

# Genética e Biologia Molecular

## 7 Genômica e principais tecnologias utilizadas na transferência de DNA



### Roteiro da semana

- Genômica
- Como o genoma humano foi sequenciado
- Técnicas de Biologia Molecular
- Enzimas de restrição cortam o DNA em sequências específicas
- Plasmídeos, Vírus e Cromossomos artificiais (YAC) são usados como vetores para carregar sequências de DNA
- RNAm é convertido em DNAc por reações enzimáticas
- Bibliotecas de DNA genômico representam sequências completas de organismos
- Métodos de sequenciamento de DNA
- Genes podem ser sintetizados a partir de oligonucleotídeos
- A reação da Polimerase em cadeia amplifica regiões específicas de um DNA-alvo

## Início de conversa

O mundo da genética vem sofrendo grandes transformações com os avanços significativos que estão ocorrendo, em velocidade surpreendente, nas técnicas de biologia molecular.

O novo campo da genética molecular foi criado, levando à clonagem de genes e à caracterização de mutações responsáveis por diversas doenças genéticas. Técnicas de sequenciamento do DNA foram aprimoradas com a introdução de sequenciamento em larga escala, de análises de bioinformática das sequências completas de genomas, de estratégias de análise e avaliação desse volume enorme de informações geradas.



Assista ao vídeo sobre o [Projeto Genoma](#).

## Genômica

A genômica teve início com o desenvolvimento do sequenciamento em larga escala, a partir de 1980, e a implantação de estratégias de análise e avaliação desse volume enorme de informações geradas. Tornou-se possível, dessa forma, estabelecer estratégias de pesquisa envolvendo o conhecimento do genoma completo de um indivíduo. O volume de informações em larga escala levou ao desenvolvimento da bioinformática, com o uso de computadores potentes para que pudesse integrar e analisar esse gigantesco volume de informações simultaneamente.

### Como o genoma humano foi sequenciado

O projeto Genoma Humano (PGH) foi iniciado oficialmente em outubro de 1990, com previsão de finalização em 2005 e com um orçamento estimado em 3 bilhões de dólares. O objetivo principal era o de determinar a sequência dos 3 bilhões de pares de bases que compõem os 24 cromossomos do genoma humano (22 autossomos e os cromossomos sexuais X e Y), e identificar todos os genes que ele contém. O PGH, com fundos públicos começou sob a direção de James Watson, codescobridor da estrutura da dupla hélice do DNA, e resultou das iniciativas do DOE (Departamento de Energia) e NIH (Instituto Nacional da Saúde) dos EUA, que estabeleceram vários centros genômicos em universidades americanas com posterior alcance internacional. Grupos de pesquisadores de diversos países como a Inglaterra, França, Alemanha, Japão e Brasil se juntaram e um fundo público internacional foi investido no projeto Genoma Humano. Surgiu então um organismo de coordenação internacional chamado HUGO (Human Genome Organization), para sintonizar o trabalho e organizar o conhecimento adquirido em um banco de dados centralizado, o Genome Database. A missão do HUGO era facilitar e coordenar a iniciativa global de mapear, sequenciar e analisar funcionalmente o genoma humano, e promover a aplicação desses conhecimentos ao melhoramento da saúde humana.

O Brasil também deu sua cota de contribuição ao projeto, com iniciativas de pesquisadores brasileiros da USP, que clonaram genes para várias doenças genéticas. Uma iniciativa conjunta da FAPESP e diversas universidades levou ao sequenciamento do genoma da bactéria *Xilela fastidiosa*, que causa a doença dos laranjais, chamada amarelinho, e à criação do Projeto Genoma Humano do Câncer.

Foi também foco do programa abordar os aspectos éticos, legais e sociais envolvidos, pois, além da descoberta da posição de cada gene e sua composição, que seria valiosa

para diagnóstico e tratamento de muitas doenças, previa-se e temia-se o perigo do uso indevido das informações genéticas geradas.

Em meados da década de 1990, uma grande quantidade de dados de mapas físicos e genéticos humanos e murinos, bem como sequências de DNAC humanas, de bactérias e levedura foram disponibilizadas para a comunidade científica, mostrando a importância do projeto. Dessa forma, grande quantidade de dados de mapeamento físico e genético, bem como de sequências de DNA, começou a ser depositada nos bancos de dados e disponibilizada imediatamente para uso dos pesquisadores. Isto mudou significativamente a forma de conduzir pesquisas em genética.

Dois grupos independentes, um público e outro privado, competiram para sequenciar o genoma humano, e a sequência rascunho foi anunciada em 2000, por ambos, através de publicações nas revistas *Nature* (IHFSC) e *Science* (Celera). Apesar de ainda incompletos, estes continham a maior informação do genoma humano já noticiada. Um resultado surpreendente foi o menor número de genes encontrado, cerca de 30.000 a 40.000, quando se acreditava que os seres humanos teriam ao redor de 100.000 genes. Isto significa que a complexidade de uma espécie não é diretamente proporcional ao número de genes. A disponibilização desses dados gerou um avanço muito grande na localização de novos genes ligados a doenças mendelianas, facilitando muito o acesso à sequência e mapas genéticos.

Um grande problema que se impôs ao sequenciamento do genoma humano estava relacionado com a enorme quantidade de sequências repetitivas, que geraram um grande desafio técnico, por causa da dificuldade de seu sequenciamento. A presença de sequências repetitivas curtas AT ou CG, presentes em centenas de milhares no genoma humano, longas, dispersas ao longo do genoma em todos os cromossomos, causou grandes dificuldades para a amplificação de sequências ou montagem das leituras pelas técnicas utilizadas na época. Assim, decidiu-se concentrar esforços nas sequências únicas, que são as que contêm as informações importantes. Grandes esforços foram então concentrados para sequenciar o DNAC. Os DNACs são produzidos por transcrição reversa dos RNAs mensageiros, não contendo íntrons, ou sequências intergênicas não-codificantes. O seu uso para o sequenciamento levou à redução significativa na quantidade de sequenciamento. O sequenciamento de fragmentos de DNACs foi muito útil na confirmação e validação na montagem da sequência do genoma humano, e atualmente existem bancos de dados públicos, que disponibilizam sequências geradas a partir de RNAs de vários tipos de tecidos e células humanas.

Posteriormente, retomou-se o sequenciamento do DNA total humano, visto que muitas regiões não-codificantes do genoma têm função importante, tais como as sequências reguladoras da transcrição e os sítios de processamento.

O fechamento final da sequência do genoma exigiu atenção especial às regiões-problema; um grande trabalho adicional foi necessário para preencher as falhas e corrigir os erros no rascunho da sequência e finalizá-la. A sequência final foi anunciada em julho de 2003 e cobriu mais de 99% das regiões de eucromatina do genoma humano.

A empresa Celera fez o pedido da patente dos 6.500 genes que mapeou, o que gerou problemas de ordem ética, pois isso poderia inviabilizar a produção de medicamentos baseados nesse conhecimento. Portanto, o presidente americano declarou que o genoma humano não poderia ser patenteado.

O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de alta resolução, capazes de gerar leituras de sequências mais longas, com maior rapidez e precisão, reduziu muito o

custo do sequenciamento de DNA. A grande expectativa de contínuas reduções de custo levou diversas companhias a propor o sequenciamento personalizado de cada indivíduo, em busca do genoma de US\$ 1.000,00.

Atualmente, já existem muitos genomas humanos personalizados decifrados no mundo e, em 2011, uma colaboração internacional pretende completar mais 1.000, com indivíduos representativos de todos os continentes. Os resultados sugerem que a variabilidade entre as bases nitrogenadas dos seres humanos é bem maior (estimada em 1%) do que se imaginava (a estimativa era de 0,1%). O pequeno número de genes encontrados sugere também que a complexidade humana provavelmente se deve à maior complexidade no funcionamento desses genes, que poderiam se organizar para originar um número maior de proteínas (projeto genoma). Esses novos dados envolvem a revisão de muitos conceitos básicos da biologia, incluindo o dogma central de um gene – uma proteína.



Veja [outro vídeo](#) proposto, também do Projeto Genoma.

## Características Importantes do Genoma Humano

- O genoma humano contém 3,1 bilhões de nucleotídeos, mas as sequências codificadoras de proteínas constituem apenas cerca de 3% do genoma.
- A sequência genômica tem ~99,9% de semelhança em indivíduos de todas as nacionalidades. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (do inglês *single-nucleotide polymorphism* - SNPs) e as variações de número de cópias (do inglês *form of structural variation* - CNVs) compõem a maior parte das diferenças de sequências entre pessoas.
- Pelo menos 50% do genoma deriva de elementos transponíveis, como as sequências LINE e Alu e outras sequências de DNA repetitivo.
- O genoma humano contém, aproximadamente, 20.000 genes codificadores de proteínas, muito menos do que os números previstos de 80.000 a 100.000 genes.
- Muitos genes humanos produzem mais de uma proteína, através de encadeamentos alternativos, o que permite que as células humanas, com apenas ~20.000 genes, produzam um número muito maior de proteínas (talvez até 200.000 proteínas).
- Mais de 50% dos genes humanos apresentam alto grau de similaridade de sequências com genes de outros organismos; entretanto, mais de 40% dos genes identificados não têm função molecular conhecida.
- Os genes não estão distribuídos uniformemente pelos 24 cromossomos humanos. Agrupamentos ricos em genes estão separados por “desertos” pobres em genes, que respondem por 20% do genoma. Esses desertos estão correlacionados com as bandas G, observadas em colorações de cromossomos. O cromossomo 19 é o que tem maior densidade gênica, e os cromossomos 13 e Y têm as menores densidades.
- O cromossomo 1 é o que contém o maior número de genes, e o Y é o que tem o menor número.
- Os genes humanos são maiores e têm mais e maiores íntrons do que os genes dos genomas de invertebrados como a *Drosophila*. O maior gene humano é o gene da proteína muscular distrofina, com 2,5 milhões de pares de bases e associado à distrofia muscular.
- O número de íntrons nos genes humanos varia de 0 (genes das histonas) a 234 (no gene da proteína muscular titina).

## A revolução “OMICA”

O Projeto Genoma Humano e o desenvolvimento das técnicas de genômica abriram uma nova era em pesquisas biológicas, com novas áreas biológicas de investigação:

**Proteômica:** a análise de todas as proteínas de uma célula ou tecido.

- **Metabolômica:** a análise das proteínas e vias enzimáticas envolvidas no metabolismo celular.
- **Glicômica:** a análise dos carboidratos de uma célula ou tecido.
- **Toxicogenômica:** a análise dos efeitos de produtos químicos tóxicos sobre os genes, inclusive as mutações criadas pelas toxinas e as mudanças de expressão gênica causadas pelas toxinas.
- **Metagenômica:** a análise dos genomas dos organismos coletados no ambiente.
- **Farmacogenômica:** o desenvolvimento de medicamentos individualizados, com base no perfil genético de uma pessoa, em uma condição específica.
- **Transcritômica:** a análise de todos os genes que se expressam em uma célula ou tecido.

## Técnicas de Biologia Molecular

O reconhecimento de que o DNA codifica a informação genética, a descoberta da estrutura do DNA e a elucidação do mecanismo de expressão gênica constituem o fundamento da biologia molecular.

A tecnologia do DNA recombinante, que possibilita aos cientistas o preparo de grandes quantidades de sequências específicas de DNA, revolucionou a genética, lançando a base para novos campos de estudos, que reforçaram o avanço do Projeto Genoma Humano, combinando a genética com a tecnologia da informação.

### Enzimas de restrição cortam o DNA em sequências específicas

As enzimas de restrição são nucleases altamente específicas, produzidas por bactérias. Estas enzimas clivam o DNA que lhe é estranho (**restrição**); portanto, este mecanismo pode ser definido como um sistema de defesa bacteriano. A bactéria protege seu próprio DNA desta degradação, “camuflando-o” através da metilação de algumas bases específicas (**modificação**).

As enzimas de restrição são agrupadas de acordo com a sua estrutura, a atividade dos sítios de reconhecimento e a clivagem. Estas enzimas reconhecem sequências específicas de 4 a 8 pares de base (pb) na molécula de DNA e fazem dois cortes, um em cada fita.

Existem dois tipos distintos de clivagens:

1. Os dois cortes ocorrem no eixo de simetria da sequência específica, gerando extremidades abruptas.
2. Os cortes são feitos simetricamente, porém, fora do eixo de simetria, gerando extremidades coesivas.

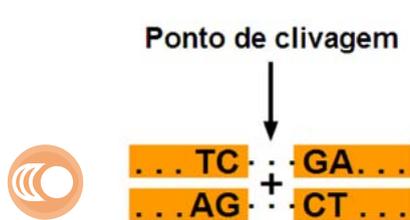


Fig. 1.1 Processo de clivagem no eixo de simetria, gerando moléculas com extremidades abruptas (clique na imagem para ver a animação).

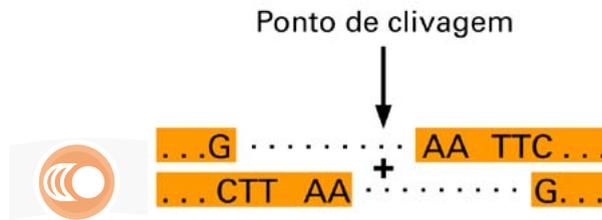


Fig. 1.2 Processo de clivagem simetricamente situada ao redor do eixo de simetria, gerando moléculas com extremidades coesivas, (clique na imagem para ver a animação).

As mais importantes na Tecnologia do DNA Recombinante são as enzimas do Tipo II; o sítio de reconhecimento deste grupo de enzima é normalmente uma sequência **palindrômica**, isto é, ela tem um eixo de simetria, e a sequência de bases de uma fita é a mesma da fita complementar quando lida na direção oposta.

## Plasmídeos, Vírus e Cromossomos artificiais (YAC) são usados como vetores para carregar sequências de DNA

Após o isolamento de um gene, pode-se inseri-lo em outra molécula de DNA diferente, capaz de carregá-lo e amplificá-lo em centenas de cópias. Este processo de amplificação é obtido por meio do uso de moléculas de DNA denominadas **vetores de clonagem molecular**. Existem tipos básicos de vetores empregados nas técnicas de biologia molecular. Entretanto, esses vetores para serem bons veículos de clonagem precisam apresentar características especiais em diferentes situações.



**Plasmídeo:** Plasmídeos são pequenas moléculas circulares de DNA dupla fita, presentes nas células procarióticas, que contêm os elementos necessários para a sua replicação e um gene de resistência a antibiótico. Os plasmídeos presentes num grande número de cópias são usados como veículos de clonagem desde que capacitem a amplificação do segmento do DNA neles clonado.

O plasmídeo deve conter características específicas para ser um bom vetor (figura 7.3).

1. **Origem de replicação (O)**; sequência de DNA que permita que o vetor seja replicado na célula hospedeira.
2. **Múltiplos Sítios de Clonagem (MSC)**; local onde o inserto é incorporado ao vetor de clonagem.
3. **Resistência à ampicilina (Amp<sup>R</sup>)**; as células que contêm tais vetores são capazes de crescer na presença de antibióticos, enquanto as células que não contêm esses vetores acabam morrendo.

No processo de clonagem molecular, é essencial que seja utilizada uma enzima de restrição capaz de produzir extremidades compatíveis, durante a clivagem, entre o DNA a ser clonado (inserto) e o DNA receptor (vetor).

Após a ligação do DNA ao vetor, esta molécula híbrida será introduzida em uma bactéria, por um processo chamado transformação. Este processo é necessário para que o vetor possa sofrer duplicações e, conseqüentemente, possa amplificar o número de cópias do inserto.



**Vírus:** Os vírus de DNA e RNA podem ser utilizados em técnicas de biologia molecular. O genoma do vírus SV40 foi amplamente estudado, tendo sido isolado de células tumorais de macacos; ele foi um dos primeiros sistemas virais utilizados para introduzir genes em células de mamíferos.

O DNA do vírus SV40 possui 5.200 pares de bases e pode ser dividido em duas regiões quanto à expressão gênica viral. Essas regiões são chamadas de região precoce e região tardia. O produto da expressão da região precoce do genoma viral é responsável pelo início da replicação viral em células permissíveis. Os produtos de expressão codificados pela região tardia correspondem às proteínas que formam o capsídeo da partícula viral. A produção de DNA recombinante no vírus SV40 pode ser realizada através da substituição do segmento de expressão precoce ou do segmento de expressão tardia (Figura 7.4).

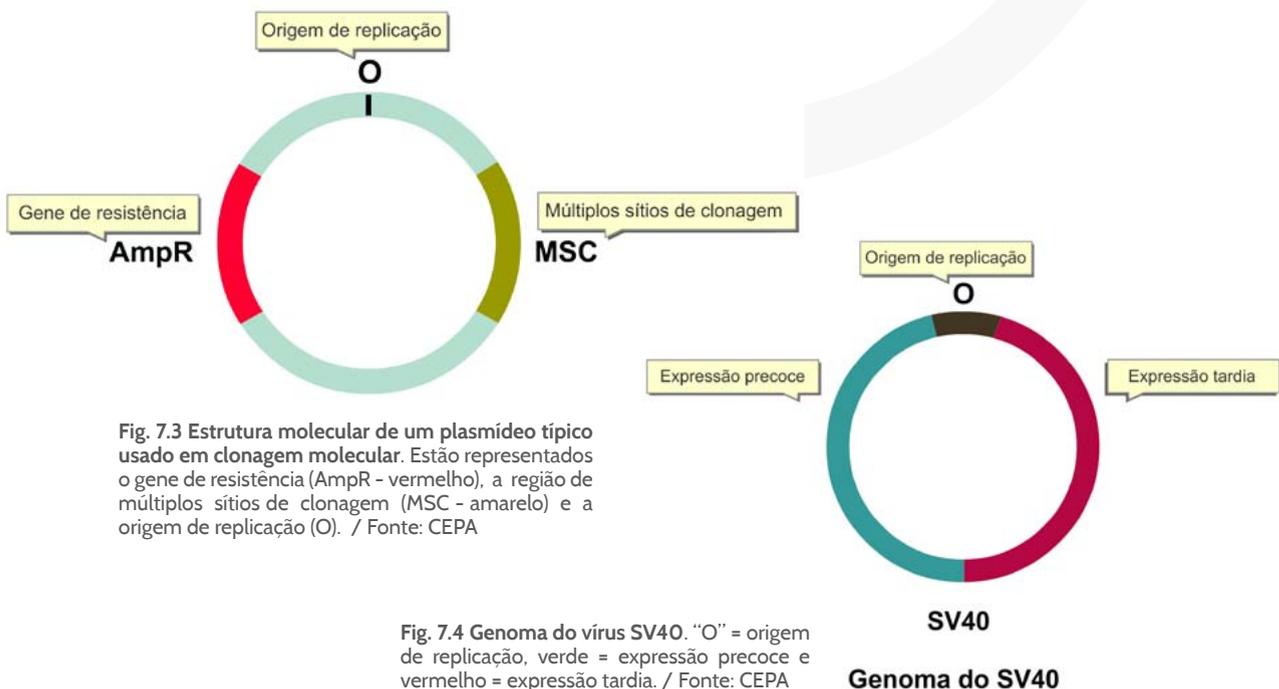


Fig. 7.3 Estrutura molecular de um plasmídeo típico usado em clonagem molecular. Estão representados o gene de resistência (Amp<sup>R</sup> - vermelho), a região de múltiplos sítios de clonagem (MSC - amarelo) e a origem de replicação (O). / Fonte: CEPA

Fig. 7.4 Genoma do vírus SV40. "O" = origem de replicação, verde = expressão precoce e vermelho = expressão tardia. / Fonte: CEPA

SV40  
Genoma do SV40

### CLONAGEM NO SV40 PELA SUBSTITUIÇÃO DA REGIÃO TARDIA

Quando a região tardia do SV40 é substituída com outro DNA, perde-se a expressão das proteínas do capsídeo (funções tardias). Para que o sistema de clonagem funcione adequadamente, pode-se realizar a infecção simultânea com outro vírus SV40, que tem uma deleção nos genes da região precoce, mas a região tardia intacta. Nas células coinfectadas, as proteínas da região precoce serão produzidas pelo vírus recombinante e as proteínas do capsídeo pelo vírus deletado. Como resultado, teremos a produção de uma população de partículas virais mistas, ou seja, vírus deletado e vírus recombinante (figura 7.5).

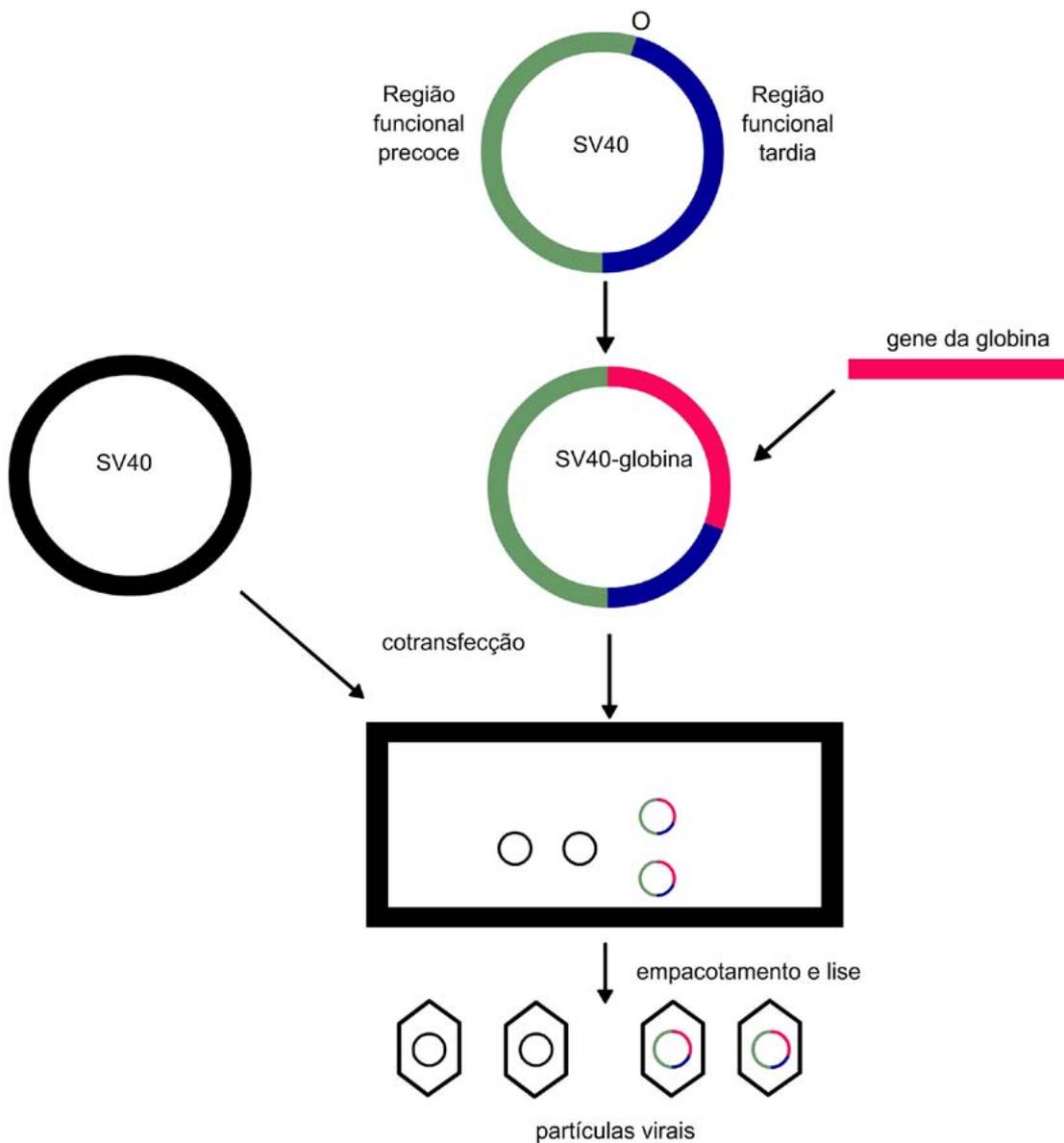


Fig. 7.5 Clonagem no SV40 pela substituição da região tardia. / Fonte: CEPA

### CLONAGEM NO SV40 PELA SUBSTITUIÇÃO DA REGIÃO PRECOCE

Quando a clonagem no SV40 é feita na região precoce, a produção de partículas virais depende do suprimento, por outra fonte, das proteínas codificadas pela região precoce. Portanto, a clonagem necessariamente deverá ser realizada em linhagens de células especializadas, as quais apresentam uma porção do genoma do SV40 integrado ao seu próprio genoma. Dessa forma, esta linhagem celular produzirá as proteínas virais responsáveis pelo processo de duplicação do vírus, induzindo a sua duplicação. Entretanto, esta estratégia de clonagem apresenta desvantagens, pois o genoma da célula hospedeira pode sofrer rearranjos ou deleções.

### CLONAGEM EM RETROVÍRUS

Atualmente, um outro sistema de clonagem está sendo utilizado e apresenta muitas vantagens quando comparado com os sistemas descritos anteriormente. São os chamados retrovírus, que são vírus cujo material genético é composto somente por RNA e, portanto, apresentam um ciclo bastante diferente dos mencionados anteriormente.

Os retrovírus infectam uma grande variedade de células de mamíferos e o seu RNA é transcrito reversamente para DNA, o qual é incorporado ao genoma da célula hospedeira. Neste estado, ele produz continuamente novas partículas virais, juntamente com o produto do gene nele clonado. Por causa da sua versatilidade, os retrovírus são atualmente os vetores eleitos para uso em terapia gênica.

### VETORES PARA LEVEDURAS

O grande interesse existente no estudo das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* se deve ao fato de que são organismos eucariotos inferiores e, assim sendo, possuem organização celular similar à de eucariotos superiores. Além disso, muitas proteínas de leveduras são similares, estrutural e funcionalmente, às suas homólogas em mamíferos, permitindo também estudos pós-traducionais.

YAC (do inglês *Yeast Artificial Chromosome*, cromossomo artificial de levedura) consiste em um tipo de vetor de cópia única, que contém sequências centroméricas (CEN) e sequências teloméricas (sequências das extremidades dos cromossomos). A presença de sequências teloméricas nestes vetores permite que sejam replicados como moléculas lineares, com comportamento semelhante ao do DNA cromossomal. YACs não são utilizados rotineiramente em experimentos de clonagem; entretanto, têm-se mostrado uma ferramenta valiosa na caracterização de grandes segmentos genômicos na medida em que é possível clonar em um YAC fragmentos que vão de 100 a 2.000 kb (Figura 7.6).

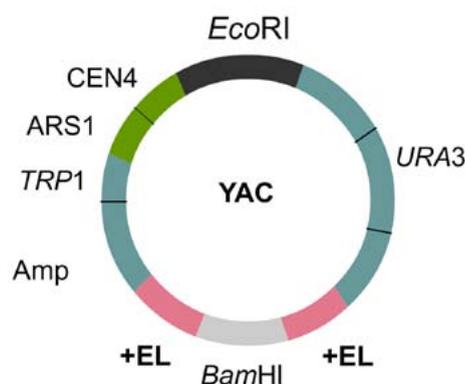


Fig. 7.6 YACs: Contêm um centrômero, dois telômeros, gene(s) marcador(es) para seleção em levedura e uma sequência tipo ARS. Devido à presença destas sequências, os YACs são duplicados como pequenos cromossomos lineares na levedura. / Fonte: CEPA

## RNA<sub>m</sub> é convertido em DNA<sub>c</sub> por reações enzimáticas

A enzima transcriptase reversa é um tipo de DNA polimerase dependente de RNA, ou seja, esta enzima é capaz de sintetizar DNA *in vitro*, usando como molde RNA<sub>m</sub>. O produto dessa reação é o DNA complementar ou, de modo abreviado, o chamado **DNA<sub>c</sub>**.

A síntese e a clonagem de DNA<sub>c</sub>s contribuem para grandes avanços na análise da estrutura e expressão de genes de eucariotos, uma vez que o DNA<sub>c</sub> é a cópia do RNA<sub>m</sub> e ele não contém íntrons. A ausência dos íntrons permite que DNA<sub>c</sub>s de eucariotos sejam diretamente transcritos e traduzidos em bactérias e em outros microorganismos, possibilitando assim a produção, em grande escala, de polipeptídeos importantes tanto na área de pesquisa como na área aplicada. Além disso, a ausência de íntrons também facilita a determinação da sequência de aminoácidos da proteína por ela codificada. Esta metodologia permite a identificação e caracterização da sequência de uma enorme quantidade de proteínas (figura 7.7).

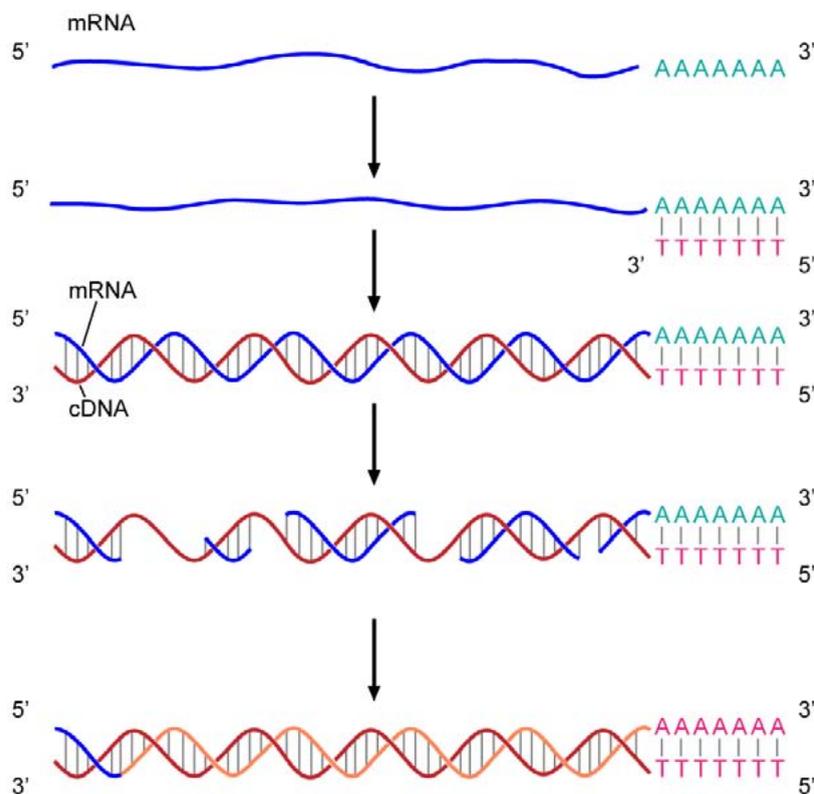


Fig. 7.7 Síntese de DNA<sub>c</sub> fita dupla. / Fonte: CEPA

## Bibliotecas de DNA genômico são sequências completas de organismos

Bibliotecas genômicas são coleções de clones recombinantes, formadas de moléculas correspondentes a todo o genoma do organismo. A construção de uma biblioteca genômica permite obter informações sobre a estrutura molecular de um gene bem como o isolamento da porção do DNA genômico, que contenha toda a unidade de transcrição mais as regiões flanqueadoras, onde se localizam os elementos controladores da expressão desse gene.

Assim, um dos aspectos principais a serem considerados na construção de uma biblioteca genômica é a obtenção de um número grande de clones portando fragmentos do genoma, obtidos aleatoriamente. Portanto, o tamanho de uma biblioteca genômica, para um dado gene de interesse, é determinado pelo tamanho dos fragmentos clonados e pelo tamanho do genoma. Sendo assim, a construção de bibliotecas genômicas tem como objetivo minimizar o número de clones necessários através da clonagem de fragmentos de DNA de maior tamanho possível. Resumidamente, a construção da biblioteca genômica envolve duas etapas (Figura 7.8).

1. Isolamento de DNA, que é posteriormente clivado, produzindo diferentes fragmentos de tamanhos compatíveis com o vetor de clonagem.
2. Ligação desses fragmentos no vetor e introdução dos vetores obtidos nas células hospedeiras.

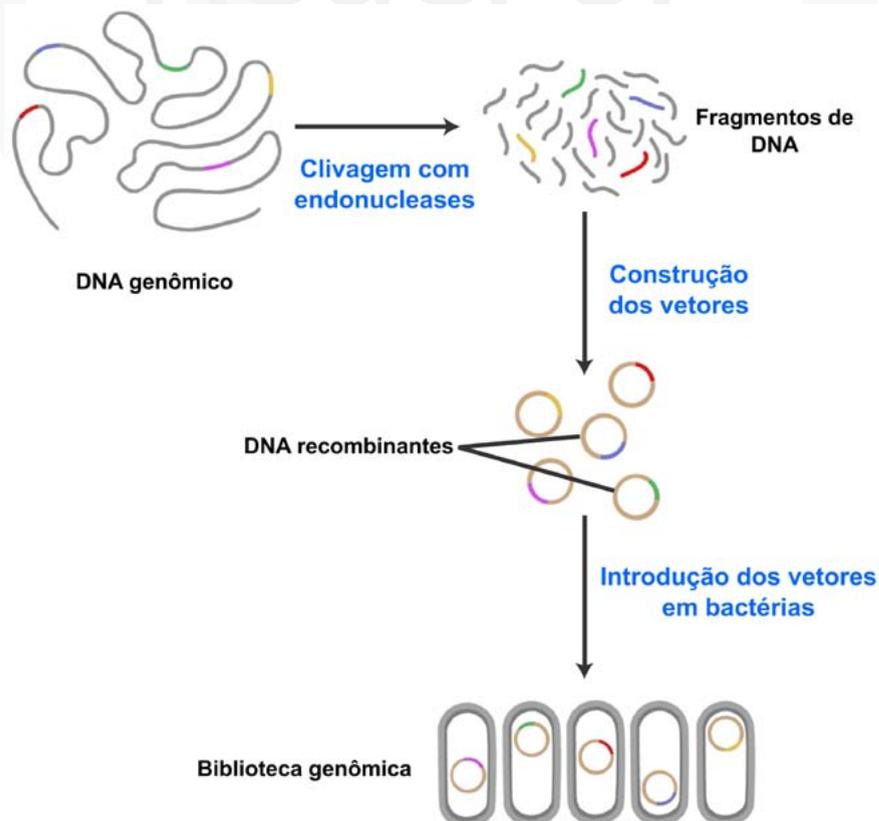


Fig. 7.8 Síntese de DNAc fita dupla / Fonte: CEPA

## Métodos de sequenciamento de DNA

A partir do final da década de 70, foram desenvolvidos métodos que possibilitaram a determinação da sequência nucleotídica de fragmentos de DNA. Esta metodologia permitiu a determinação de sequências completas de DNA e milhares de genes. O princípio do método baseia-se na síntese de DNA *in vitro*, realizada na presença de desoxirribonucleotídeos trifosfato sem um grupo OH na posição 3', que está presente em nucleotídeos normais.

A molécula de DNA é sintetizada *in vitro* utilizando os desoxirribonucleotídeos trifosfato e desoxirribonucleotídeos trifosfato sem um grupo OH na posição 3'. Portanto, o alongamento da cadeia de DNA é bloqueado pela incorporação do nucleotídeo sem um grupo OH na posição 3'. Cada reação produz um conjunto de cópias do DNA inicial, que terminam em diferentes pontos da sua sequência. Os desoxirribonucleotídeos trifosfato sem um grupo OH na posição 3' são marcados com diferentes corantes fluorescentes (fluorocromos).

Após a reação de sequenciamento, os diferentes fragmentos de DNA são separados por eletroforese em gel ou em capilar. Os fluorocromos presentes nos fragmentos são excitados por um feixe laser, os sinais fluorescentes são amplificados e detectados por tubos fotomultiplicadores ou, nos modelos mais modernos, por câmaras CCD. A identificação de cada nucleotídeo é realizada por análises computacionais através do comprimento de onda de emissão específica de cada fluorocromo (Figura 7.9).

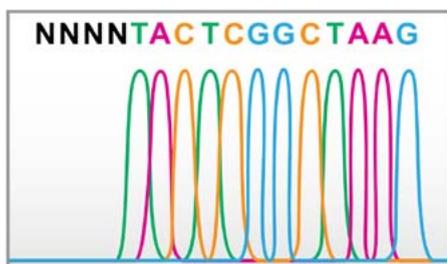


Fig. 7.9 O produto da reação de sequenciamento é submetido à eletroforese em uma raia de gel. À medida que os fragmentos passam pelo feixe de laser, os fluorocromos são excitados e a luz emitida é detectada por um fotomultiplicador. Esta informação é traduzida em forma de sequência através de um computador. / Fonte:CEPA

## Genes podem ser sintetizados a partir de oligonucleotídeos. A reação da Polimerase em cadeia amplifica regiões específicas de um DNA-alvo.

Por meio da reação em cadeia da polimerase, denominado também PCR (do inglês - *Polymerase Chain Reaction*), é possível amplificar uma sequência de DNA específica, sem a utilização da clonagem molecular. Anteriormente à amplificação, é necessária a construção, por síntese química, de dois oligonucleotídeos de DNA (iniciadores) complementares às extremidades de cada fita de DNA de interesse, que flanqueará uma região específica do DNA. Estes oligonucleotídeos servem como iniciadores da síntese de DNA *in vitro*, que é catalisada pela DNA polimerase.

Um ciclo de PCR começa com a desnaturação por calor (95°C), que promove a separação da fita dupla de DNA. A reação é resfriada na presença de um excesso dos dois oligonucleotídeos, possibilitando a hibridização dos dois iniciadores com a sequência complementar presente no DNA-alvo. Em seguida, a reação é incubada para atividade da DNA polimerase, produzindo novas fitas de DNAs a partir dos iniciadores e utilizando os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP).

30 a 40 de ciclos de 3 etapas:

### 1. Desnaturação 1 minuto 94°C



### 2. Hibridização dos iniciadores 45 segundos 54°C



### 3. Extensão 2 minutos 72°C

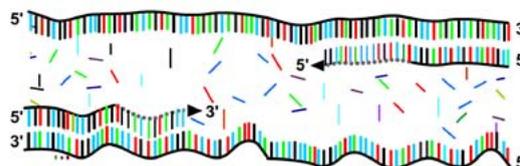


Fig. 7.10 As três etapas do ciclo de PCR (clique na imagem para ver a animação).

## Referências Bibliográficas

WILLIAM S. KLUG, MICHAEL R. CUMMINGS, CHARLOTTE A. SPENCER e MICHAEL A. PALLADINO. **Conceitos de Genética**. 9ª ed. Editora: Artmed®.

WATSON J.D. RICHARD M. MYERS. CAUDY AMY A. WITKOWSKI, JAN A. **DNA Recombinante - Genes e Genomas**. 3ª ed. Editora: Artmed®.

STRACHAN T. e READ P.A. **Genética Molecular Humana**. 2ª ed. Editora: Artmed®.

TURNPENNY P. ELLARD S. Emery. **Genética Médica**. 13ª ed. Editora: Elsevier

BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS e PETER WALTER. **Biologia molecular da célula**. 4ª ed. Editora: Artmed®.

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE: NASCIMENTO, Alexandra A. C.; ESPREAFICO, Enilza Maria; LARSON, Maria Luisa Paçó, MONESI, Nádia; ROSSI, Nilce Maria Martinez e RODRIGUES, Vanderlei. (Acesse o pdf pelo link no ambiente virtual)

### Ampliando o conhecimento

Para saber mais sobre as tecnologias e técnicas discutidas nesta semana, acesse os seguintes links:

- animação [Polymerase Chain Reaction \(PCR\)](#)
- apostila [Tecnologia do DNA Recombinante](#) elaborada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.



### Atividades

#### Questionário

1. Correlacione:
  - a. DNA e cromossomo
  - b. Gene e Genoma
  - c. Gene e RNA
  - d. Transcrição e Tradução.
2. Discuta dois avanços importantes relacionados à descoberta das enzimas de restrição.