

BIOTECNOLOGIA

Prof. Kennedy Ramos

UNIDADE 03: Extração de DNA, PCR, Sequenciamento

Extração de DNA em Vegetais

O DNA é um ácido nucleico presente em quase todas as células dos organismos vivos, além de ser responsável por carregar toda a informação genética das espécies. Logo abaixo temos uma extração de DNA de lentilha, mas se excluirmos o liquidificador pela laceração manual poderia ser feito com cebola, morango, banana e até DNA humano.



1. Manda ver e bata tudo no liquidificador:
1/2 xícara de lentilhas
1/8 de colher de chá de sal
1 copo de água gelada



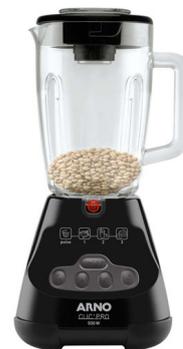
+



+



2. Use um coador para eliminar os pedaços maiores. Adicione 2 colheres de detergente (uns 30 mLs) e mexa com uma colher. Deixe quieto por uns 5 minutos. Transfira o “caldo” para um tudo de vidro encha menos que a metade do tubo (um copo de coquetel fino e pequeno funciona).



+



3. Para diregir as proteínas, coloque um pouco de suco de abacaxi (uns 2 mL). Se não tiver serve de contato. Mexa com um canudo devagar para não quebrar o DNA.



4. Com o tubo inclinado, adicione o mesmo volume de álcool, vagarosamente, pela parede do tubo. O álcool é menos denso que a água e deve flutuar por cima do “caldo”.



5. O DNA é uma molécula longa. O sal que você adicionou no primeiro passo auxilia as fitas a grudarem, umas nas outras, formando essa “coisa” branca e viscosa que você observa quando em contato com o sal e álcool precipita. Você consegue isolar o DNA enrolado esse precipitado num palito.

1. Qual a função do Sal?

A função do sal proporcionou o DNA um ambiente favorável, pois o sal contribuiu com os íons positivos que neutralizaram a carga negativa do DNA, para que assim as numerosas células de DNA pudessem coexistir na solução, através da precipitação das proteínas.

2. Qual a função do Detergente?

O detergente irá lisar as membranas, visto que estas são constituídas de lipídios, estes são insolúveis em água, mas são solúveis em detergente. Com a ruptura dessa membrana o conteúdo celular, incluindo as proteínas e o DNA, soltou-se e dispensou-se na solução.

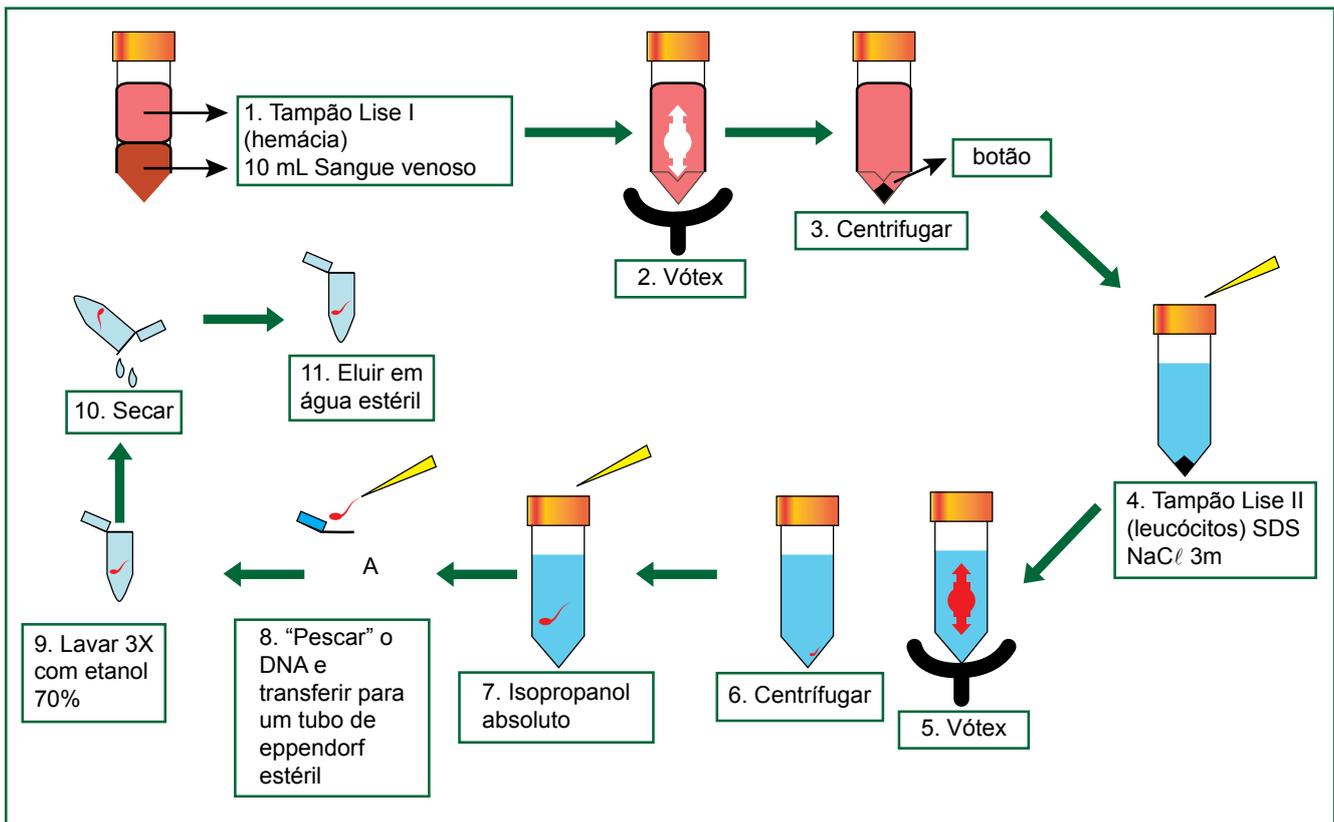
3. Qual a função do Álcool?

Como o DNA é insolúvel em álcool, esta forma uma aglomeração de moléculas, portanto o álcool permite o isolamento do DNA.

DNA Humano em Laboratório

O DNA extraído da amostra a ser analisada, quer seja sangue (Leucócitos), células ou tecido. A extração e a purificação do DNA de uma dada amostra podem ser feitas por métodos laboratoriais caseiros ou por kits comerciais.

A extração do DNA genômico do sangue total periférico, conhecida como salting-out, é técnica simples. Fonte: Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. An. Bras. Dermatol. vol.83, n.3, pp.187-203.



É proibida a reprodução, total ou parcial, deste material

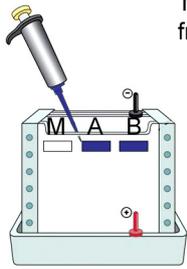
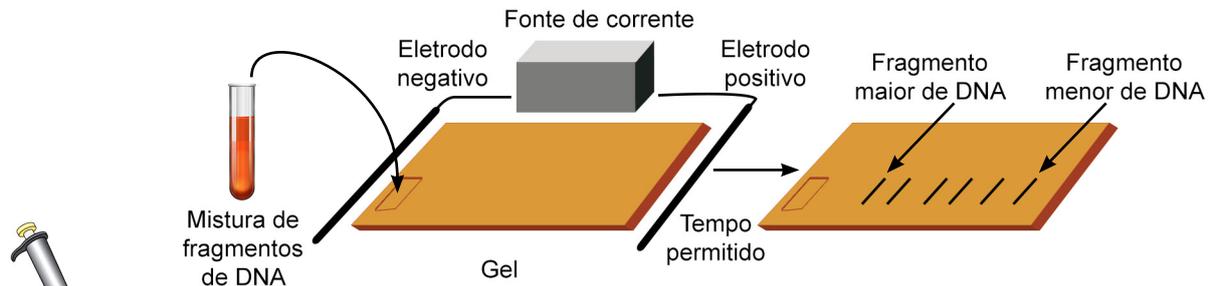
Eletroforese

A técnica de separação dos fragmentos de DNA mais utilizada é a eletroforese através de géis de agarose. A agarose é um polissacarídeo (como ágar e pectina) que dissolve em água fervente e então gelifica quando esfria como a gelatina.

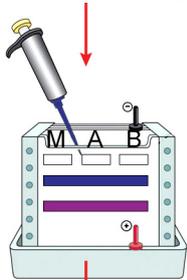
Para realizar uma eletroforese, um gel de agarose é preparado, o DNA é introduzido em pequenos poços de gel, e então uma corrente elétrica é aplicada através do gel. Como o DNA é negativamente carregado, ele é atraído pelo eletrodo positivo.

Entretanto, para chegar ao eletrodo positivo, o DNA deve migrar através do gel de agarose. Os fragmentos de DNA menores podem migrar através de um gel de agarose mais rapidamente que os fragmentos de DNA maiores.

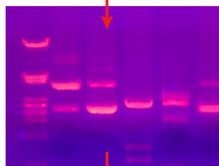
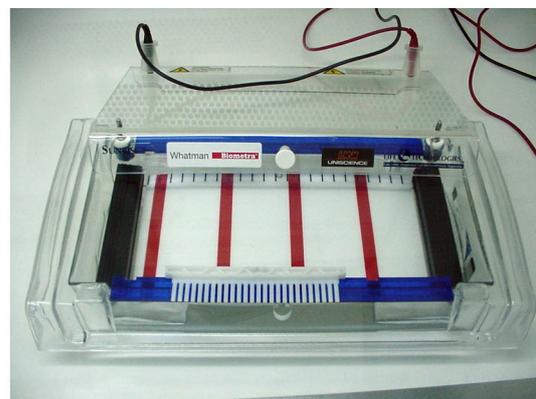
A velocidade de migração de fragmentos de DNA lineares através da agarose é inversamente proporcional a \log_{10} de seus pesos moleculares. É possível calcular o tamanho exato de um dado fragmento com base na sua razão de migração. Após a eletroforese em gel, os fragmentos de DNA normalmente são corados com brometo de etídeo ou outras substâncias, que possui afinidade pelo DNA e fluoresce (torna-se visível) vivamente em contato com a luz ultravioleta ou Luz azul. Dessa forma pode-se localizar as bandas que correspondem ao DNA. Os fragmentos de DNA podem, então, ser isolados e purificados a partir dos géis de agarose.



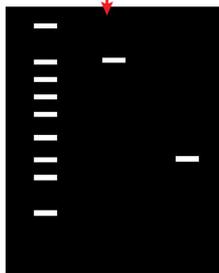
I. Aplicação das amostras no gel de agarose



II. Aspecto do gel no final da eletroforese



III. Visualização das bandas no transmutador (luz UV)



IV. Fotografia

M. Marcador de pesos moleculares
A e B. Amostras de DNA



É proibida a reprodução, total ou parcial, deste material

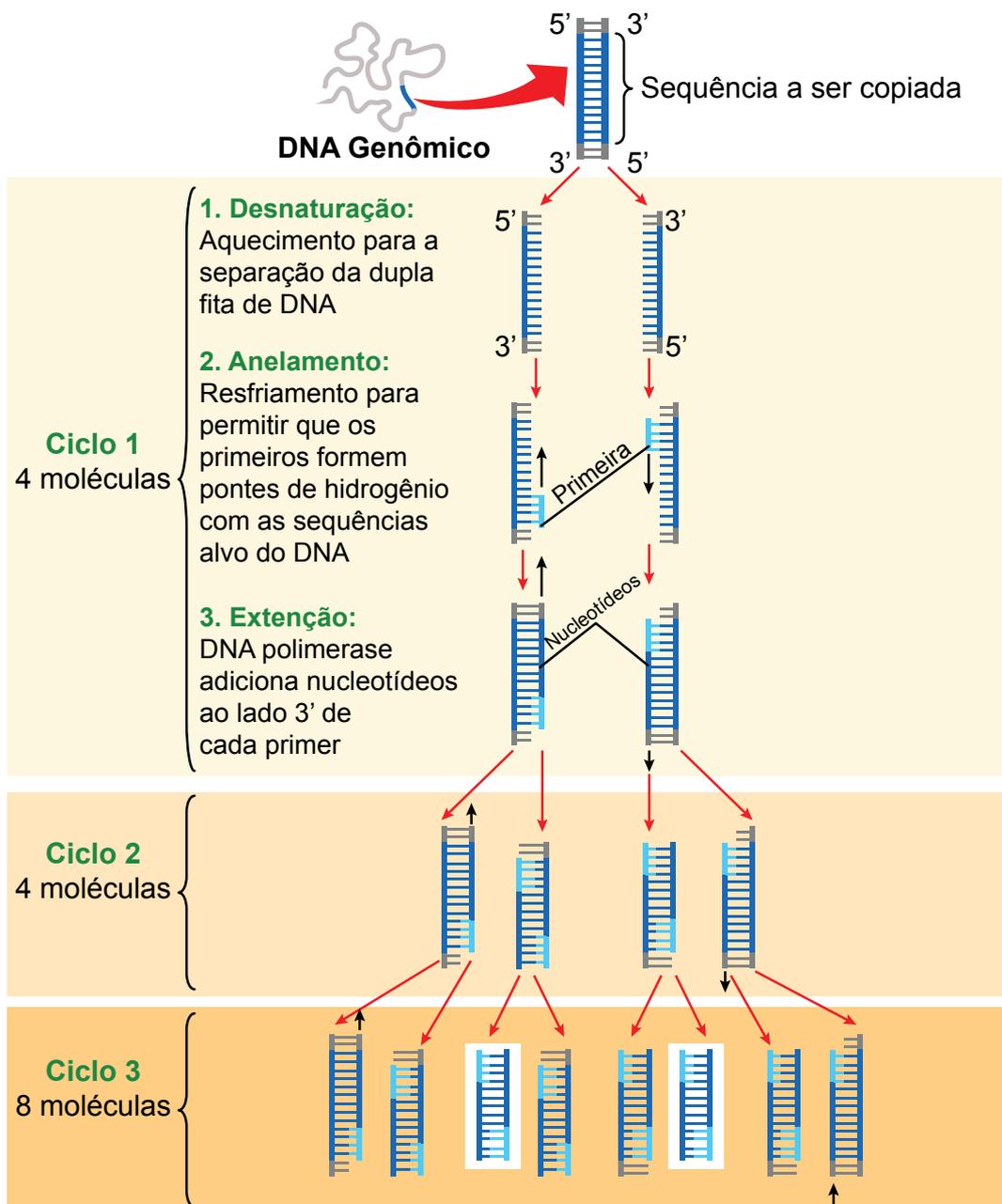
Reação de cadeia da polimerase (PCR)

O objetivo principal da PCR é a replicação do DNA em trechos específicos, geralmente quando não possuímos grande quantidade de DNA, logo ela amplifica a quantidade de DNA para ser estudado. Para a replicação vamos precisar de:

- **DNA polimerase (Taq):** A enzima Taq. suporta grandes temperaturas e não desnatura facilmente. Sua função é inserir nucleotídeos nas fitas de DNA.
- **Primer:** É um segmento curto de RNA que é inserido no local onde será iniciada a replicação. Com primer's específicos podemos replicar um segmento específico do DNA.
- **Desoxirribonucleotídeos:** São nucleotídeos que formam o DNA (dbATP, dbTTP, dbCTP e dbGtP).
- **Máquina de PCR:** Ela realiza a clicagem de temperaturas para a replicação.

Passos da PCR:

1. A amostra de DNA, a enzima que faz a replicação (DNA polimerase), os nucleotídeos de DNA e os primers complementares a sequência de DNA são colocados em um tubo de ensaio.
2. Coloca-se o tubo de ensaio em uma máquina de PCR (máquina que aumenta e diminui a temperatura de acordo com um programa). Os passos seguintes, de aquecimento e resfriamento, acontecem dentro da máquina controlados pelo programa.
3. Aquece-se o tubo a 94°C para desnaturar (separar a dupla fita) o DNA.
4. Cada fita simples do DNA que foi desnaturado serve de molde para a síntese de novas cadeia complementares. Para isso resfria-se a 54°C onde os primers se anelam ao início das duas fitas simples, servindo de iniciadores para a enzima polimerase.
5. Aquece-se novamente o tubo a 72°C (temperatura ideal de funcionamento da DNA polimerase) para a duplicação da fita. A DNA polimerase inicia, após o final do primer, a colocar os nucleotídeos livres na fita de DNA ligando-os por complementaridade, formando assim uma nova fita dupla.

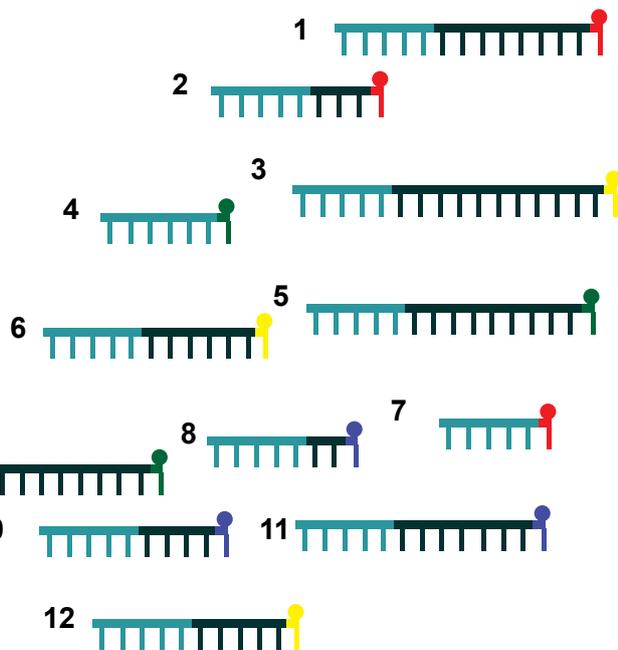
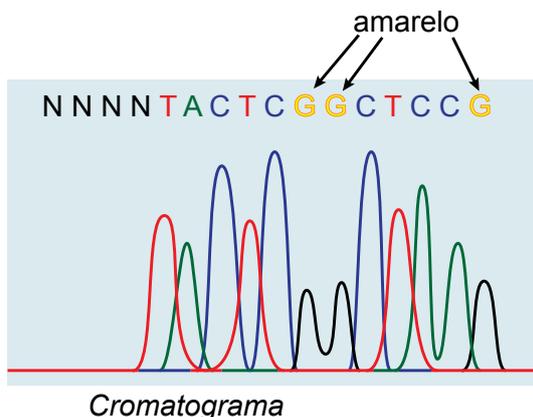


Sequenciamento de DNA O sequenciamento do DNA é uma série de processos bioquímicos tem por finalidade determinar a ordem dos nucleotídeos (adenina, guanina, citosina e timina) em uma amostra de DNA. Até meados da década de 70 era muito complicado obter uma sequência de DNA, independente de ser fita simples ou fita dupla.

No começo da década de 80, foi desenvolvida uma técnica rápida de sequenciamento, por meio da quebra de uma cadeia de DNA por diversos produtos químicos, sendo os fragmentos visualizados através do processo de eletroforese. Era necessário marcar as moléculas com radiação, devido à baixa produção de material, não podendo ser detectada de outra maneira.

Poucos anos após houve um novo avanço tecnológico foi conseguido por meio da introdução da técnica de interrupção da sequência através da incorporação ao acaso de um nucleotídeo modificado, sendo chamada de técnica de didesoxi ou dideoxi. Essa técnica, de imediato, tomou o lugar da anterior, possibilitando o desenvolvimento de sequenciadores automáticos de DNA. O sequenciamento manual ainda existe, mas é muito mais trabalhoso, caro e arriscado, pois utilizam-se substâncias radioativas.

O cromatograma da figura abaixo foi obtido a partir da análise dos fragmentos de DNA ao lado, quando estes passaram por um sensor capaz de detectar cores diferentes.



ATIVIDADES PROPOSTAS



01.(Upe) O exemplo mostrado no texto a seguir revela o potencial que as ferramentas usadas em genética podem ter para inibir a exploração e o comércio de produtos e espécimes da fauna, auxiliando na conservação das espécies ameaçadas. Um dos casos mais interessantes da genética molecular forense envolveu o comércio ilegal de carne de baleias no Japão e Coreia. A pedido do Earthrust, Baker e Palumbi (1996) desenvolveram um sistema para monitorar esse comércio, utilizando sequências de DNAm e PCR, que distinguiam, com confiança, uma variedade de espécies de baleias umas das outras e de golfinhos. As análises revelaram que parte das amostras obtidas em mercados varejistas não era de baleias Minke, nas quais o Japão caçava para “fins científicos”, mas sim de baleias Azuis, Jubartes, Fin e de Bryde, as quais são protegidas por lei. Além disso, parte da “carne de baleia” era na realidade de golfinhos, botos, ovelhas e cavalos. Assim, além da ilegalidade da caça das ba-

leias, os consumidores estavam sendo ludibriados. Leia as proposições abaixo sobre a reação em cadeia da polimerase (PCR):

- I. Antes da PCR, para se detectarem genes ou VNTRs (número variável de repetições em sequência), havia a obrigação de se ter grande quantidade de DNA alvo.
- II. Pela PCR, promove-se a deleção de trechos do DNA in vivo, usando polimerases de DNA.
- III. A técnica da PCR permitiu a obtenção de grandes quantidades de fragmentos específicos do DNA por meio da amplificação em ciclos.
- IV. O DNA a ser amplificado não pode ser submetido a temperaturas altas, acima de 40°C, sob pena de desnaturar e não mais renaturar.

Apenas é correto afirmar o que está contido nas proposição:

- a) I e II.
- b) I e III.
- c) II e III.
- d) II e IV.
- e) III e IV.



02. (Ufes) "O genoma humano foi mapeado e sua sequência estabelecida pela primeira vez na história da humanidade, anunciaram ontem o presidente norte-americano, Bill Clinton, o primeiro ministro britânico, Tony Blair, e os representantes dos grupos rivais, o consórcio público internacional Projeto Genoma Humano (PGH) e a empresa norte-americana Celera."

"Folha Ciência", São Paulo - 27/6/2000.

Leia as proposições a seguir sobre o Projeto Genoma Humano.

I. O sequenciamento do genoma humano possibilitará a identificação dos genes envolvidos em doenças e a criação de novas abordagens preventivas ou de tratamentos mais rápidos e eficazes.

II. O genoma humano pode ser sequenciado a partir de qualquer célula do corpo, com exceção das hemácias.

III. O sequenciamento do genoma humano determinou a posição exata e a função de cada gene, possibilitando a melhor compreensão dos diferentes fenótipos.

IV. O sequenciamento do genoma de outras espécies, como o das bactérias ('Xylela fastidiosa'), dos camundongos e ratos, é de grande auxílio para o Projeto Genoma Humano.

Considerando as proposições anteriores, pode-se afirmar que estão CORRETAS

- a) apenas I e II.
- b) apenas II e III.
- c) apenas I, III e IV.
- d) apenas I, II e IV.
- e) todas as proposições.



03. (Ufrgs) O que se imaginava impossível acabou acontecendo antes do prazo previsto: após a elucidação da sequência de DNA de vários organismos, no ano 2000, foi anunciado o sequenciamento do genoma humano.

Com relação à organização genômica, considere as seguintes afirmações.

- I. O genoma humano contém uma grande percentagem de sequências de DNA que não codificam genes. Por isso, quando o sequenciamento é realizado a partir de RNA mensageiro, identifica-se mais facilmente um gene.
- II. O genoma humano tem organização diferente da organização do genoma da bactéria

'Xyllela fastidiosa', causadora da praga do amarelinho nos laranjais, recentemente sequestrado no Brasil.

III. A expressão dos genes humanos depende da presença, ou ausência, de cada gene no DNA de células diferenciadas.

Quais estão corretas?

- a) Apenas I.
- b) Apenas II.
- c) Apenas I e II.
- d) Apenas II e III.
- e) I, II e III.



04. (Ufrgs) No início da década de 1950, foi desenvolvido um experimento onde um dos componentes de um tipo de bacteriófago foi marcado radiativamente com enxofre e outro, com fósforo. Esses bacteriófagos foram utilizados para infectar uma cultura de 'Escherichia coli'. Um dos componentes entrou na bactéria, e o outro foi retirado da parede da mesma, por agitação. A cultura foi, então, imediatamente, centrifugada.

O resultado obtido encontrase ilustrado no esquema a seguir.



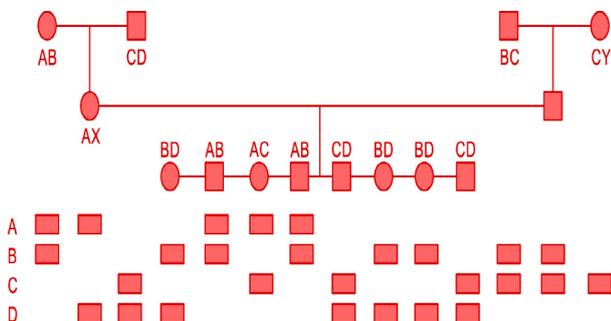
depósito bacteriano

Sobre o resultado do experimento, é correto afirmar que:

- a) o DNA do bacteriófago marcado com fósforo encontrase no depósito bacteriano.
- b) as proteínas do bacteriófago marcadas com enxofre encontram-se no depósito bacteriano.
- c) o DNA do bacteriófago marcado com enxofre encontrase em suspensão.
- d) as proteínas do bacteriófago marcadas com fósforo encontram-se em suspensão.
- e) o DNA do bacteriófago marcado com enxofre encontrase no depósito bacteriano.



05. (Ucs) Analise o heredograma e a análise genética abaixo. Se estiverem presentes quatro alelos em um dado locus denominados “A”, “B”, “C”, “D”, inicialmente, com os avós, pode-se traçar a herança de cada alelo pelos genitores até os netos.



Sobre o heredograma, conclui-se que

- a) os quatro avós são heterozigotos.
- b) os pais, uma vez que são heterozigotos para alelos diferentes, terão todos os filhos heterozigotos.
- c) o alelo representado pelo X é o alelo C.
- d) o alelo representado pelo Y é o alelo D.
- e) o heredograma representa uma situação de codominância.



ATIVIDADES ENEM



06. (MODELO ENEM)O DNA (ácido desoxirribonucleico), material genético de seres vivos, é uma molécula de fita dupla, que pode ser extraída de forma caseira a partir de frutas, como morango ou banana amassados, com uso de detergente, de sal de cozinha, de álcool comercial e de uma peneira ou de um coador de papel.

O papel do detergente nessa extração de DNA é:

- a) aglomerar o DNA em solução para que se torne visível.
- b) promover lise mecânica do tecido para obtenção do DNA.
- c) emulsificar a mistura para promover a precipitação do DNA.
- d) promover atividades enzimáticas para acelerar a extração do DNA.
- e) romper as membranas celulares para liberação do DNA em solução.



07. (MODELO ENEM) “Após o anúncio histórico da criação de vida artificial no laboratório do geneticista Craig Venter, o mesmo responsável pela decodificação do genoma humano em 2001, o presidente dos EUA, Barack Obama, pediu a seus conselheiros especializados em biotecnologia para analisarem as consequências e as implicações da nova técnica.” A experiência de Venter ainda não explica como a vida começou, mas reforça novamente que, sob determinadas condições, fragmentos químicos são unidos para formar a principal molécula responsável pelo código genético da vida.

Para a síntese de uma molécula de DNA em laboratório, a partir de uma fita molde de DNA, além do primer, deve-se utilizar:

- a) nucleotídeos de Timina, Citosina, Guanina e Adenina; DNA e RNA polimerase.
- b) nucleotídeos de Timina, Citosina, Guanina e Uracila; e DNA polimerase.
- c) nucleotídeos de Timina, Citosina, Guanina e Adenina; e DNA polimerase.
- d) nucleotídeos de Timina, Citosina, Guanina e Uracila; e RNA polimerase.
- e) nucleotídeos de Timina, Citosina, Guanina, Uracila e Adenina; e DNA polimerase.



08. A descoberta de um fóssil de bebê mamute, extremamente bem preservado nas estepes congeladas da Rússia, oferece aos pesquisadores melhor oportunidade de obter o genoma de uma espécie extinta. A técnica de PCR vem sendo utilizada para a amplificação do DNA nestes estudos.

Para a realização desta técnica, deve-se empregar além do DNA extraído do mamute usado, como molde, as seguintes moléculas.

- a) nucleotídeos de Uracila, Citosina, Guanina, Adenina, DNA polimerase e primers de DNA
- b) nucleotídeos de Timina, Citosina, Guanina, Adenina, DNA polimerase e primers de DNA
- c) nucleotídeos de Uracila, Citosina, Guanina, Adenina, RNA polimerase e primers de DNA
- d) nucleotídeos de Timina, Citosina, Guanina, Adenina, RNA polimerase e primers de DNA.
- e) nucleotídeos de Timina, Citosina, Guanina, Adenina, RNA polimerase e DNA polimerase.



09. (MODELO ENEM) Células microbianas, plantas e animais são usados na produção de materiais úteis às pessoas, tais como alimentos, remédios e produtos químicos. A respeito do DNA recombinante e da biotecnologia, pode-se inferir que.

- uma cópia de DNA pode ser feita a partir de rRNA, constituindo uma biblioteca de DNA. Após a extração do rRNA de um tecido, este é misturado com a enzima transcriptase reversa, um pequeno primer de oligo dT é adicionado e hibridiza-se com a cauda poli A, para a síntese do cDNA, pela transcriptase, em seguida o rRNA é removido, deixando a fita única de cDNA.
- alguns fragmentos de DNA, gerados por clivagem com o uso das enzimas de restrição, podem ser separados com a técnica de eletroforese em gel e suas frequências identificadas por sonda de DNA, pela técnica de hibridização molecular.
- os cromossomos humanos, na construção de uma biblioteca gênica, são quebrados em fragmentos de DNA e inseridos em bactérias, que os replicam sem a necessidade de vetores construídos por fragmentos de cromossomos e plasmídeos.
- as endonucleases de restrição são usadas na clivagem do DNA em sequências específicas e são produzidas por vírus em defesas de invasões de DNA, por meio das quais as referidas endonucleases, sem alterar o seu DNA, produzem as enzimas que catalisam a clivagem de moléculas de DNA de dupla hélice.
- a produção comercial do hormônio do crescimento humano é um exemplo de expressão de genes em camundongo, desde que o gene de interesse possa ser expresso durante a transcrição.



10. (MODELO ENEM) Há 60 anos, Watson e Crick publicaram um artigo sobre a estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA). Leia, a seguir, trechos traduzidos e adaptados da publicação original.

(Fonte: Watson, J. D. e Crick, FHC – 1953. Molecular Structure of Nucleia Acid. Nature v. 171, n. 4356, p.737- 738).

Uma estrutura para o ácido nucleico foi proposta anteriormente por Pauling e Corey (1953), na qual o modelo consiste de três cadeias entrelaçadas com os fosfatos próximos do eixo do filamento e as bases localizadas na parte externa....Fraser também apresenta um modelo de estrutura com três cadeias. Nesse modelo, os fosfatos estão na parte externa, e as bases, na interna, unidas por ligações de hidrogênio (...) Propomos uma estrutura radicalmente diferente para o sal de ácido desoxirribonucleico.

Essa estrutura tem duas cadeias helicoidais, cada uma delas enrolada em torno do mesmo eixo (...)

Foi observado experimentalmente, por Chargaff e Wyatt (1952), que a razão entre as quantidades de adenina e timina e a razão entre guanina e citosina são sempre muito próximas da unidade para o DNA (...) Os dados de raios-X sobre o DNA, publicados por Atsbury (1974), Wilkins e Randal (1953), são insuficientes, mas compatíveis com os dados experimentais de helicoidização da molécula (...) Não escapou à nossa observação que o emparelhamento específico que postulamos sugere imediatamente um possível mecanismo de cópia para o material genético. (...)

Sobre a estrutura do DNA e com base no texto, pode-se inferir que:

- A exemplo do modelo de Pauling e Corey, o modelo de Watson e Crick também apresenta fosfatos próximos do eixo do filamento e as bases localizadas na parte externa.
- No modelo de Fraser, as bases estão ligadas por hidrogênio, enquanto no de Watson e Crick, isso é feito por meio de pontes de sulfeto.
- Utilizando a informação de Chargaff e Wyatt, Watson e Crick concluíram: a sequência de bases em uma única cadeia sofre restrições, ou seja, uma cadeia será rica em purinas, e a complementar, rica em pirimidinas.
- O emparelhamento específico dos nucleotídeos foi a grande novidade na proposta de Watson e Crick, os quais se utilizaram dos dados de Atsbury, Wilkins e Randal para elaborar essa informação.
- Quando pares específicos de bases são formados, a sequência de bases de uma cadeia determina a sequência da cadeia complementar, servindo de molde para a cópia do material genético.



GABARITOS

QUESTÃO 01: Gabarito: [B]

QUESTÃO 02: Gabarito: [D]

QUESTÃO 03: Gabarito: [C]

Questão 04: Gabarito: [A]

Questão 05: Gabarito: [B]

Comentário: A leitura da impressão digital do DNA dos pais mostra que, na mãe, X corresponde ao alelo D e o pai apresenta os alelos B e C.

Dessa forma, sendo ambos heterozigotos (AD e BC), só poderão ter filhos heterozigotos (AB, AC, BD e CD).

Questão 06: Gabarito: [E]

Comentário: A extração do DNA das células eucarióticas é feita com o uso de detergentes, sais e alcoóis, pois essas substâncias rompem as membranas lipoproteicas que armazenam e protegem os cromossomos.

Questão 07: Gabarito: [C]

Comentário: A síntese do DNA em laboratório exige, no mínimo, nucleotídeos de timina, citosina, guanina e adenina, além da enzima DNA-polimerase que catalisa a união dos nucleotídeos para a formação do polinucleotídeo de DNA.

Questão 08: Gabarito: [B]

Questão 09: Gabarito:[B]

Comentário: O DNA recombinante é obtido pela clivagem de trechos de DNA de organismos distintos, com a utilização de enzimas de restrição e posterior união por meio da enzima DNA ligase. Os fragmentos do DNA clivado são separados por eletroforese em gel e suas frequências são determinadas pela hibridização com sondas de DNA.

Questão 10: Gabarito: [E]

Comentário: O pareamento específico das bases nitrogenadas do DNA determina a formação de cópias idênticas dos genes, isto é, a base adenina (A) sempre pareia com timina (T) e a base guanina (G) pareia com citosina (C).

REFERENCIAL TEÓRICO

GRIFFITHS, A.J.F. et al. Introdução à Genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 9ª ed., 2010.

SNUSTAD, D.P. e SIMMONS, M.J. Fundamentos de genética. 2º ed. Rio de Janeiro: guanabara Kogan, 200.

GARDNER, E. J. e SNUSTAD, D.P. Genética. 7º ed. Rio de Janeiro: guanabara Kogan, 1986

BURNS, G. W. e BOTTINA, P. J. Genética 6º ed. Rio de Janeiro: guanabara Kogan,

STANFIELD, W. D. Genética 2º ed. Editora Mc Graw - Hill.

JUNIOR, C.S.; SASSON, S.; JUNIOR, N.C. Biologia VOL 1 – 9º Ed. São Paulo, Saraiva, 2010.

JUNIOR, C.S.; SASSON, S.; JUNIOR, N.C. Biologia VOL 2 – 9º Ed. São Paulo, Saraiva, 2010

LOPES, S.; ROSSO, S.; BIO volume 2. 1. Ed. São Paulo: Saraiva, 2010.

AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R.; Biologia volume 1: Biologia das Células 2. Ed. São Paulo: Moderna, 2004.

AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R.; Biologia volume 1: Biologia das Células 2. Ed. São Paulo: Moderna, 2010.

AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R.; Biologia volume 2: Biologia dos Organismos 3. Ed. São Paulo: Moderna, 2004.

AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R.; Biologia volume 2: Biologia dos Organismos 3. Ed. São Paulo: Moderna, 2010.

LINHARES, S.; GEWANDSZNAJDER, F.; Biologia, volume único 1. Ed. São Paulo: Ática, 2011.

DOS SANTOS, F.S.; VICENTIN, J.B; DE OLIVEIRA, M.M.A. Ser Protagonista- Biologia (ensino médio) – Vol 2. 1º edição, São Paulo, Edições SM, 2010.