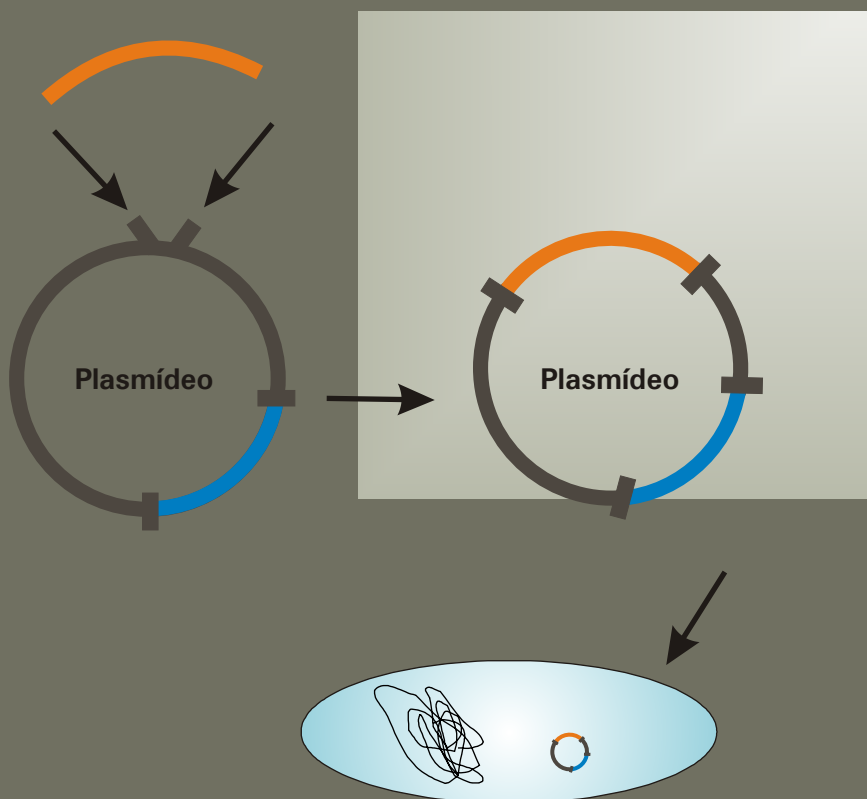


Engenharia Genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1517-5111

Maio, 2003

Documentos 86

Engenharia Genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações

Maria Cristina Rocha Cordeiro

Planaltina, DF
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Dimas Vital Siqueira Resck*

Editor Técnico: *Carlos Roberto Spehar*

Secretária-Executiva: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Supervisão editorial: *Jaime Arbués Carneiro*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Jaime Arbués Carneiro

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares*

Tratamento das ilustrações: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Jaime Arbués Carneiro

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 100 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).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Cerrados.

C794e Cordeiro, Maria Cristina Rocha.

Engenharia genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações /
Maria Cristina Rocha Cordeiro. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados,
2003.

43 p. — (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 86)

1. Engenharia genética. I. Título. II. Série.

636.0821 - CDD 21

© Embrapa 2003

Autora

Maria Cristina Rocha Cordeiro

Biomédica, Dra., Embrapa Cerrados,
cristina@cpac.embrapa.br

Apresentação

A Engenharia Genética tem-se destacado como prática para a geração de novas tecnologias. São inúmeros os exemplos em diversas áreas como a produção de vacinas, a terapia gênica, a transgenia, entre outras.

Na agropecuária, a Engenharia Genética também encontra sítio para sua prática, desenvolvendo novos processos. Nessa área cita-se a utilização dessa ferramenta principalmente para melhoria dos processos como o melhoramento genético, manejo de pragas e o controle biológico.

Este documento tem como finalidade introduzir estudantes de graduação e outros profissionais nessa área de conhecimento, de maneira a divulgar seu potencial e importância.

Roberto Teixeira Alves
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução	9
Conceito de Engenharia Genética	9
Estrutura dos Ácidos Nucléicos	9
Replicação do DNA	14
Expressão da Informação Gênica	15
Histórico	18
Ferramentas Técnicas da Engenharia Genética	22
Extração de Ácidos Nucléicos	22
Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	24
Eletroforese em gel	25
Análises moleculares	25
<i>Sistemas de Restrição e Metilação</i>	25
Enzimas Modificadoras: polimerases, ligases	26
Clonagem Molecular	27
Técnicas Básicas para caracterização de genes	29
Construção de Biblioteca genômica	29
Construção de biblioteca de cDNA	29

Seqüenciamento de DNA	30
Técnicas para estudo de caracterização e expressão de genes	31
<i>Southern blotting</i>	31
Hibridização subtrativa e <i>Differential Display</i>	32
<i>Northern blotting</i>	34
Análises em Microarranjos	35
Aplicações da Engenharia Genética	36
Agricultura	36
Pecuária	37
Referências Bibliográficas	38
Abstract	40
Apêndice 1. Código Genético - códons de aminoácidos para síntese de proteínas	41
Apêndice 2. Algumas enzimas de restrição utilizadas em engenharia genética	42

Engenharia Genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações

Maria Cristina Rocha Cordeiro

Introdução

Conceito de Engenharia Genética

A Engenharia Genética constitui um conjunto de técnicas de análises moleculares que permitem estudos de caracterização, expressão e modificações do material genético (DNA e RNA) dos seres vivos.

A Engenharia Genética tem sido tema polêmico. A sua prática levanta aspectos relacionados à ética, pois baseia-se em modificação de material genético natural (produção de organismos geneticamente modificados – OGMs) ou sua clonagem. A discussão é importante, uma vez que expressa a opinião pública à comunidade científica, suscitando reflexões para a solução de problemas. É necessário, portanto, conhecer o seu significado para saber como, e de que forma, ela pode contribuir como um efetivo benefício à vida.

Esta síntese dos principais temas da engenharia genética tem como objetivo divulgar o conhecimento básico sobre suas possíveis contribuições na agropecuária, a estudantes, outros profissionais não familiarizados com a biologia molecular, e um apoio didático a professores.

Estrutura dos Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos são macromoléculas intracelulares de dois tipos: o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). Apresentam constituição química e função biológica diferentes.

O DNA é considerado o mais importante. Constitui o genoma dos seres vivos onde estão contidas todas as informações genéticas fundamentais para sua existência. A partir dele, essas informações se expressam nas células e se perpetuam na progênie. Assim, pode-se dizer que o DNA tem função de armazenar e manter a informação genética (código genético).

O DNA é constituído por subunidades menores chamadas nucleotídeos, agrupadas em quatro tipos. Cada tipo subdivide-se em moléculas menores que são: bases nitrogenadas do tipo purinas (adenina e guanina) ou pirimidinas (timina e citosina); açúcar do tipo pentose (desoxirribose) e fosfato. As bases associam-se à pentose por uma ligação no carbono 1' da pentose e, o fosfato, associa-se ao carbono 5' da mesma pentose, e ao carbono 3' da pentose do nucleotídeo adjacente. Essa última ligação é chamada de fosfodiéster e constitui a cadeia de nucleotídeos. Este tipo de ligação confere uma polaridade a molécula do DNA que tem função na replicação e transcrição, chamada de sentido 5' → 3' (Figura 1).

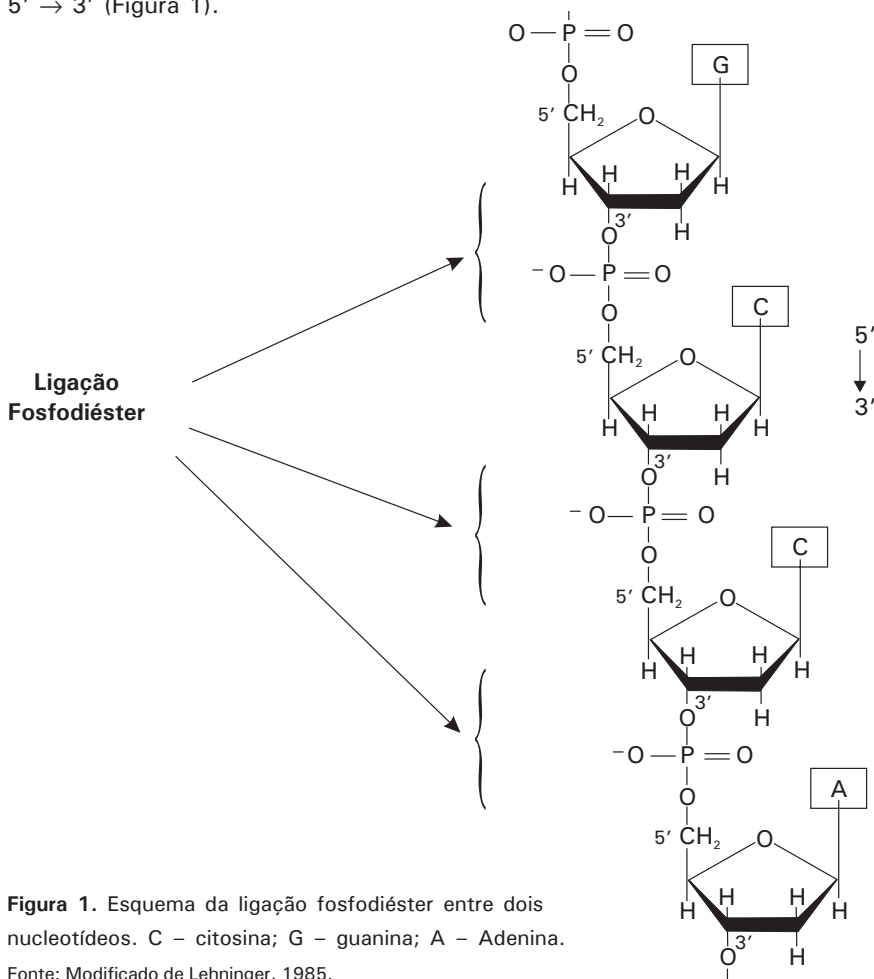


Figura 1. Esquema da ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos. C – citosina; G – guanina; A – Adenina.

Fonte: Modificado de Lehninger, 1985.

O DNA é constituído por duas cadeias de nucleotídeos. A associação entre elas faz-se por pareamento das bases nitrogenadas. Estas não se pareiam ao acaso, mas a adenina sempre se associa à timina e a citosina à guanina. Isto deve-se a ligações do tipo ponte de hidrogênio (H) (Figura 2). Há duas possibilidades de pontes entre adenina e timina (envolvendo o nitrogênio (N) de uma base e o oxigênio (O) da base complementar) e três entre citosina e guanina (envolvendo dois N com O e um N com N). Essa constituição é universal nos seres vivos. Assim alguns vírus, as bactérias, os fungos, os vegetais e os animais contêm DNA estruturado da mesma maneira. As diferenças estão na sequência em que os nucleotídeos se associam.

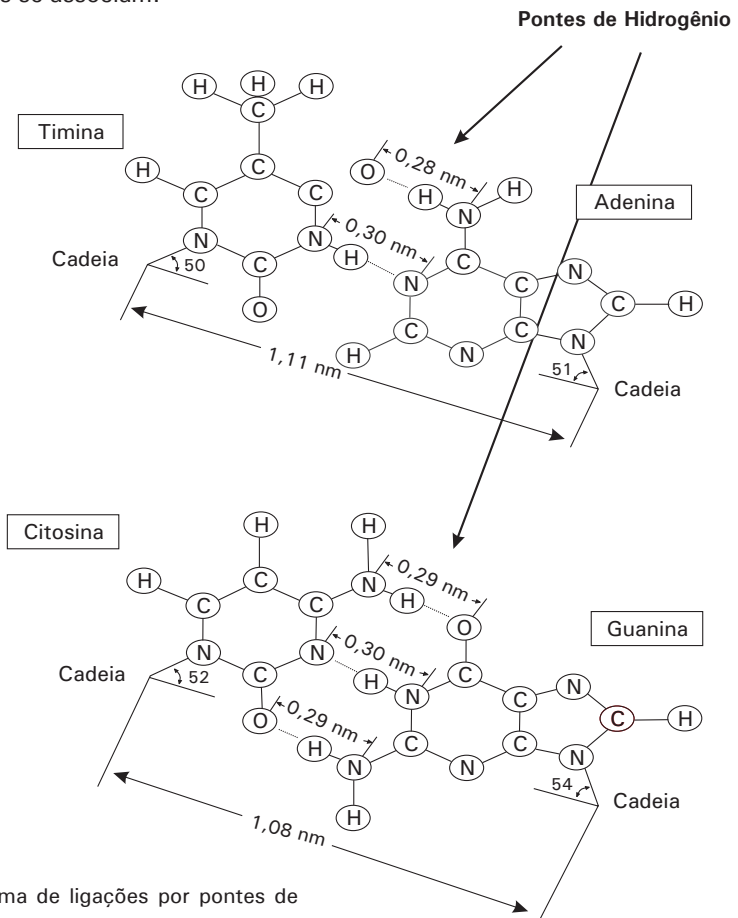


Figura 2. Esquema de ligações por pontes de hidrogênio entre adenina e timina ou citosina e guanina.

Fonte: Modificado de Lehninger, 1985.

As cadeias de nucleotídeos que, cada uma quando se formam, constituem um sentido (5' → 3'), quando se associam, o fazem em sentido contrário. Sentido 5' → 3' com sentido 3' → 5'. Essa associação vai ter função no momento da perpetuação da molécula (replicação) como também na sua função biológica de expressão genética (transcrição e regulação da transcrição).

Existem vários tipos de DNA: o genômico, o mitocondrial, o de cloroplastos (células vegetais) e o plasmidial (Tabela 1). O primeiro está presente no núcleo das células eucarióticas ou no citoplasma das células procarióticas (bactérias). Nos seres eucarióticos, pode chegar a cerca de 2 m quando distendidos; porém, encontra-se restrito a um espaço extremamente reduzido: núcleo, com 0,006 mm de diâmetro. Como isto ocorre? O DNA associa-se com proteínas de carácter básico (histonas) constituindo a cromatina. As histonas (que podem ser de vários tipos: H1, H2A, H2B, H3, H4...) associam-se e formam nucleossomas (Figura 3) e, ao redor do qual a dupla cadeia do DNA dá voltas. Em conjunto, essa formação pode ser observada em microscópio eletrônico e é conhecida por “colar de pérolas”. Este pode se “enrolar” ainda mais sobre si mesmo, como se fosse um novelo. Assim, a grande molécula de DNA pode assumir tamanhos tão diminutos. Esse processo de espiralização da molécula do DNA ocorre por ação de enzimas como as topoisomerases, helicases entre outras.

Tabela 1. Características dos Ácidos Nucléicos.

Característica	DNA	RNA
Principal Função	Armazenar e perpetuar o código genético do ser	Transcrever o código genético
Tipos	Genômico, plasmidial, mitocondrial, de cloroplasto	Ribossômico, Mensageiro, Transportador
Número de cadeias em geral	2	1
Tipo de bases nitrogenadas	Adenina, Timina, Guanina, Citosina	Adenina, Uracila, Guanina, Citosina
Tipo de Açúcar	Deoxiribose	Ribose

A outra molécula de ácido nucléico conhecida é a de RNA. Ao contrário do DNA, é constituído por somente uma cadeia de nucleotídeos que se associam por meio dos fosfatos em polaridade (sentido 5' → 3'). Porém, no RNA as bases

que o constituem são: adenina, uracila, citosina, guanina, ligados por ribose. As principais características comparativas entre DNA e RNA podem ser observadas na [Tabela 1](#).

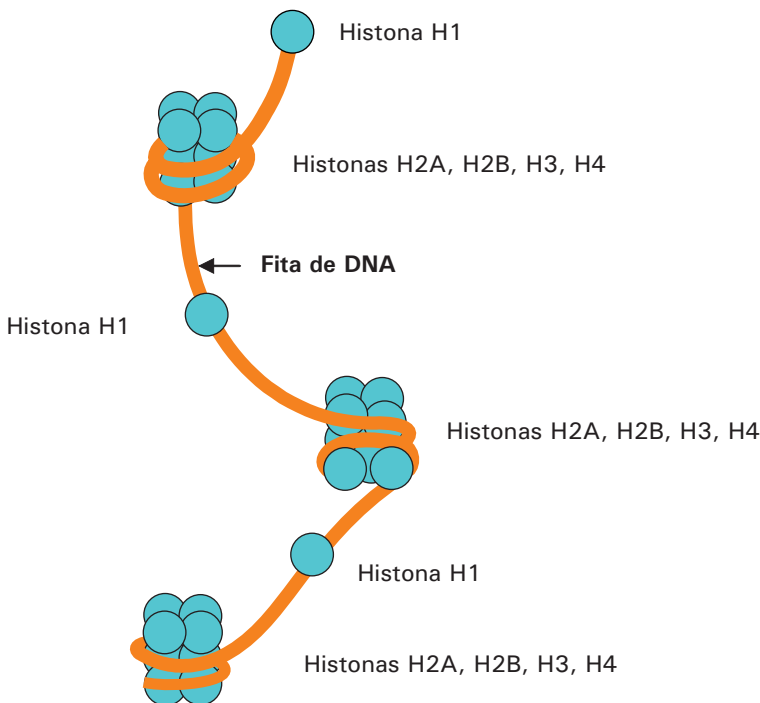


Figura 3. Desenho esquemático dos nucleossomos.

O RNA pode ser observado no núcleo e no citoplasma da célula. Na verdade, a molécula é formada no núcleo (células eucarióticas), mas sua função principal ocorre no citoplasma. São moléculas bem menores do que o DNA e menos estáveis.

Existem três tipos de RNA: o ribossômico, o mensageiro e o transportador. O ribossômico pode ser observado no núcleo na região do nucléolo e no citoplasma, pois constitui o ribossoma. O transportador é formado no núcleo e sua função biológica ocorre no citoplasma; o RNA mensageiro é formado no núcleo e desempenha sua função também no citoplasma. Qual é a função dos diferentes tipos de RNA? A síntese de proteínas, que são os compostos finais da expressão de um caráter genético estocado no DNA. São elas que desempenham

funções nas células: estruturais (queratina, colágeno), enzimas (polimerases, fosfatases, quinases) etc. e como componentes de sistemas como a hemoglobina e os anticorpos. O RNA mensageiro é o carreador da informação genética diretamente do DNA. A partir dele, temos a transcrição do código genético. O RNA ribossomal, constituído por subunidades menor e maior dos ribossomas, são o *locus* da síntese de proteínas no citoplasma. Encontram-se livres no citoplasma ou associados ao retículo endoplasmático rugoso. E, finalmente, os RNAs transportadores são RNAs pequenos que têm função de ligar aminoácidos específicos e transportá-los para a região de síntese de proteínas. A transcodificação da mensagem do DNA para proteínas faz-se por meio de um código de trinca ou códon (três nucleotídeos). Cada trinca representa um aminoácido; estes porém, podem reconhecer mais de um códon. Assim, o código genético é dito “degenerado”. Essa característica é importante em atividades da engenharia genética, como a amplificação de seqüências gênicas a partir de iniciadores degenerados, que tem como base a seqüência de proteínas. No apêndice 1, estão relacionados os códons para os principais aminoácidos.

Replicação do DNA

A replicação ou duplicação é o processo que permite a perpetuação da molécula do DNA. Na divisão celular (mitose ou meiose). Subdivide-se em etapas que serão enumeradas a seguir ([Figura 4](#)):

1. O primeiro passo é a desespiralização da molécula por enzimas como as topoisomerases, helicases e outras;
2. Depois, ocorre a separação das cadeias de nucleotídeos com a ruptura das pontes de hidrogênio. Essa separação faz-se em vários pontos da molécula, formando “forquilhas” ou aberturas onde se origina a replicação;
3. Quando as cadeias estão separadas cada uma é associada a um pequeno RNA chamado “iniciador”. Este se liga às seqüências presentes em cada cadeia, sempre no sentido $5' \rightarrow 3'$. A sua presença é fundamental para a posterior associação da enzima DNA polimerase I;
4. Com a associação da enzima, no ponto em que se ligou o iniciador, começa a polimerização das novas cadeias do DNA. A mesma fita onde o RNA iniciador se ligou, serve como molde para a adição, de forma complementar, dos novos nucleotídeos. A polimerização se faz no sentido $5' \rightarrow 3'$. Enquanto uma das cadeias é polimerizada de forma contínua, forma-se a outra também no sentido

5' → 3' porém de forma descontínua constituindo pequenas cadeias que se formam para constituir esta última cadeia. Essas cadeias são conhecidas como “fragmentos de Okasaki” em homenagem ao pesquisador que as observou pela primeira vez. Assim, a replicação do DNA é bidirecional e semiconservativa, pois cada molécula nova contém uma fita da molécula precursora.

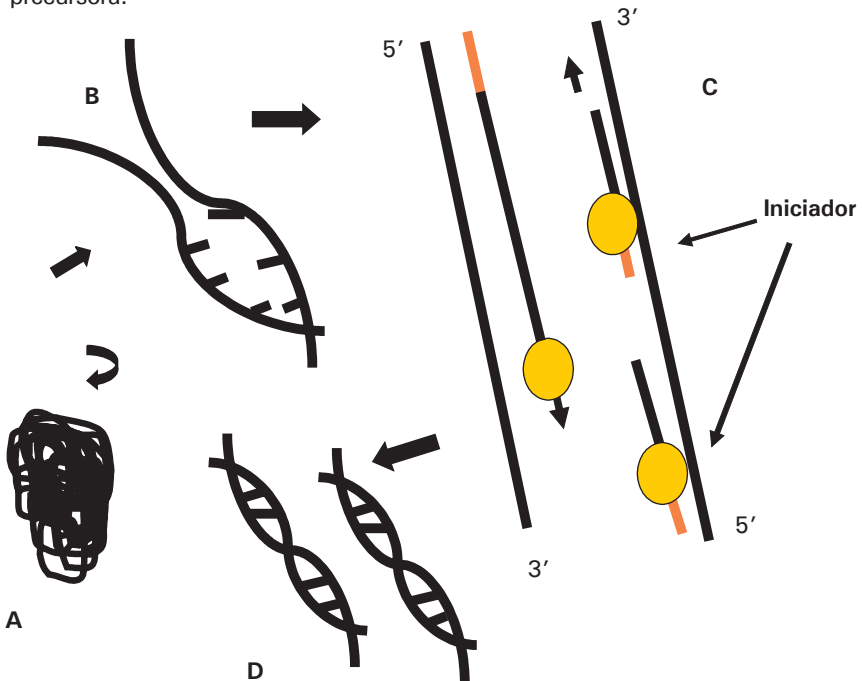


Figura 4. Desenho esquemático das principais fases da replicação do DNA. A – Desespiralização da cadeia; B – Abertura de forquilha (origem de replicação); C – Polimerização de novas fitas e D – Duas moléculas recém-formadas.

Expressão da Informação Gênica

Antes de comentar sobre expressão gênica, é importante conceituar o gene. Gene é uma unidade do DNA que é capaz de constituir ao menos uma cadeia polipeptídica. As exceções são os que transcrevem os RNAs ribossômico (subunidade maior e menor) e os RNAs transportadores. Cada unidade gênica está dividida nas seguintes regiões: promotora, EXON, INTRON, terminadora e reguladoras ([Figura 5](#)). A região promotora ou simplesmente promotor é aquela onde se associam proteínas como fatores de transcrição e também a enzima RNA

polimerase. Essa região é uma seqüência geralmente rica em adenina e timina. A região de EXON é aquela que apresenta a informação para constituir cadeias polipeptídicas; a região de INTRON pode estar associada à regulação da expressão gênica. Na verdade, é incerta sua presença ou função nos genes, mas o fato é que elas existem em alguns casos.

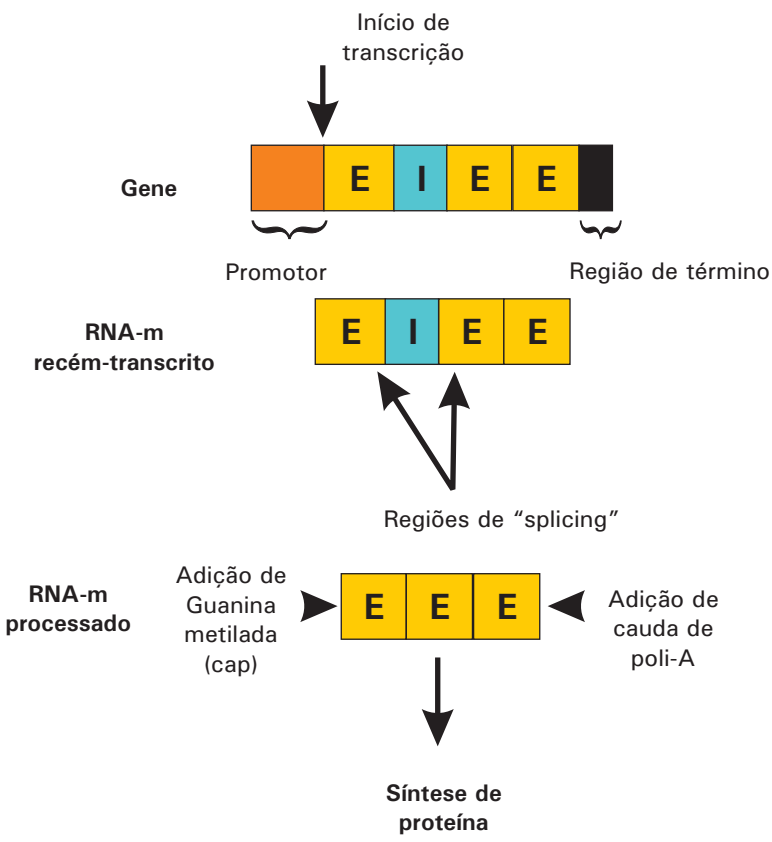


Figura 5. Desenho esquemático indicando a estrutura gênica, formação e modificação pós-transcricional do RNA-m.

A região terminadora é aquela em que se pode observar o códon de término de tradução e transcrição. Esses códigos apresentam um padrão específico bastante conservado nos seres vivos.

Finalmente, as regiões reguladoras da expressão podem estar presentes em *cis* (áreas adjacentes ao gene, na região promotora, nas regiões de INTRON e terminadora) ou ainda, em *trans* (próximas ao gene desde o ponto de vista tridimensional, porém, afastadas quando observada pela estrutura linear do DNA).

Os RNA-m, transcritos do DNA, nos eucariotos (organismos superiores ou com núcleo definido) passam por modificações (pós-transcricionais) antes de serem traduzidos em proteínas. A primeira é a deleção das seqüências de INTRON. Esse mecanismo é chamado de ***splicing***. A segunda é a adição da cauda de poliA em seu extremo 3'. Essa cauda não existe nos RNAs-m de procariotos (sem núcleo definido) e tem função de aumentar a estabilidade do RNA-m. No extremo 5', é adicionado um "chapéu" de guanossina metilada importante no direcionamento do RNA-m no momento da tradução.

A expressão gênica é a principal função relacionada com os RNAs mensageiros (RNA-m) e o processo da transcrição. Ela define o perfil das proteínas nas células e sua diferenciação. Por exemplo, somente as células de tecido muscular expressam proteínas associadas ao sarcômero e, à contração muscular, como miosina e desmina, as células do fígado, enzimas responsáveis pela desintoxicação; os linfócitos tipo B, a síntese de anticorpos específicos. Nas células vegetais, ocorre a síntese de proteínas específicas da fotossíntese, da reação a estresses bióticos ou abióticos, da formação de compostos fenólicos específicos etc.

A transcrição e a expressão gênica ([Figura 5](#)) têm grande importância na engenharia genética. A partir do seu estudo, pode-se isolar e caracterizar genes que são especificamente ativados em células e representam funções mais relevantes como, por exemplo, anticorpos (para produção de vacinas), proteínas de resistência a patógenos e a pragas da agricultura, crescimento celular, entre outros.

É considerado dogma da biologia molecular que a informação genética contida no DNA é transcrita em RNA e este traduz uma mensagem que é expressa na forma de proteínas ([Figura 6](#)). Porém, hoje, é possível inverter esse mecanismo natural e realizá-lo ao contrário, ou seja, a partir de proteínas ou do RNA, pode-se obter os genes que os originaram. Esse fato tornou-se possível graças à descoberta da enzima transcriptase reversa em alguns vírus (retrovírus). Esta permite muitas estratégias da engenharia genética que serão vistas a seguir. Além da descoberta da enzima transcriptase reversa, também há a possibilidade de desenhar iniciadores *in vitro*.

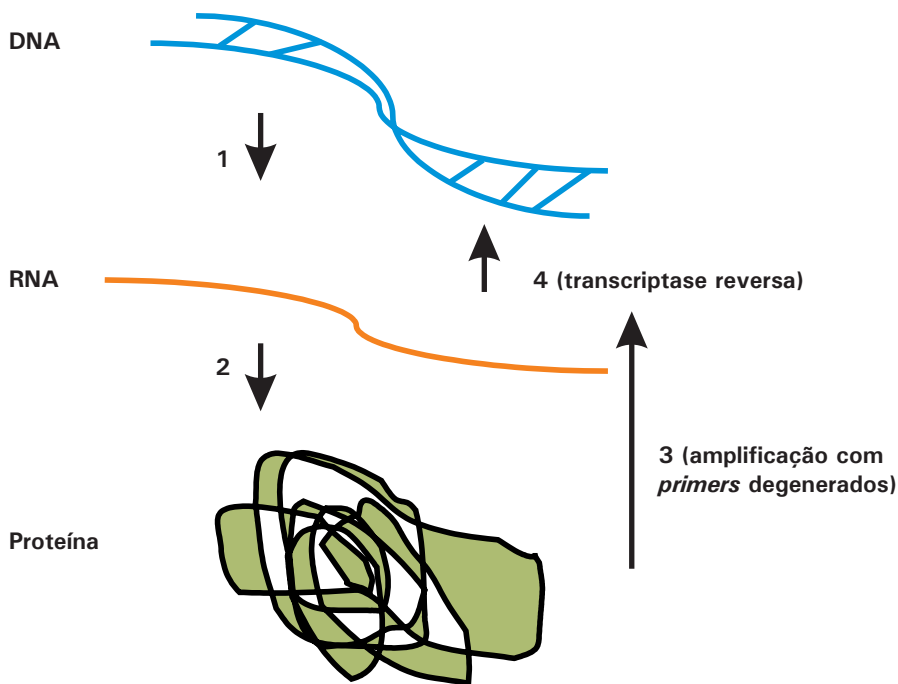


Figura 6. Desenho esquemático de estratégias de trabalho em Engenharia Genética.

Histórico

Até o século 18, a biologia estudava basicamente a relação dos seres vivos com a natureza. Essa época destacou-se pelas primeiras observações de células vivas. Havia grande questionamento de como estavam organizados morfologicamente os seres vivos. Nessa época, os nomes que se destacaram foram Leenwenhoek e Hooke por seus trabalhos de Microscopia. Além desses autores, Lammarck, com seus trabalhos, começava a questionar-se a respeito da evolução das espécies.

No século 19, Charles Darwin consolida a teoria da evolução dizendo que os seres vivos evoluem de acordo com a seleção natural do ambiente onde, os mais adaptados sobrevivem em detrimento dos menos adaptados. Nesse século, apareceram também grandes personalidades como Louis Pasteur e Gregor Mendel. O primeiro, bioquímico, confirmou a presença de seres vivos invisíveis (microrganismos) demonstrando o princípio em que estava baseado os

processos de putrefação. Com seus estudos, a comunidade científica abandonou definitivamente a teoria de origem da vida baseada na “geração espontânea”. Louis Pasteur contribuiu, também, com os processos até hoje utilizados de assepsia, tanto em laboratórios de análises (utilizados hoje na cultura de tecidos e na biologia molecular) quanto em hospitais (salas de cirurgia, unidades de tratamento intensivo). Mendel ficou conhecido como o pai da genética. Realizou ensaios com ervilhas e descreveu que os caracteres morfológicos (cor das pétalas, textura da semente) são herdadas pelos descendentes seguindo leis bem definidas. Assim, elaborou duas leis, que são primordiais na genética até os dias de hoje: a da segregação e a da distribuição independente.

Somente no início do século 20 foi caracterizado o “material genético” no núcleo das células (cromossomas) e em 1944, Avery; MacLeod & McCarty, estudando cepas virulentas e avirulentas de *Streptococcus pneumoniae* descreveram que havia um “princípio transformador” que era passado da cepa virulenta para a avirulenta. Mais tarde, Hershey & Chase, em 1952, atribuíram aos ácidos nucleicos (DNA e RNA) esse “princípio transformador”.

Estudos bioquímicos para determinar a constituição dos ácidos nucleicos realizados principalmente por Chargaff e estudos de difração de Raios-X, realizados pelo grupo de Wilkins, foram decisivos para que, em 1953, Watson & Crick deduzissem a estrutura do DNA em α -hélice. Essa década também foi marcada por descobertas importantes como a enzima DNA polimerase I (Kornberg, 1956), os primeiros experimentos de controle da expressão gênica (Jacob & Monod, 195-), e a descrição da replicação semiconservativa e bidirecional do DNA (Meselson & Stahl, 1957; J. Cairns, 195-).

Na década de 1960, descreveu-se o RNA mensageiro como carreador da mensagem armazenada no DNA, expressa em proteínas no citoplasma. Na década de 1970, foram descobertas várias enzimas de restrição (endonucleases específicas), implementados avanços tecnológicos no estudo da bioquímica / biologia molecular como processos eletroforéticos de análises, desenvolvidas as técnicas de hibridação em colônias (Southern blotting) e os primeiros ensaios de clonagem. Em 1977, em função desse conhecimento prévio foi elaborada a técnica de seqüenciamento de DNA.

Tabela 2. Histórico das Principais Descobertas / Estudos de Bioquímica, Genética e Microscopia que permitiram o desenvolvimento da Engenharia Genética.

Ano	Pesquisador	Pesquisa - Descoberta
1632 - 1723	Leenwenhoek	Estudos de Microscopia e observação de células
1665	R. Hooke	Estudos de Microscopia – observação da cortiça
1744 -1829	Lamarck	Estudos de Evolução – Defendeu a tese da herança dos caracteres adquiridos por modificações do ambiente
1809 - 1882	Charles Darwin	Teoria da Evolução das Espécies
1822 - 1895	Louis Pasteur	Demonstrou a existência de microrganismos – Desenvolveu as bases dos processos de assepsia
1822 - 1884	Gregor Mendel	Considerado pai da genética – Descreveu as teorias da herança de caracteres genéticos
1833	vários	Descoberta das primeiras enzimas
1903	W. Sutton	Observou e descreveu os cromossomos no núcleo das células
1944	O. Avery; C. MacLeod; MacLyn; McCarty; F. Griffiths	Descobriram o DNA como o “princípio transformador” que carregava caracteres que se expressavam no fenótipo virulento (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
1952	A.Hershey; M.Chase	Descobriram os ácidos nucleicos (DNA e RNA) em vírus como os carregadores de mensagens genéticas
1953	Watson & Crick; E.Chargaff; Wilkin & Colbs	Dedução da estrutura do DNA em α -hélice
1956	A. Kornberg	Descoberta da enzima DNA polimerase I
195-	Jacob & Monod	Primeiros experimentos de Controle da Expressão Gênica por proteínas

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Ano	Pesquisador	Pesquisa - Descoberta
1957	Meselson & Stahl	Demonstraram que a replicação do DNA é semiconservativa
195-	J. Cairns	Demonstrou que a replicação do DNA é bidirecional originado em forquilhas
1960	-	Descoberta do RNA mensageiro
1970	vários	Descoberta das enzimas de restrição (nucleases específicas)
1973	Cohen & Boyer	Desenvolvem o primeiro experimento de DNA recombinante utilizando genes bacterianos
1975	Southern	Descreveu a técnica de hibridação em colônias e Southern blotting para detectar seqüências de DNA específicas, possibilitando o isolamento de genes individuais do genoma de organismos
1976	-	A hibridação molecular é utilizada para diagnose pré-natal de doença genética
1977	Sanger	Determinação da primeira seqüência de DNA (Bacteriófago ϕ X174)
1982	-	Produção de insulina humana por engenharia genética em bactérias para tratamento de diabetes (primeiro produto da biotecnologia moderna a ser aprovado pelos órgãos competentes dos Estados Unidos da América)
1985	K.B. Mullins	Descrição da técnica PCR
2000	(vários laboratórios no mundo)	Seqüenciamento Completo do Genoma Humano

Em 1985 foi descrita pela primeira vez a técnica de reação de polimerase em cadeia também conhecida como PCR. Assim, a biologia molecular e a engenharia genética já demonstravam seu alto potencial na identificação de doenças genéticas, produção de medicamentos (insulina em bactérias), testes de paternidade etc.

O início do século 21 é marcado pelo seqüenciamento completo do genoma humano. A perspectiva de trabalho em biologia molecular e engenharia genética é cada vez mais ampla. Talvez o maior questionamento da atualidade, seja objetivar os temas de pesquisa de forma que representem benefícios reais para a humanidade.

Ferramentas Técnicas da Engenharia Genética

Extração de Ácidos Nucléicos

A extração de DNA e RNA são as duas primeiras etapas técnicas aos posteriores estudos. Existem inúmeros procedimentos adotados para sua extração. Nas células animais são diferentes daqueles utilizados nas células vegetais. A principal diferença é a ruptura da parede celular que é uma etapa comum nas células vegetais e não na das células animais.

Para a extração do DNA, podem ser citados protocolos que utilizam o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) ou o brometo de cetil trietil amônio (CTAB). Esses procedimentos podem ser utilizados em pequena (minipreparações), média ou grande escalas. Os de pequena escala tendem a fornecer uma amostra mais suja (com presença de contaminantes fenólicos, proteínas, açúcares etc.). Em média e grande escala o DNA é purificado em gradientes de cloreto de cério ou em colunas de afinidade e são bastante puros. Porém, pode-se conseguir DNA com razoável pureza e quantidade para alguns experimentos de biologia molecular e engenharia genética em minipreparações. Ainda, os diferentes procedimentos de extração fornecem amostras que variam em peso molecular. Dependendo da finalidade ou do estudo, é necessário obtenção de DNA genômico de alto peso molecular ou um pouco mais fragmentado. A fragmentação do DNA genômico é causada pela ação dos agentes utilizados no processo de extração e, alguns deles, apresenta maior ação lesiva. Essa lesão também pode estar relacionada ao tipo de tecido utilizado. Apesar de determinado grau de fragmentação, o DNA extraído para

análises de engenharia genética ainda tem um peso molecular elevado (80 – 150 KB). Em geral, o DNA genômico obtido nos diversos procedimentos deve ter uma pureza razoável e não deve estar degradado.

Basicamente os protocolos de extração do DNA de células vivas apresentam as seguintes etapas:

1. Ruptura da parede celular (células vegetais) e membrana plasmática (todas as células). Nos tecidos vegetais inicia-se por meio de maceração do tecido congelado em gral & pistilo. A ruptura da membrana plasmática, é feita com a utilização de detergentes como o SDS e o CTAB;
2. Extração de proteínas. Com a ruptura da membrana plasmática, saem para o meio extracelular todos os componentes intracelulares como DNA, RNA, proteínas, polissacarídeos e organelas. As organelas e os restos celulares (membranas, debris) são eliminados por meio de centrifugação em velocidades de 16.000 X g. Como são mais pesadas, tendem a se precipitar enquanto as moléculas de DNA, RNA e proteínas permanecem no sobrenadante. As proteínas são removidas por agentes tais como o fenol, o clorofórmio e o álcool isoamílico. Esses agentes desnaturam as proteínas que tendem, também, a precipitar em soluções aquosas. Em seguida, as amostras são novamente submetidas à centrifugação;
3. Precipitação do DNA em solução aquosa com agentes desidratantes (sais e álcoois). Nessa fase, geralmente, são utilizados álcoois e os mais freqüentes são o isopropanol e o etanol na presença de sal. Os sais realizam um efeito precipitante do tipo *salting out* parecido com aquele que ocorre com soluções de proteínas. Os principais são: o cloreto de sódio, o acetato de sódio e o cloreto de amônio;
4. Degradação do RNA residual. O RNA restante nas amostras de DNA genômico pode ser eliminado pela ação de ribonucleases (RNases) que o degradam. A presença de RNA nas amostras interferem em sua quantificação espectrofotométrica, bem como no processo de amplificação gerando fragmentos amplificados inespecíficos;

Na extração de RNA, algumas medidas adicionais devem ser tomadas tendo em vista que essa molécula é mais instável que a do DNA. Essa molécula pode ser facilmente degradada pela ação de RNases e assim não pode ser utilizada em

nenhuma análise. A principal causa da degradação da molécula de RNA é a presença de contaminação com RNases em vidraria e soluções. Essas enzimas são muito estáveis mesmo quando submetidas a altas temperaturas que são normalmente desnaturantes para outras proteínas. Ainda que se alterem, ao término do aquecimento podem retornar à sua estrutura tridimensional de enzima ativa. Um dos únicos agentes que garante a desnaturação irreversível da RNase é o dietilpirocarbonato (DEPC). Assim, toda a vidraria e solução usadas nas extrações de RNA devem ser previamente tratadas com este produto. Além disso, durante a manipulação deve-se utilizar luvas, pois, a RNase pode estar presentes nas mãos do operador.

Os procedimentos prévios são análogos aos empregados na extração do DNA. Uma das principais diferenças é que, em geral, o RNA é precipitado com soluções de acetato de lítio ou cloreto de lítio. Esses agentes permitem uma precipitação diferencial de RNA em relação ao DNA, de forma que a amostra resultante, em geral, obtida por centrifugação, será enriquecida em RNA. Porém, se a análise prescinde da eliminação completa de DNA residual, faz-se necessário o tratamento posterior da amostra com desoxiribonuclease (DNase) livre de RNase.

Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma ferramenta metodológica muito utilizada na biologia molecular e na engenharia genética. Aplica-se em muitos trabalhos tais como: amplificação de seqüências gênicas total ou parcialmente homólogas a uma conhecida, identificação genotípica (*fingerprinting*), testes de paternidade, análises de dissimilaridade entre genomas, caracterização de germoplasma, mapeamento genético, seleção diferencial de genes expressos em sistemas entre outros.

A PCR é uma técnica que imita a duplicação do DNA *in vitro*. Ela é realizada em três etapas fundamentais: desnaturação da dupla fita do DNA, hibridação de oligonucleotídeos iniciadores e polimerização das novas cadeias de DNA. A primeira é realizada à temperatura de 92 °C a 95 °C para separar completamente a dupla cadeia (quebra das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas). A segunda é variável de acordo com a seqüência do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) que pode ser específico ou não. Assim, a temperatura de anelamento do *primer* pode variar de 35 °C a 52 °C ou mais conforme T_m (temperatura de *melting*) que depende da sua seqüência. Finalmente submete-se à temperatura de 72 °C, ótima para o funcionamento da DNA polimerase (Taq polimerase ou Pfu).

Essas etapas são repetidas em ciclos de 30 a 40 vezes, garantindo uma amplificação em progressão geométrica do DNA a partir da quantidade inicial colocada no ensaio (da ordem de 25 ng de DNA). Esse mecanismo é automatizado em máquinas denominadas termocicladoras. Somente foi possível sua concepção e utilização depois do descobrimento da Taq polimerase, resistente a temperaturas altas tais como as adotadas na desnaturação da molécula do DNA. A PCR é uma metodologia que tem contribuído largamente com o avanço das pesquisas na área da biologia molecular.

Eletroforese em gel

A eletroforese é um procedimento básico de todas as análises com ácidos nucleicos. Essa metodologia baseia-se no fato de que essas moléculas apresentam carga elétrica negativa quando solúveis em soluções aquosas. Essa carga é fornecida pela ionização dos grupamentos de fosfato presentes em suas moléculas. Essas moléculas podem migrar em um suporte sólido (agarose ou poliacrilamida) submetido a um campo elétrico (condição com diferença de potencial elétrico). Assim, os ácidos nucleicos migram em direção ao pólo positivo e se separam dependendo do peso molecular que contêm. Moléculas pequenas tendem a migrar com velocidades maiores do que as grandes.

A eletroforese dá suporte a outras técnicas tais como: clonagem e subclonagem de fragmentos gênicos; construção de bibliotecas genômicas e de DNA complementar (cDNA); análises de *southern blot* e *northern blot*, técnicas baseadas na amplificação via reação de polimerase em cadeia (PCR), no controle dos procedimentos da extração do DNA e RNA; em estudos genéticos de caracterização de germoplasma, mapeamento genético.

Além dos processos eletroforéticos de ácidos nucleicos, também são conhecidos processos eletroforéticos de análises de proteínas. Proteínas podem ser separadas em suportes como o papel, o acetato de celulose, o amido, o ágar, a agarose e a poliacrilamida. Em corridas unidimensionais ou bidimensionais ou, em separações por peso molecular ou carga elétrica.

Análises moleculares

Sistemas de Restrição e Metilação

Esses sistemas são operados por enzimas chamadas de enzimas de restrição e metilases. A restrição / metilação pode ser operada por uma mesma enzima como também por enzimas distintas.

Os sistemas de restrição/metilação foram caracterizados pela primeira vez, em bactérias, na década de 1950. Esse sistema, nesses organismos, têm função de defesa contra vírus invasores (bacteriófagos).

As enzimas de restrição são endonucleases que cortam DNA em sítios determinados chamados de palíndromos. Palíndromos são seqüências de nucleotídeos idênticas no sentido 5' → 3' e seu anti-sentido. Cada enzima de restrição tem um sítio específico. Essas enzimas podem também ter função de metilases. Quando isso ocorre, ela adiciona um radical metila no sítio onde a porção da enzima com função de restrição atua. Na presença desse radical, a parte da enzima com função de restrição não consegue atuar. As metilases também podem aparecer como enzimas independentes (sem função de restrição associada). Ou seja, enquanto as enzimas de restrição cortam o DNA do vírus invasor, as metilases metilam as bases presentes no DNA da própria bactéria impedindo sua restrição.

O sistema restrição/metilação em bactérias é aquele conhecido como de tipo I. Além desses, foram também caracterizados os de tipo II e III. O sistema de tipo II é aquele mais utilizado em engenharia genética.

Existem muitas enzimas de restrição hoje conhecidas. As mais comuns são a Eco RI, Hind III, Bam H1, Pst I etc (vide apêndice 2). Essas enzimas são consideradas verdadeiras “tesouras” moleculares, pois podem ser utilizadas para fragmentar especificamente os genomas de maneira que possam ser facilmente “colocados” em outros (clonagem). Porém, para isto é necessária outra enzima chamada de DNA ligase.

Algumas aplicações das enzimas de restrição na biologia molecular e na engenharia genética são: análises em RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para, por exemplo, diagnósticos de doenças genéticas e mapeamento genético, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) para análises de divergência genética entre genomas e também mapeamento genético, clonagem e subclonagem de fragmentos para seqüenciamento, estudos de expressão gênica, transformação de plantas.

Enzimas Modificadoras: polimerases, ligases

Além das enzimas de restrição, a engenharia genética também utiliza outras muito úteis em diversos processos. Entre muitas, podemos citar: DNA ligase,

DNA polimerase I, polinucleotídeo quinases, fosfatases, transcriptase reversa. A DNA polimerase I é a enzima que polimeriza novas cadeias de DNA. Existem variações de DNA polimerase como a Taq polimerase, a Pfu e o fragmento de klenow. Essas últimas são muito úteis na reação de PCR. A DNA ligase, como o próprio nome diz, é uma enzima que tem função de “ligar” dois fragmentos de DNA fazendo ligações fosfodiéster entre eles. As polinucleotídeo quinases transferem um grupamento fosfato do adenosina trifosfato (ATP) para o grupo 5’ hidroxil do nucleosídeo da ponta do fragmento de DNA. Essa enzima também pode ser utilizada para fazer marcação radioativa nesse nucleotídeo (da ponta), com P marcado. As fosfatases desfosforilam o último nucleotídeo depois da restrição com enzima. Essa estratégia é utilizada em clonagens direcionadas para evitar a religação do vetor. A transcriptase reversa é aquela enzima que consegue polimerizar a cadeia de DNA a partir de RNA-m. Ela consegue fazer cadeia de DNA, utilizando-se de um *primer* iniciador do tipo oligo dT que se associará à cauda de poli-A presente nos RNA-m dos eucariotos. A transcriptase reversa é uma enzima muito importante para todas as estratégias que envolvem seleção de genes a partir da transcrição gênica.

Clonagem Molecular

O que é afinal clonagem molecular? Clonagem é uma estratégia que se pode dizer “chave” da engenharia genética. Significa “cortar” determinada sequência gênica de um genoma e “inseri-la” em outro DNA que é chamado vetor e é, em geral, um plasmídeo ([Figura 7](#)). Esse processo de corte seguido de nova inserção somente foi possível realizar depois do conhecimento das enzimas de restrição e das ligases respectivamente.

O gene ou fragmento de DNA a ser retirado do genoma pode ser obtido por meio de clones em bibliotecas de DNA, cDNA (DNA complementar) ou ampliações específicas obtidas em reação de PCR. O novo DNA no qual o gene será inserido é chamado de vetor de clonagem e pode ser um plasmídeo, cosmídeo, bacteriófago, phagemid ou um cromossoma bacteriano artificial (BACS). A escolha de cada um deles depende basicamente do tamanho do fragmento de DNA a ser inserido. Plasmídeos são DNAs pequenos (~ 3 Kb) que podem ser naturalmente encontrados em bactérias. Foram descobertos, por carrear genes que tornam as bactérias portadoras, resistentes a um dado antibiótico. Cosmídeos e phagemídeos são variações construídas em laboratório que permitem a clonagem de fragmentos maiores que contêm outros genes que servem de controle do processo de transformação de bactérias. Além de genes

de controle (em geral resistência a antibióticos) esses vetores têm um sítio de policlonagem com vários sítios de restrição de enzimas e seqüências iniciadoras. Estas permitem o rápido seqüenciamento do fragmento clonado. Os phagemídeos são DNAs de bacteriófago, mas que podem converter-se em plasmídeos no interior de bactérias, por meio de dupla infecção viral (phagemídeo e fagos “helper”). São muito utilizados na construção de bibliotecas de cDNA e facilitam a etapa da subclonagem do fragmento clonado em fago inicial para plasmídeo. Em plasmídeos e phagemídeos, podem-se inserir fragmentos de até 5 Kb; em cosmídeos, fragmentos maiores, em bacteriófagos ao redor de 20 Kb e os BACS são aqueles mais apropriados para inserção de grandes fragmentos de DNA (~ 100 Kb). Esses últimos são especialmente utilizados na construção de bibliotecas de DNA e outras distintas finalidades. Depois do corte, inserção do fragmento (ou gene) no vetor, este é colocado no interior de células bacterianas por metodologias diversas (utilizando-se o cloreto de cálcio, eletroporação, choque térmico etc) e, nessas células, podem-se multiplicar produzindo muitos plasmídeos que contêm o fragmento clonado (gene).

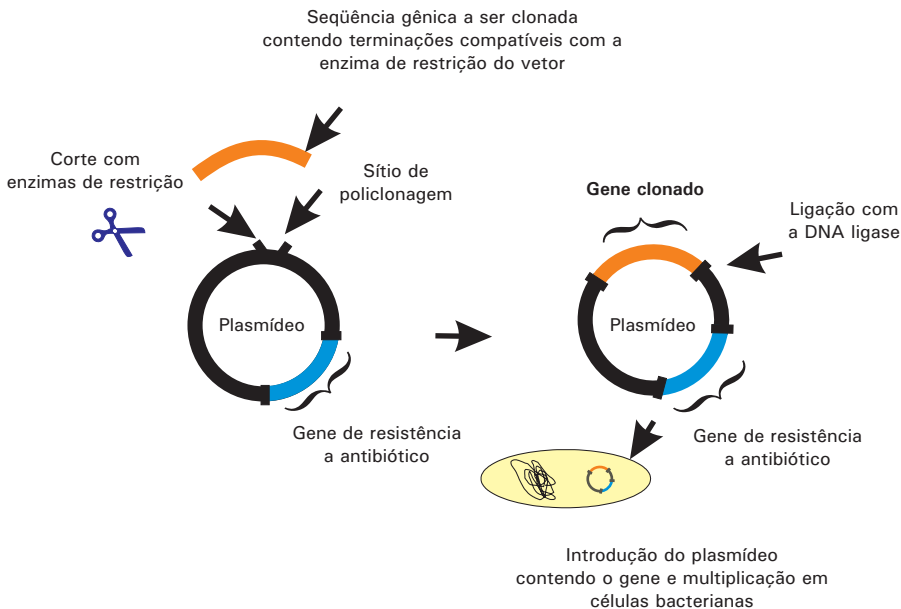


Figura 7. Esquema das etapas para clonagem molecular.

Assim, a clonagem permite que um organismo possa conter um gene que não está presente naturalmente no seu organismo e expressá-lo (ex. gene da insulina humana em bactéria). Porém, se o objetivo é integrar esse fragmento de DNA ou gene diretamente em seu genoma (ex. um organismo/tecido mais complexo), ainda são necessárias as técnicas de transformação estável de células ou tecido (animal ou vegetal).

Técnicas Básicas para caracterização de genes

Estas metodologias permitem conhecer os genes que estão associados diretamente a um dado mecanismo fisiológico de um tecido ou células. Existem muitas estratégias que podem ser utilizadas. Serão citadas aquelas de maior impacto nos estudos sobre genômica funcional com distintos objetivos.

Construção de Biblioteca genômica

Uma biblioteca genômica é o conjunto de todas as informações genético-moleculares de um ser vivo. Como se constrói uma biblioteca genômica? Para construí-la é necessário, em primeiro lugar, obter o DNA do organismo em questão de forma que ele esteja com alto grau de pureza e integridade. Os procedimentos adotados para extração desse DNA deverão ser, preferencialmente, aqueles em larga escala com purificação em gradiente de cloreto de cério. Depois da obtenção do DNA, a estratégia é digeri-lo com enzima de restrição de forma que se obtenha fragmentos entre 5 e 50 Kb serão selecionados para clonagens aqueles com 20 Kb de peso molecular aproximadamente. Esses fragmentos deverão ser clonados em vetores preparados a partir de DNA de bacteriófagos e posteriormente inseridos nas capas virais constituindo partículas virais contendo fragmentos de DNA genômico de um ser vivo. Portanto, uma biblioteca genômica consiste em um *pool* de partículas virais, cada uma, contendo um fragmento de DNA genômico de um dado ser. As bibliotecas de DNA são úteis para o isolamento de um gene específico para caracterização de sua sequência. Também são úteis em estudos de sequências do tipo microssatélites que podem ser utilizadas em estudos de caracterização de germoplasma ou testes de paternidade.

Construção de biblioteca de cDNA

Uma biblioteca de cDNA é um conjunto de sequências gênicas de um ser vivo que expressam-se em uma situação fisiológica específica. Como se constrói uma biblioteca de cDNA? Uma biblioteca de cDNA é obtida do *pool* de RNA-m expresso em uma célula ou tecido específico. A obtenção do cDNA é realizada a

partir do RNA-m (que serve de molde) pela polimerização da primeira fita do DNA pela enzima transcriptase reversa e um iniciador do tipo oligo dT e, a segunda fita é polimerizada pela DNA polimerase I. Uma vez formada a sequência de cDNA procede-se à clonagem dela em um vetor que pode ser um cosmídeo, um DNA de bacteriófago ou phagemídeo. Os cosmídeos, contendo sequências de cDNA, são introduzidos em bactérias ou se o vetor é um DNA de bacteriófago ou phagemídeo, ele é inserido em uma capa protéica viral. Assim, uma biblioteca de cDNA constitui um *pool* de bactérias ou partículas virais que contém as sequências de cDNA, relativas a RNAs-m expressos em células ou tecidos específicos. As bibliotecas de cDNA são úteis para caracterizar sequências de genes que são especificamente expressas em células.

Seqüenciamento de DNA

A técnica de seqüenciamento de DNA é utilizada principalmente para conhecer a sequência de bases nitrogenadas correspondente a um gene. Na obtenção de clones específicos, tanto de bibliotecas genômicas quanto de bibliotecas de cDNA, o seqüenciamento é a técnica subsequente. Existem várias metodologias para seqüenciar cadeias de DNA: método químico, dideoxi com marcação radioativa, método dideoxi com marcação fluorescente etc. O método mais utilizado hoje é o de dideoxi com marcação fluorescente automatizado. O que se faz é amplificar a sequência que se quer estudar utilizando-se misturas contendo cada uma um dos dNTPs (A, T, C, ou G) e, nessa mistura, além do nucleotídeo normal também há um desses (A ou T ou C ou G) do tipo dideoxi (contendo duas hidroxilas na pentose) que impossibilita a ligação de um novo nucleotídeo a ele. Nesse ponto da amplificação, a cadeia do DNA é interrompida. Como há uma competição entre dNTP dideoxi e o normal o ponto de polimerização é parado em momentos distintos e no produto final da reação conseguem-se fragmentos de diferentes tamanhos. Podem ser utilizadas duas formas de realizar essa reação: a primeira é aquela em que se adiciona um iniciador contendo a marcação fluorescente (tetrametilrodamina) em quatro tubos que contêm, cada um, um dos nucleotídeos dideoxi e os outros normais. A segunda é feita adicionando-se cada um dos quatro nucleotídeos contendo um com uma marcação fluorescente diferente (fluoresceína; NDB – 4 cloro, 7-nitrobenzeno, 2-oxal-diazol; tetrametilrodamina e o vermelho do Texas) mais o nucleotídeo dideoxi adequado em quatro reações separadas. Assim, para cada sequência estudada, realizam-se quatro reações de PCR que são analisadas em gel de eletroforese onde os fragmentos constituídos são revelados por seu tamanho molecular graças à marcação fluorescente (diferente). Da segunda maneira, pode-se

correr as amostras em um único *slot* ou pocinho do gel já que os fragmentos estão com marcações diferentes. O resultado final é organizado seqüencialmente em computador dando o produto que é a seqüência correta das bases que compõe o gene ou seqüência expressa. O seqüenciamento automatizado pode fornecer informações de seqüências de até 1 kb por reação. Dessa maneira, os modernos laboratórios que trabalham com projetos GENOMA conseguem seqüenciar todo o código genético de um ser vivo. Essa técnica é hoje em dia considerada de grande impacto, pois promove enorme acúmulo de informações científicas.

Técnicas para estudo de caracterização e expressão de genes

Southern blotting

Análise em *Southern blotting* constitui uma estratégia tecnológica, no qual se reconhecem seqüências de DNA iguais ou semelhantes em genomas. Para a análise, é necessário obter DNA (s) genômico (s) e pelo menos uma seqüência – aquela que se quer investigar a presença no (s) genoma (s). Essa seqüência é, em geral, um gene clonado e caracterizado.

Para realizar a análise em *Southern blotting* procede-se ao seguinte esquema de trabalho:

1. Extração de DNA genômico que se quer investigar, puro e livre de RNA residual;
2. Digestão completa com uma enzima de restrição. Em geral, utiliza-se a EcoRI ou HindIII, mas pode ser também outra de corte freqüente;
3. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%;
4. Transferência dos fragmentos de DNA resultantes da digestão e separados no gel para uma membrana de nylon. Essa etapa pode ser realizada por capilaridade durante a noite ou eletricamente em aparatos próprios por algumas horas;
5. Desnaturação da cadeia do DNA com solução de hidróxido de sódio, ácido clorídrico e tampão;
6. Ligação irreversível dos fragmentos de DNA transferidos do gel para membrana de nylon. Esse processo é comumente chamado de *crosslinking* e

pode ser realizado em temperaturas altas como 80 °C por duas horas ou sob ação ultravioleta durante alguns segundos ou minutos;

7. À membrana de nylon contendo fragmentos de DNA genômico associados é adicionada uma solução chamada de hibridação que contém tampão Tris, NaCl, leite, formamida, polivinilpirrolidona (PVP) em sacos de plástico ou pequenos reservatórios e submetidos a 42 °C a 65 °C (depende da homologia do DNA e do genoma, por no mínimo duas horas. Essa etapa é chamada de pré-hibridação);
8. Prepara-se o fragmento de DNA (gene) que se quer investigar, sua presença ou ausência no determinado genoma. Esta é realizada de forma que o fragmento torna-se marcado de alguma maneira (radiativamente, com componentes luminescente ou fluorescente). Esse procedimento é chamado de “preparo da sonda” e pode ser realizado com auxílio de um grande número de possibilidades obtidas em “kits” comerciais;
9. Hibridação do DNA fixado na membrana de nylon com o fragmento marcado (sonda). Essa etapa é realizada na mesma solução de hibridação descrita na mesma temperatura da pré-hibridação por um tempo de pelo menos 12 horas;
10. Lavagem da membrana de nylon com soluções contendo Tris e SDS em concentrações e temperaturas variáveis. A variação da concentração e da temperatura será importante para uma lavagem mais estridente ou menos estridente. Concentrações e temperaturas altas devem ser utilizadas sempre quando se quer identificar um fragmento com grande homologia com o DNA genômico em estudo. Se, no entanto, investiga-se a presença de um gene com uma sonda não homóloga realiza-se uma lavagem pouco estridente (baixa concentração salina) como em baixa temperatura. Na prática, esses parâmetros devem ser obtidos por tentativa e erro.
11. Secagem da membrana de nylon e exposição a filmes de Raios-X (sondas marcadas radiativamente ou luminescentes) e análise após revelação do filme em um aparelho que detecta fluorescência se for o caso.

Hibridização subtrativa e *Differential Display*

Essas técnicas objetivam basicamente a seleção de genes que são expressos diferencialmente em tecidos ou células e tem significado fisiológico para o organismo. Fundamenta-se na seleção dos genes de importância em um dado

sistema, descartando-se aqueles que são chamados constitutivos nas células ou tecidos. Por exemplo, durante o processo de defesa de plantas a patógenos, sabe-se que é induzido grande número de genes. No entanto, nesse tecido as células infectadas continuam a ser expressos genes relacionados às atividades básicas (fotossíntese, produção de energia etc.).

A hibridação subtrativa é uma técnica que engloba a construção de biblioteca de cDNA, *Southern blotting* diferenciado (hibridação em colônia), seqüenciamento de cadeias de DNA e análise de homologia em banco de dados. Depois da construção de uma biblioteca de cDNA que contenha as seqüências expressas, ela é plaqueada em meio nutritivo. Utilizam-se células bacterianas infectadas pelo vetor bacteriófago com seqüências de cDNA da biblioteca ou, células bacterianas que contenham vetores, plasmídeos ou cosmídeos, com os cDNAs clonados. As colônias (bactérias) ou placas (vírus) são transferidas para membranas de nylon por algum tempo. Depois são tratadas com solução de hidróxido de sódio, ácido clorídrico e tampão, para desnaturar as moléculas de DNA (abrindo a dupla cadeia). As moléculas de cDNA contidas nas colônias bacterianas ou placas virais são ligadas irreversivelmente, sendo submetidas à pré-hibridação e hibridação (etapas similares ao método do *Southern blotting*). A etapa de hibridação nessas colônias, nesse caso, faz-se com dois tipos de sondas. Uma proveniente do *pool* de RNAs-m (cDNA) expressos na situação em estudo (ex. estresse de plantas) e outra em condições normais do tecido (*pool* de cDNAs constitutivos, normais da planta). No primeiro caso, usa-se membrana que contém o DNA das colônias e, no segundo, com uma membrana que é réplica da primeira. Depois da exposição das membranas a um filme de Raios-X, analisa-se a expressão diferencial de colônias positivas na membrana 1 em relação a sua réplica (membrana 2). As colônias constantes da primeira membrana que hibridaram com cDNAs presentes na situação de estudo e não hibridaram com aquelas presentes na condição normal, são selecionadas para serem purificadas, seqüenciadas e analisadas em banco de dados. Essas seqüências têm uma enorme chance de constituírem genes expressos na situação de estudo. Para a etapa de análise de seqüências em banco de dados, existem muitas *homepages* com programas que realizam análises em seqüências de DNA, traduzem essa seqüência para as possíveis cadeias polipeptídicas, com padrões de início de transcrição, tradução, *splicing* sítios de fosforilação. Essa etapa envolve a utilização da bioinformática, bastante utilizada pelos grupos envolvidos em projetos de seqüenciamento de genomas.

O *differential display* tem o mesmo fundamento da hibridação subtrativa, no entanto, apresenta algumas vantagens, pois, a seleção faz-se diretamente em géis de poliacrilamida comparando-se o padrão diferencial de amplificação das amostras em reação de polimerase em cadeia. Para empregar a metodologia, procede-se à extração de RNA-m nas duas amostras diferentes. Essas amostras de RNA-m devem estar puras e totalmente livres de DNA residual. Depois dessa obtenção, faz-se a primeira fita do cDNA com a utilização de um *primer* ou de poli dT que vai parear com a cauda de poli A presente nos RNA-m de células eucarióticas e a enzima transcriptase reversa. A segunda fita é sintetizada em seguida utilizando-se a enzima DNA polimerase e um *primer* de sequência ao acaso que contém, todavia, dois nucleotídeos conhecidos. As duas fitas são marcadas por meio de um nucleotídeo radioativo. O mesmo *primer* deve ser usado nas amostras que contêm padrão de expressão gênica diferentes. O *pool* de fragmentos amplificados é analisado em um gel de poliacrilamida + uréia, seco e exposto a um filme de Raios-X (auto-radiografia). Depois de determinado tempo, o filme é revelado e analisa-se o padrão diferencial de expressão encontrado. As metodologias decorrentes dessa análise incluem: *Northern blotting* confirmatório, eluição, amplificação, clonagem, seqüenciamento e análise da homologia do fragmento selecionado. Se a homologia encontrada merecer outros testes, procede-se à seleção da sequência codante ou do gene completo utilizando-se uma biblioteca de cDNA ou genômica, como também a partir de desenho de *primers* homólogos à sequência resgate do gene empregando-se o sistema 5' 3' RACE e seqüenciamento completo da sequência obtida. Esses outros estudos podem servir para estudo da regulação do gene, expressão tecido ou órgão específico, análise da presença desse gene em outros genomas, transformação gênica etc.

Northern blotting

Análise em *Northern blotting* é uma estratégia tecnológica na qual se caracterizam a presença e o nível de expressão de genes em determinado tecido ou células. Para a análise, é necessário obter o RNA-m presente no tecido e/ou célula e a sequência gênica que se quer estudar sua expressão. O RNA-m pode ser obtido de diferentes tecidos e/ou células em diferentes tempos de desenvolvimento.

Para realizar a análise procede-se ao seguinte esquema de trabalho:

1. Extração do RNA total do tecido e/ou célula que se quer investigar a expressão de um gene. Essa amostra de RNA deve estar, de preferência, pura e livre de DNA residual;

2. Separação eletroforética em gel de formaldeído a 1,5%;
3. Transferência dos RNAs separados no gel para uma membrana de nylon. Essa etapa pode ser realizada por capilaridade durante a noite ou eletricamente em aparatos próprios por algumas horas;
4. Ligação irreversível (*crosslinking*) dos RNAs transferidos do gel na membrana de nylon;
5. A membrana de nylon contendo os RNAs separados por eletroforese e associados é adicionada a uma solução chamada de solução de hibridação como descrito na análise em *Southern blotting* (etapa de pré-hibridação). As demais etapas que se seguem na análise em *Northern blotting* são as mesmas descritas na análise em *Southern blotting*.

Análises em Microarranjos

Microarranjos de DNA ou cDNA são as seqüências representativas de uma biblioteca genômica ou de cDNA que são colocadas sobre um suporte e, por meio de hibridações específicas com seqüências correspondentes à primeira fita de cDNAs, ou fragmentos de DNA pode-se investigar o padrão de expressão gênica e a presença ou a ausência da expressão de um gene em determinado sistema. Por exemplo, imaginemos um estudo que objetive investigar quais são os genes que se expressam em determinada etapa do desenvolvimento de um ser. Nessa etapa determinada, são isolados os RNA-m presentes no tecido ou células que servem de molde para preparar uma fita de DNA marcada (por exemplo por fluorescência). Essa fita é uma sonda ou sinal. Quando colocada sobre o suporte que contém as seqüências provindas de uma biblioteca genômica, as sondas irão hibridar com aquelas seqüências que lhes são complementares. Assim, com o isolamento das seqüências complementares do suporte e seu seqüenciamento, podem-se conhecer os genes que são expressos naquele tecido ou célula, naquela determinada etapa do desenvolvimento. Em geral, a marcação da sonda utilizada é fluorescente e, como existe mais de um tipo de composto fluorescente associado à sonda, geralmente, analisa-se mais de uma etapa de desenvolvimento ou situação fisiológica. Assim, sabe-se quais os genes expressos em distintas etapas de desenvolvimento.

A análise em microarranjos tende a superar, com o tempo, as análises em *Southern blotting* e *Northern blotting* tradicionais.

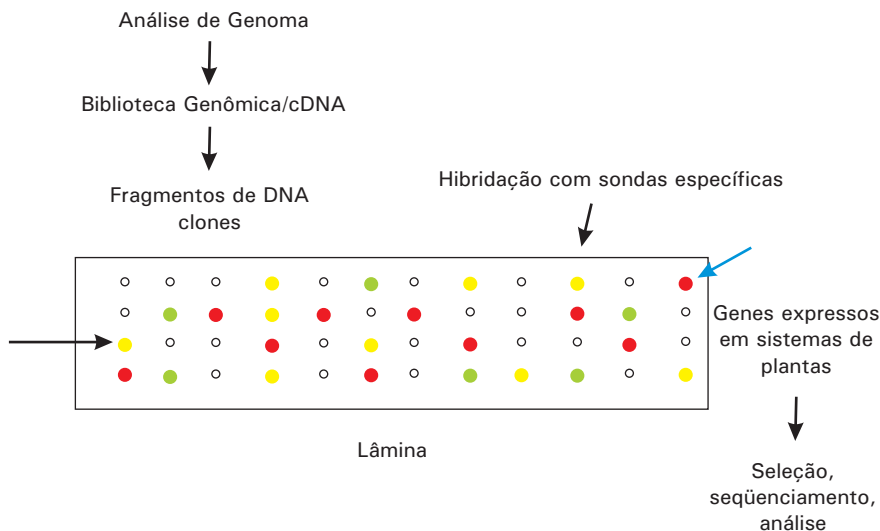


Figura 8. Esquema geral da análise em microarranjos.

Aplicações da Engenharia Genética

Agricultura

São inúmeras as aplicações da engenharia genética na agricultura. Podem estar envolvidas nas diversas etapas do ciclo produtivo de uma cultura de importância agrônômica. Por exemplo, a engenharia genética pode auxiliar a seleção de plantas superiores em um programa de melhoramento, em relação a características como resistência a doenças, pragas e fatores abióticos. Para isto, são necessários estudos de caracterização de genes expressos nesses sistemas, seguidos da análise de sua presença em determinada progênie. Nessa fase, também pode-se estudar como estes genes segregam na progênie. Para conseguir essa detecção, somente é necessário amplificar a seqüência do gene de interesse em reação de PCR nos diferentes indivíduos e assim selecionar aqueles que o contém. A engenharia genética pode atuar em fase de manejo das culturas, em especial, quando se pensa no manejo de pragas e controle biológico. O uso de engenharia genética permite o maior conhecimento da fisiologia das pragas e patógenos à nível da genética e, assim pode ser usado na elaboração de estratégias de controle biológico. Para atingir esses objetivos, são necessários estudos preliminares de caracterização. Na fase de comercialização de um produto, a engenharia genética pode beneficiar uma cultura permitindo a seleção

de genótipos que produzem frutos com vida longa de prateleira. Esse aspecto é muito importante na fruticultura, uma vez que nosso país tem um enorme potencial para o mercado interno e exportação. A engenharia genética também pode auxiliar em fases de processamento, por exemplo, selecionando variedades de frutas com maior teor de aroma específico (busca-se nesse estudo a caracterização dos genes envolvidos nesses sistemas). Também pode ser utilizada, uma abordagem parecida, na horticultura e na olericultura.

Outra potencialidade da engenharia genética, auxiliada pela técnica de cultura de tecidos *in vitro* é a produção das plantas transgênicas. Essa talvez seja a aplicação mais controversa da atualidade. Plantas resistentes a uma doença ou a uma praga que ocasiona restrições de produção, resistentes ao alumínio trocável do solo, resistentes a herbicidas, produtoras de elementos protetores (como anticorpos, servindo como alimentos protetores), enriquecidas em proteínas, frutas com menor perecibilidade são algumas das possibilidades da transgenia. Em geral, a produção de plantas transgênicas envolve questões relacionadas com propriedade intelectual e *royalties*, assim os países detentores de mais tecnologia deste tipo estarão em posição privilegiada no futuro. No entanto, é necessário que se estabeleçam discussões e elaborem-se critérios claros em âmbito mundial, na distinção de estratégias biotecnológicas de produção de transgênicos, bem como seu controle, de forma que esta não venha a acarretar em perda do patrimônio biológico natural do planeta. Além disso, são necessários controles e testes de segurança alimentar e ambiental.

Pecuária

Na pecuária, a engenharia genética também representa uma ferramenta que pode contribuir gerando benefícios. Como no caso da agricultura, a engenharia genética permite estudos genéticos e moleculares dos principais patógenos dos diversos rebanhos (leiteiro, suíno, equino etc). Esses estudos podem propiciar ainda estratégias de controle biológico e produção de vacinas DNA (terapia gênica).

Pode auxiliar igualmente os programas de melhoramento genético animal de forma a selecionar características gênicas específicas contidas em raças, em uma dada progênie, ou relacionadas a doenças genéticas. E, finalmente, fundamentar estudos de produção de animais transgênicos e a clonagem animal. Esses últimos aspectos, sem dúvida, os mais controversos e polêmicos, exigindo-se ainda, discussões éticas porque, em especial, a clonagem de animais, abre prerrogativas e estudos que podem subsidiar a clonagem humana.

Bibliografia Consultada

BINSFELD, P. C. Análise diagnóstica de um produto transgênico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 12, p. 16-19, 2000.

BIOSEGURANÇA. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n. 18, 2001.

CAIRNS, J.; STENT, G.; WATSON, J. D. (Ed.) **Phage and the origins of molecular biology**. New York: Cold Spring Harbor, 1966.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; CARVALHO, C. H.; VASCONCELOS, M. J. V.; PAIVA, E.; LOPES, M. A. Milho transgênico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 15, p. 42-46, 2000.

CORDEIRO, M. C. R.; GROSSI DE SÁ, M. F. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 10, p. 34-39, 1999.

CRICK, J. Split genes and RNA splicing. **Science**, Washington, DC, v. 204, n. 4390, p. 264-271, Apr. 1979.

CURI, R. A.; LOPES, C. R. Teste de paternidade em bovinos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 21, p. 40-45, 2001.

DANI, S. U. Terapia gênica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 12, p. 28-33, 2000.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. **Molecular cell biology**. 2. ed. New York: Scientific American Books, 1990. 1105 p.

DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 26, p. 32-37, 2002.

FELIX, J. M.; DRUMMOND, R. D.; NOGUEIRA, F. T.; ROSA JUNIOR, V. E.; JORGE, R. A.; ARRUDA, P.; MENOSSI, M. Genoma funcional. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 24, p. 60-67, 2002.

FRANCO, O. L.; MELO, F. R.; SILVA, M. C. M.; GROSSI DE SÁ, M. F. Resistência de plantas a insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 11, p. 36-40, 1999.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 589 p.

KORNBERG, A. **DNA replication**. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 223, p. 1-4, 1988.

LÁSARO, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Vacinas contra diarreia. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 3, n. 14, p. 28-32, 2000.

LASKEY, R. A.; EARNSHAW, W. C. Nucleosome assembly. **Nature**, London, v. 286, p. 763-767, 1980.

LEHNINGER, A. L.; **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1985. 725 p.

MOREIRA-FILHO, C. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Genoma clínico. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 162-167, 2000.

OJOPI, E. P. B.; NETO, E. D. Genes e câncer. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 27, p. 28-38, 2002.

PESQUERO, J. B.; MAGALHÃES, L. E.; BAPTISTA, H. A.; SABATINI, R. A. Animais transgênicos. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 27, p. 52-56, 2002.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 6. ed. São Paulo: Globo, 1997. 355 p.

ROJO, M. I. **La reacción en cadena de la polimerasa**: In: ROJO, M. I. ingeniería genética y transferencia génica. Madrid: Pirámide, 1999. p. 85-99.

SALZANO, F. M. Passado, presente e futuro da humanidade: o que a tecnologia nos promete ? **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 27, p. 40-47, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 417 p.

SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Bioscience Reports**, New York, v. 1, p. 3-18, 1981.

SOUZA JR., M. T. Mamão transgênico. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 13, p. 132-137, 2000.

VAZ JR., I. S. Vacina contra carrapato. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 13, p. 18-23, 2000.

Genetic Engineering: basic concepts, tools and applications

Abstract – *Basic concepts and methodologies concerning genetic engineering are presented in this review and is directed to people or professionals not familiarized to it. Moreover, it can be a document to clarify what is genetic engineering, the importance of its contributions to modern agriculture, medicine or livestock research and to support discussions on genetic research ethics. Covers information on structure of nucleic acids, types, functions and main processes such as DNA duplication, transcription and translation. Important methodologies are covered about DNA / RNA extraction, electrophoresis, PCR, nucleic acid libraries production, cloning, sequencing, gene characterization in connection to main historical events of genetic engineering. It emphasizes the most important applications in agriculture and livestock research.*

Index terms: genetic engineering, DNA, RNA, transgenic, molecular biology.

Apêndice 1. Código Genético - códons de aminoácidos para síntese de proteínas

Primeira Letra	Segunda Letra				Terceira Letra
	U	C	A	G	
U	Fenilalanina (Fen)	Serina (Ser)	Tirosina (Tir)	Cisteína (Cis)	U
	Fenilalanina (Fen)	Serina (Ser)	Tirosina (Tir)	Cisteína (Cis)	C
	Leucina (Leu)	Serina (Ser)	Final de Tradução	Final de Tradução	A
	Leucina (Leu)	Serina (Ser)	Final de Tradução	Triptofano (Trp)	G
C	Leucina (Leu)	Prolina (Pro)	Histidina (His)	Arginina (Arg)	U
	Leucina (Leu)	Prolina (Pro)	Histidina (His)	Arginina (Arg)	C
	Leucina (Leu)	Prolina (Pro)	Glutamina (Glu)	Arginina (Arg)	A
	Leucina (Leu)	Prolina (Pro)	Glutamina (Glu)	Arginina (Arg)	G
	Isoleucina (Ile)	Treonina (Tre)	Asparagina (Asn)	Serina (Ser)	U
	Isoleucina (Ile)	Treonina (Tre)	Asparagina (Asn)	Serina (Ser)	C
	Isoleucina (Ile)	Treonina (Tre)	Lisina (Lis)	Arginina (Arg)	A
	Metionina (Met)	Treonina (Tre)	Lisina (Lis)	Arginina (Arg)	G
G	Valina (Val)	Alanina (Ala)	Ácido Aspártico (Asp)	Glicina (Gli)	U
	Valina (Val)	Alanina (Ala)	Ácido Aspártico (Asp)	Glicina (Gli)	C
	Valina (Val)	Alanina (Ala)	Ácido Glutâmico (Glu)	Glicina (Gli)	A
	Valina (Val)	Alanina (Ala)	Ácido Glutâmico (Glu)	Glicina (Gli)	G

Apêndice 2. Algumas enzimas de restrição utilizadas em engenharia genética

Enzima	Seqüência Palíndromo/Sítio de Clivagem	Origem
<i>Acc</i> I	↓ 5' GTATAC 3' 3' CATATG 5' ↑	<i>Acinobacter calcoaceticus</i>
<i>Alu</i> I	↓ 5' AGCT 3' 3' TCGA 5' ↑	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>Apa</i> I	↓ 5' GGGCC 3' 3' CCCGG 5' ↑	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Bam</i> H I	↓ 5' GGATC 3' 3' CCTAG 5' ↑	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Bgl</i> II	↓ 5' AGATCT 3' 3' TCTAGA 5' ↑	<i>Bacillus globigii</i>
<i>Dra</i> I	↓ 5' TTTAAA 3' 3' AAATTT 5' ↑	<i>Deinococcus radiophilus</i> ATCC 27603
<i>Eco</i> R I	↓ 5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5' ↑	<i>Escherechia coli</i>
<i>Eco</i> R V	↓ 5' GATATC 3' 3' CTATAG 5' ↑	<i>Escherechia coli</i>

Continua...

Apêndice 2. Continuação.

Enzima	Seqüência Palíndromo/Sítio de Clivagem	Origem
<i>Hind</i> III	↓ 5' AAGCT 3' 3' TTCGA 5' ↑	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Hpa</i> I	↓ 5' GTTAAC 3' 3' CAATTG 5' ↑	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Kpn</i> I	↓ 5' GGTACC 3' 3' CCATGG 5' ↑	<i>Klebsiela pneumoniae</i>
<i>Mse</i> I	↓ 5' TTAA 3' 3' AATT 5' ↑	<i>Micrococcus species</i>
<i>Not</i> I	↓ 5' GCGGCCGC 3' 3' CGCCGGCG 5' ↑	<i>Nocardia ottidis-cavarium</i>
<i>Pst</i> I	↓ 5' CTGCAG 3' 3' GACGTC 5' ↑	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Sal</i> I	↓ 5' GTCGAC 3' 3' CAGCTG 5' ↑	<i>Streptomyces albus</i>
<i>Sma</i> I	↓ 5' CCCGGG 3' 3' GGGCCC 5' ↑	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Xba</i> I	↓ 5' TCTAGA 3' 3' AGATCT 5' ↑	<i>Xanthomonas badrii</i>