Genética NA ESCOLA
01.02, 55-62 (2006)
www.sgb.org.br

DNA RECOMBINANTE

Octavio Henrique de O. Pavan
Laboratório de Difusão Científica & Cultural
Departamento de Genética e Evolução – Instituto de Biologia – UNICAMP
Campinas, SP - ohpavan@unicamp.br

Resumo

Este protocolo de aula prática visa facilitar o entendimento de um dos princípios básicos da manipulação do DNA. Trata-se de um conjunto de duas práticas extremamente simples que podem ser entendidas por alunos do ensino fundamental e que ajudam o estudante de Genética Molecular a visualizar os processos envolvidos na manipulação gênica.

I . CORTANDO O DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Introdução

A construção de moléculas de DNA recombinante, ou seja, a ligação de segmentos específicos de moléculas de DNA de origens diferentes, é uma técnica que pôde ser desenvolvida graças à descoberta das enzimas de restrição ou endonucleases.

- O que são essas enzimas?

As enzimas de restrição foram descobertas e isoladas de inúmeras espécies de bactérias as quais têm a função de protegê-las de infecções virais. Os vírus bacterianos, ou fagos, ao invadirem o interior da bactéria, têm seu DNA cortado em sítios específicos, causando assim a restrição de seu ciclo de replicação que levaria à lise ou destruição da bactéria.

- Como funcionam as enzimas de restrição?

As enzimas de restrição são proteínas que têm a capacidade de reconhecer, na dupla hélice do DNA, sítios de clivagem, ou seja, seqüências específicas de 4 ou 6 bases. Uma vez reconhecido, é realizado um corte específico em cada ponto ou sítio em que as moléculas da enzima se ligam.

Esses sítios, além de estarem presentes no vírus, também existem no DNA de todos os outros organismos, inclusive na própria bactéria que produz a enzima. Para evitar que seu próprio DNA seja cortado e, portanto, tornado inativo na bactéria, esses sítios de restrição aparecem ligados a uma molécula do grupo metil (CH_3) o que impede a ação da enzima.

Uma das características mais importantes dessas enzimas é a sua especificidade, ou seja, uma mesma molécula de DNA submetida à ação de uma enzima é sempre cortada nos mesmos pontos e gera um conjunto de fragmentos de mesmo tamanho. Essa característica permite uma análise relativamente grosseira, porém bastante efetiva do ponto de vista prático na identificação de diferentes moléculas de DNA, permitindo o diagnóstico de organismos contendo pequenas alterações nas bases do material genético. É óbvio que, quaisquer duas moléculas de DNA de mesmo tamanho, contendo os mesmos sítios de restrição nas mesmas posições, resultam em conjuntos de fragmentos de tamanho idêntico. Da mesma forma, porém, quaisquer alterações no DNA fora dos sítios digeridos pela enzima não são detectadas por esse método. Como esses sítios são relativamente raros (em geral bem menos de 1 por 1000 pares de bases - pb), moléculas diferentes podem apresentar o mesmo padrão de fragmentos ao serem cortadas com enzimas.

Como identificar os fragmentos cortados?

A separação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos pode ser feita através de um processo relativamente simples e rápido, a eletroforese em gel de agarose. Este gel representa, na verdade, uma “peneira”

ou matriz capaz de retardar diferencialmente o movimento de moléculas de tamanhos variados. A molécula de DNA, devido à presença do ácido fosfórico, apresenta carga negativa, de modo que, quando submetida a um campo elétrico, em pH neutro, é atraída para o pólo positivo. A primeira etapa do processo da eletroforese consiste em se colocar numa cavidade ou poço, em uma das extremidades do gel, uma solução contendo a molécula do DNA cortado. Em seguida, deve-se fazer uma corrente elétrica passar pelo gel colocando o pólo positivo (ânodo) na extremidade oposta. Desta forma, após algum tempo, encontram-se, a partir do ponto de aplicação, as moléculas distribuídas em ordem decrescente de tamanho.

Para a visualização, o DNA é corado com um reagente fluorescente que se intercala na molécula, o brometo de etídio. Os fragmentos podem ser, então, observados sob luz ultravioleta (UV).

Atividade

Esta atividade pretende ilustrar e simular os processos envolvidos na digestão da molécula de DNA por enzimas de restrição e a posterior análise dos fragmentos.

Na Figura 1 são representadas três cópias (I, II e III) de uma seqüência hipotética de uma molécula de DNA contendo 90 pares de bases. Dentro desta seqüência encontram-se sítios de restrição de, pelo menos, duas enzimas.

1. Corte na linha superior e inferior de cada cópia da seqüência de modo a obter três fitas de papel contendo as duas cadeias da molécula em cada fita.

2. Identifique e marque nas seqüências o sítio de restrição das duas enzimas:

*Eco*RI : **g.aattc**

*Pst*I : **ctgca.g**

Marque os sítios nas duas cadeias lembrando que elas são antiparalelas, portanto tendo a seqüência em direções opostas.

3. Com uma tesoura contendo a etiqueta *Eco*RI e outra *Pst*I (representando a enzima) corte o sítio como se fosse a enzima:

Cópia I - *Eco*RI: **...g aattc...**
...cttaa g...

Cópia II- *Pst*I: **...ctgca g...**
...g acgtc...

Cópia III - *Eco*RI + *Pst*I

4. As Figuras 2 e 3 representam géis de agarose onde o cátodo está representado na parte superior e o anôdo na parte inferior da folha. Desta forma, o sentido de corrida do DNA seria de cima para baixo da folha, e as moléculas mais longas ficariam mais próximas do cátodo (-), e as menores, mais próximas do ânodo (+). Os fragmentos obtidos de uma digestão por enzimas de restrição são designados por letras e em ordem decrescente de tamanho. Por exemplo, no caso mostrado, têm-se os fragmentos *Eco*RI-A (maior) e *Eco*RI-B (menor).

5. Para representar o resultado dessa corrida, cole, na Figura 2, os fragmentos resultantes dos cortes com *Eco*RI no gel nº 1 e, *Pst*I, no gel nº 2, nos locais indicados acima das linhas.

Na Figura 3 cole os fragmentos resultantes da dupla digestão no gel nº 3.

O resultado obtido é uma representação do perfil de restrição da molécula analisada. Este perfil pode caracterizar uma molécula ou um indivíduo.

6. Essa simulação ilustra como o DNA pode ser analisado. A digestão dupla evidencia a posição do sítio *Pst*I dentro do fragmento *Eco*RI-A. O resultado final é que se obtem, além do fragmento *Eco*RI-B, dois fragmentos resultantes da quebra de *Eco*RI-A. Este tipo de análise permite a construção dos chamados mapas de restrição. A prática permite visualizar o processo com muita facilidade.

II. CONSTRUINDO UMA MOLÉCULA DE DNA RECOMBINANTE

Introdução

Na prática anterior, um dos aspectos interessantes da ação de algumas endonucleases, como *Eco*RI e *Pst*I, é que o sítio de restrição é composto por uma seqüência com simetria rotacional dupla, ou seja, ele apresenta a mesma leitura nos dois sentidos da cadeia. O corte, como visto nessas duas enzimas (nem todas têm essa característica) resulta em duas "caudas" de fita simples complementares. Estas caudas, chamadas "de pontas aderentes" ou "coesivas", têm a capacidade de se ligar naturalmente a qualquer molécula cortada com a mesma enzima.

A conseqüência importante desse fenômeno é que, não importando a origem do DNA, moléculas cortadas com a mesma enzima têm a mesma chance de se ligar à sua própria molécula como à outra molécula presente. Assim, podem-se clivar (ou cortar) moléculas de DNA de duas espécies diferentes com uma mesma enzima e, colocando simplesmente as duas preparações no mesmo tubo, obter-se parte (50%) das moléculas resultantes na forma híbrida, ou seja, na forma de DNA recombinante. Uma outra enzima encontrada nas células, a DNA ligase, completa a ligação de forma estável, restabelecendo a molécula de fita dupla.

Um outro importante instrumento da técnica de DNA recombinante é uma molécula também encontrada em bactérias, o plasmídeo. Trata-se de uma molécula de DNA circular que contém genes não essenciais para a bactéria. Três características são importantes nestas moléculas:

- têm ciclo de replicação autônomo, podendo se replicar várias vezes sem que ocorra a divisão da bactéria.

- são capazes de passar de uma bactéria para outra naturalmente.

- são portadores de genes que conferem resistência a vários tipos de antibióticos.

Graças a estas características pode-se construir, por exemplo, um plasmídeo contendo um gene humano por meio do corte das duas moléculas com uma mesma endonuclease de restrição. Este plasmídeo é inserido numa bactéria e é capaz de se replicar, replicando junto o gene de interesse numa escala muito maior do que aquela que seria possível no organismo original.

Estes plasmídeos representam veículos de transporte do DNA desejado para dentro da bactéria e são chamados "vetores". Cada bactéria pode produzir até 500 cópias de um plasmídeo e, num litro de cultura de bactéria, pode-se multiplicar, em questão de poucos dias, 250 trilhões de vetores contendo o mesmo número de cópias do gene. Estes genes podem se expressar e sintetizar a proteína na bactéria hospedeira do vetor.

Esta possibilidade tornou-se uma nova fronteira tecnológica. Esta metodologia pode ser utilizada desde a produção de insulina humana e hormônio de crescimento até a terapia gênica, numa gama de processos, nunca antes imaginada, de ficção científica transformada em realidade.

Atividade

Para uma compreensão clara das bases do processo, esta atividade propõe a simulação deste mecanismo de construção de um vetor representado por um plasmídeo bacteriano contendo um gene humano que codifica a insulina.

1. Na Figura 4, o plasmídeo pBR 322 está representado por uma seqüência de pontos indicando as bases do DNA. Com uma tesoura, corte a fita rente aos asteriscos de modo que se tenha uma fita de papel contendo duas colunas de pontos delimitados por duas colunas de asteriscos.

2. O plasmídeo é uma molécula circular, assim, deixe, numa das pontas da fita a parte em branco do papel e cole no verso desta. O resultado é um círculo com a seqüência de bases representada por pontos. Dentro dela a representação da seqüência do sítio PstI.

3. Corte, da mesma maneira, a fita representando o fragmento do genoma humano. Corte rente às duas linhas externas, mantendo-as na fita, já que elas identificam a seqüência do gene humano e a diferenciam da seqüência do plasmídeo com a borda de asteriscos (além da cor vermelha). Tem-se então, temos uma seqüência que contém no seu interior uma região que corresponde ao gene da insulina. Este gene encontra-se cercado por outras bases diversas, mas, de cada um dos lados, encontram-se duas seqüências específicas que representam sítios da enzima *Pst*I.

4. Utilize uma tesoura contendo uma etiqueta "*Pst*I -ctgca/g" e simule a digestão das duas moléculas de DNA cortando como indicado:

.....ctgca g.....
.....g acgtc.....

5. Verifique, em seguida, se o gene da insulina encontra-se isolado com pontas adesivas livres e o círculo do plasmídeo encontra-se aberto com pontas adesivas idênticas e igualmente livres. Coloque as duas fitas próximas (como estariam em solução, dentro de um tubo) e verifique se o pareamento destas pontas é possível. Ao colocá-las pareadas, forma-se um círculo maior do que aquele plasmídeo original que nesta situação, contém DNA do plasmídeo (asteriscos) e o DNA humano (linha contínua e vermelha).

6. Adicione ao seu "tubo" a enzima ligase representada por dois pedaços pequenos de fita adesiva e cole a cadeia no sítio *Pst*I, reparando a molécula cortada. Tem-se um plasmídeo composto por DNA recombinante bacteriano e humano, capaz de ser inserido numa bactéria para sintetizar insulina.

Bibliografia

- Farah, S.B. 1997. **DNA Segredos & Mistérios**. Ed. Sarvier. p. 276.

-Griffits A.J.F., Miler J.H., Suzuki, D.T., Lewontin R.C, Gelbart W.M. 1996. **Introdução a Genética**. 6ª edição. W.H. Freeman and Company, NY.p.916.

Figura 1. Corte com *Eco*RI (g.aattc) e *Pst*I (ctgca.g)

I. Cortar com *Eco*RI

atgcctgccgtgcacctgactcctgag**gaattc**gagaag**ctgcag**tctgccgttactgccgtgtggggcaaggtggtgaacgtggatgaa

tacggacggcacgtggactgaggactc**cttaag**ctcttc**gacgtc**agacggcaatgacggcacaccccgttccaccacttgcacctactt

II. Cortar com *Pst*I

atgcctgccgtgcacctgactcctgag**gaattc**gagaag**ctgcag**tctgccgttactgccgtgtggggcaaggtggtgaacgtggatgaa

tacggacggcacgtggactgaggactc**cttaag**ctcttc**gacgtc**agacggcaatgacggcacaccccgttccaccacttgcacctactt

III. Cortar com *Eco*RI e *Pst*I (dupla digestão)

atgcctgccgtgcacctgactcctgag**gaattc**gagaag**ctgcag**tctgccgttactgccgtgtggggcaaggtggtgaacgtggatgaa

tacggacggcacgtggactgaggactc**cttaag**ctcttc**gacgtc**agacggcaatgacggcacaccccgttccaccacttgcacctactt

Figura 2. Fragmentos A & B de *Eco*RI e *Pst*I

.....

*Eco*RI - Gel nº 1

(-) cátodo

cole o fragmento de restrição aqui

_____ **A**

cole o fragmento de restrição aqui

_____ B

(+)ânodo

.....

.....

*Pst*I - Gel nº 2

(-) cátodo

cole o fragmento de restrição aqui

_____ **A**

cole o fragmento de restrição aqui

_____ B

(+)ânodo

.....

Figura 3. Fragmentos da digestão dupla com *Eco*RI e *Pst*I.

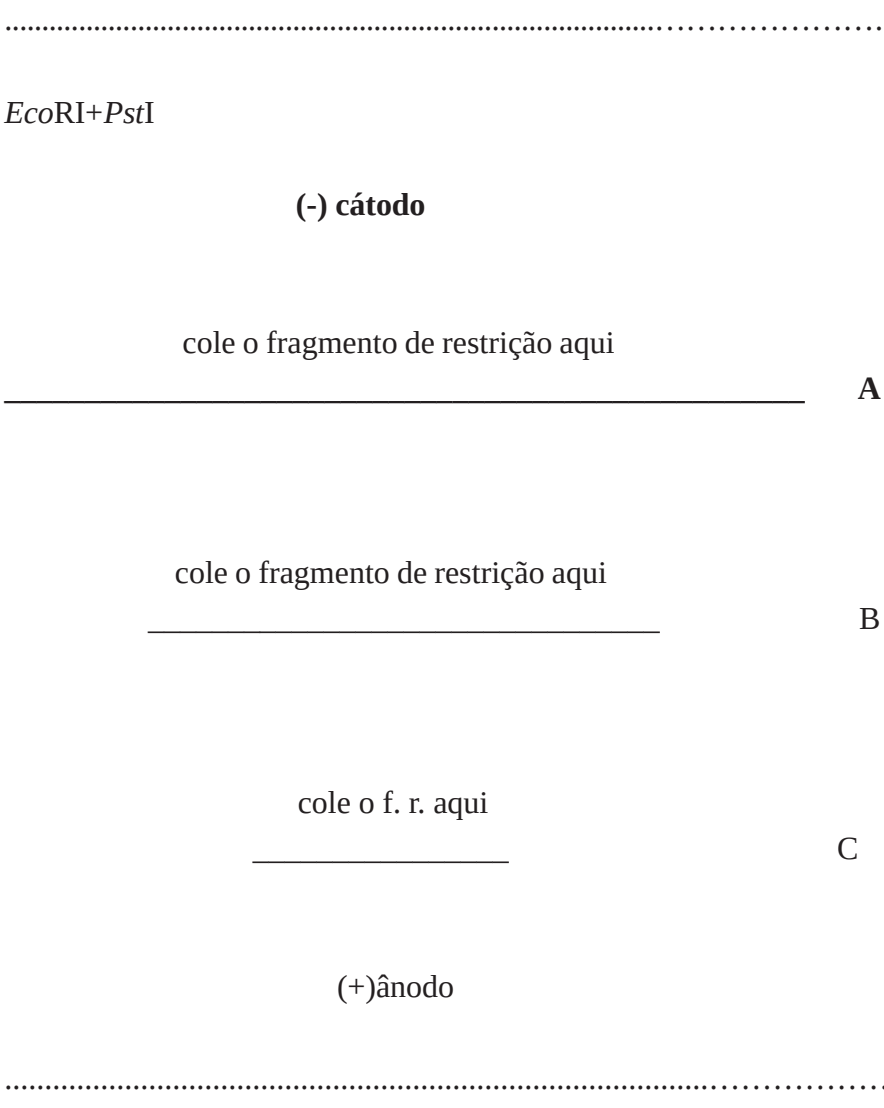
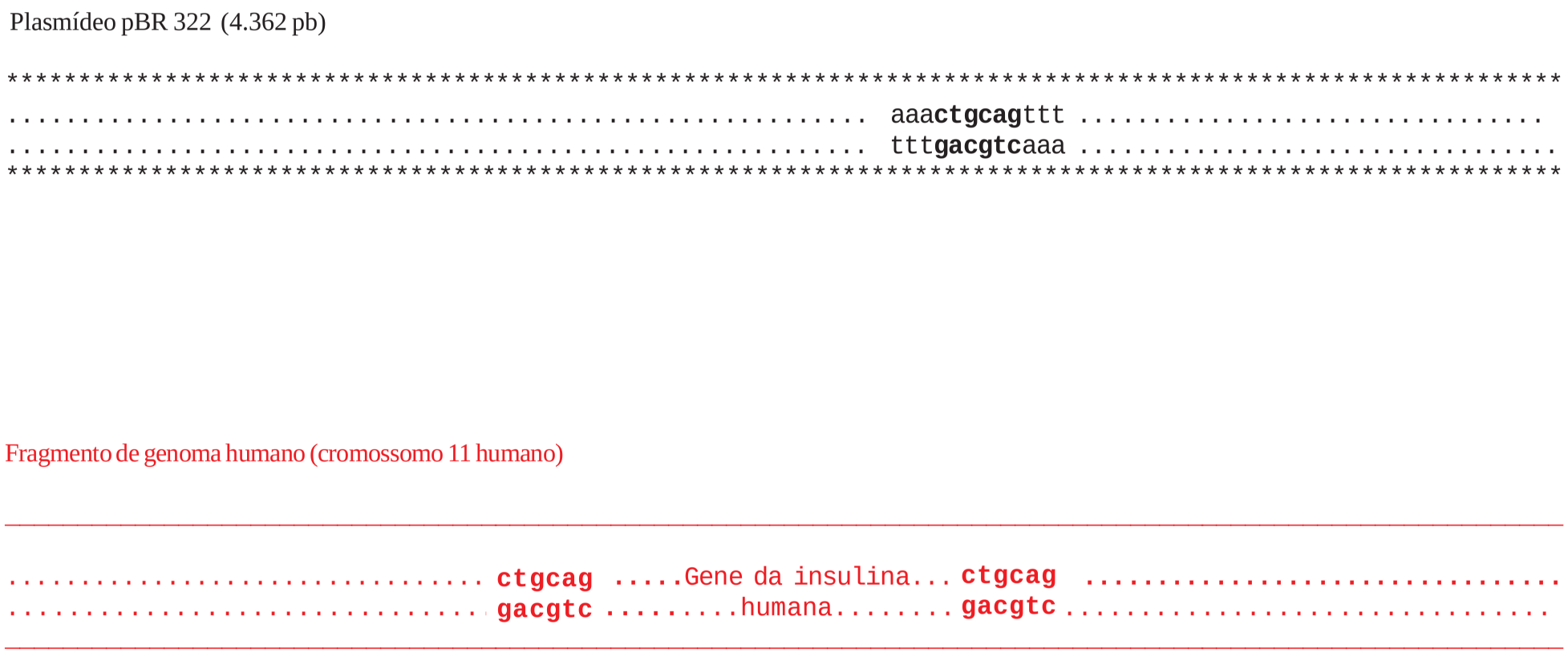
Figura 4. Construindo uma molécula de DNA recombinante. Cortar as fitas e cortar com *Pst*I (vide texto).