

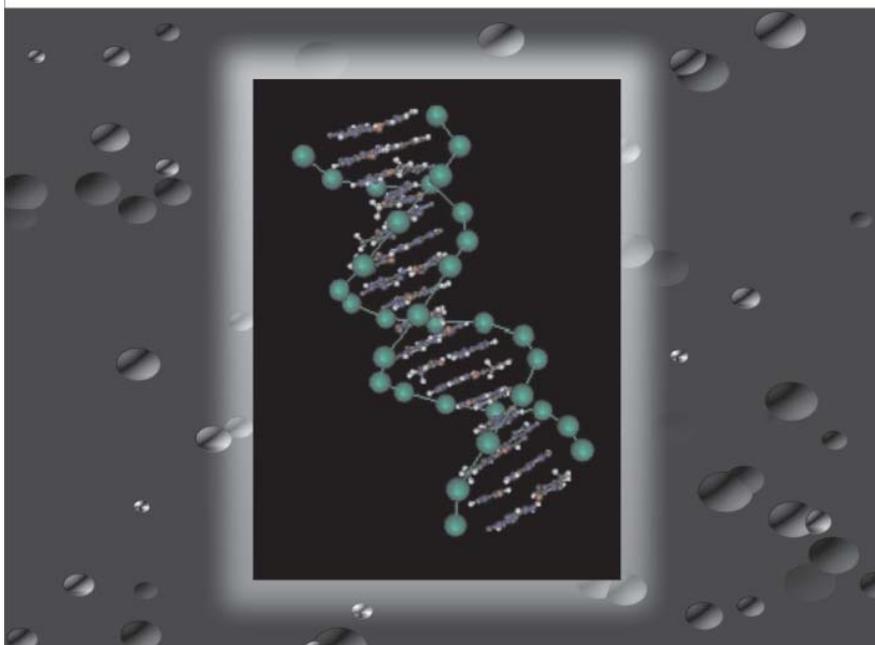
Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Setembro, 2008

191

**Conceitos Básicos de Técnicas em
Biologia Molecular**



Embrapa



ISSN 0103-0205
Setembro, 2008

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 191

Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular

Liziane Maria de Lima

Campina Grande, PB.
2008

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3315-4300
Fax: (83) 3315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
http://www.cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Carlos Alberto Domingues da Silva
Secretário: Valter Freire de Castro

Membros: Fábio Aquino de Albuquerque

Giovani Greigh de Brito

João Luiz da Silva Filho

Maira Milani

Maria da Conceição Santana Carvalho

Nair Helena Castro Arriel

Valdinei Sofiatti

Wirtton Macedo Coutinho

Supervisor Editorial: Valter Freire de Castro

Revisão de Texto: Maria José da Silva e Luz

Tratamento das Ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôrres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2008) 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB)

Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular, por Liziane Maria de Lima. Campina Grande, 2008

27p. (Embrapa Algodão. Documentos, 191)

1. Cronagem molecular. 2. Manipulação de DNA. 3. Extração de DNA. 4. Purificação de DNA. 5. Sequenciamento de DNA. I. Lima, L.M. de II. Título. III. Série.

CDD 574.88

© Embrapa 2008

Autores

Liziane Maria de Lima

D.Sc. Bióloga da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143,
Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB.

E-mail: liziane@cnpa.embrapa.br

Apresentação

Objetivou-se com este documento apresentar de forma sucinta alguns conceitos básicos em Biologia Molecular a estudantes ainda não graduados da área biológica, no intuito de despertarem para a importância da tecnologia do DNA recombinante na biotecnologia. A Biologia Molecular baseia-se nos conhecimentos produzidos pelas disciplinas de Bioquímica, Microbiologia, Genética, Biologia Celular, entre outras, os quais estimulam o surgimento de idéias para projetos inovadores com objetivos que visam, muitas vezes, a melhoria da produção de alimentos, produtos farmacêuticos e químicos, além da aplicabilidade na terapia gênica.

Trata-se de uma apostila oferecida durante o curso de curta duração "Tópicos Básicos em Biotecnologia Vegetal", ministrado na Embrapa Algodão, onde foram apresentadas as teorias de algumas técnicas aplicadas a Biologia Molecular, no módulo destinado a esse fim.

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular	11
1. Conceitos básicos	11
1.1. Clonagem molecular	11
1.2. Enzimas para a manipulação de DNA	12
1.3. PCR	14
1.4. Eletroforese em gel de agarose	16
1.5. Clonagem de produtos de PCR	17
1.6. Plasmídeos ou vetores.....	17
1.7. Transformação celular	18
1.8. Extração e purificação de DNA	20
1.9. Seqüenciamento de DNA	21
1.10. Análise de DNA e RNA em blotting	22
2. Minidicionário	24
3. Referências Bibliográficas	26

Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular

Liziane Maria de Lima

1. Conceitos básicos

1.1. Clonagem molecular

A clonagem molecular consiste na difusão de moléculas de DNA idênticas e baseia-se na propagação natural de células ou indivíduos geneticamente idênticos ao inicial. O experimento de clonagem gênica consiste em introduzir o gene dentro de células bacterianas e isolá-las em colônias. As células de cada colônia são idênticas entre si (NASCIMENTO et al., 1999). A clonagem gênica consiste em duas etapas básicas:

- a) Na primeira etapa faz-se a ligação entre um fragmento de DNA, chamado inserto, contendo o gene de interesse com uma outra molécula de DNA, o vetor, para formar uma quimera ou molécula de DNA recombinante (figura 1) (BROWN, 2003).

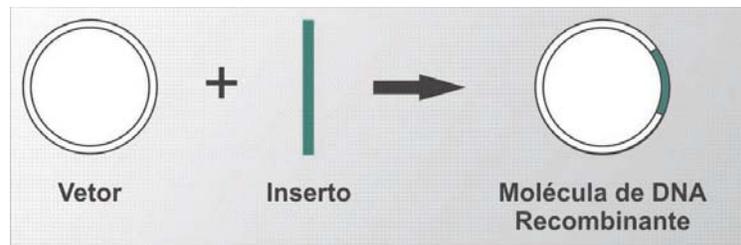


Fig. 1. Ligação do vetor com o inserto para formar a molécula de DNA recombinante.

b) Na segunda etapa, a molécula de DNA recombinante é transportada para dentro de uma célula hospedeira, em geral uma bactéria, ocorrendo o processo de transformação. A célula que recebeu o DNA recombinante é chamada de célula transformada, a qual sofre muitos ciclos de divisão, produzindo várias cópias do DNA recombinante, como pode ser visto na Figura 2 (BROWN, 2003).

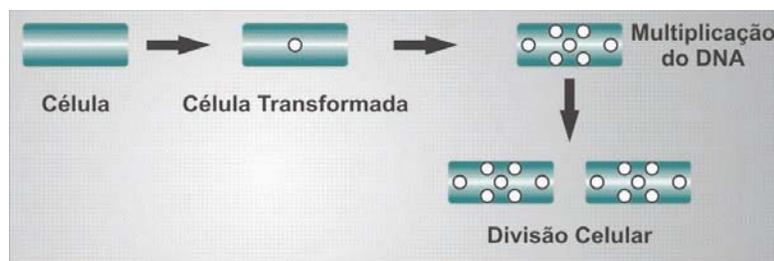


Fig. 2. Transformação de uma célula bacteriana com uma construção de DNA recombinante.

1.2. Enzimas para a manipulação de DNA

As enzimas modificadoras de DNA são as principais ferramentas da engenharia genética e possibilitam a manipulação *in vitro* de moléculas de DNA ou RNA. A tecnologia do DNA recombinante é possível devido a descoberta das enzimas bacterianas que catalisam reações específicas nas moléculas de DNA. As enzimas podem ser agrupadas em cinco classes (AUSUBEL, et al., 2003; TORRES, 2003).

Nucleases e ribonucleases - clivam a ligação fosfodiéster do DNA e RNA, respectivamente, e podem ter atividade exonucleásica 3' - 5' e/ou 5' - 3' ou endonucleásica. Dentre as nucleases, destacam-se as endonucleases de restrição, comumente chamadas de enzimas de restrição, que são importantes para a tecnologia do DNA recombinante. Elas clivam seqüências de DNA específicas em ambas as fitas, chamadas de sítios de restrição, e podem gerar extremidades abruptas ou coesivas (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de endonucleases de restrição com os organismos de origem e as seqüências de reconhecimento. As setas indicam os sítios de clivagem (NASCIMENTO et al, 1999).

Microrganismo	Enzima	Sítio de restrição	Extremidade
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	G ↓ A A T T C C T T ↑ A A G	Coesiva
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>BamHI</i>	G ↓ G A T C C C C T A G ↑ G	Coesiva
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	T ↓ C G A A G ↑ C T	Coesiva
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HindIII</i>	A ↓ A G C T T T T C ↑ G A A	Coesiva
<i>Serratia marcescens</i>	<i>SmaI</i>	C C ↓ C G G G G G ↑ G C C C	Abrupta
<i>Brevibacterium albidium</i>	<i>BalI</i>	T G ↓ G C C A A C ↑ C G G T	Abrupta

Esse sítio de reconhecimento da enzima é normalmente uma seqüência palindrômica, ou seja, a seqüência de bases de uma fita é a mesma da fita complementar, quando lida na direção contrária. As enzimas de restrição são nomeadas conforme o microrganismo do qual foram isoladas; a primeira letra representa o gênero, as segunda e terceira letras representam a espécie, as seguintes, geralmente, representam a linhagem e a ordem da descoberta.

Ligases - catalisam a formação de uma ligação fosfodiéster entre grupos 3'-OH e 5'-PO₄⁻, unindo covalentemente moléculas de DNA de fita dupla, resultando em uma molécula de DNA recombinante.

Polimerases - catalisam a síntese de moléculas de DNA a partir de um molde, ou seja, sintetizam uma nova fita de DNA, complementar a um molde de DNA ou RNA preexistente. As polimerases são DNA ou RNA-dependentes e são essenciais para a replicação e manutenção de todos os organismos.

Modificadoras - catalisam reações que modificam moléculas de DNA pela remoção ou adição de grupos químicos específicos, como a remoção ou adição de grupamentos fosfato das extremidades 5'.

Topoisomerases - modificam a conformação do DNA circular pela indução ou remoção de superenrolamento.

1.3. PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um procedimento rápido que possibilita a amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA específicos, partindo-se de uma quantidade mínima de DNA alvo ou de RNA previamente convertido em cDNA. Para a aplicação da técnica, são necessários três segmentos de ácidos nucleicos: a dupla fita de DNA para servir de molde e a construção de dois oligonucleotídeos (primers) específicos - de fita simples e complementares as duas fitas molde de DNA -, desenhados de modo a flanquear a seqüência a ser amplificada. Além disso, são necessários DNA polimerase, dNTPs, tampão e sais (MgCl). A técnica consiste de ciclos repetitivos; cada ciclo está dividido nos passos apresentados na Figura 3 (AUSUBEL, et al., 2003; WEAVER, 2001).

1º passo (94-96°C) - Desnaturação do DNA a alta temperatura, devido ao rompimento das pontes de hidrogênio que unem as duas fitas.

2º passo (30-60°C) - Anelamento dos primers em posições específicas (essa temperatura é definida em função da seqüência nucleotídica dos primers).

3º passo (72-75°C) - Extensão da seqüência a ser amplificada pela ação da DNA polimerase.

Durante cada ciclo, as fitas complementares de DNA são copiadas pela extensão dos primers que se anelam em posições opostas. Desta forma, cada fita de DNA recém amplificada é usada como molde no ciclo seguinte, resultando assim, no acúmulo exponencial do fragmento de DNA flanqueado pelos dois primers (Figura 4).

Para o isolamento de um gene específico podem ser utilizadas diferentes estratégias de PCR (SÁ et al., 2002; WEAVER et al., 2001): RT-PCR

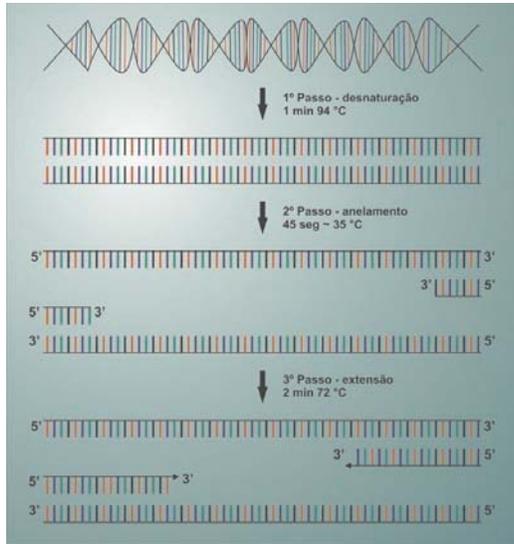
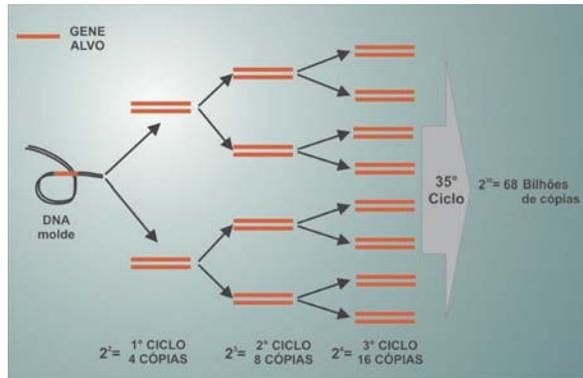


Fig. 3. Etapas da PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

Fig. 4. Esquema de amplificação exponencial de um gene por PCR.



(amplificação de seqüências de cDNA); RACE-PCR (amplificação das extremidades 3' e 5' de seqüências de cDNA); Tail-PCR (isolamento de segmentos de DNA adjacentes a seqüências conhecidas) e PCR inverso (isolamento de seqüências que flanqueiam uma região genômica conhecida).

1.4. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é um método simples e eficiente que permite separação, identificação e purificação de moléculas de DNA. As moléculas são separadas através da migração de partículas no gel, com a aplicação de uma diferença de potencial elétrico, onde as moléculas de menor massa migram mais rápido. O protocolo padrão de gel de agarose permite separar fragmentos de DNA entre 0,5 a 25 kb. A eletroforese também pode ser utilizada para separar proteínas e moléculas de RNA. A agarose utilizada no gel é um polissacarídeo que forma uma rede e permite regular a velocidade da migração das moléculas durante a separação. A adição de corante fluorescente (brometo de etídio ou sybr®), que se intercala entre as bases do DNA, e o uso de radiação ultravioleta permitem a visualização e a fotografia, conforme Figura 5 (NASCIMENTO et al., 1999; SOUZA, 2003).

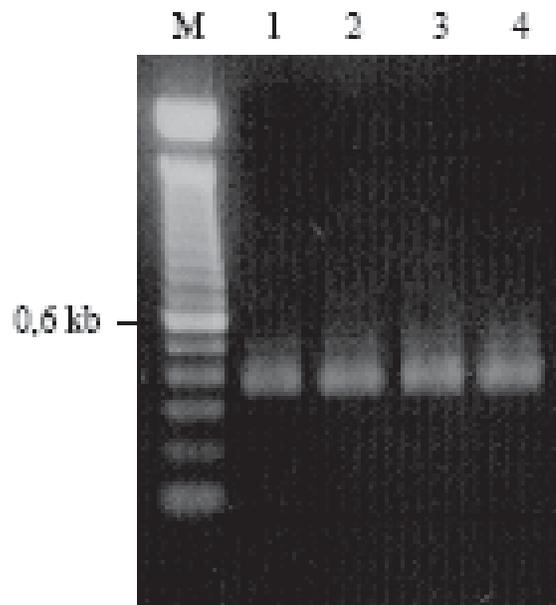


Fig. 5. - Eletroforese de fragmentos de PCR amplificados; (M - marcador de peso molecular).

1.5. Clonagem de produtos de PCR

A Taq DNA polimerase adiciona um resíduo de deoxiadenosina (A) à extremidade 3' das fitas de DNA, durante a amplificação por PCR. Esse A-protuberante permite ligar o fragmento de DNA a vetores específicos, especialmente preparados, contendo um resíduo de deoxitimidina (T) protuberante na extremidade 3'. A molécula do vetor tem somente um sítio de clivagem para uma determinada enzima de restrição que abre o vetor na sequência onde o inserto será inserido. Os fragmentos de DNA oriundos da reação de PCR são misturados ao vetor linearizado juntamente com a enzima T4 DNA ligase, a qual permite a ligação entre eles, gerando uma molécula de DNA plasmidial, contendo o gene de interesse. Este plasmídeo pode ser inserido dentro de uma bactéria por transformação e, então, ser replicado. Além do fragmento de PCR, outras moléculas de DNA podem ser inseridas em vetores previamente clivados com enzimas de restrição. A DNA ligase pode atuar em ligações de fragmentos com extremidades coesivas ou abruptas (BROWN, 2003; NASCIMENTO et al., 1999).

1.6. Plasmídeos ou vetores

Os plasmídeos são moléculas de DNA fita dupla extracromossomal encontrados em todas as espécies de bactérias. Os plasmídeos variam em estrutura, tamanho, modo de replicação, número de cópias por célula e habilidade para propagarem-se em diferentes bactérias. Todos contêm três características comuns: marca seletiva, origem de replicação e sítio múltiplo de clonagem (NASCIMENTO, 1999). A marca seletiva refere-se a genes que conferem resistência a antibióticos e que proporcionam a seleção dos clones transformados daqueles não transformados. Para essa seleção, é adicionado ao meio de cultura o antibiótico adequado, em concentrações que permitam diferenciar a célula não-transformada (sensível ao antibiótico) da célula transformada (resistente ao antibiótico). Os principais antibióticos utilizados nos meios de cultura para a seleção de transformantes estão apresentados na Tabela 2. A origem de replicação autônoma ou ori é o sítio em que se inicia a replicação do DNA, podendo se

Tabela 2. Principais antibióticos utilizados como agentes seletivos e a concentração final utilizada.

Antibiótico	Concentração Final
Ampicilina	100 a 200 µg/ml
Carbencilina	20 a 50 µg/ml
Kanamicina	10 a 70 µg/ml
Tetraciclina	10 a 50 µg/ml
Cloranfenicol	10 a 20 µg/ml

Fonte: MARANHÃO (2003).

replicar independentemente da replicação bacteriana e produzir milhares de cópias do plasmídeo dentro da célula hospedeira. A replicação dos plasmídeos pode ser sincronizada com o ciclo celular, resultando em baixo número de cópias, ou ser independente do ciclo da célula hospedeira, permitindo a proliferação de centenas de cópias por célula. O sítio múltiplo de clonagem ou polylinker é um sítio de clivagem de endonucleases de restrição no qual é inserido um fragmento de DNA de interesse sem interferir na funcionalidade do plasmídeo (BROWN, 2003; WEAVER, 2001).

1.7. Transformação celular

O processo de transformação consiste na introdução de um DNA exógeno em células hospedeiras, que podem ser: bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células vegetais e células de mamíferos. A célula mais comumente utilizada é a célula bacteriana de *Escherichia coli*. O processo de transformação bacteriana utilizada na Biologia Molecular ocorre *in vitro*, e pode ser afetado pelo tamanho e conformação da molécula de DNA a ser introduzida na célula. Plasmídeos pequenos incorporam-se mais facilmente à célula bacteriana competente. A transformação bacteriana é utilizada para a preparação de DNA plasmidial, em larga escala, e para a seleção de clones recombinantes (BROWN, 2003; MARANHÃO, 2003a).

A atração do DNA pelas células bacterianas, em condições naturais, é um evento muito raro, devido à ocorrência da repulsão eletrostática entre as cargas negativas dos fosfolípidios da membrana e as cargas negativas dos grupamentos fosfatos da molécula de DNA, esquematizada na Figura 6 (MARANHÃO, 2003a).

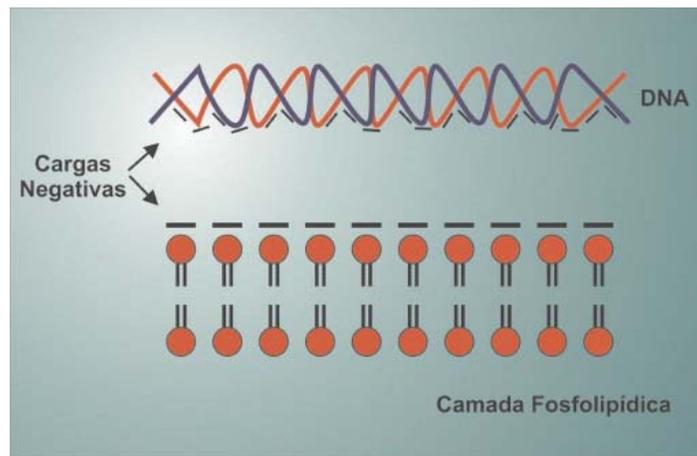


Fig. 6. Representação esquemática da repulsão eletrostática entre as cargas negativas da molécula de DNA e a camada fosfolipídica da membrana celular.

Para a transformação bacteriana, podem-se utilizar dois diferentes métodos de transformação:

Choque térmico - Comumente chamado transformação com cloreto de cálcio, é um método fácil e relativamente barato de transformação. Consiste na preparação das células, para torná-las competentes, por tratamento com cloreto de cálcio ou outro íon divalente (cloreto de lítio ou magnésio). Os íons atuam neutralizando as cargas negativas da membrana e do DNA. Após um choque térmico na temperatura de 37° a 42°C, criam-se poros na membrana e o DNA pode alcançar o interior da célula (MARANHÃO, 2003b; NASCIMENTO et al., 1999).

Eletroporação - É um método mais eficiente para transformação de células com DNA plasmidial. Consiste, inicialmente, na preparação das células com

uma solução aquosa para torná-las competentes e aptas a receber o DNA. As células são submetidas a alta voltagem (choque elétrico) que provoca uma desestabilização da membrana externa e a formação de poros, possibilitando a entrada do DNA para o interior da célula. Esse tipo de transformação, que requer um equipamento - denominado eletroporador -, pode ser utilizado para a transformação de bactérias gram positivas e negativas, leveduras, fungos filamentosos, células animais e vegetais. O eletroporador deve ser ajustado para cada tipo celular, considerando os seguintes parâmetros: capacitância, intensidade e duração do pulso elétrico (AUSUBEL et al., 2003; MARANHÃO, 2003b).

1.8. Extração e purificação de DNA

O isolamento de DNA cromossomal ou plasmidial é um procedimento básico e fundamental para a clonagem molecular. Existem muitas técnicas disponíveis que permitem o isolamento de DNA, porém esses métodos possibilitam o isolamento de apenas um tipo de DNA por extração. A purificação consiste na separação do DNA a partir dos restos celulares e das proteínas, principalmente as DNases que degradam as moléculas de DNA, tanto em células bacterianas como em células eucarióticas. Diferentes reagentes e substâncias são combinados e utilizados para esse procedimento de acordo com o tipo celular. No caso das bactérias gram negativas (*E. coli*), a combinação de detergentes e substâncias alcalinas removem as camadas lipídicas da membrana externa e da parede celular expondo o DNA para a purificação. As proteínas podem ser removidas eficientemente com a utilização de uma mistura dos solventes orgânicos fenol e clorofórmio. Esses solventes atuam como agentes desproteinizantes, rompendo rapidamente a integridade celular e desnaturando as proteínas, deixando os ácidos nucleicos em solução aquosa (BROWN, 2003; MARANHÃO; MORAES, 2003). O procedimento de preparação de DNA, a partir de uma cultura de células bacterianas, pode ser resumido da seguinte maneira:

1º - As células são cultivadas em meio de cultura, depois recuperadas por

centrifugação, a partir da cultura, e concentradas no menor volume possível.

2° - As células são rompidas e seu conteúdo liberado, formando um extrato celular.

3° - Esse extrato celular é tratado e todos os seus componentes são removidos, exceto o DNA.

4° - O DNA resultante é concentrado por precipitação e mantido em solução aquosa.

1.9. Seqüenciamento de DNA

A seqüência do DNA é um pré-requisito para a análise detalhada de um gene. O método de seqüenciamento de DNA mais utilizado é o automático, baseado no método de Sanger-Coulson, desenvolvido em 1979, também conhecido como método de terminação de cadeia, que permite determinar a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA. No seqüenciamento automático, os nucleotídeos são marcados com quatro fluorocromos diferentes, um para cada nucleotídeo (A, C, G, T). Esse método necessita de um DNA de fita simples e, normalmente, é clonado em um vetor M13 ou outro vetor comercial. O método baseia-se na síntese de uma segunda fita de DNA complementar ao DNA molde, na presença de um primer complementar à seqüência adjacente ao sítio múltiplo de clonagem do vetor. O fragmento de Klenow da DNA polimerase I inicia o alongamento da cadeia complementar a partir da extremidade 3' do primer; os deoxinucleotídeos - dNTP - (dATP - deoxiadenosina trifosfato -, dTTP - deoxitimidina trifosfato -, dGTP - deoxiguanosina trifosfato -, dCTP - deoxicitosina trifosfato) são selecionados de acordo com o pareamento ao molde e ligados a cadeia por ligações fosfodiéster (AUSUBEL et al., 2003; NASCIMENTO et al., 1999).

Como, para cada dNTP, utiliza-se um fluorocromo diferente, a eletroforese é realizada em um único canal do gel de seqüenciamento. À medida que os fragmentos passam pelo feixe de laser, os fluorocromos são excitados e a

luz emitida, em diferentes comprimentos de onda, é detectada por um fotomultiplicador. Esta informação é traduzida na forma de seqüência por meio de um computador e apresentada no eletroferograma, apresentado na Figura 7 (AUSUBEL et al., 2003; NASCIMENTO et al., 1999).

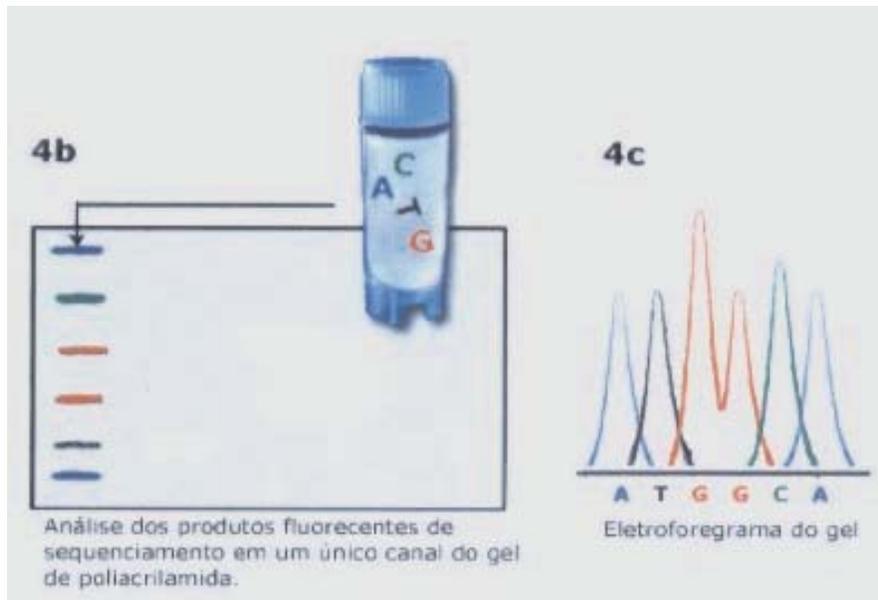


Fig. 7. Sequenciamento automático utilizando todos os dNTP marcados com fluorescência

(Fonte: <http://educacao.genesisdbm.com.br/sequenciamento.shtml>).

1.10. Análise de DNA e RNA em blotting

As técnicas de blotting baseiam-se nas propriedades de hibridização das moléculas de ácidos nucleicos. Algumas técnicas foram criadas propondo-se localizar a posição de um gene em uma molécula de DNA. Para a análise de DNA, utiliza-se a técnica de Southern blotting. Primeiramente, o DNA é digerido com uma ou mais enzimas de restrição e separado em uma eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos de DNA fita dupla são

desnaturados *in situ* e transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, na qual são imobilizados no mesmo padrão de bandejamento do gel. A imobilização é realizada com radiação UV, para as membranas de nylon, e calor, para as membranas de nitrocelulose. A membrana é colocada sobre o gel e um tampão de alta concentração salina é adicionado e, por capilaridade, passa através do gel, promovendo a transferência dos fragmentos de DNA para a membrana. A membrana resultante é uma réplica do gel de agarose. Sondas de RNA ou DNA marcadas com radioatividade são utilizadas, a hibridização com o DNA fixo na membrana ocorre e uma auto-radiografia revela qual fragmento de restrição contém o gene clonado, conforme pode ser visto na Figura 8 (AUSUBEL et al., 2003; HARWOOD, 1996; WEAVER, 2001).

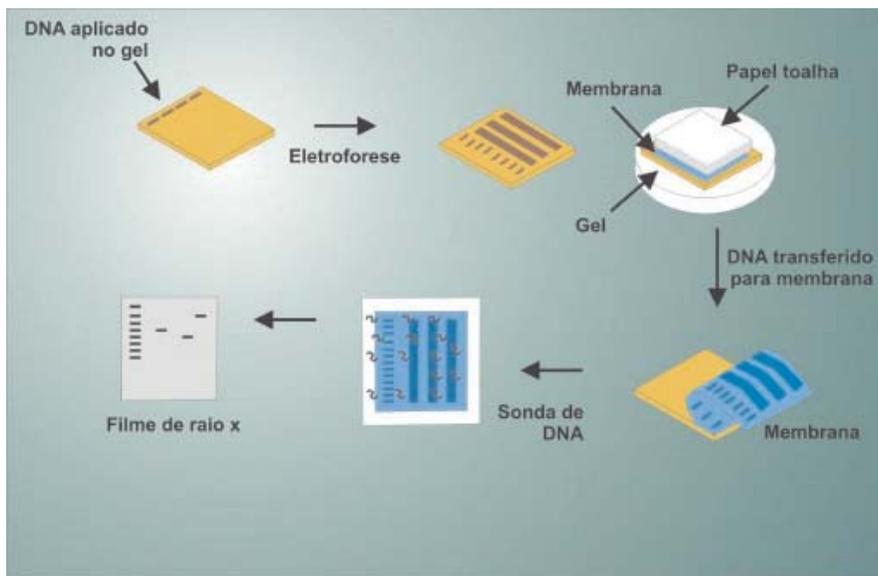


Fig. 8. Southern blotting. Um fragmento de DNA específico pode ser identificado separando a mistura de fragmentos por eletroforese, transferindo para a membrana e hibridizando a sequência com uma sonda molecular complementar e marcada com ^{32}P

Para a análise de RNA, a técnica, que é análoga ao Southern blotting, recebeu o nome de Northern blotting. Um RNA extraído é submetido à eletroforese em gel de agarose, transferido para uma membrana e hibridizado com sondas radioativas de RNA ou DNA. Esta técnica permite identificar em qual tecido ou tipo celular um determinado gene é expresso. Para um experimento de Northern blotting, alguns cuidados para manter as soluções e os materiais do experimento livres de RNases devem ser adotados até a transferência do RNA para a membrana (HARWOOD, 1996; KYAN, 2003).

2. Minidicionário

Atividade exonucleásica - é a propriedade da enzima em clivar ligação fosfodiéster na extremidade de uma molécula de DNA.

Atividade endonucleásica - é a propriedade da enzima em clivar ligação fosfodiéster no interior de uma molécula de DNA.

Bactéria competente - é uma bactéria apta a receber DNA exógeno.

Extremidade abrupta - produzida por algumas enzimas de restrição, também chamada de extremidade cega por não apresentar nucleotídeos em cadeia simples.

Extremidade coesiva - produzida por algumas enzimas de restrição, apresenta um pequeno número de nucleotídeos em cadeia simples e permite a ligação a outro fragmento de DNA pela complementariedade das bases.

Fluorocromo - corante fluorescente usado para corar amostras biológicas, emite energia luminosa quando excitado por radiação luminosa adequada.

Fragmento Klenow - fragmento protéico da DNA polimerase I com capacidade de polimerização e atividade exonucleotídica 3' - 5'.

Transformação bacteriana - é o processo que envolve a introdução de DNA exógeno na bactéria competente.

Vetor circular - é um vetor fechado, não permite a ligação a um fragmento de DNA.

Vetor linearizado - é um vetor digerido por uma enzima de restrição específica, permite a ligação a um fragmento de DNA compatível com as extremidades.

Quimera - molécula de DNA recombinante que contém seqüências gênicas de origens diferentes.

3. Referências Bibliográficas

- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley , 2003. 4755 p.
- BROWN, T. A. . **Clonagem gênica e análise de DNA**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376 p.
- SOUZA, M. T. de. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M.T. de. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003. 211 p.
- SÁ, M. F. G. de; BATISTA, J. A. N.; OLIVEIRA NETO, O. B.; FRAGOSO, R. R.; MONTEIRO, A. C. **Clonagem e expressão de genes**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002, 52 p. Apostila.
- HARWOOD, A. J. **Basic DNA and RNA protocols**. London: Human Press, 1996. 528 p.
- KYAN, C. M. Northern blot: detecção de RNA por hibridização em membranas. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. de. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003. 211 p.
- MARANHÃO, A. Q. Transformação bacteriana. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. de. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003a. 211 p.
- MARANHÃO, A. Q.; MORAES, L. M. P. Extração e purificação de DNA. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.;

SOUZA, M. T. de. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003b. 211 p.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1999. 85 p. Apostila.

TORRES, F. A. Principais enzimas modificadoras de ácidos nucléicos. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. de. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003. 211 p.

WEAVER, R. F. **Molecular biology**. Lawrence: University of Kansas, 2001. 880 p.

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

