentos obtidos após separação por eletroforese. Sua tarefa consiste em simular a digestão deste DNA com cada uma das três enzimas e a separação dos fragmentos por eletroforese.

Abaixo estão três representações de uma molécula de DNA de 15.000 pares de base. Cada representação mostra a localização de diferentes de sítios de restrição, com as linhas verticais representando os sítios de clivagem. Os números entre os sítios de clivagem correspondem ao tamanho (em pares de bases) dos fragmentos gerados pela digestão do DNA pela aquela enzima.

Sítios de *EcoRI*

4.000	3.500	2.500	5.000
-------	-------	-------	-------

Sítios de *BamHI*

6.000	4.000	3.000	2.000
-------	-------	-------	-------

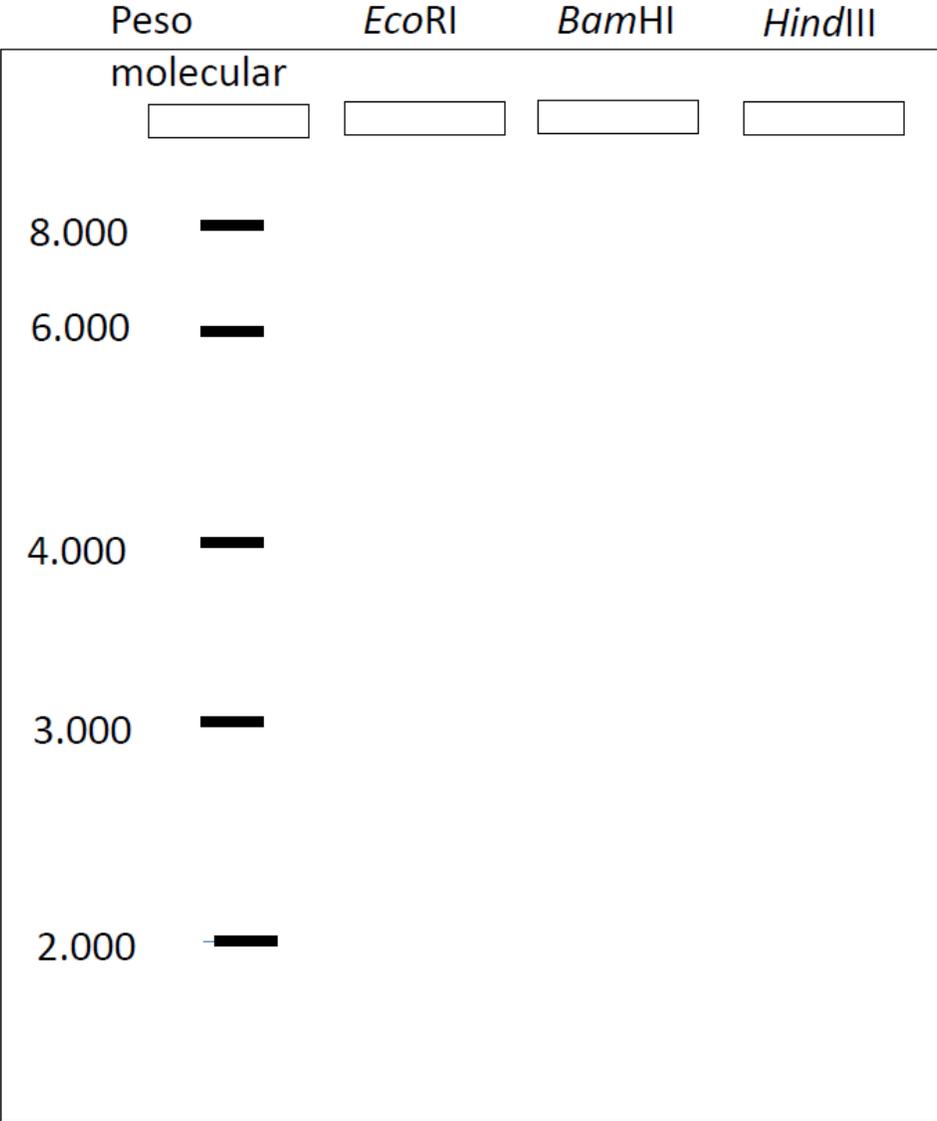
Sítios de *HindIII*

8.000	4.500	2.500
-------	-------	-------

1. Recorte as três figuras da molécula de DNA e simule a atividade das enzimas de restrição. Empilhe cada digestão em uma pilha separada.
2. No modelo de gel de eletroforese, você separará os fragmentos gerados por cada enzima como se tivesse aplicando os produtos das digestões nos poços.
3. Observe a representação do gel de eletroforese fornecido. Note que há uma escala de tamanho, em pares de base, no lado esquerdo, e que os poços de amostra para cada digestão estão indicados. Usando o esquema e a escala de tamanho como referência desenhe o resultado.

Analisando o resultado:

- a) Você notou que o padrão de peso molecular não parece ter intervalos regulares entre as bandas?
- b) Faça um gráfico, no excel, relacionando a distância percorrida pelos fragmentos do peso molecular e o seu tamanho.
- c) Aplique a análise de regressão que melhor se adapte aos seus pontos no gráfico .
- d) Aponte os tamanhos, máximo e mínimo, que este gel representado no modelo consegue separar.



PRÁTICA I - VISUALIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 0,8%

A integridade do DNA obtido após extração pode ser avaliada por eletroforese, quanto maior o rastro na eletroforese, mais fragmentada ela se apresenta. Já a intensidade das bandas pode ser usada para estimar a quantidade de amostra. Entretanto, para que essas análises sejam feitas o DNA precisa ser corado. Historicamente, o brometo de etídio, um intercalante de DNA, foi usado para este fim. Após coloração a fluorescência emitida pela amostra o DNA é visualizada utilizando um transiluminador com luz ultravioleta.

Gel de Agarose 0,8 %

0,8 g de agarose
100 ml de TBE
5 µL de brometo de etídio a 10 mg/mL

TBE 5X

54 g de Tris base
27.5 g de ácido bórico
20 mL de 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Amostras de DNA

- 1- Padrão de peso molecular
- 2- Amostras de DNA 1, 2 e 3

Loading buffer

Substância [Inicial]	Quantidade	[Final]
EDTA pH 8,0 [1 mM]	1 mL	
Azul de bromofenol	25 mg	0,25%
Xilenocianol	25 mg	0,25%
Glicerol [87%]	4 mL	30 %
H2O	qsp 10 mL	

Agitar no vórtex; esterilizar por filtração com filtro millipore e armazenar em eppendorf a -20 °C.

PRÁTICA II – EXTRAÇÃO DO DNA DE FRUTAS

OBJETIVO:

Isolar DNA de frutas.

1. INTRODUÇÃO

Nos organismos eucariontes e procariontes a informação genética está localizada nas moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA), que são polímeros de nucleotídeos, nos quais o açúcar é a desoxirribose. O DNA está localizado principalmente no núcleo dos eucariontes, associado com proteínas (principalmente histonas) e dentro de organelas como mitocôndrias e cloroplastos.

Os métodos utilizados para a detecção e dosagem do DNA celular implicam no rompimento das membranas citoplasmática e nuclear. Neste experimento, o rompimento das membranas plasmática e nuclear será realizado com o tratamento do detergente aniônico duodecil sulfato de sódio (SDS). Os tratamentos com detergentes, iônicos ou não, são largamente utilizados na solubilização de proteínas e lipídeos de membrana. Nestes processos de solubilização por detergentes, são formadas micelas, que consistem de proteínas, lipídios e detergente. O tratamento das células com uma concentração relativamente alta de SDS resulta no rompimento das membranas celulares com a consequente liberação das nucleoproteínas. A atividade da enzima digestiva (DNAase) será inibida pela ação do EDTA em meio alcalino - que altera pH e quelar os íons bivalentes necessários à ação da DNAase. A adição de etanol sobre a fase aquosa, contendo os ácidos nucleicos dissolvidos, resultará na precipitação destes, uma vez que o etanol diminui a constante dielétrica da água, promovendo uma menor solubilização das moléculas de DNA. Nas técnicas de biologia molecular, o DNA deve estar livre de proteínas, para isto, estas devem ser extraídas. Normalmente, esse procedimento é realizado utilizando-se uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico, que desnatura as proteínas e, após centrifugação, estas são retiradas da solução de DNA.

2. MATERIAL

• **Frutas:** mamão, kiwi, tomate, banana ou acerola.

• **Solução salina-EDTA:**

NaCl 0,15 M

EDTA 0,1 m (pH=8,0).

• **SDS** 2% (p/v).

• Etanol absoluto.

• **Solução tris-EDTA (TE)**

10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA - pH 7,5.

OBS:

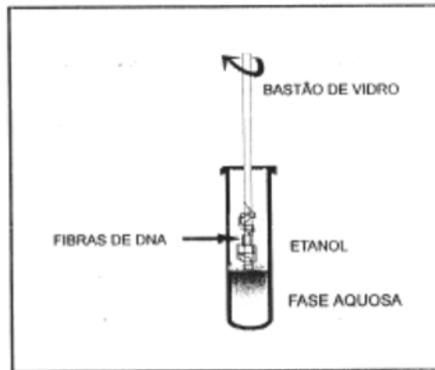
*esta solução mantém a força iônica, dissolvendo o DNA, além de quelar íons bivalentes, necessários para a ação da DNase.

3. PROCEDIMENTOS

EXTRAÇÃO DO DNA :

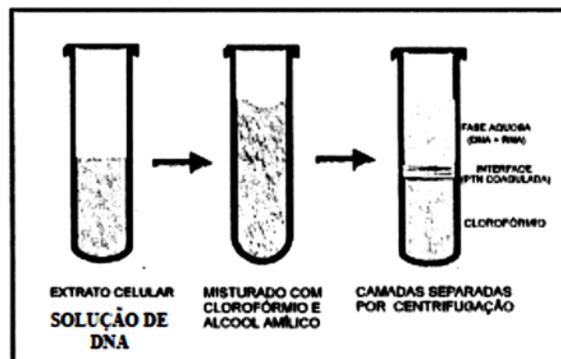
Cortar 10 g de uma fruta; colocar a fruta picada dentro de um saco zip, macerar e adicionar 20 mL de solução salina EDTA; adicionar 10 ml de SDS 2%; macerar; filtrar a solução por uma gaze; colocar 4 mL do filtrado em um tubo de vidro; adicionar lentamente com pipeta pela parede do tubo 4 ml de etanol, de modo que os dois líquidos não se misturem. Notar que na interface, forma-se um material insolúvel filamentososo, o DNA.

Introduzir um bastão até a região de interface. Imprimir-lhe um movimento circular e verificar que o material filamentososo irá aderir ao mesmo. Retirar o bastão e dissolver o precipitado a ele aderido em 2 mL da solução de Tris-EDTA.



DESPROTEINIZAÇÃO :

Após a dissolução do DNA, adicione igual volume (2 mL) da mistura de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (V/V), e agite vigorosamente por 30 minutos. Centrifugue a emulsão resultante a 3000 rpm durante 10 minutos. A emulsão será separada em 3 camadas. A camada superior (aquosa) contém os dois tipos de ácidos nucleicos (DNA e RNA) que devem ser coletados para posterior precipitação e utilização.



Questões para discussão:

- 1 - Qual a função da solução de SDS?
- 2 - Qual a função da extração com fenol clorofórmio?
- 3 - Ao romper a célula e, também, suas organelas, pela técnica descrita acima, o DNA não seria degradado por enzimas lisossomais?

ATIVIDADE IV - CONSTRUINDO PLASMÍDEOS RECOMBINANTES EM PAPEL

I) Perguntas a serem respondidas:

- 1) Em seus experimentos você deseja remover um fragmento de 1500 pares de bases de *EcoRI* do plasmídeo ilustrado na **figura 1**, e substituir pelo fragmento de 1500pb **figura 2**. No procedimento você precisa digerir o plasmídeo com enzima *EcoRI* e, ao terminar a digestão, faz a ligação com o fragmento.

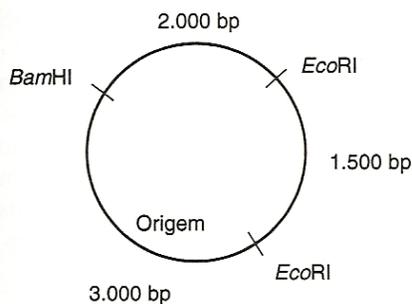


Figura 1: Plasmídeo

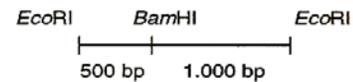


Figura 2: Fragmento de *EcoRI* a ser inserido

- a) Ilustre o DNA recombinante obtido após finalizar o procedimento que possua origem de replicação e seja menor que 7000pb. Identifique os produtos como A, B, C, etc., e indique os sítios de restrição.
- b) Faça um estudo de análise de restrição que lhe permita identificar o máximo de produtos possíveis após uma única digestão, incluindo seus respectivos tamanhos. Você pode usar mais de uma enzima de restrição na digestão.
- c) A partir da dos produtos formados nos itens a e b, utilize o gel representado na figura 3 para ilustrar os padrões esperados após eletroforese. Identifique as bandas com os tamanhos dos fragmentos distinguindo os diferentes produtos, utilize como referência a escala fornecida no gel.

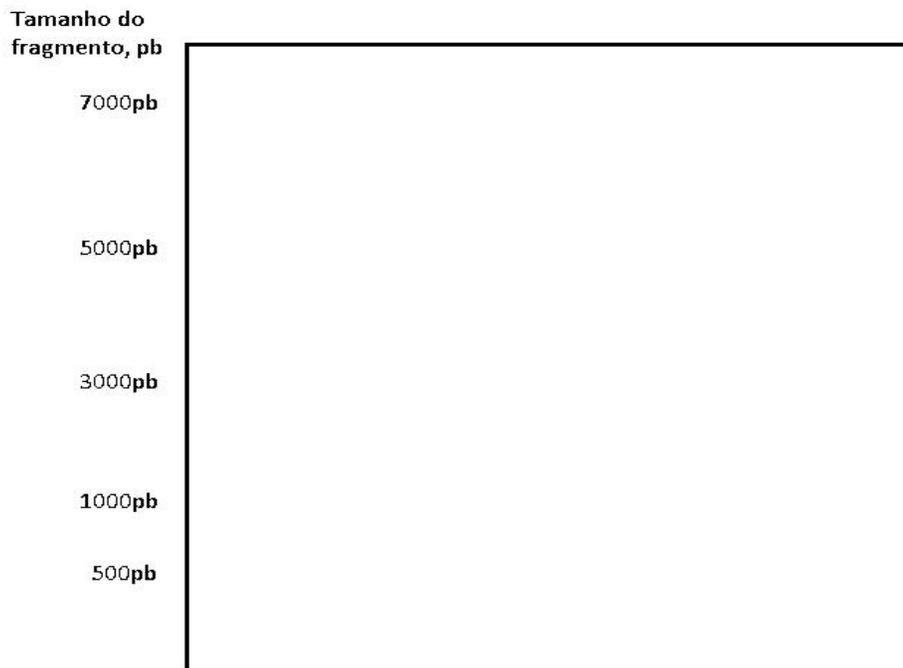


Figura 3: Esquema de gel de agarose para esboço da eletroforese.

- 2) Quando os cientistas estudavam um novo fragmento de DNA, uma das primeiras análises realizadas era um mapa de restrição desse fragmento. O mapa de restrição é então usado como guia no estudo dos genes codificados por esse DNA. Mas como é construído um mapa de restrição? São feitas digestões com uma única enzima e com combinações de enzimas. Observando os tamanhos dos fragmentos produzidos, os cientistas determinam as localizações dos sítios de restrição que forneceriam os padrões que eles observaram.

Para aprender como é feito um mapa de restrição use o exercício a seguir:

Um pedaço de DNA linear foi digerido com endonuclease de restrição *EcoRI*, originando fragmentos de 3000, 3600 e 3400pb. Quando digerido com *BamHI*, são originados fragmentos de 4500, 3000 e 2500pb. Uma dupla digestão com *EcoRI* e *BamHI* origina fragmentos de 2500, 500, 3600, 3000 e 400pb.

Com base nessas informações, desenhe o mapa de restrição do fragmento inicial de DNA, mostrando a localização dos sítios de restrição de *EcoRI* ou *BamHI*. Indique também a distância de cada extremidade do fragmento inicial ao sítio de restrição mais próximo.

Se o DNA que você analisou fosse circular, seriam obtidos os mesmos fragmentos?

II) Construção de plasmídeos pAMP e pKAN de papel

Nesse exercício construiremos um plasmídeo de papel utilizando tesoura e fita adesiva que simularão a atividade das enzimas de restrição e da ligase.

Passo 1: Recorte as tiras dos modelos de plasmídeo de papel (figuras 2 e 3) e a seguir, cole como pedido até que complete o modelo do plasmídeo circular pAMP. Faça o mesmo procedimento com o pKAN;

Passo 2: Usando tesouras, que imitam a ação de enzimas de restrição, recorte o pAMP e o pKAN com duas enzimas a *Bam*HI e a *Hind*III. Os sítios de restrição são: *Bam*HI: 5' G/GATCC 3' e *Hind*III: 5' A/AGCTT 3' , identifique-os e corte com a tesoura;

Passo 3: Junte os fragmentos contendo os genes que conferem resistência a ampicilina e canamicina e em seguida use a ligase (fita adesiva), formando o plasmídeo recombinante.

Após realizar a construção do plasmídeo responda as perguntas abaixo:

- a) Após gerar os 4 fragmentos acima com a ação das enzimas de restrição, se você usar dois fragmentos de cada vez, quantas combinações diferentes poderiam ser formadas? Quantos desses poderiam ser detectados em colônias transformadas em meio contendo antibiótico?
- b) Suponha que você tenha realizado o experimento de forma real. Descreva o procedimento experimental obter a bactéria transformada pelo pAmp/pKan. Inclua controles que indiquem se as bactérias estão vivas e se os antibióticos são efetivos.
- c) Com relação ao item b, descreva um procedimento experimental para encontrar a bactéria que foi transformada por outras moléculas de DNA que se formaram durante o processo de ligação (você descreveu essas moléculas no item a).
- d) Os cientistas frequentemente combinam um gene que conferem resistência a antibiótico com o gene que estejam tentando clonar em um vetor. O gene desejado pode ser associado a um gene de resistência a antibiótico embora não se interessem pela proteína que confere resistência ao antibiótico. Por que os cientistas combinam os genes deste modo?

[1] Gene de resistência à Ampicilina		cole 2
5'	AATTGGATGAATTCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGAATTCTGAAGGTTCGAAGCGCTAT	
3'	TTAAGCTACTTAAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTTAAGACTTCCAAGCTTCGCGATA	
[2]		cole 3
5'	GTCCGGATCCAGATCCGAAGTCTCTCTAGGACCTTGCGAAGCCACGTAGTTCAGATTAATGCCTGAT	
3'	CAGCCTAGGTCTAGGCTTCAGAGAGATCCTGGAACGCTTCGGTGCATCAAGTCTAATTACGGACTA	
[3] Origem de replicação		cole 1
5'	CGCTACAAGCTTATAGCGGCCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXAATATTGCGCAGTCTTAGCACTCC	
3'	GCGATGTTCGAATATCGCCGGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTTATAACGCGTCAGAATCGTGAGG	

Figura 2: Modelo de plasmídeo de papel pAMP

[1] Origem de replicação		cole 2
5'	TACTCGATGAAATCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXAGCTATGTTCTGAAGGATCCATATAGCGC	
3'	ATGAGCTACTTTAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTCGATACAAGACTTCTTAGGTATATCGCG	
[2] Gene de resistência à Canamicina		cole 3
5'	ATGACCGTCAGATCCGATGCTTCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTCGAACGTACGGTCCGA	
3'	TACTGGCAGTCTAGGCTACGAAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXAGCTTGCATGCCAGGCT	
[3]		cole 1
5'	GATCACATGCTTATAAATATTGCGAAGCTTCAGTCAGCGCGTAGCACTCCTTAACGCGATGCATTAA	
3'	CTAGTGACGAATTTATAACGCTTCGAAGTCAGTCGCGCATCGTGAGGAATTGCGCTACGTAATT	

Figura 3: Modelo de plasmídeo de papel pKAN

REFERÊNCIAS:

Engenharia Genética e Biotecnologia, Kreuzer, Helen Massey, Artmed, 2ª Edição, 2002.

Molecular Cloning: Laboratory Manual, 4th Edition, Michael R. Green, Joseph Sambrook, Cold Spring Harbor, 2012.

Gene Cloning And Dna Analysis An Introduction, T.A. Brown, 6th edition, Blackwell Publishing, 2010.