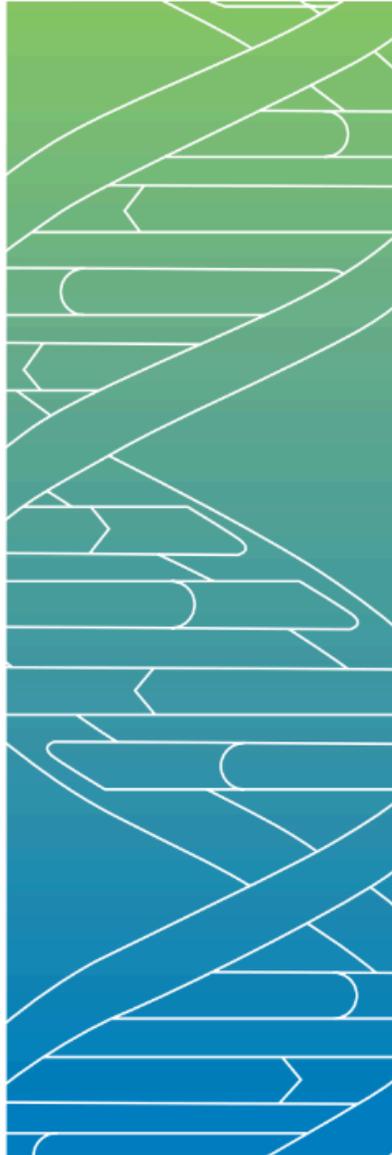


**AMGEN®** Biotech Experience

Descoberta científica na sala de aula  
Brasil

# FUNDAMENTOS DA BIOTECNOLOGIA



## SEQUÊNCIA DE ENGENHARIA GENÉTICA RESUMIDA

**Guia do estudante**

[www.amgenbiotechexperience.com](http://www.amgenbiotechexperience.com)

**AMGEN®** Foundation

<b>SOBRE A AMGEN BIOTECH EXPERIENCE</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUÇÃO AO PROGRAMA</b>	<b>5</b>
Leitura: O que é biotecnologia?	6
Introdução ao programa: Glossário	9
<b>CAPÍTULO 1: ALGUMAS FERRAMENTAS DA ÁREA</b>	<b>10</b>
Introdução	11
Laboratório 1.1: Como usar uma micropipeta	12
Laboratório 1.2: Eletroforese em gel	16
Capítulo 1: Perguntas	22
Capítulo 1: Glossário	23
<b>CAPÍTULO 2A: COMO COMEÇAR A CLONAR UM GENE?</b>	<b>24</b>
Introdução	25
Leitura: Seu desafio	26
Leitura: Como começar a clonar um gene	27
Leitura: Como produzir proteínas terapêuticas humanas em bactérias	32
Atividade: Vamos clonar o gene	34
Laboratório 2A: Preparação para verificar o gene <i>rfp</i> : digestão do plasmídeo pARA-R	37
Capítulo 2A: Perguntas	41
Capítulo 2A: Glossário	42

<b>CAPÍTULO 4A: COMO CONFIRMAR QUE VOCÊ TEM UM PLASMÍDEO RECOMBINANTE</b>	<b>45</b>
Introdução	46
Leitura: Por que é necessário verificar?	46
Laboratório 4A: Verificação do plasmídeo recombinante com uso da eletroforese em gel	51
Capítulo 4A: Perguntas	55
Capítulo 4A: Glossário	56
<b>CAPÍTULO 5A: COMO INSERIR PLASMÍDEOS RECOMBINANTES EM BACTÉRIAS</b>	<b>57</b>
Introdução	58
Leitura: Como transformar bactérias com plasmídeos recombinantes	59
Laboratório 5A: Como transformar bactérias com o plasmídeo pARA-R	63
Capítulo 5A: Perguntas	72
Capítulo 5A: Glossário	73
<b>CAPÍTULO 6: COMO CONSEGUIR O QUE PRECISAMOS</b>	<b>75</b>
Introdução	76
Leitura: Como produzir a proteína de interesse	77
Laboratório 6: Como purificar a proteína fluorescente	82
Capítulo 6: Perguntas	87
Capítulo 6: Glossário	88

# SOBRE A AMGEN BIOTECH EXPERIENCE

A engenharia genética é uma disciplina da biotecnologia que utiliza procedimentos e técnicas especiais para alterar o DNA de um organismo. Essa habilidade teve um enorme impacto na medicina, porque uma bactéria geneticamente modificada é capaz de produzir insulina humana (o hormônio responsável pela regulação dos níveis de glicose no sangue) e outros produtos que podem salvar vidas. Estudantes do ensino médio raramente têm a chance de aprender e praticar os procedimentos e técnicas que são a base da indústria de biotecnologia, mas, neste programa, você terá exatamente essa oportunidade. Conforme você trabalha no laboratório e realiza os mesmos experimentos que levaram a grandes avanços na biotecnologia, vai adquirindo experiência prática na produção de bactérias geneticamente modificadas.

Os procedimentos deste programa foram desenvolvidos com base em uma série de descobertas que resultaram em avanços importantes na biotecnologia. Alguns dos cientistas pioneiros que fizeram essas descobertas receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, em 1978, e de Química, em 1980 e 1993. (O Prêmio Nobel é a condecoração mais importante do mundo concedida a cientistas nessas áreas.) O trabalho que você está prestes a fazer é fundamentado nessa ciência premiada com o Nobel - uma ciência relevante que continuará desempenhando papel fundamental no desenvolvimento da biotecnologia e da medicina. Você seguirá os passos dos muitos cientistas que traçaram e continuam traçando os caminhos da biotecnologia. Ainda existem muitos avanços pela frente, e os estudantes que decidirem continuar nessa área poderão contribuir para eles.

Na ciência, a habilidade de registrar o que você está fazendo e comunicar seu trabalho é de extrema importância. Para comprovar a realização de um experimento, seja para replicação e verificação por outros colegas, seja para solicitar uma patente, você precisa ter um registro muito preciso e detalhado do seu trabalho. Neste programa, você registrará cuidadosamente suas anotações, ideias, observações, resultados e respostas a perguntas. Para fins científicos, é importante registrar inclusive seus erros.

Se possível, utilize um caderno de laboratório com divisórias organizadas com etiquetas adesivas. Como você estará registrando com caneta, será necessário riscar os erros; uma boa forma de fazer isso é colocando apenas um "X" na seção que deseja corrigir (para que as anotações ainda possam ser lidas) e anotar o motivo da correção. Ao seguir essas boas práticas, você conseguirá aproveitar este programa ao máximo!

O programa Amgen Biotech Experience (anteriormente conhecido como Amgen-Bruce Wallace Biotechnology Lab Program) teve início humilde há trinta anos com cientistas e educadores visionários que compartilhavam a paixão e a motivação de transmitir seu conhecimento aos estudantes. Bruce Wallace, um dos primeiros membros da Amgen, queria que todos os estudantes sentissem a alegria de descobrir e a empolgação de ter a ciência na ponta dos dedos. O desejo de proporcionar um ensino de ciências mais aprofundado nas escolas próximas da sede global da Amgen levou educadores do ensino médio das escolas locais e, posteriormente, um educador universitário, a se envolverem na criação de um currículo e na formação de educadores em biotecnologia. O programa cresceu pela propaganda boca a boca e pelo interesse dos educadores, expandindo-se por outros estados e países.

**Acesse o site da ABE em [www.amgenbiotechexperience.com](http://www.amgenbiotechexperience.com).**

**INTRODUÇÃO AO PROGRAMA**

**AMGEN BIOTECH EXPERIENCE**

# O QUE É BIOTECNOLOGIA?

Em termos simples, a biotecnologia é o uso de sistemas biológicos para criar produtos. O uso de levedura para fazer pão é um dos exemplos mais antigos do ser humano usando um processo biológico (fermentação por levedura) para criar um produto desejado (alimento).

A ciência da biotecnologia decolou realmente apenas na década de 1970, quando os cientistas fizeram duas descobertas importantes sobre as bactérias. A primeira descoberta foi que as bactérias contêm pequenos círculos de **DNA** (ácido desoxirribonucleico, uma biomolécula formada por uma fita dupla que codifica informações genéticas), chamados **plasmídeos**. A segunda foi que as bactérias também têm **proteínas** (biomoléculas grandes que realizam funções essenciais nas células), chamadas **enzimas de restrição**, capazes de cortar o DNA em locais altamente específicos.

Em geral, as pesquisas básicas resultam em descobertas que contribuem para a compreensão fundamental das bases da natureza da vida. Em alguns casos, essas descobertas podem levar também ao desenvolvimento de novas ferramentas e tecnologias para melhorar a qualidade de vida. A descoberta dos plasmídeos e das enzimas de restrição, por exemplo, deu início a uma nova era da biotecnologia com o uso da tecnologia do DNA recombinante. DNA recombinante é o DNA que contém sequências ou genes de duas ou mais fontes, às vezes até de duas espécies diferentes! Ao utilizar processos biológicos naturais, os cientistas conseguem gerar produtos que beneficiam o bem-estar da sociedade humana de formas nunca antes imaginadas.

Atualmente, a biotecnologia moderna é empregada no aprimoramento de sistemas de produção de alimentos, na melhora da saúde humana e no desenvolvimento de centenas de produtos e tecnologias, incluindo a criação de combustíveis que impulsionam o mundo.

## ESTUDO DA BIOLOGIA HUMANA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS

Pesquisadores biofarmacêuticos estudam a biologia humana para desenvolver soluções que melhorem a vida de pessoas com doenças graves. Para isso, os pesquisadores estudam de perto uma doença, investigando seu funcionamento e as alterações que ela causa no corpo humano. Com base nessa pesquisa, os cientistas conseguem desenvolver terapias biofarmacêuticas que usam os sistemas biológicos para tratar ou curar essas doenças.

A indústria biofarmacêutica inaugurou uma nova era de medicamentos à base de proteínas, produzidos através da união da ciência com a dinâmica molecular das **células** (as unidades básicas de qualquer organismo vivo que realizam os processos bioquímicos da vida). Os primeiros medicamentos biotecnológicos eram versões de proteínas humanas geneticamente modificadas: moléculas grandes e complexas demais para serem criadas por meio de processos químicos, mas que poderiam ser produzidas com o uso de células com DNA estrategicamente modificado. Hoje, a engenharia de proteínas consegue reconfigurar os elementos que compõem a natureza para criar estruturas inovadoras que combatem doenças de forma mais sofisticada.

Qual é a relação entre o DNA e as proteínas? Ambos são **biomoléculas**, isto é, moléculas grandes produzidas por células vivas. Ao investigar **traços** (características determinadas geneticamente) em organismos, os cientistas

descobriram que as proteínas são responsáveis por esses traços e que o DNA é responsável pela produção das proteínas. Por exemplo, pense em uma planta que tem o traço de flores vermelhas. O pigmento vermelho das flores é produzido por uma **enzima** (uma proteína que aumenta a taxa de reação química). O DNA dessa planta tem instruções para produzir proteínas, inclusive essa enzima. O **gene** é a parte de uma molécula de DNA que contém as instruções para produzir uma proteína específica.

## O FUTURO DA BIOFARMACÊUTICA

---

A compreensão avançada e a riqueza de dados disponíveis sobre o genoma humano na atualidade possibilitaram aos pesquisadores biofarmacêuticos a descoberta de novos métodos de identificação da base genética de doenças e respostas individuais a tratamentos, a fim de direcionar terapias a indivíduos específicos. Dessa forma, os médicos podem identificar pacientes para os quais determinados medicamentos são ineficazes devido ao seu perfil genético e selecionar alternativas mais adequadas a cada indivíduo. A análise do genoma humano e suas variações genéticas permite que os pesquisadores entendam melhor as diferenças genéticas relacionadas a doenças de diversas populações e usem esse conhecimento para desenvolver medicamentos mais eficazes.

Os pesquisadores biofarmacêuticos trabalham também no desenvolvimento de novos mecanismos de tratamento de doenças. Os novos medicamentos "específicos" para o câncer, por exemplo, são a grande promessa da indústria da biotecnologia. Os fármacos quimioterápicos, utilizados no tratamento convencional de câncer, são voltados para a destruição das células que estão se dividindo. Infelizmente, esses medicamentos sempre causam "efeitos colaterais" porque não são capazes de distinguir as células cancerígenas que se dividem rapidamente das células normais que fazem o mesmo. A quimioterapia, por meio desses medicamentos, pode destruir células sanguíneas saudáveis, folículos capilares e células que revestem o estômago e o trato digestório, resultando em efeitos adversos debilitantes para os pacientes. Os pesquisadores estão trabalhando sem parar para desenvolver medicamentos que efetivamente eliminem as células cancerígenas, mas preservem os tecidos saudáveis. Os médicos estão otimistas em relação ao potencial de vários medicamentos imunoterápicos desenvolvidos recentemente que permitem que o próprio sistema imunológico do paciente combata o câncer. Um desses medicamentos é um tipo de anticorpo sintético que é atraído apenas às proteínas localizadas em células tumorais. Uma vez ligados a uma célula tumoral, esses anticorpos liberam várias proteínas que induzem a morte celular programada (apoptose) e destroem a célula. A capacidade de eliminar células cancerígenas de modo seletivo sem danificar as células saudáveis seria um avanço enorme no tratamento do câncer.

Desde o início dos anos 1970, o campo da **engenharia genética** (o processo de modificar o material genético das células ou dos organismos para que possam produzir novas substâncias ou realizar novas funções) tem revolucionado a medicina. A cada ano, o ritmo das descobertas cresce e nossa compreensão do papel da genética na saúde humana cresce constantemente. A tecnologia que permite a rápida e eficiente edição do DNA está sendo aplicada no desenvolvimento de 42 novos fármacos e até mesmo estudada como uma forma de substituir genes defeituosos em células somáticas humanas, por exemplo, para substituir um gene defeituoso responsável pela fibrose cística por um gene funcional. Outro avanço recente permite que os pesquisadores reprogramem células adultas em células-tronco embrionárias para que se tornem qualquer tipo de célula. Essas células podem ser usadas para produzir órgãos modelos para testar medicamentos fora do corpo humano. Essas e outras tecnologias que nem podemos imaginar estão mudando o futuro da medicina e promovendo melhorias dramáticas na saúde humana e no tratamento de doenças.

## VOCÊ SABIA?



### O código do DNA

As informações do DNA são codificadas pelo arranjo de **nucleotídeos**, moléculas pequenas que se unem para formar a molécula de DNA. Uma molécula de DNA tem milhões de nucleotídeos. Existem quatro tipos de nucleotídeos, dispostos em uma **sequência** específica (ordem). Uma sequência específica de nucleotídeos no DNA (ou seja, um gene) é uma instrução para a produção de uma proteína específica. A sequência de nucleotídeos é como uma sequência de notas musicais em uma partitura musical, ou seja, o código de como tocar uma música.

Assim como diferentes sequências de notas codificam músicas diferentes, diferentes sequências de nucleotídeos codificam proteínas diferentes.

## AS FERRAMENTAS E AS TÉCNICAS DA BIOTECNOLOGIA

Nos próximos dias, você conhecerá a ciência da biotecnologia e as ferramentas que cientistas usam para criar produtos. Na primeira tarefa, você experimentará duas ferramentas usadas na biotecnologia: a micropipeta e a eletroforese em gel de agarose.

Quando estiver realizando qualquer experimento científico, você descobrirá que a exatidão e a precisão são tão importantes quanto seguir os procedimentos com atenção. Ao longo da sua experiência com a ABE, seu objetivo deve ser entender como e por que as ferramentas e técnicas que você está aprendendo são usadas.

## COMO USAR ESTE GUIA DO ESTUDANTE

Os ícones usados ao longo do Guia do Estudante servem para chamar sua atenção para vários aspectos do currículo. A seguir, apresentamos uma lista desses ícones e seus significados.

Ícone	Significado
	VOCÊ SABIA? – Informações básicas sobre os conceitos abordados no capítulo.
	PARE E PENSE – Perguntas sobre os protocolos de laboratório.

	<b>REFLITA</b> – Perguntas sobre conceitos biológicos importantes.
	<b>SEGURANÇA</b> – Lembretes das principais técnicas de segurança laboratorial.
	<b>TÉCNICA DE LABORATÓRIO</b> – Técnicas laboratoriais úteis para melhorar a eficiência e os resultados.

## INTRODUÇÃO AO PROGRAMA: GLOSSÁRIO

**Biomolécula:** molécula produzida por células vivas. Entre elas, temos as proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos.

**Células:** as unidades básicas de qualquer organismo vivo que realizam processos bioquímicos vitais.

**DNA (ácido desoxirribonucleico):** biomolécula formada por duas fitas que codifica as informações genéticas.

**DNA recombinante:** o DNA que contém sequências de genes de duas ou mais fontes.

**Engenharia genética:** um ramo da biotecnologia que utiliza procedimentos e técnicas específicas para alterar o DNA de um organismo.

**Enzima:** proteína que aumenta a taxa de uma reação química.

**Enzima de restrição:** proteína capaz de cortar o DNA em uma sequência específica.

**Gene:** a parte de uma molécula de DNA que contém as instruções para produzir uma proteína específica.

**Nucleotídeos:** pequenas moléculas que se unem para formar uma molécula de DNA.

**Plasmídeo:** molécula circular de DNA.

**Proteína:** biomolécula grande. As proteínas realizam funções essenciais nas células, desde a formação de estruturas celulares até a viabilização de reações químicas.

**Sequência:** conjunto de eventos, movimentos ou itens (como nucleotídeos) relacionados que se sucedem em uma ordem específica.

**Traço:** uma característica determinada geneticamente. O DNA codifica as proteínas que, por sua vez, determinam os traços.

# **CAPÍTULO 1**

## **ALGUMAS FERRAMENTAS DA ÁREA**

# INTRODUÇÃO

---

O ano de 1978 foi marcado por um grande avanço na medicina. Pela primeira vez na história, os cientistas conseguiram modificar uma bactéria capaz de produzir proteínas humanas. Esse feito foi alcançado inserindo estrategicamente pequenos pedaços de DNA humano nas células bacterianas. Essa nova tecnologia, chamada "engenharia genética", pode ser usada para produzir proteínas que tratam os sintomas de **doenças genéticas** específicas (causadas por uma alteração no DNA, geralmente herdada dos pais). A engenharia genética, também chamada de modificação genética, é a manipulação direta dos genes de um organismo com o uso da biotecnologia.

Para realizar a engenharia genética, você precisa de boas habilidades laboratoriais. Neste capítulo, você vai praticar o uso de **micropipetas** (instrumentos usados para transferir pequenos volumes de líquidos) e a **eletroforese em gel** (uma técnica para separar e identificar biomoléculas). Essas duas habilidades são essenciais para trabalhar com biotecnologia. Você vai participar de duas atividades de laboratório usando instrumentos e suprimentos idênticos aos usados em laboratórios de pesquisa biotecnológica. Essas atividades são o primeiro passo para desenvolver habilidades das quais você vai precisar para ter sucesso na biotecnologia.

## CAPÍTULO 1: OBJETIVOS

No final deste capítulo, você saberá:

- Como usar corretamente micropipetas e a técnica de eletroforese em gel
- Explicar a importância das micropipetas e da eletroforese em gel na engenharia genética
- Descrever como a eletroforese em gel separa o DNA
- Explicar como a engenharia genética pode ser usada para tratar algumas doenças genéticas

## O QUE VOCÊ JÁ SABE?

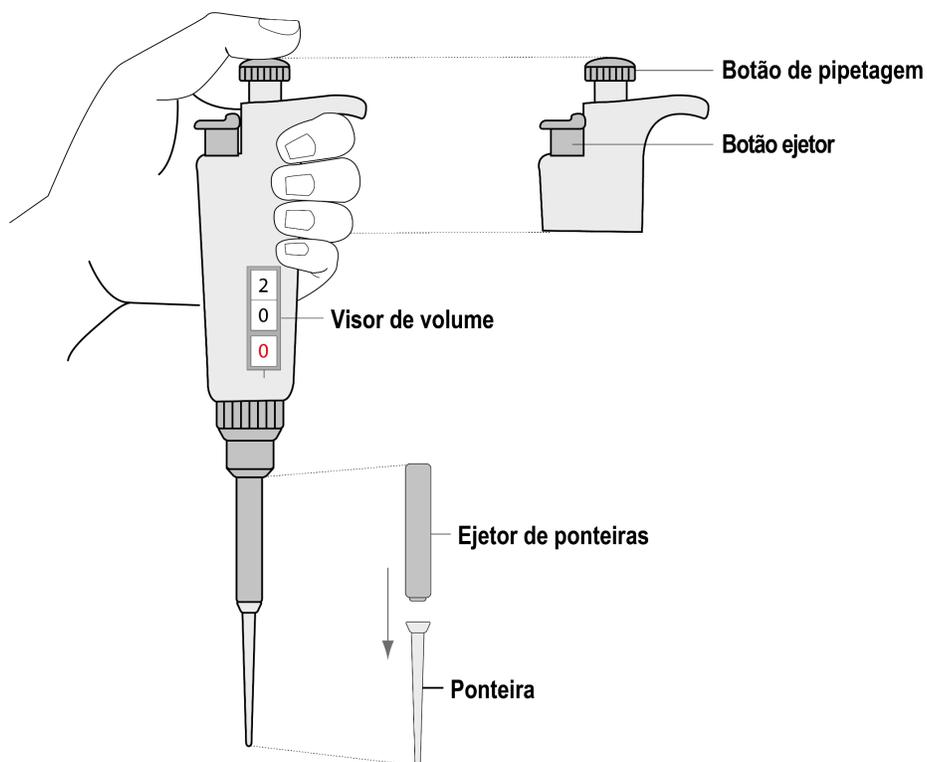
Discuta com um colega as perguntas a seguir e anote suas ideias no caderno. Prepare-se para discutir suas respostas com a turma. Não se preocupe se você não souber todas as respostas. Discutir essas perguntas ajudará você a refletir sobre seus conhecimentos de biotecnologia.

1. Quais ferramentas e técnicas de biotecnologia você já usou? Para que você as usou?
2. Por que a precisão é fundamental ao realizar procedimentos biotecnológicos?

## LABORATÓRIO 1.1: COMO USAR UMA MICROPIPETA

O objetivo desta atividade é apresentar uma ferramenta importante usada na engenharia genética: a micropipeta, mostrada na **Figura 1.1**. A micropipeta é usada para transferir pequenos volumes exatos de líquidos em mililitros (mL, milésimos de litro) ou microlitros ( $\mu\text{L}$ , milionésimos de litro), que são as medidas de volume mais utilizadas na engenharia genética. Nesta atividade, você vai aprender a usar a micropipeta e observar o tamanho relativo de diferentes volumes de solução medidos por essa ferramenta de extrema precisão. Além disso, você terá a oportunidade de entender o nível de precisão que esse instrumento proporciona.

**Figura 1.1: Micropipeta P-20**



## ANTES DO LABORATÓRIO

Responda às seguintes perguntas com seu grupo e se prepare para compartilhar suas respostas com a turma.

1. Por que você acha que é necessário usar volumes muito pequenos e exatos de materiais na biotecnologia?
2. Vá até a seção *Métodos*, leia as páginas 13 a 15 e faça uma breve descrição das etapas, usando palavras e um fluxograma.

## MATERIAIS

### Reagentes

- Suporte de plástico (para tubos de microcentrífuga) com um tubo de microcentrífuga contendo uma solução de corante vermelho.

### Equipamentos e suprimentos

- Micropipeta P-20 (de 2,0  $\mu\text{L}$  a 20,0  $\mu\text{L}$ )
- Caixa de ponteiros descartáveis
- Folha plastificada para a atividade de micropipetagem
- Coletor para descarte de ponteiros e tubos de microcentrífuga usados (o material será compartilhado entre os grupos)

### BIOSSEGURANÇA:

- Tome todas as precauções e use vestimentas de segurança adequadas para atividades em laboratório de ciências, inclusive óculos de proteção. Siga as instruções do seu educador.
- Lave as mãos muito bem com sabão antes e depois de utilizar o laboratório.



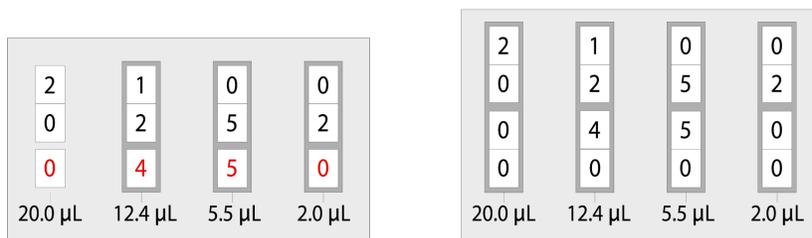
## MÉTODOS

1. Verifique se o seu suporte inclui o tubo com o reagente descrito na lista de *Materiais*.
2. Confira as partes da micropipeta mostradas na **Figura 1.1**, na página 12.
3. Localize o visor de volume no corpo da micropipeta.
4. Cada modelo de micropipeta tem um método de ajuste diferente. Muitos têm um botão giratório para ajustar o volume. Outros são ajustados simplesmente girando o botão de pipetagem. Na maioria dos casos, você deve girar o botão em sentido anti-horário para aumentar o volume e em sentido horário para diminuir o volume.
5. A **Figura 1.2** mostra o ajuste de 4 volumes diferentes na micropipeta P-20. Tente reproduzir esses volumes como uma maneira de praticar.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** nunca configure volumes inferiores a 2,0  $\mu\text{L}$  nem superiores a 20,0  $\mu\text{L}$  na micropipeta P-20, porque isso pode danificar o equipamento.



**Figura 1.2: Ilustração de 4 volumes em 2 micropipetadores P-20 diferentes**



O visor de volume de uma micropipeta mostra a quantidade de líquido aspirado e dispensado. A figura acima mostra quatro exemplos de visores e as quantidades correspondentes.

6. Pegue a folha plastificada da atividade de micropipetagem e confira os volumes indicados. Cada integrante do grupo vai pipetar 5 gotas com volumes diferentes sobre a folha. A pipetagem é feita em duas etapas: aspiração do líquido na micropipeta e dispensação do líquido da micropipeta.
7. Aspire 20,0 µL de corante vermelho (CV) na micropipeta acompanhando os passos a seguir:
  - a. Ajuste o volume para 20,0 µL.
  - b. Abra a caixa de ponteiros. Encaixe a micropipeta em uma ponteira e pressione com firmeza (não toque na ponteira com os dedos). Feche a caixa quando tiver terminado.
  - c. Leve a micropipeta e o tubo com corante vermelho até a altura dos olhos.
  - d. Use o dedo polegar para pressionar o botão de pipetagem até a primeira posição de parada, que é o primeiro ponto de resistência.



**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** ao aspirar o líquido na micropipeta, pressione o botão de pipetagem somente até a primeira parada; do contrário, você colocará muita solução na ponteira.



- e. Insira a ponteira no corante vermelho e solte lentamente o botão de pipetagem para aspirar a solução.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** não deite a micropipeta com líquido na ponteira nem a segure com a ponteira virada para cima. Se a ponteira descartável não estiver bem encaixada no ejetor de ponteiros, o líquido pode vazar de volta para a pipeta.



8. Dispense o corante vermelho sobre a folha plastificada da seguinte maneira:
  - a. Posicione a ponteira sobre o círculo de 20,0 µL.
  - b. Use o dedo polegar para pressionar o botão de pipetagem até a primeira posição de parada e, em seguida, pressione até a segunda parada.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** ao dispensar o líquido da micropipeta, pressione o botão de pipetagem até a primeira parada para dispensar a maior parte do líquido. Em seguida, pressione o botão de pipetagem até a segunda parada para dispensar o restante do líquido.



- c. Com o botão de pipetagem ainda pressionado, retire a pipeta da folha plastificada, evitando que o líquido volte para a ponteira acidentalmente.
9. Mantendo a micropipeta na posição vertical, gire o botão de pipetagem para configurar 15,0  $\mu\text{L}$  e repita os passos 7b a 8c, dispensando o líquido sobre o círculo de 15,0  $\mu\text{L}$ .
  10. Mantendo a micropipeta na posição vertical, gire o botão de pipetagem para configurar 10,0  $\mu\text{L}$  e repita os passos 7b a 8c, dispensando o líquido sobre o círculo de 10,0  $\mu\text{L}$ .
  11. Mantendo a micropipeta na posição vertical, gire o botão de pipetagem para configurar 5,0  $\mu\text{L}$  e repita os passos 7b a 8c, dispensando o líquido sobre o círculo de 5,0  $\mu\text{L}$ .
  12. Mantendo a micropipeta na posição vertical, gire o botão de pipetagem para configurar 2,0  $\mu\text{L}$  e repita os passos 7b a 8c, dispensando o líquido sobre o círculo de 2,0  $\mu\text{L}$ .
  13. Utilize o botão ejetor para descartar a ponteira no coletor de ponteiras apropriado.

### **PARE E PENSE:**



- **Ao aspirar e dispensar uma solução, por que é crucial observar a entrada e a saída da solução pela ponteira?**
- **De acordo com as instruções de pipetagem, você deve evitar o contato com as ponteiras. Entre as ações de precaução estão não usar as mãos para encaixar a ponteira na pipeta, segurar a micropipeta verticalmente, usar o botão ejetor para remover a ponteira e deixar a caixa de ponteiras fechada. Se você estivesse trabalhando com plasmídeos e células de bactérias, por que essas precauções seriam importantes?**

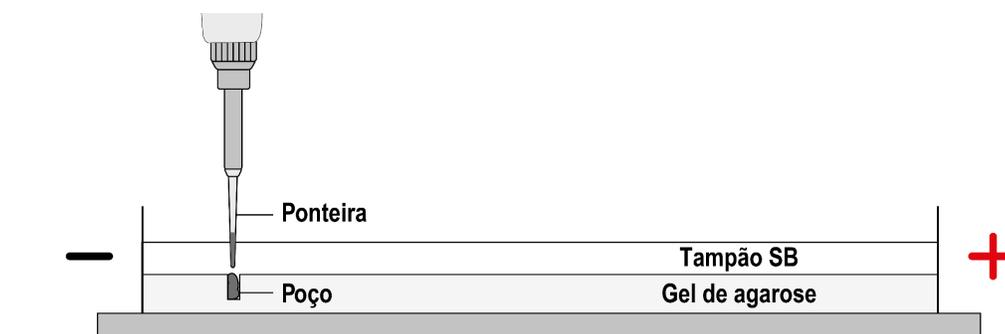
14. Usando a folha plastificada de atividade de pipetagem, cada integrante do seu grupo deve ter a oportunidade de aspirar e dispensar as 5 gotas de volumes diferentes e cada pessoa deve usar uma ponteira nova.
15. Quando todos do grupo tiverem dispensado o corante vermelho sobre a folha plastificada, desenhe os tamanhos aproximados de cada gota em seu caderno (ou tire uma foto e cole-no caderno) e identifique as quantidades.

## LABORATÓRIO 1.2: ELETROFORESE EM GEL

O objetivo desta atividade de laboratório é aprender a trabalhar com eletroforese em gel, uma técnica usada para separar e identificar uma mistura de biomoléculas, inclusive o DNA. O tamanho dos componentes de cada mistura pode ser identificado pela localização no gel. Como as biomoléculas são microscópicas, é muito difícil enxergá-las a olho nu e estimar seu tamanho exato. A eletroforese em gel permite que cientistas visualizem as informações e comparem várias biomoléculas com facilidade. A eletroforese em gel é baseada no fato de que muitas biomoléculas têm carga negativa, então elas se movimentam em resposta a uma carga elétrica. As biomoléculas se movem pelo gel e a distância que percorrem em determinado tempo varia, principalmente de acordo com o tamanho. O formato da molécula e o tipo de carga, no entanto, também influenciam o movimento.

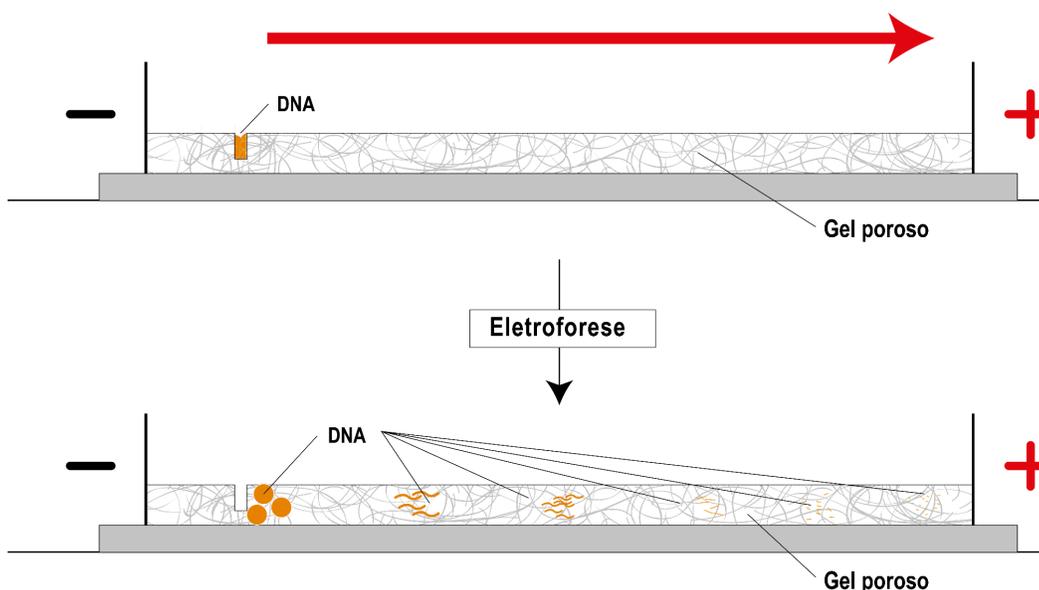
Para aplicar a eletroforese, precisamos de uma cuba com gel de agarose e dois eletrodos, que criam um campo elétrico no gel quando a cuba é conectada a uma fonte de energia. O eletrodo negativo é preto e o eletrodo positivo é vermelho. Os **poços** são depressões na agarose capazes de reter pequenos volumes de amostras. As moléculas em um poço vão se movimentar pelo gel e serão classificadas de acordo com a carga e o tamanho. As amostras de biomoléculas com carga negativa são pipetadas nos poços próximos ao eletrodo negativo (preto). As amostras se movem pelo gel em direção ao eletrodo positivo (vermelho), conforme mostrado na **Figura 1.3**, porque cargas opostas se atraem e cargas iguais se repelem.

Figura 1.3: A unidade de eletroforese em gel



O gel pelo qual as biomoléculas se movem é composto de **agarose**, um polissacarídeo (açúcar complexo) encontrado em algas marinhas. Ele tem uma matriz porosa (como uma esponja) com vários buracos pelos quais a solução e as biomoléculas se movimentam. **Veja a Figura 1.4.**

Figura 1.4: O movimento de biomoléculas, como o DNA, pela matriz do gel de agarose na eletroforese em gel



## ANTES DO LABORATÓRIO

Responda às seguintes perguntas com seu grupo e se prepare para compartilhar suas respostas com a turma.

1. Em que circunstâncias pode ser importante usar a eletroforese em gel para separar e identificar plasmídeos e pequenos pedaços lineares de DNA?
2. Vá até a seção Métodos, leia as páginas 18 a 20 e faça uma breve descrição das etapas da Parte A e da Parte B, usando palavras e um fluxograma.

## MATERIAIS

### Reagentes

- Suporte de plástico para tubo de microcentrífuga, contendo:
  - ◆ Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante vermelho (CV)
  - ◆ Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante 1 (S1)
  - ◆ Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante 2 (S2)
  - ◆ Tubo de microcentrífuga com uma solução de corante 3 (S3)
- Frasco de 50 mL com tampão de borato de sódio 1x (tampão SB 1x) - esse reagente pode ser compartilhado com outro grupo

### Equipamentos e suprimentos

- Micropipeta P-20 (de 2,0  $\mu$ L a 20,0  $\mu$ L)
- Caixa de ponteiras descartáveis
- Placas para pipetagem com 0,8% de gel de agarose

- Placa de pipetagem para teste, com agarose concentrada
- Cuba de eletroforese com 0,8% de gel de agarose
- Microcentrífuga (será compartilhada entre os grupos)
- Coletor para descarte de ponteiros e tubos de microcentrífuga usados (será compartilhado entre os grupos)

### SEGURANÇA:

- Tome todas as precauções e use vestimentas de segurança adequadas para atividades em laboratório de ciências, inclusive óculos de proteção. Siga as instruções do seu educador.
- Lave as mãos muito bem com sabão antes e depois de utilizar o laboratório.

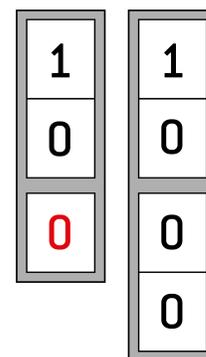


## MÉTODOS

### PARTE A: PIPETAGEM EM POÇOS

Você vai pipetar corante vermelho nos poços formados no gel de agarose.

1. Verifique se o suporte contém o tubo de microcentrífuga com o corante vermelho (CV).
2. Encha as duas placas para pipetagem com tampão SB 1x até cobrir toda a superfície do gel. Se você notar algum “furinho” sobre os poços, adicione mais **tampão** (uma solução capaz de manter o pH praticamente constante. Na eletroforese em gel, ele evita que o pH do gel seja alterado devido à corrente elétrica).
3. Configure a micropipeta P-20 para 10,0 µL e conecte uma ponteira.
4. Aspire 10,0 µL na micropipeta.



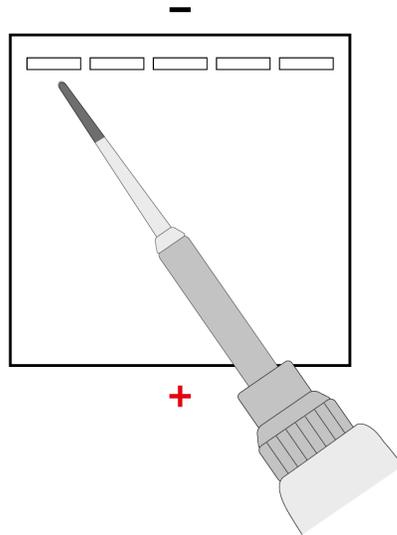
**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** não deite a micropipeta com líquido na ponteira nem a segure com a ponteira virada para cima.



5. Dispense o corante vermelho no poço em uma das placas da seguinte maneira:
  - a. Coloque o cotovelo sobre a bancada para dar estabilidade à pipeta que você está segurando. Se necessário, use a outra mão para apoiar a que está segurando a pipeta.
  - b. Insira a ponteira no tampão, sem tocar no poço.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** cuidado para não inserir a ponteira no poço, porque você pode perfurar o gel e inutilizar o poço.





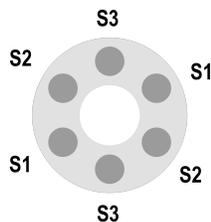
- c. Pressione suavemente o botão de pipetagem para dispensar a amostra com delicadeza. Para evitar a entrada de ar no tampão, não passe da primeira parada. A amostra afundará no poço.
6. Repita os passos 4 a 5 até que todos os poços das placas tenham sido preenchidos. Cada integrante do grupo deve ter a oportunidade de fazer a pipetagem nos poços.
7. Ejete a ponteira.

## PARTE B: COMO SEPARAR CORANTES COM ELETROFORESE EM GEL

Agora você usará a eletroforese em gel para separar corantes diferentes. Primeiro, adicione corantes aos poços na unidade de eletroforese em gel. Em seguida, ligue a unidade para movimentar os corantes com carga negativa pelo gel. (Você compartilhará as cubas de eletroforese com outro grupo. Sua professora ou seu professor vai informar quais poços seu grupo deve usar).

1. Verifique se o suporte contém os tubos de microcentrifuga com as 3 soluções de corante (S1, S2 e S3).
2. Veja a **Figura 1.4** na página 17. Verifique se os poços no gel estão próximos ao eletrodo negativo (preto).
3. Encha a cuba com tampão SB 1x até cobrir toda a superfície do gel. Se você notar algum “furinho” sobre os poços, adicione mais tampão.
4. Centrifugue os tubos de microcentrifuga com os corantes S1, S2 e S3.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** distribua os tubos de microcentrifuga uniformemente na microcentrifuga de modo que o peso fique equilibrado.



5. Faça um desenho no caderno mostrando a localização dos poços na cuba de eletroforese. Anote a solução colocada em cada poço.

6. Configure a micropipeta P-20 para 10,0  $\mu\text{L}$  e encaixe uma ponteira.
7. Aspire 10,0  $\mu\text{L}$  de corante S1 na micropipeta.
8. Dispense o corante S1 no poço que você designou para a solução da seguinte maneira:
  - a. Coloque o cotovelo sobre a bancada para dar estabilidade à pipeta que você está segurando. Se necessário, use a outra mão para apoiar aquela que está segurando a pipeta.
  - b. Insira a ponteira no tampão, sem tocar no poço.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** não perfure o gel com a ponteira, porque isso vai inutilizá-lo, fazendo com que a amostra afunde no buraco abaixo do gel em vez de se movimentar por ele.



- c. Pressione suavemente o botão de pipetagem para dispensar a amostra lentamente. Para evitar a entrada de ar no tampão, não passe da primeira parada. A amostra afundará no poço.

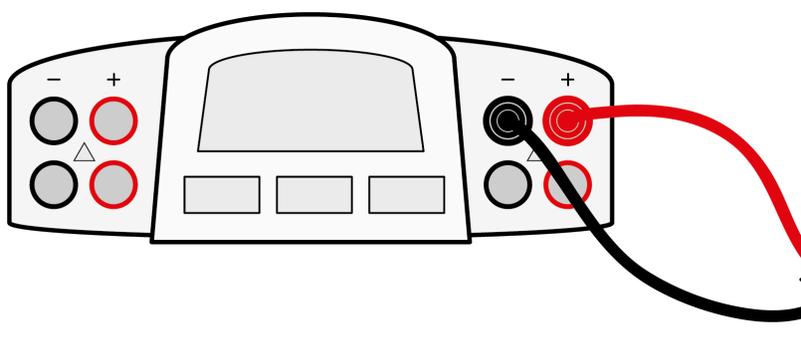
**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:**

- Com o botão de pipetagem ainda pressionado, retire a ponteira do tampão para não aspirar a solução nem o tampão.
- Use uma ponteira nova para cada amostra.



9. Usando uma ponteira nova com cada solução, repita os passos 7 e 8 para os corantes S2 e S3.
10. Quando todas as amostras tiverem sido colocadas, feche muito bem a tampa da cuba de eletroforese. Feche a tampa com cuidado para não derramar as amostras.
11. Conecte os cabos à fonte de energia. Conecte os 2 cabos ao canal correspondente, cátodo (-) com cátodo (preto com preto) e ânodo (+) com ânodo (vermelho com vermelho). Veja a **Figura 1.5**.

**Figura 1.5:** Cabos da cuba de eletroforese conectados ao canal correto na fonte de energia



12. Ligue a fonte de energia e configure a tensão entre 130 V e 135 V. Você verá bolhas se formando no tampão na extremidade vermelha (+) da unidade de eletroforese.
13. Depois de 2 ou 3 minutos, verifique se os corantes estão se movendo em direção ao eletrodo positivo (vermelho). Você deve ver o corante roxo (azul de bromofenol) começar a se separar do corante azul (xileno cianol).

**PARE E PENSE:**



- **Estude os resultados da eletroforese em gel. Qual amostra de solução continha um único corante: S1, S2 ou S3? Como você sabe?**
- **Qual é a carga elétrica dos corantes? Explique seu raciocínio.**
- **Os corantes que você está separando são alaranjado G (amarelo), azul de bromofenol (roxo) e xileno cianol (azul). Se o formato das moléculas for considerado similar e a carga elétrica dos 3 corantes for considerada igual, como você ordenaria as moléculas de corante, da mais pesada para a mais leve? Explique seu raciocínio.**

14. Em aproximadamente 10 minutos, ou quando você conseguir distinguir os 3 corantes, desligue o interruptor e desconecte os eletrodos da fonte de energia. Puxe o plugue de plástico do eletrodo, NÃO o cabo.
15. Remova com cuidado a tampa da cuba e observe os corantes no gel.
16. Em seu caderno, desenhe o local relativo e as cores das bandas em cada uma das faixas com as amostras.
17. Deixe as amostras na cuba.

## CAPÍTULO 1: PERGUNTAS

1. Na biotecnologia, por que é útil usar uma micropipeta para medir reagentes em vez de outro instrumento medidor?
2. O que os resultados da eletroforese em gel nos informam a respeito das amostras de DNA que separamos?

### VOCÊ SABIA?



#### Eletroforese em gel na impressão digital genética

A impressão digital genética utiliza a eletroforese em gel para diferenciar amostras de material genético. Na impressão digital genética, as moléculas de DNA humano são tratadas com as chamadas "enzimas de restrição" -enzimas que cortam o DNA em determinados pontos característicos e o reduzem a um conjunto de pedaços menores e mais manejáveis. Os fragmentos de DNA são inseridos em um gel e colocados em um campo elétrico, que classifica os fragmentos de DNA em várias bandas. Essas bandas podem ser coloridas com um corante fluorescente, sensível à luz ultravioleta para torná-las visíveis às técnicas de imagem. Os métodos de identificação de DNA são aplicados em muitas áreas da ciência e tecnologia, inclusive na medicina (testes pré-natais, rastreamento genético), biologia da conservação (orientação de programas de reprodução em cativeiro para espécies ameaçadas) e ciência forense. Nessa última área, a análise do padrão dos fragmentos de DNA resultante da ação das enzimas de restrição nos ajuda a distinguir os suspeitos acusados de um crime ou os possíveis pais em uma ação de reconhecimento de paternidade.

# CAPÍTULO 1: GLOSSÁRIO

**Agarose:** polímero formado por moléculas de açúcar que é usado como matriz em processos de eletroforese em gel.

**Doença genética:** doença causada por uma alteração no DNA. Normalmente, as doenças genéticas são herdadas dos pais.

**Eletroforese em gel:** movimento das moléculas carregadas em direção ao eletrodo de carga oposta. Técnica usada para separar biomoléculas. Quando usada para separar fragmentos de DNA, a eletroforese separa os fragmentos por tamanho, sendo que os fragmentos menores se movimentam mais rapidamente que os fragmentos maiores.

**Micropipeta:** instrumento de laboratório usado para medir, dispensar e transferir quantidades muito pequenas de líquidos.

**Poço:** depressão na agarose capaz de reter pequenos volumes de amostras.

**Tampão:** solução capaz de manter o pH praticamente constante. Na eletroforese em gel, ele evita que o pH do gel seja alterado devido à corrente elétrica.

## **CAPÍTULO 2A**

# **COMO COMEÇAR A CLONAR UM GENE?**

# INTRODUÇÃO

---

Na Introdução ao Programa, você aprendeu sobre o desenvolvimento de produtos biofarmacêuticos e conheceu as técnicas utilizadas no desenvolvimento desses produtos terapêuticos. Uma dessas técnicas, a transformação bacteriana, permite que genes humanos sejam inseridos na bactéria, fazendo com que ela produza as proteínas terapêuticas humanas. No capítulo 1, você teve a oportunidade de trabalhar com duas ferramentas físicas e técnicas de engenharia genética usadas na clonagem de genes: a micropipeta e a eletroforese em gel. Neste capítulo, você vai trabalhar com outras duas ferramentas importantes de engenharia genética: plasmídeos e enzimas de restrição. Na verdade, essas “ferramentas” são biomoléculas presentes em muitas bactérias, e a descoberta delas foi crucial para a engenharia genética. Com essas ferramentas, os cientistas conseguem modificar microrganismos para produzir proteínas humanas. Agora você vai conhecer essas ferramentas e dar os primeiros passos em sua missão de clonar um gene.

## CAPÍTULO 2A: OBJETIVOS

Ao final deste capítulo, você saberá:

- Descrever as características dos plasmídeos
- Explicar como os plasmídeos são usados na clonagem de genes
- Descrever a função das enzimas de restrição
- Explicar como usar as enzimas de restrição para criar um plasmídeo recombinante

## O QUE VOCÊ JÁ SABE?

Discuta com seu colega as perguntas a seguir e anote suas ideias no caderno. Prepare-se para discutir suas respostas com a turma. Não se preocupe se você não souber todas as respostas. Discutir essas perguntas vai ajudar você a refletir sobre seus conhecimentos de DNA, plasmídeos e enzimas de restrição.

1. Qual é a estrutura e a função do DNA? Descreva em palavras ou faça um desenho da estrutura de uma molécula de DNA. Seja o mais detalhista possível.
2. Todos os organismos vivos têm DNA. Quais são as semelhanças e diferenças no DNA de organismos distintos e como ele varia?
3. Por que uma célula bacteriana consegue produzir proteína humana a partir das instruções codificadas em um gene humano? Explique sua resposta usando seus conhecimentos sobre genes e como são expressos.
4. Conforme descrito na Introdução ao Programa, os cientistas usam duas ferramentas biológicas para fazer com que organismos produzam novas proteínas: plasmídeos e enzimas de restrição. Você se lembra de como essas ferramentas são usadas?

## SEU DESAFIO

Agora que já conhece as ferramentas básicas da biotecnologia, você terá a oportunidade de realizar alguns dos mesmos procedimentos usados pelos cientistas para produzir proteínas terapêuticas humanas. Mas, em vez de produzir proteína humana, você vai modificar a *E. coli* (uma bactéria comum presente no intestino de animais endotérmicos) para produzir uma proteína da anêmona-do-mar chamada **proteína fluorescente vermelha** (conhecida internacionalmente por RFP, de *red fluorescent protein*), que é direcionada por um gene chamado *rfp* (repare que o gene tem o mesmo nome da proteína, mas em letras minúsculas). A anêmona-do-mar é um animal de corpo mole, parente dos corais e das águas-vivas.

Na atividade de laboratório, você vai adicionar à *E. coli* uma nova proteína, que lhe dará uma característica que ela não tinha antes: a capacidade de brilhar. Como você saberá se deu certo? A bactéria que você criar terá uma nova característica bastante visível: ela produzirá RFP, que dará às células uma tonalidade vermelha ou rosa brilhante!

**OBSERVAÇÃO:** o número de etapas pode variar dependendo do tempo de aula.

### VOCÊ SABIA?



#### Proteína fluorescente vermelha nas anêmonas-do-mar

A RFP é derivada de uma proteína presente nas anêmonas-do-mar (veja a **Figura 2A.1**). Embora as anêmonas-do-mar sejam sedentárias e fixadas às rochas, elas são animais predadores e usam seus tentáculos venenosos para capturar presas. A proteína brilha porque consegue absorver determinada cor de luz e emitir uma luz de outra cor, um processo chamado **fluorescência**. Mas por que a fluorescência é importante para as anêmonas-do-mar? Nosso melhor palpite é que as proteínas fluorescentes ajudam na sobrevivência das anêmonas-do-mar, mas ainda não se sabe muito bem qual é a função dessas proteínas.

As moléculas fluorescentes podem servir como uma barreira contra o sol, transformando a luz UV nociva em uma luz menos prejudicial para os tecidos das anêmonas. Outra possibilidade é que outros animais consigam detectar a fluorescência na luz solar e sejam atraídos pelo brilho, tornando-se presas fáceis.

**Figura 2A.1:** Anêmona-do-mar, *Discosoma* sp.



# COMO COMEÇAR A CLONAR UM GENE

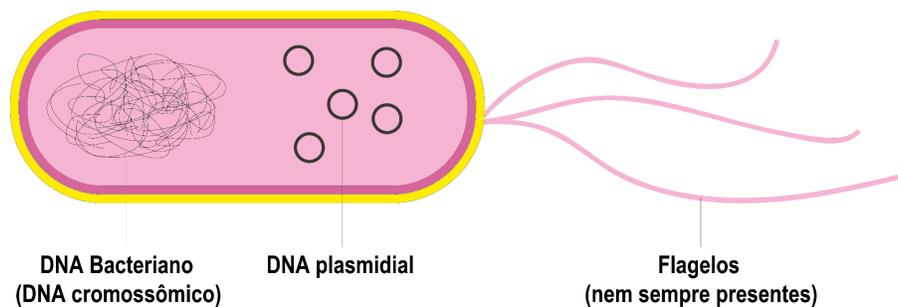
Neste capítulo, você vai conhecer o uso dos plasmídeos e das enzimas de restrição na biotecnologia. A **clonagem de DNA** é o processo de produzir muitas cópias exatas de um pedaço específico de DNA. Primeiro, um gene específico (por exemplo, o gene de uma proteína terapêutica humana) é cortado usando uma enzima de restrição. Em seguida, ele é colado a outros fragmentos para criar um **plasmídeo recombinante**, um plasmídeo produzido com fragmentos de DNA de fontes diferentes.

A descoberta dos plasmídeos e das enzimas de restrição nas bactérias é um exemplo clássico de como as descobertas feitas em pesquisas básicas podem revolucionar uma área. Quando essas biomoléculas foram descobertas, os cientistas tiveram grandes avanços na compreensão de processos vitais fundamentais e no desenvolvimento de produtos para melhorar a qualidade de vida.

## PLASMÍDEOS

Muitos tipos diferentes de bactérias carregam duas formas de DNA: (1) um único cromossomo formado por uma grande molécula de DNA com todas as informações necessárias para que o organismo sobreviva e se reproduza e (2) plasmídeos, pequenas moléculas circulares de DNA, cujo tamanho varia entre 1.000 e 200.000 **pares de base** (duas bases nitrogenadas unidas para conectar fitas complementares de DNA) presentes em várias cópias separadas do DNA cromossômico (veja a **Figura 2A.2**). Algumas bactérias carregam até 500 plasmídeos em cada célula.

Figura 2A.2: DNA das células bacterianas



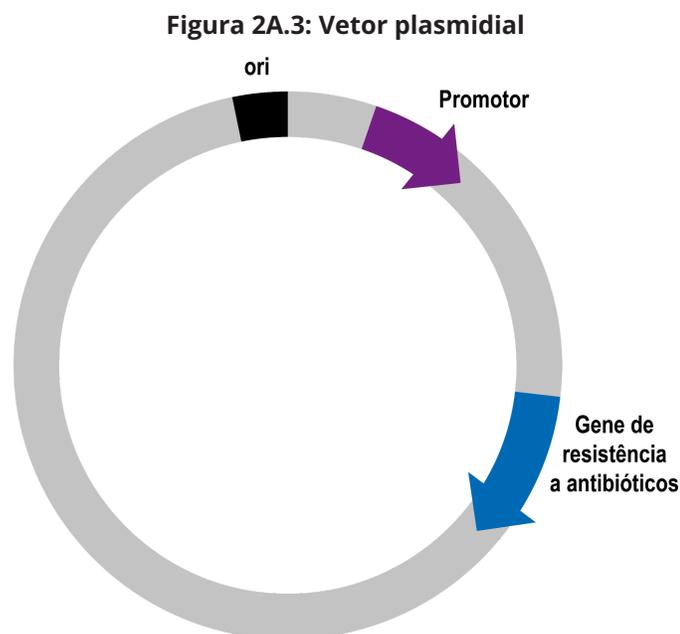
Os plasmídeos têm quatro características que fazem deles **vetores** (veículos que transportam sequências de DNA de um organismo para outro) ideais para a engenharia genética: (1) a capacidade de se replicar; (2) a capacidade de iniciar a transcrição; (3) um gene ou genes que codificam a resistência a **antibióticos** - uma classe de compostos que matam ou inibem o crescimento de microrganismos; e (4) a capacidade de serem transmitidos entre as bactérias. A seguir, descrevemos essas características em detalhes:

1. Os plasmídeos têm a capacidade de se replicar, ou seja, de produzir cópias de si mesmos independentemente do cromossomo bacteriano. Para isso, os plasmídeos têm uma sequência específica à qual as enzimas de síntese de DNA da célula hospedeira se ligam e iniciam a **replicação do DNA** (um processo biológico que ocorre em todos os organismos vivos para fazer cópias de seu DNA). Essa sequência é chamada de local de **origem da replicação (ori)**.
2. Os plasmídeos podem iniciar a **transcrição** – processo pelo qual as informações codificadas no DNA são transferidas para o **RNA mensageiro (RNAm)**. O RNAm é uma molécula de RNA transcrita a partir

do DNA de um gene usado como molde para a síntese de proteínas, usando a **RNA-polimerase** (proteína que produz RNAm a partir do DNA) da célula hospedeira. O **RNA**, ou **ácido ribonucleico**, é uma biomolécula formada por uma fita simples, composta de uma base nitrogenada, um açúcar ribose e um fosfato. Ele desempenha uma função essencial na síntese de proteínas, transmitindo as informações genéticas do DNA para o ribossomo, onde as proteínas são produzidas. Essa capacidade requer outra sequência, chamada **promotor** (uma sequência específica de DNA que se liga à RNA polimerase e inicia a transcrição do gene). O promotor se liga à RNA-polimerase, onde a transcrição é iniciada. Todos os genes têm promotores próximos no DNA. Para que os genes de proteínas terapêuticas humanas sejam expressos nas bactérias, eles devem ser inseridos no plasmídeo próximo ao promotor.

3. Os plasmídeos têm um gene ou genes que codificam a **resistência a antibióticos** (o estado em que as bactérias não são mais sensíveis a um antibiótico e continuarão crescendo e se dividindo na presença desse antibiótico). Esses genes codificam as proteínas que inibem a ação dos antibióticos secretados pelos microrganismos, o que pode conferir uma vantagem seletiva às bactérias com plasmídeos em uma população microbiana em que as bactérias competem pela sobrevivência.
4. Os plasmídeos podem ser transmitidos de uma cepa bacteriana para outra em um processo chamado **conjugação bacteriana**, que permite que as bactérias compartilhem e troquem informações genéticas. Quando um plasmídeo com um gene de resistência a antibióticos é absorvido por uma bactéria sem esse plasmídeo, a bactéria se tornará resistente a esse antibiótico específico. Na natureza, a conjugação ocorre com baixíssima eficiência, ou seja, apenas uma pequena porcentagem de bactérias em uma população consegue absorver um DNA plasmidial a qualquer momento.

A **Figura 2A.3** ilustra os componentes básicos de um plasmídeo.



**REFLITA:** use seus conhecimentos sobre seleção natural e evolução para descrever como os plasmídeos podem conferir uma vantagem seletiva à bactéria hospedeira.



Os plasmídeos são uma ferramenta poderosa para cientistas desenvolverem técnicas de clonagem de genes em bactérias. Eles funcionam como um vetor que pode ser absorvido pelas bactérias e replicado para produzir muitas cópias de si mesmo, além de ter um promotor para a transcrição de um gene inserido e carregar um gene de resistência a antibióticos. A presença de um gene de resistência a antibióticos no vetor plasmidial permite que os cientistas identifiquem a pequena porcentagem de bactérias que absorveram o plasmídeo. As bactérias que não absorveram o plasmídeo serão mortas pelo antibiótico. As que têm o plasmídeo com o gene de interesse vão sobreviver e crescer. A atividade de laboratório do Capítulo 5 aproveita essas características dos plasmídeos para transferir o plasmídeo recombinante para a bactéria.

Depois que os cientistas reconheceram o poder dos plasmídeos como um possível vetor, o desafio seguinte foi determinar como incorporar um gene de interesse, como o gene da insulina, ao DNA plasmidial. Os plasmídeos com os quais você trabalhará nesta atividade e nas próximas têm os genes para resistência aos antibióticos ampicilina e canamicina. Esses genes produzem proteínas que inativam o antibiótico-alvo por meio da modificação química de sua estrutura.

## ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

No início da década de 1950, os cientistas observaram que determinadas cepas de *E. coli*, uma bactéria comum presente no intestino humano, eram resistentes a infecções pelo vírus **bacteriófago**, que infecta as bactérias injetando seu DNA e controlando os processos moleculares da célula hospedeira para produzir mais bacteriófagos. As investigações desse primitivo "sistema imunológico" bacteriano levaram à descoberta das enzimas de restrição, proteínas que restringem o crescimento dos bacteriófagos por meio do reconhecimento e da destruição do DNA do fago sem danificar o DNA da célula (bacteriana) hospedeira. Estudos posteriores demonstraram que as enzimas de restrição de diferentes cepas de bactérias cortam o DNA em sequências específicas, chamadas de **sítios de restrição**.

**REFLITA:** como as bactérias que carregam uma enzima de restrição evitam que seu próprio DNA seja cortado?



Tabela 2A.1: Enzimas de restrição usadas neste laboratório

Fonte	Enzima de restrição	Local de restrição
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	$\begin{array}{c} 5' \text{ GAATTC } 3' \\ \downarrow \\ 3' \text{ CTTAAG } 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>BamHI</i>	$\begin{array}{c} 5' \text{ GGATCC } 3' \\ \downarrow \\ 3' \text{ CCTAGG } 5' \\ \uparrow \end{array}$
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>HindIII</i>	$\begin{array}{c} 5' \text{ AAGCTT } 3' \\ \downarrow \\ 3' \text{ TTCGAA } 5' \\ \uparrow \end{array}$

Atenção: Os símbolos  $\uparrow$  e  $\downarrow$  indicam onde o DNA é cortado.

A **Tabela 2A.1** mostra exemplos de enzimas de restrição isoladas de diferentes cepas de bactérias e as sequências de DNA que elas cortam. Nos exemplos apresentados, as enzimas cortam as fitas de DNA assimetricamente, deixando sequências soltas de fita simples no sítio do corte. Por exemplo, um corte (ou **digestão**) com a enzima de restrição *EcoRI* deixará uma sequência solta AATT (ou "**extremidade coesiva**") em uma fita e uma extremidade coesiva TTAA na outra fita.

**REFLITA:**

- Qual é a sequência da extremidade coesiva resultante quando o DNA é cortado com a enzima *BamHI*? E com a enzima *HindIII*?
- Os cientistas podem modificar os plasmídeos para que tenham um único sítio de enzima de restrição. Imagine que você tem um plasmídeo com um único sítio da enzima *EcoRI*. Desenhe a estrutura do plasmídeo depois de ter sido cortado com a enzima e mostre as sequências de nucleotídeos deixadas no sítio do corte. Se você quiser inserir um gene de uma planta nesse local, qual enzima deve usar para cortar o DNA da planta? Explique sua resposta.



**VOCÊ SABIA?**



### **O surgimento das bactérias resistentes a antibióticos**

Os antibióticos e medicamentos similares têm sido usados nos últimos setenta anos para tratar pacientes com doenças infecciosas. Quando prescritos e tomados corretamente, os antibióticos são muito valiosos no tratamento de pacientes. No entanto, esses medicamentos têm sido usados de forma tão indiscriminada e por tanto tempo que os organismos infecciosos que os antibióticos devem matar se adaptaram a eles, diminuindo a eficiência dos medicamentos. A resistência a antibióticos ocorre se algumas bactérias em uma população forem capazes de sobreviver quando expostas a um ou mais antibióticos. Essas espécies que se tornaram resistentes causam infecções que não podem ser tratadas com medicamentos antibióticos comuns nas dosagens e concentrações usuais. Algumas desenvolveram resistência a vários antibióticos e receberam o apelido de bactérias multirresistentes ou "superbactérias".



A resistência a antibióticos é um fenômeno grave e crescente, que tem se mostrado como um dos principais problemas de saúde pública do século XXI. Quando os organismos resistentes a medicamentos adquirem resistência a antibióticos de primeira linha (selecionados de acordo com vários benefícios, inclusive segurança, disponibilidade e custo), é necessário usar agentes de segunda linha. Normalmente, os antibióticos de segunda linha abrangem um espectro mais amplo, podendo ser menos benéficos em relação aos riscos associados, além de serem mais caros e difíceis de encontrar.

---

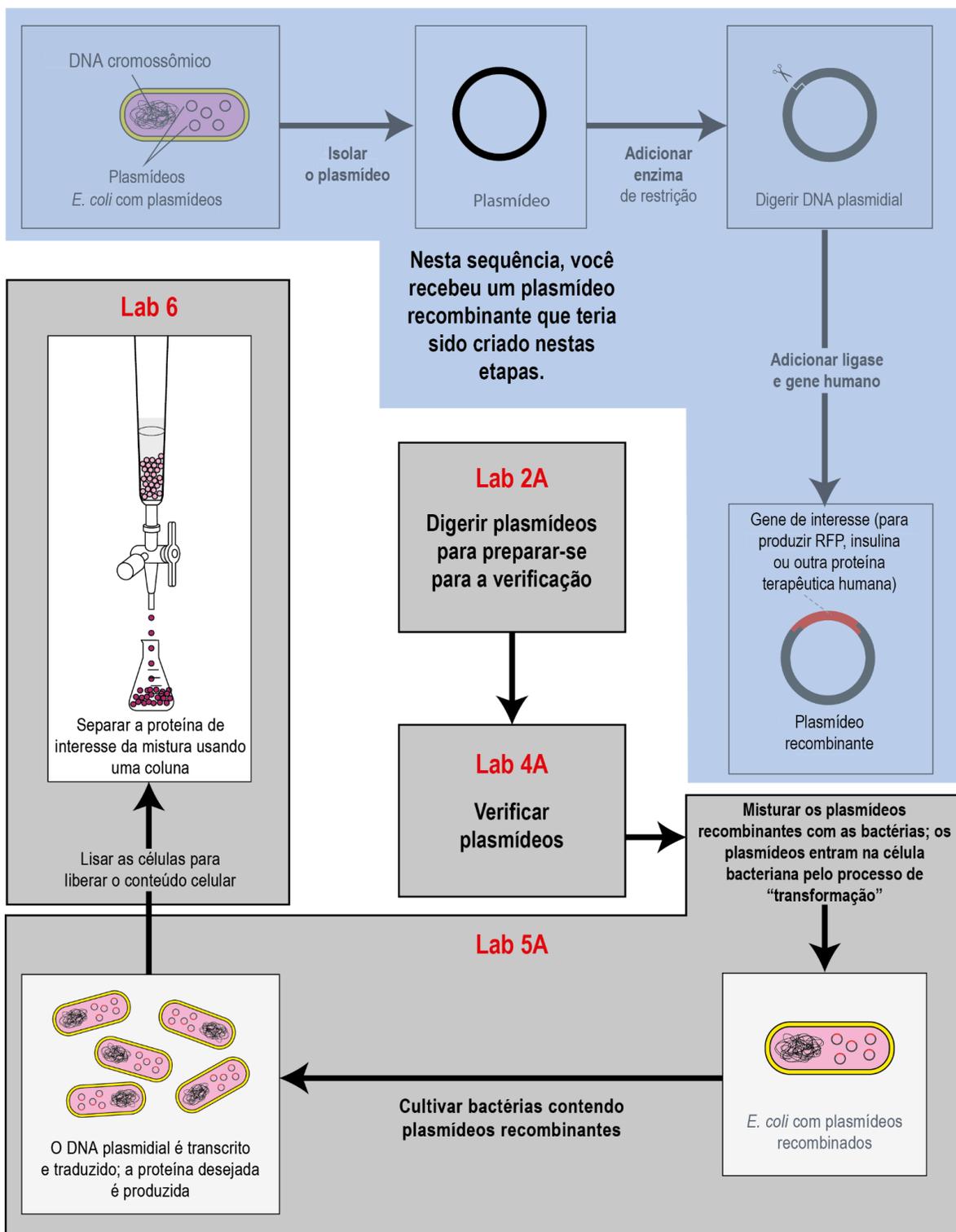
## COMO PRODUZIR PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS HUMANAS EM BACTÉRIAS

Você conhece alguém que tenha **diabetes** (doença que ocorre quando os níveis de glicose [açúcar] no sangue de uma pessoa são muito altos), **hemofilia** (que ocorre quando a capacidade de coagulação do sangue é reduzida) e **deficiência de hormônio de crescimento** (doença em que a pessoa não cresce adequadamente)? Essas três doenças ocorrem porque o corpo da pessoa não consegue produzir determinadas proteínas. No caso da diabetes, o corpo não consegue produzir **insulina** (hormônio do pâncreas que controla a quantidade de glicose no sangue). Pessoas com hemofilia são incapazes de produzir **fatores de coagulação do sangue** (uma variedade de proteínas no plasma sanguíneo que participam do processo de coagulação). A deficiência de hormônio de crescimento ocorre quando a pessoa não consegue produzir o **hormônio do crescimento humano** (hormônio secretado pela glândula pituitária que estimula o crescimento). Um paciente com qualquer uma dessas doenças precisa ser tratado com a proteína ausente.

Antes do desenvolvimento das tecnologias do DNA recombinante, as proteínas terapêuticas humanas eram extraídas de animais ou de outros humanos. A insulina era originalmente isolada dos pâncreas dos porcos e das vacas. O hormônio do crescimento humano era extraído das glândulas pituitárias de cadáveres humanos. Esses métodos eram eficientes, mas usar proteínas produzidas por animais às vezes causava reações adversas, além de ser difícil produzi-las em grandes quantidades. Hoje, os cientistas descobriram como adicionar o DNA humano ao DNA de uma bactéria, permitindo que a bactéria produza proteína humana.

No processo de engenharia genética, um gene humano é adicionado a um plasmídeo que foi cortado usando enzimas de restrição. O plasmídeo é incorporado pelas células bacterianas em um processo chamado **transformação bacteriana**, e as células usam suas próprias proteínas para produzir a proteína humana que é codificada pelo gene humano (veja a **Figura 2A.4**). Durante esse processo, os cientistas usam uma combinação de ferramentas humanas e biológicas. Nessas atividades de laboratório, você vai conhecer e usar essas ferramentas para entender em primeira mão como elas funcionam.

Figura 2A.4: Produção de proteína terapêutica humana em bactérias



# VAMOS CLONAR O GENE

---

Agora você conhece duas ferramentas biotecnológicas para clonagem de gene: plasmídeos e enzimas de restrição.

1. Os plasmídeos apresentam diversas características importantes:
  - Uma sequência para iniciar a replicação do DNA, chamada sítio *ori* (local de origem da replicação), que permite que o plasmídeo se replique na bactéria usando as enzimas de síntese de DNA da célula hospedeira.
  - Um promotor para iniciar a transcrição do gene inserido.
  - Um gene codificador de uma proteína para resistência a antibióticos que permite a identificação das bactérias que absorveram o plasmídeo.
2. As enzimas de restrição digerem (clivam) o plasmídeo e o DNA humano que contém o gene de interesse (como a insulina) a ser clonado.

Como os cientistas utilizam essas duas ferramentas para criar um plasmídeo recombinante com o gene humano inserido em um plasmídeo bacteriano? Uma etapa importante é escolher uma enzima (ou enzimas) de restrição que corte o plasmídeo e o DNA humano. A(s) enzima(s) de restrição deve(m) realizar todos os processos a seguir:

- Cortar o plasmídeo em um sítio (ou sítios) que permita a inserção do novo gene.
- Cortar o plasmídeo no local adequado para garantir que nenhum gene ou sequências importantes sejam destruídos, inclusive o sítio *ori*, o promotor e pelo menos um dos genes codificadores da resistência a antibióticos.
- Cortar o plasmídeo próximo ao promotor de modo que o gene inserido possa ser expresso.
- Cortar o DNA humano o mais próximo possível das duas extremidades do gene de interesse de modo que esse gene possa ser inserido no sítio apropriado no DNA plasmidial, sem cortar o gene.

**PARE E PENSE:** por que é fundamental utilizar a mesma enzima (ou enzimas) para realizar o corte tanto no plasmídeo quanto no gene de interesse do DNA humano?



Nesta atividade, você fará um modelo de papel de um plasmídeo recombinante com um gene de uma proteína terapêutica humana, nesse caso, a insulina. Você tem três tarefas:

1. Cortar o plasmídeo e o DNA humano com a enzima de restrição apropriada. Atenção que a enzima para clivar o plasmídeo e o DNA humano precisa ser a mesma.
2. Inserir o gene da insulina no DNA plasmidial.
3. Determinar qual antibiótico você usaria para identificar as bactérias que absorveram o plasmídeo

## FOLHA DE ATIVIDADES

- Diagrama do plasmídeo (Anexo 2 - Guia do Educador)
- Sequência do DNA humano (Anexo 3 - Guia do Educador)

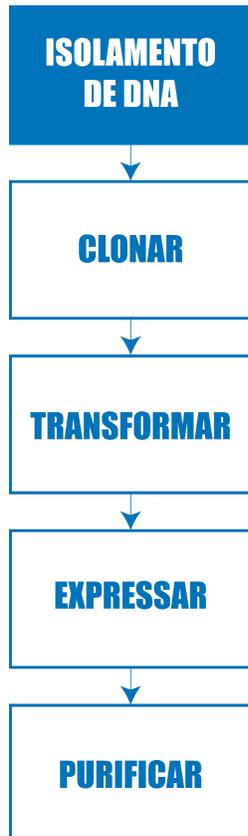
## PROCEDIMENTO

2. Para o diagrama do plasmídeo (Anexo 2 - Guia do Educador):
  - Use uma tesoura para cortar a sequência do plasmídeo e cole as extremidades para fazer um modelo de papel do plasmídeo.
  - Localize as posições do sítio ori (local de origem da replicação), do promotor e dos genes de resistência a antibióticos.
  - Localize as posições de cada sítio de enzima de restrição.
3. Escolha a enzima de restrição que deve ser usada para cortar o plasmídeo. Verifique se a enzima de restrição atende aos seguintes critérios:
  - Deixa o sítio ori, o promotor e pelo menos um gene de resistência a antibióticos intactos.
  - Realiza o corte no plasmídeo apenas uma vez.
  - O corte precisa ser próximo ao promotor.
4. Consulte a Tabela 2A.1 na página 29 e use uma tesoura para cortar o plasmídeo no sítio de restrição exatamente como a enzima de restrição cortaria. Escreva as sequências dos nucleotídeos que são deixadas em cada extremidade do plasmídeo.
5. Examine a sequência do DNA Humano (Anexo 3 - Guia do Educador) e determine onde as três enzimas de restrição (BamHI, EcoRI e HindIII) cortariam o DNA.
6. Determine se a enzima de restrição que você escolheu na etapa 2 serve para cortar o gene da insulina do DNA humano, verificando se ela atende a todos os critérios a seguir:
  - Ela não corta no meio o gene da insulina.
  - Ela corta bem próximo ao começo e ao final do gene.
  - Ela permitirá que o gene da insulina seja inserido no plasmídeo cortado.
7. Consulte a Tabela 2A.1 e use uma tesoura para cortar o DNA humano no sítio de restrição exatamente como a enzima de restrição cortaria. Escreva as sequências dos nucleotídeos que ficaram em cada extremidade do gene da insulina após ter sido cortado o DNA humano.
8. Use uma fita adesiva para inserir o gene da insulina no plasmídeo cortado. Verifique se as extremidades vão se unir na posição correta. (No laboratório, uma terceira ferramenta biológica, a DNA ligase, é usada para fazer a ligação permanente das extremidades coesivas.) Agora você tem um modelo de papel de um plasmídeo recombinante com o gene da insulina. Assim que o plasmídeo se replicar (fizer cópias de si mesmo), o gene da insulina também será copiado ou clonado!

## **PERGUNTAS SOBRE A ATIVIDADE**

1. Qual enzima de restrição você escolheu? Por que você escolheu essa enzima?
2. Onde você inseriria o gene da insulina e por quê?
3. Qual antibiótico você usaria para determinar se o DNA recombinante foi absorvido?

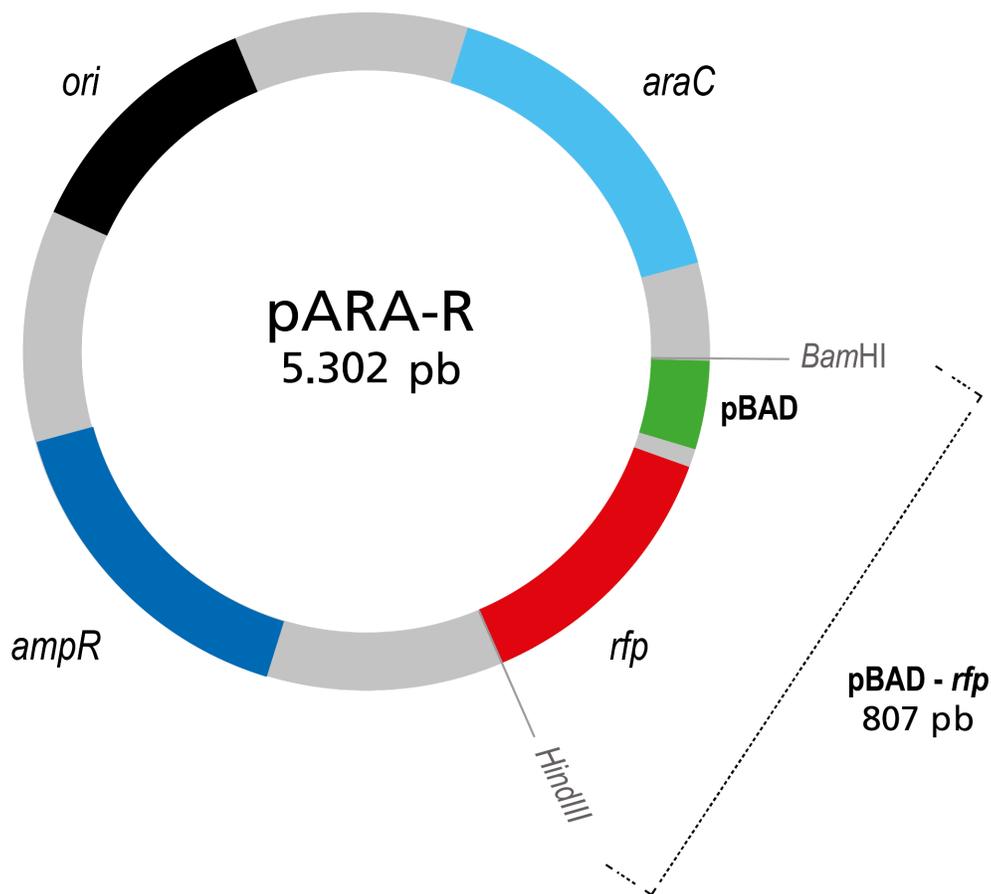
## LABORATÓRIO 2A: PREPARAÇÃO PARA VERIFICAR O GENE RFP: DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pARA-R



Para gerar proteínas terapêuticas humanas, os cientistas precisam primeiro isolar um fragmento de DNA com o gene humano que codifica a proteína desejada, depois inserir essa sequência em um plasmídeo. Neste experimento, você fará exatamente isso. Você vai precisar confirmar que o plasmídeo recombinante, pARA-R que você recebeu é o correto para produzir a RFP na bactéria. Para isso, você vai usar enzimas de restrição para cortar o plasmídeo (veja a Figura 2A.5), que vai gerar fragmentos de DNA com comprimentos característicos do plasmídeo pARA-R. Esse procedimento é chamado de *digestão por enzimas de restrição* e os comprimentos dos fragmentos podem ser determinados pela eletroforese em gel (que você poderá fazer no Capítulo 4A).

O plasmídeo de DNA recombinante, pARA-R contém o gene de resistência à *ampicilina*, o gene da proteína fluorescente vermelha (*rfp*), um promotor para iniciar a transcrição e o sítio *ori* para iniciar a replicação do DNA. O plasmídeo pARA-R também contém a sequência de DNA que ativa o promotor quando a bactéria cresce na presença de *arabinose*, um açúcar de cinco carbonos encontrado naturalmente em vários carboidratos vegetais e bacterianos. Essa sequência é chamada de *ativador* de arabinose (*araC*). O ativador controla o promotor. Se houver arabinose na bactéria, o promotor vai se ligar à RNA-polimerase, ocorrendo a transcrição. Se não houver arabinose na bactéria, o promotor não se liga à RNA-polimerase, não ocorrendo a transcrição.

Figura 2A.5: O plasmídeo pARA-R



Os componentes relevantes do plasmídeo são o gene *rfp*, o promotor (pBAD), o gene de resistência à ampicilina (*ampR*) e o ativador de arabinose (*araC*).

Além dos componentes relevantes, a **Figura 2A.5** mostra o tamanho do plasmídeo (o número no centro, que indica o número de pares de base [pb]) e as sequências onde ele pode ser cortado pelas enzimas de restrição que serão usadas na atividade de laboratório. Os pontos identificados como “*Bam*HI” e “*Hind*III” representam os sítios de restrição dessas duas enzimas (veja a **Tabela 2A.1**, na página 29.) A **Figura 2A.4** (página 33) mostra o gene da insulina sendo inserido em um único sítio de enzima de restrição no plasmídeo. Na clonagem do gene *rfp*, duas enzimas de restrição (*Bam*HI e *Hind*III) são usadas para cortar o plasmídeo e isolar o gene *rfp*. Usar duas enzimas de restrição diferentes traz suas vantagens: assim, o gene inserido pode ser colocado na posição correta para transcrever a fita codificadora do DNA (a fita que codifica a proteína) e evitar que o plasmídeo refaça o círculo sem o gene inserido. Você aprenderá mais sobre isso nas atividades do Capítulo 4A.

**PARE E PENSE:** por que usar duas enzimas diferentes para cortar o plasmídeo evita que o plasmídeo refaça o círculo sem o gene inserido?



## ANTES DO EXPERIMENTO DE LABORATÓRIO

Responda às seguintes perguntas com seu grupo e se prepare para compartilhar suas respostas com a turma.

1. Veja a **Figura 2A.5**. Se o pARA-R for digerido pelas enzimas *Bam*HI e *Hind*III, quais fragmentos serão produzidos? Registre a sequência de nucleotídeos das extremidades coesivas e o comprimento de cada fragmento (pb), e indique os genes e outras sequências importantes em cada fragmento.
2. Quais componentes são necessários no plasmídeo para criar um plasmídeo capaz de produzir RFP em bactérias?
3. As bactérias podem ser mortas por um antibiótico, a menos que carreguem um plasmídeo com um gene de resistência àquele antibiótico específico. Os cientistas chamam esses tipos de genes de **marcadores selecionáveis**; apenas as bactérias que carregam esse gene sobreviverão quando expostas a um antibiótico. Pensando nisso, responda: se a absorção do DNA pela bactéria for ineficiente (conforme discutido na seção de leitura, página 28), por que o marcador selecionável é essencial na clonagem de um gene na bactéria?
4. Vá até a seção *Métodos*, leia as páginas 40 e 41 e faça uma breve descrição das etapas, usando palavras e um fluxograma.

## MATERIAIS

### Reagentes

- Um suporte contendo:
  - ♦ Tubo de microcentrifuga com tampão de restrição 2,5 x (T 2,5x)
  - ♦ Tubo de microcentrifuga com o plasmídeo pARAR-R (pR-2A)
  - ♦ Tubo de microcentrifuga com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (ER)
  - ♦ Tubo de microcentrifuga com água destilada (dH<sub>2</sub>O)

### Equipamentos e suprimentos

- Micropipeta P-20
- Caixa de ponteiros descartáveis
- 2 tubos de microcentrifuga de 1,5 mL
- Marcador permanente
- Microcentrifuga (será compartilhada entre os grupos)
- Banho-maria a 37 °C com suporte flutuante para tubo de microcentrifuga (será compartilhado entre os grupos)
- Coletor para descarte de ponteiros e tubos de microcentrifuga usados (será compartilhado entre os grupos)

### SEGURANÇA:

- Tome todas as precauções e use vestimentas de segurança adequadas para atividades em laboratório de ciências, inclusive óculos de proteção. Siga as instruções do seu educador.
- Lave as mãos muito bem com sabão antes e depois de utilizar o laboratório.



## MÉTODOS

1. Verifique se o suporte contém os tubos com todos os reagentes da lista.
2. Use o marcador permanente para identificar dois tubos limpos de microcentrífuga com as marcações "R+" e "R-". Inclua o número do grupo e o período da aula em cada tubo.
3. Consulte a **Tabela 2A.2**, que apresenta os reagentes que você vai adicionar na etapa 4.

**Tabela 2A.2: Adição dos reagentes nos tubos R+ e R-**

	Tubo R+	Tubo R-
Etapa 4a: Tampão de restrição (T 2,5x)	4,0 µL	4,0 µL
Etapa 4b: plasmídeo pARA-R (pR-2A)	4,0 µL	4,0 µL
Etapa 4c: Enzimas de restrição (ER)	2,0 µL	
Etapa 4d: Água destilada (dH <sub>2</sub> O)		2,0 µL

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** na etapa 4, não se esqueça de usar uma nova ponteira para cada reagente a fim de evitar a contaminação.



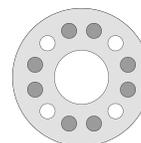
4. Usando uma nova ponteira com cada reagente, adicione:
  - a. 4,0 µL de T 2.5x aos tubos R+ e R-.
  - b. 4,0 µL de pR-2A aos tubos R+ e R-.
  - c. 2,0 µL de ER ao tubo R+. Adicione as enzimas diretamente à solução no fundo do tubo de microcentrífuga. Bombeie a solução delicadamente para dentro e para fora com a pipeta para misturar os reagentes. Tampe o tubo quando terminar.
  - d. 2,0 µL de dH<sub>2</sub>O ao tubo R-. Bombeie a solução suavemente para dentro e para fora com a pipeta para misturar os reagentes. Tampe o tubo quando terminar.

**PARE E PENSE:** nesta etapa, você preparou um tubo sem as enzimas de restrição, BamHI e HindIII. Qual é o objetivo desta etapa e por que ela é importante?



5. Centrifugue os 2 tubos (R+ e R-) na microcentrífuga por 4 segundos para misturar os reagentes no fundo de cada tubo.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** distribua os tubos uniformemente na microcentrífuga de modo que o peso fique equilibrado.



6. Coloque os 2 tubos no banho-maria a 37 °C. (Você colocará os tubos no suporte flutuante. Quando o suporte estiver cheio, sua professora ou seu professor vai colocá-los no banho-maria). Incube por 15 minutos. Depois de finalizada a incubação, coloque os 2 tubos no freezer a -20 °C. Você analisará os conteúdos dos tubos no Laboratório 4A.

**PARE E PENSE:** por que as enzimas funcionam melhor a 37 °C? Então por que as enzimas devem ser colocadas no freezer? (Dica: a temperatura do corpo humano é 37 °C).



## CAPÍTULO 2A: PERGUNTAS

Discuta com seu colega as perguntas abaixo e se prepare para compartilhar suas respostas com a turma.

1. Faça uma lista ou um desenho sobre as características importantes de um vetor plasmidial necessárias para clonar um gene. Explique a finalidade de cada característica.
2. Qual é a função das enzimas de restrição na natureza?
3. Com base em seus conhecimentos sobre evolução, por que as bactérias reteriam um gene que oferece resistência a antibióticos? Como a existência das bactérias com resistência a antibióticos afeta a medicina nos dias de hoje?
4. À primeira vista, bactérias, anêmonas-do-mar e seres humanos parecem ser organismos muito diferentes. Como um gene de humanos ou de uma anêmona-do-mar pode ser expresso em uma bactéria para fabricar um produto que ela nunca gerou antes?
5. Devido a um acidente no laboratório, as bactérias que carregam um plasmídeo com um gene de resistência à ampicilina e as bactérias que carregam um plasmídeo com um gene de resistência a outro antibiótico (canamicina) foram misturadas. Como você desenharia um experimento para separar os dois tipos de bactéria? (Dica: cuidado para não matar um dos tipos de bactéria que você está tentando separar!)

## CAPÍTULO 2A: GLOSSÁRIO

**Ampicilina:** antibiótico que utilizaremos para realizar um controle do crescimento das bactérias. Trata-se de um produto derivado de penicilina. Estudantes que têm alergia a antibióticos devem evitar mexer nas placas de Petri do laboratório 5A nas quais esse composto será utilizado.

**Antibiótico:** classe de compostos que matam ou inibem o crescimento de microrganismos.

**Arabinose:** açúcar de cinco carbonos encontrado naturalmente em vários carboidratos vegetais e bacterianos.

**Ativador:** proteína que regula a transcrição de um gene, ligando-se a uma sequência próxima ao promotor, permitindo que a RNA-polimerase se ligue ao promotor e inicie a transcrição do gene. A proteína ativadora também pode bloquear a ligação da RNA-polimerase e inibir a transcrição do gene.

**Bacteriófago:** vírus que infecta uma célula bacteriana e usa a estrutura celular para se replicar, destruindo as células bacterianas.

**Clonagem de DNA:** processo de produção de muitas cópias exatas de um pedaço específico de DNA. (Veja "Replicação de DNA".)

**Conjugação bacteriana:** processo pelo qual duas células bacterianas se unem e transferem material genético entre si.

**Deficiência de hormônio de crescimento:** doença em que a pessoa não cresce adequadamente.

**Diabetes:** doença que ocorre quando os níveis de glicose no sangue de uma pessoa são muito altos.

**Digestão:** o corte do DNA feito por uma enzima de restrição.

**Digestão por enzima de restrição:** técnica em que as enzimas encontradas naturalmente são usadas para clivar o DNA em sequências específicas.

**DNA ligase:** enzima que catalisa a formação de ligações químicas covalentes na estrutura açúcar-fosfato, unindo fragmentos de DNA.

**Escherichia coli (E. coli):** bactéria comum encontrada no intestino de animais endotérmicos. A maioria das cepas não é nociva, inclusive a cepa usada nesses protocolos de laboratório.

**Extremidade coesiva:** extremidade de uma molécula de DNA cortada por determinadas enzimas de restrição. Essas extremidades são assimétricas, uma mais longa que a outra; portanto, as bases delas não são emparelhadas. As extremidades coesivas de dois pedaços diferentes de DNA que foram cortados com a(s) mesma(s) enzima(s) de restrição podem ser ligadas, já que as bases não emparelhadas são complementares.

**Fator de coagulação do sangue:** variedade de proteínas no plasma sanguíneo que participam do processo

de coagulação.

**Fluorescência:** produção de luz por uma molécula (por exemplo, a proteína fluorescente vermelha libera luz vermelha quando é exposta à luz ultravioleta).

**Hemofilia:** doença que ocorre quando a capacidade de coagulação do sangue é reduzida.

**Hormônio do crescimento humano:** hormônio secretado pela glândula pituitária que estimula o crescimento.

**Insulina:** hormônio produzido no pâncreas que controla a quantidade de glicose no sangue. A insulina é uma proteína.

**Marcador selecionável:** gene de um plasmídeo que é introduzido em uma célula junto com o gene de interesse que está sendo clonado. Os marcadores selecionáveis permitem que cientistas confirmem se o plasmídeo foi absorvido pela célula, porque marcadores podem ser visualizados ou detectados. Um marcador muito usado é o gene de resistência a antibióticos: apenas as bactérias que têm o gene sobreviverão ao antibiótico.

**Origem da replicação (*ori*):** sequência de DNA na qual a replicação do DNA é iniciada.

**Par de bases:** duas moléculas complementares com nitrogênio que formam um par em um DNA de fita dupla por meio de ligações fracas.

**Plasmídeo recombinante:** plasmídeo criado a partir de fragmentos de DNA de múltiplas fontes.

**Promotor:** sequência específica de DNA que se liga à RNA-polimerase e inicia a transcrição do gene.

**Proteína fluorescente vermelha (RFP):** a proteína codificada pelo gene *rfp*. A proteína fluorescente mutante é uma molécula com cerca de 238 aminoácidos. Quando é expressa em células bacterianas, as células parecem vermelhas ou rosa brilhante.

**RNA (ácido ribonucleico):** biomolécula formada por uma fita simples, composta de uma base nitrogenada, um açúcar ribose e um fosfato. Ele desempenha uma função essencial na síntese de proteínas, transmitindo as informações genéticas do DNA ao ribossomo onde as proteínas são produzidas.

**RNA mensageiro:** molécula de RNA transcrita a partir do DNA de um gene e usada como molde para a síntese de proteínas.

**RNA-polimerase:** proteína que produz o RNA mensageiro a partir do DNA.

**Replicação de DNA:** processo biológico de produção de cópias idênticas de uma seção do DNA, que ocorre sempre que uma nova célula é formada em organismos vivos. O processo começa quando uma molécula de DNA de fita dupla produz duas cópias idênticas. A dupla hélice é desenrolada e cada fita da molécula original serve como molde para produzir a fita complementar.

**Resistência a antibióticos:** o estado em que as bactérias não são mais sensíveis a um antibiótico e continuarão crescendo e se dividindo na presença dele.

**Sítio de restrição** (também conhecido como sítio de reconhecimento): sequência específica de DNA que é cortada por uma enzima de restrição. Muitos sítios de restrição são palíndromos, ou seja, sequências que podem ser lidas da mesma forma da esquerda para a direita e vice-versa.

**Transcrição:** Processo pelo qual as informações codificadas no DNA são transferidas ao RNA mensageiro, um ácido ribonucleico de fita simples.

**Transformação bacteriana:** troca de material genético entre cepas de bactéria, processo em que o plasmídeo é incorporado pelas células bacterianas.

**Vetor:** veículo para transportar as sequências de DNA de um organismo para outro.

## **CAPÍTULO 4A**

# **COMO CONFIRMAR QUE VOCÊ TEM UM PLASMÍDEO RECOMBINANTE**

# INTRODUÇÃO

---

Quando os cientistas clonam um gene para produzir uma proteína terapêutica humana, eles criam um plasmídeo recombinante que contém o gene humano de interesse. Para isso, são utilizadas enzimas de restrição para criar fragmentos de DNA contendo os componentes do plasmídeo (Capítulo 2A) e, em seguida, é empregada a DNA ligase para unir esses fragmentos. Como parte do processo de clonagem, os cientistas precisam **verificar** (confirmar) se criaram o plasmídeo recombinante desejado, ou seja, aquele que carrega o gene de interesse (responsável pela produção da proteína terapêutica humana) e todos os componentes necessários para sintetizar a proteína. Neste capítulo, você continuará trabalhando com as ferramentas da engenharia genética para confirmar se você tem o plasmídeo recombinante necessário para produzir RFP.

## CAPÍTULO 4A: OBJETIVOS

Ao final deste capítulo, você será capaz de:

- Descrever a importância de verificar os produtos criados no processo de engenharia genética.
- Prever a velocidade relativa dos fragmentos de restrição de DNA e dos plasmídeos durante a eletroforese em gel.
- Separar e identificar os fragmentos de restrição de DNA e plasmídeos usando a eletroforese em gel.

## O QUE VOCÊ JÁ SABE?

Discuta com seu colega as perguntas a seguir e anote suas ideias no caderno. Prepare-se para compartilhar suas respostas com a turma. Não se preocupe caso você não saiba todas as respostas. Discutir essas perguntas ajudará você a refletir sobre seus conhecimentos de eletroforese em gel e verificação no laboratório.

1. Por que os fragmentos de restrição de DNA e os plasmídeos se separam quando são analisados pela eletroforese em gel?
2. Por que é importante identificar e verificar um plasmídeo recombinante?

## POR QUE É NECESSÁRIO VERIFICAR?

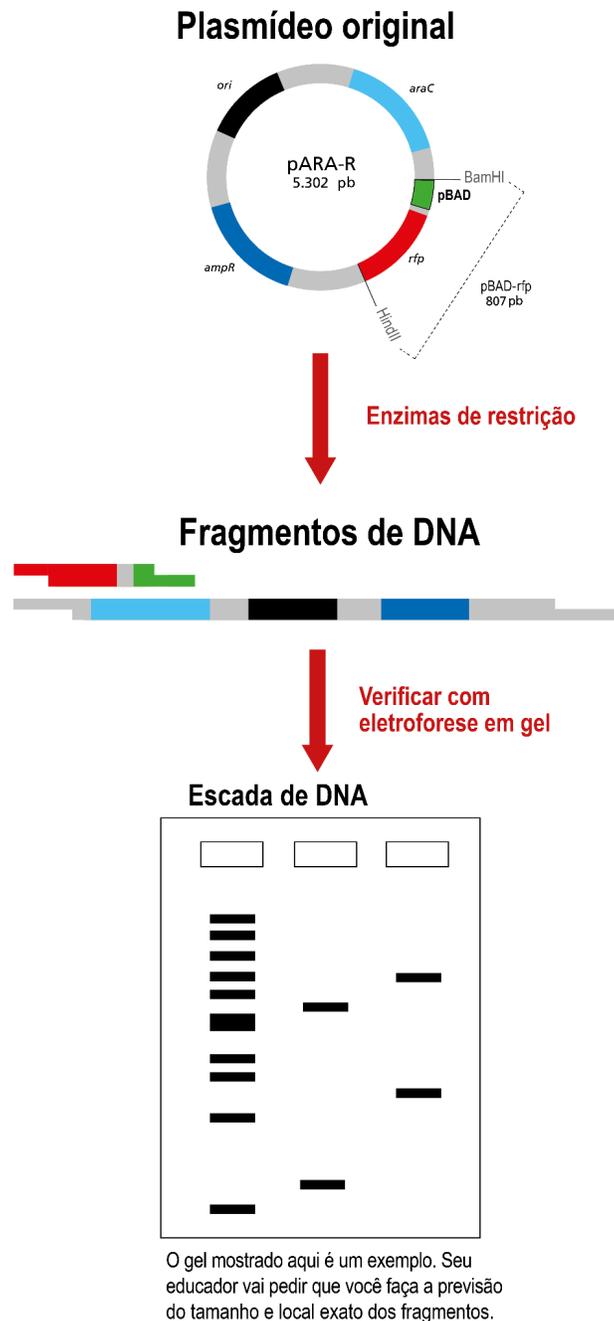
---

Porque existem muitas fontes de possíveis erros em qualquer procedimento, inclusive naqueles usados na clonagem de genes, por isso é importante verificar se você tem o plasmídeo correto. Na clonagem de genes, também há o problema de alguns procedimentos não serem seletivos. Por exemplo, quando a DNA ligase é usada para **ligar**, unir, os fragmentos de DNA, são criadas muitas combinações diferentes no processo de **ligadura**.

## COMO VERIFICAR O PLASMÍDEO RECOMBINANTE

A **Figura 4A.1** mostra como verificar a identidade de um plasmídeo. Você deve comparar os resultados da digestão por enzima de restrição do Laboratório 2A com a escada de DNA para garantir que você tem o plasmídeo correto.

Figura 4A.1: Método de verificação de um plasmídeo recombinante

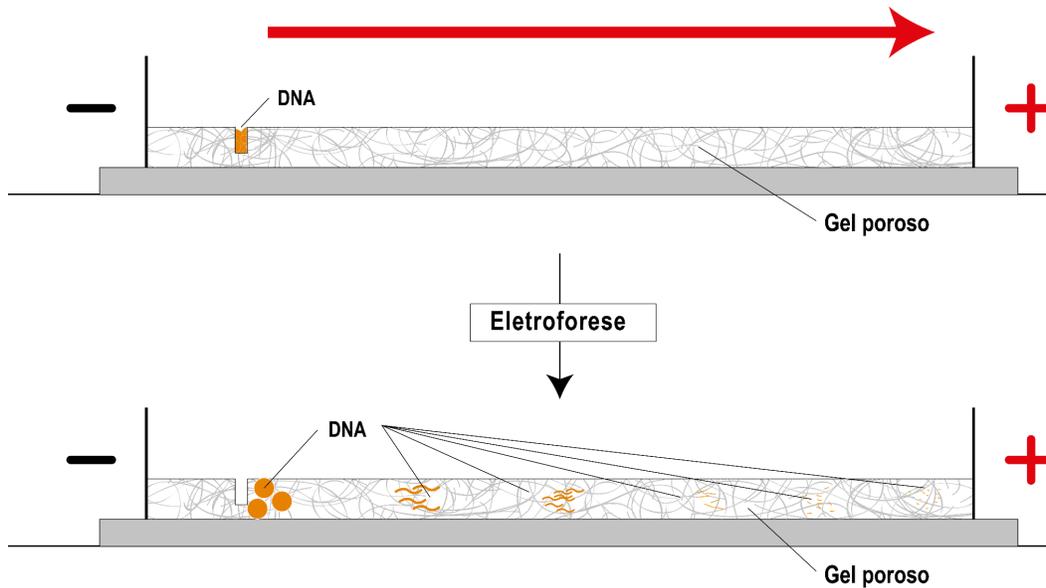


## ELETROFORESE EM GEL

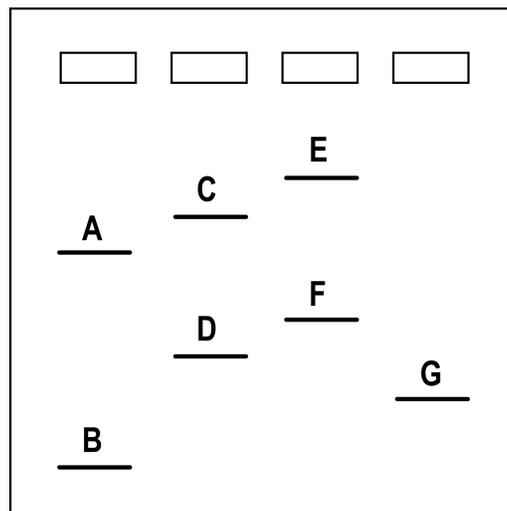
A eletroforese em gel é muito usada na verificação e purificação de DNA. Para identificar ou purificar os fragmentos de restrição de DNA, é necessário separar as moléculas de DNA, que apresentam diferentes tamanhos. A eletroforese em gel separa as biomoléculas principalmente de acordo com seu tamanho molecular que, no caso do DNA, é medido pelo número de pares de bases. Por causa dos grupos fosfatos,

a estrutura de uma molécula de DNA tem carga negativa e, portanto, vai se afastar do eletrodo negativo (preto) e se mover na direção do eletrodo positivo (vermelho). Como moléculas de DNA menores conseguem se deslocar mais facilmente pela matriz do gel de agarose, elas migram mais rapidamente do que as moléculas de DNA maiores. Veja a **Figura 4A.2**.

**Figura 4A.2: Separação do DNA por tamanho usando a eletroforese em gel**



**REFLITA:** depois que a eletroforese em gel separa os diferentes fragmentos de DNA e os plasmídeos, o gel fica tingido para mostrar as bandas que indicam o local de cada tipo de fragmento e plasmídeo. A ilustração abaixo, de um gel tingido, mostra várias bandas que foram identificadas com letras. Os locais dos poços também estão mostrados. Qual é a ordem dos fragmentos, do menor para o maior?



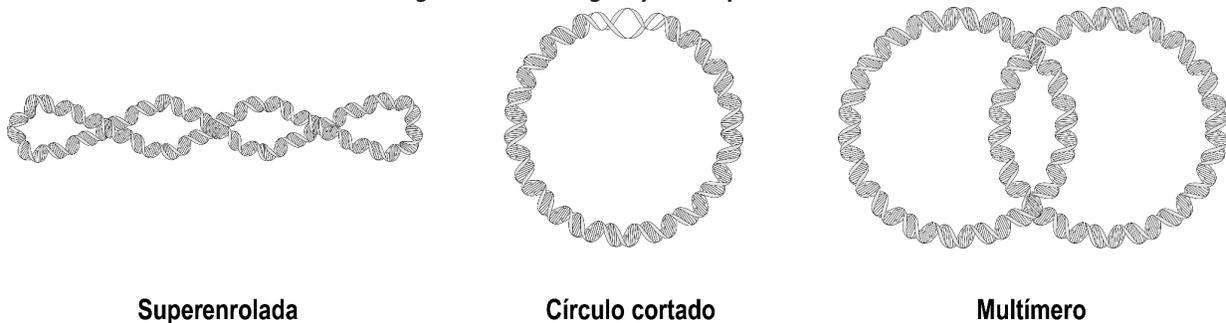
## PLASMÍDEOS NA ELETROFORESE EM GEL

Enquanto os pequenos pedaços lineares de DNA se movem como o esperado durante a eletroforese em gel, o movimento dos plasmídeos não é uniforme. Isso acontece porque o plasmídeo pode ter diferentes configurações e cada uma delas faz com que ele se movimente com velocidades diferentes pelo gel. Os plasmídeos podem ter três configurações:

- A mais comum é a **superenrolada**. Essa configuração é como um elástico torcido. Essa forma torcida ou superenrolada gera uma molécula muito compacta que se movimenta pelo gel com muita rapidez devido ao seu tamanho. Essa configuração aparece apenas nos plasmídeos que foram replicados em bactérias, porque a forma superenrolada é produzida por uma enzima presente nas células bacterianas. Essa é a configuração natural padrão dos plasmídeos presentes nas bactérias.
- A segunda configuração é o **círculo cortado**. Ela é como um grande círculo irregular. Esse plasmídeo tem um corte em uma das **ligações covalentes** localizadas em sua estrutura açúcar-fosfato junto com uma das duas fitas de nucleotídeos. Essa configuração circular não permite que o plasmídeo se movimente pelo gel de agarose com a mesma facilidade que o plasmídeo superenrolado. Embora sejam do mesmo tamanho, em termos de pares de bases, esse plasmídeo fica mais próximo do poço do que o plasmídeo superenrolado.
- A terceira configuração é o **multímero**. Pense em dois ou mais plasmídeos unidos, como os elos de uma corrente. Essa configuração é encontrada apenas nos plasmídeos replicados nas bactérias, porque os multímeros se formam quando os plasmídeos são replicados tão rapidamente que acabam unidos. Se dois plasmídeos estão unidos, o multímero será duas vezes o tamanho de um plasmídeo simples e se movimenta muito lentamente pelo gel. Na verdade, ele se movimenta mais vagarosamente que o círculo cortado.

A **Figura 4A.3** mostra essas possíveis configurações do plasmídeo.

**Figura 4A.3: Configurações do plasmídeo**



**REFLITA:** se você usasse a eletroforese em gel para separar o mesmo plasmídeo com as três configurações, qual plasmídeo se moveria mais rápido e qual se moveria mais devagar? Por que os plasmídeos com configurações diferentes se movimentam de formas distintas pelo gel? Explique em palavras ou desenhos.



## VOCÊ SABIA?



### História da engenharia genética

A engenharia genética não é um fenômeno novo. Ao longo da história, o homem tem usado a reprodução seletiva para produzir organismos com características desejáveis. A ciência da agricultura começou com a seleção de gramíneas selvagens e sua subsequente reprodução para formar os precursores dos alimentos básicos da modernidade, como o trigo, o arroz e o milho. Na **reprodução seletiva**, dois membros da mesma espécie são cruzados para estimular características desejáveis nos descendentes. Por exemplo, vacas que produzem grandes volumes de leite podem ser reproduzidas para transmitir essa característica às futuras gerações.

O processo de inserir ou remover DNA do genoma de um organismo é uma tecnologia bem nova, mas muito promissora. Com a modificação genética, podemos aumentar o valor nutricional de alimentos básicos, modificar bactérias para produzir proteínas terapêuticas para uso medicinal e, quem sabe, desativar genes que causam doenças.

Nos organismos produzidos pela reprodução seletiva natural, o genoma dos descendentes contém informações genéticas do pai e da mãe. Na engenharia genética moderna, o novo organismo contém também informações genéticas de muitos outros organismos. A engenharia genética alcança resultados semelhantes aos da reprodução seletiva, só que com mais rapidez e altíssima precisão.

**ISOLAMENTO  
DE DNA**



**CLONAR**



**TRANSFORMAR**



**EXPRESSAR**



**PURIFICAR**

## LABORATÓRIO 4A: VERIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE COM O USO DA ELETROFORESE EM GEL

Nesta atividade de laboratório, você usará a eletroforese em gel para examinar os produtos da digestão por enzima de restrição do plasmídeo pARA-R (Laboratório 2A). Os tamanhos dos fragmentos de DNA podem ser determinados, comparando-os com a escada de DNA, uma solução composta de vários fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos. Quando a *escada de DNA* é tingida e passa pela eletroforese em gel, as bandas que mostram os fragmentos ficam parecendo os degraus de uma escada. A escada de DNA é carregada ao lado de outras amostras de DNA para facilitar a comparação das bandas das amostras com as bandas da escada.

Os resultados da eletroforese em gel fornecerão evidências de que você está usando o plasmídeo recombinante pARA-R que contém o gene *rfp*. O mesmo procedimento serve para verificar se um plasmídeo recombinante criado no laboratório continha o gene de uma proteína terapêutica humana.

### ANTES DO LABORATÓRIO

Discuta com seu grupo as perguntas a seguir e se prepare para compartilhar suas respostas com a turma.

1. O plasmídeo pARA-R que você digeriu no Laboratório 2A foi replicado em uma célula bacteriana. Quais configurações (superenrolada, círculo cortado e multímero) o plasmídeo poderia ter antes da digestão?
2. Você precisa prever todos os produtos possíveis, inclusive as diferentes configurações do plasmídeo. Revise seu trabalho do Laboratório 2A. Quais produtos você espera encontrar nos tubos R- e R+? Crie uma tabela que mostre todos os possíveis fragmentos e plasmídeos por tubo. Inclua o comprimento (tamanho do par de base) de cada possível fragmento ou plasmídeo e organize os produtos encontrados em cada tubo de microcentrífuga por tamanho, do menor para o maior. Inclua quaisquer configurações possíveis do plasmídeo e organize-*as* primeiro pelo tamanho e depois pela velocidade de movimentação no gel, do plasmídeo mais rápido para o mais lento.
3. Vá até a seção *Métodos*, leia as páginas 52 a 54 e faça uma breve descrição das etapas, usando palavras e um fluxograma.

## MATERIAIS

### Reagentes

- Um suporte contendo:
  - ◆ Tubo de microcentrífuga com pARA-R não digerido do Laboratório 2A (R-)
  - ◆ Tubo de microcentrífuga com pARA-R digerido do Laboratório 2A (R+)
  - ◆ Tubo de microcentrífuga com **corante de carga** (Cor)
  - ◆ Tubo de microcentrífuga com a escada de DNA (E)
- Frasco de 50 mL contendo tampão SB 1x (compartilhado com outro grupo)

### Equipamentos e suprimentos

- Micropipeta P-20
- Caixa de ponteiros descartáveis
- Microcentrífuga (será compartilhada entre os grupos)
- Cuba de eletroforese contendo 0,8% de gel de agarose (será compartilhada entre 2 grupos)
- Coletor para descarte de ponteiros e tubos de microcentrífuga usados (será compartilhado entre os grupos)
- Diagrama da escada de DNA (Anexo 4 - Guia do Educador)

### SEGURANÇA:

- **Tome todas as precauções e use vestimentas de segurança adequadas para atividades em laboratório de ciências, inclusive óculos de proteção. Siga as instruções do seu educador.**
- **Lave as mãos muito bem com sabão antes e depois de utilizar o laboratório.**



## MÉTODOS

1. Verifique se o suporte contém os tubos com todos os reagentes da lista.
2. Adicione 2,0 µL de **corante de carga** aos tubos R- e R+.

**PARE E PENSE:** por que é útil usar o corante de carga nesta atividade?

3. Centrifugue os tubos R- e R+ na microcentrífuga por vários segundos para misturar os reagentes no fundo de cada tubo.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** distribua os tubos uniformemente na microcentrífuga de modo que o peso fique equilibrado.

4. Verifique se os poços da unidade de eletroforese em gel estão próximos ao eletrodo negativo (preto).



- Encha a cuba com tampão SB 1x até cobrir toda a superfície do gel. Se você notar algum “furinho” sobre os poços, adicione mais tampão.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** se você notar algum “furinho”, adicione quantidades bem pequenas de tampão à cuba de eletroforese em gel. Embora o gel precise estar completamente submerso no tampão, você não precisa de muito tampão na cuba, porque isso fará com que a corrente elétrica percorra o tampão e não o gel.



- Faça um desenho no caderno mostrando a localização dos poços na cuba de eletroforese. A ordem das amostras em cada poço deve ser:



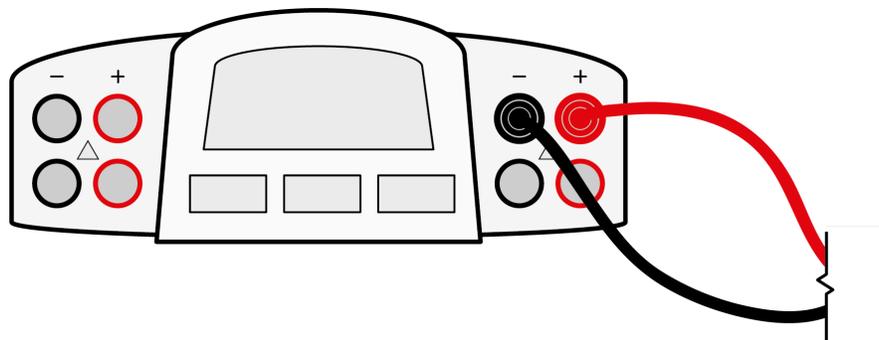
- Usando uma ponteira nova para cada amostra, dispense 10,0  $\mu\text{L}$  de escada de DNA (E), 10,0  $\mu\text{L}$  de R- e 10,0  $\mu\text{L}$  de R+ nos poços designados. Para cada amostra, faça o seguinte:
  - Coloque o cotovelo sobre a bancada para dar estabilidade à pipeta que você está segurando. Se necessário, use a outra mão para apoiar aquela que está segurando a pipeta.
  - Insira a ponteira no tampão, sem tocar no poço.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** não perfure o gel, porque isso vai inutilizá-lo. Pressione suavemente o botão de pipetagem para dispensar a amostra lentamente. Para evitar a entrada de ar no poço, não passe da primeira parada. A amostra afundará no poço.



- Quando todas as amostras tiverem sido colocadas, feche muito bem a tampa da cuba de eletroforese.
- Conecte os cabos à fonte de energia. Conecte os 2 cabos ao canal correspondente, cátodo (-) com cátodo (preto com preto) e ânodo (+) com ânodo (vermelho com vermelho). Veja a Figura 4A.4.

**Figura 4A.4:** Cabos da cuba de eletroforese conectados ao canal correto na fonte de energia



10. Ligue a fonte de energia e configure a tensão entre 130 V e 135 V.
11. Depois de 2 ou 3 minutos, verifique se o corante de carga está se movendo em direção ao eletrodo positivo (vermelho). Se estiver se movendo na direção oposta, ou seja, para o eletrodo negativo (preto), verifique se os cabos estão conectados corretamente.

#### **PARE E PENSE:**



- **A escada de DNA serve como um padrão, porque contém uma mistura de moléculas de DNA de tamanhos conhecidos. Ao passar as amostras e a escada de DNA lado a lado no gel, você consegue estimar o tamanho real em pares de bases das moléculas desconhecidas. O Diagrama da Escada de DNA (Anexo 4 - Guia do Educador) mostra 10 bandas de DNA de tamanhos diferentes. Usando essas informações, você consegue prever as posições das bandas de DNA produzidas pelos possíveis produtos encontrados nos tubos R- e R+, indicando sua posição no Diagrama da Escada de DNA?**
  - **As amostras de DNA e a escada de DNA não são visíveis no gel. Como o DNA pode ser visto depois que a eletroforese em gel termina?**
12. Seu educador explicará o que fazer com o gel. Talvez você não tenha tempo suficiente para concluir a eletroforese. A execução completa da eletroforese em gel pode durar cerca de 40 a 50 minutos e, após o término, o gel precisará ser posicionado sobre um retroiluminador fluorescente para revelar o local dos fragmentos de DNA e dos plasmídeos. Se necessário, seu educador fornecerá uma fotografia do gel para você analisar.

## CAPÍTULO 4A: PERGUNTAS

Analise a foto do gel e discuta as perguntas abaixo com seu colega. Prepare-se para compartilhar suas respostas com a turma.

1. Por que é importante verificar se você tem o plasmídeo recombinante correto?
2. Qual é a comparação dos resultados reais do seu gel com suas previsões?
3. Você está vendo bandas em lugares que não esperava? O que poderia explicar a origem dessas bandas inesperadas?
4. O gel mostra que você está usando o plasmídeo recombinante correto? Descreva as evidências que você usou para fazer essa análise.
5. Na faixa do R-, você nota evidências de várias configurações de plasmídeos? Explique sua resposta.
6. Na faixa do R+, você nota evidências de uma digestão completa? Explique sua resposta.
7. Em qual faixa você esperaria encontrar o gene *rfp* e o gene *ampR* na foto do gel? Você consegue localizar esses dois genes? Explique sua resposta.
8. Compare as faixas dos fragmentos lineares com as dos plasmídeos. Existe alguma diferença no formato das bandas entre essas duas formas de DNA?

## CAPÍTULO 4A: GLOSSÁRIO

**Círculo cortado:** configuração do plasmídeo formada por um único plasmídeo com um corte em uma de suas duas fitas. A forma desse plasmídeo é circular.

**Corante de carga:** conjunto de corantes adicionados a biomoléculas, como o DNA, para fazer a eletroforese em gel. Quando o corante se move a uma distância maior que a amostra, significa que está na hora de interromper a corrida de eletroforese em gel.

**Escada de DNA:** conjunto de fragmentos de DNA conhecidos com diferentes tamanhos medidos em pares de bases (pb) ou quilobases (kb). Esses fragmentos de DNA são separados e visualizados como bandas de DNA em um gel. Juntas, as bandas de DNA parecem uma escada no gel.

As escadas de DNA são usadas na eletroforese em gel para determinar o tamanho e a quantidade de fragmentos de DNA.

**Ligação covalente:** tipo de ligação química entre dois átomos na qual um ou mais elétrons ficam em um estado de compartilhamento.

**Ligadura:** reação que liga quimicamente dois ou mais fragmentos de DNA, resultando em uma molécula de DNA recombinante.

**Ligar:** unir duas extremidades de DNA.

**Multímero:** configuração composta de vários plasmídeos que se interligaram durante a formação, fazendo com que pareçam os elos de uma corrente.

**Reprodução seletiva:** quando dois membros da mesma espécie são cruzados para estimular características desejáveis nos descendentes.

**Superenrolada:** configuração composta de um único plasmídeo torcido. O formato desse plasmídeo é mais *compacto* (ocupa menos espaço) do que a forma circular.

**Verificar:** estabelecer que algo é verdadeiro, preciso ou pode ser defendido.

## **CAPÍTULO 5A**

# **COMO INSERIR PLASMÍDEOS RECOMBINANTES EM BACTÉRIAS**

# INTRODUÇÃO

---

Assim que um plasmídeo recombinante com o gene de interesse é criado, a próxima etapa é replicar o plasmídeo e permitir que a bactéria produza a proteína. A replicação e a **expressão de proteína** (a forma como as proteínas são sintetizadas, modificadas e reguladas nos organismos vivos) só podem ocorrer dentro da célula. Portanto, a próxima etapa do processo de clonagem de um gene é inserir o plasmídeo recombinante na bactéria *E. coli* por um processo chamado **transformação bacteriana**, que altera o conteúdo do DNA da bactéria. Neste capítulo, você vai transformar a bactéria *E. coli* usando um plasmídeo recombinante com o gene *rfp*. Se você estivesse produzindo uma proteína terapêutica humana, a bactéria transformada teria o gene humano e seria capaz de produzir a proteína terapêutica humana desejada.

## CAPÍTULO 5A: OBJETIVOS

Ao final deste capítulo, você saberá:

- Descrever o papel da transformação no processo de clonagem de genes
- Explicar para que serve cada controle usado no experimento de transformação
- Explicar como a informação codificada em um gene é **expressa** (o processo de converter a informação no RNA mensageiro e, depois, em uma proteína) como um traço

## O QUE VOCÊ JÁ SABE?

Discuta com seu colega as perguntas a seguir e anote suas ideias no caderno. Prepare-se para discutir suas respostas com a turma. Não se preocupe se você não souber todas as respostas. Discutir essas perguntas ajudará você a refletir sobre seus conhecimentos relacionados à incorporação de plasmídeos e à expressão de genes nas bactérias.

1. Você acha que é comum um plasmídeo do ambiente ser incorporado por uma bactéria? Por quê?
2. Quais são as etapas envolvidas na transcrição e **tradução** (processo pelo qual as informações codificadas no RNA mensageiro são decodificadas e transformadas em proteínas) de um gene?
3. Qual é a relação entre genes, proteínas e traços (ou características observáveis)?
4. O que as bactérias e os seres humanos têm em comum que possibilita a expressão gênica em bactérias?

# COMO TRANSFORMAR BACTÉRIAS COM PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

O plasmídeo é um vetor ideal para transportar sequências de DNA de um organismo para outro porque tem (1) um promotor que permite transcrever o gene, (2) uma sequência para iniciar a replicação de DNA e (3) um gene de resistência a antibióticos. O plasmídeo pode ser incorporado pela bactéria onde se replica e seus genes são expressos usando a estrutura celular da bactéria. Se um gene de interesse for inserido no vetor, a bactéria vai gerar o produto codificado por esse gene.

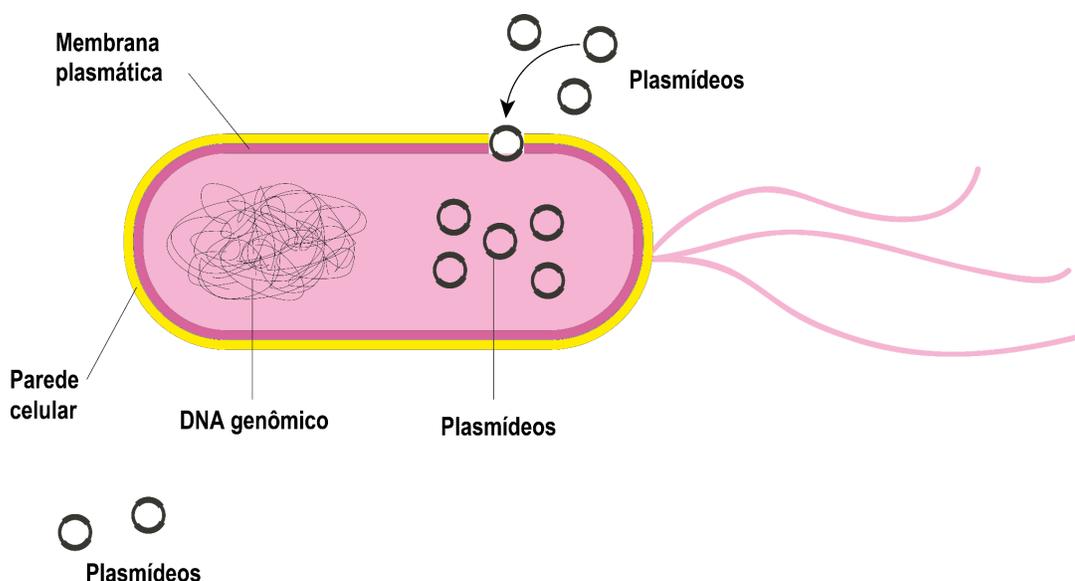
**REFLITA:** quando um gene é inserido em um vetor, o que você acha que é necessário para fabricar o produto codificado pelo gene inserido?



## TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Assim que é produzido um plasmídeo recombinante com um gene de interesse, como o gene da insulina, o plasmídeo consegue entrar nas células bacterianas pelo processo de transformação. A Figura 5A.1 ilustra a transformação.

Figura 5A.1: Transformação bacteriana



A incorporação de um DNA por uma célula bacteriana na natureza é muito pouco eficiente. A bactéria *E. coli* tem membranas plasmáticas complexas que separam o ambiente externo da estrutura interna da célula e fazem o controle rigoroso das substâncias que entram e saem da célula. Além disso, a parede celular tem carga negativa e repele as moléculas de DNA, que também são negativamente carregadas.

**REFLITA:** por que é importante que as membranas da bactéria *E. coli* façam o controle rigoroso das substâncias que entram e saem da célula?



Para aumentar a eficiência da incorporação do DNA, a bactéria passa por dois processos. Primeiro, a bactéria *E. coli* é colocada em uma solução contendo íons de cálcio positivos que neutralizam a carga negativa das membranas externas das células, permitindo que as moléculas de DNA atravessem as membranas plasmáticas e entrem na célula. Em seguida, a bactéria passa por um **choque térmico** (um aumento brusco de temperatura), provocando um aumento da pressão no ambiente externo da célula. Essa diferença de pressão permite que o DNA plasmidial entre na célula bacteriana.

As células tratadas com cálcio e aquecidas são chamadas de **competentes**, ou seja, são capazes de incorporar o DNA com mais eficiência. No entanto, mesmo com esse tratamento, apenas uma em 10.000 células bacterianas incorpora um plasmídeo ao seu ambiente. Então, como a bactéria que incorporou o plasmídeo recombinante pode ser identificada? Lembre-se de que um componente importante desses plasmídeos recombinantes é o gene de resistência a antibióticos. Se você colocar células bacterianas na presença do antibiótico, apenas as células com o plasmídeo recombinante vão crescer.

## VOCÊ SABIA?



### A corrida contra as bactérias

A incorporação de um plasmídeo pode provocar consequências graves na medicina. A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria comum responsável por infecções da pele e do trato respiratório. Se a infecção não for tratada ou se espalhar pela corrente sanguínea, até 30% dessas infecções são letais.

Algumas cepas de bactérias fazem a troca natural de plasmídeos, permitindo uma variação genética maior em espécies que se reproduzem assexuadamente. Um mecanismo de troca é a **conjugação bacteriana**, em que o plasmídeo é compartilhado entre duas células bacterianas que entram em contato. O outro método é a transformação, em que a bactéria incorpora o DNA diretamente do ambiente. Na natureza, isso sempre ocorre quando as células mortas liberam seu conteúdo no ambiente.

Tradicionalmente, os médicos tratam infecções estafilocócicas com antibióticos, como a vancomicina, que interrompe a formação das paredes celulares das bactérias. No entanto, nos últimos anos, os médicos descobriram que esses antibióticos não são mais eficientes no tratamento de infecções estafilocócicas. Novas cepas de bactérias mais agressivas estão se tornando cada vez mais comuns e difíceis de tratar.

Os pesquisadores acreditam que algumas bactérias *Staphylococcus* adquiriram o gene *VanA* ao se conjugarem com outro tipo de bactéria. O gene *VanA* instiga a resistência à vancomicina e determinadas espécies carregam esse gene naturalmente em seu genoma. A bactéria *Staphylococcus aureus* resultante resistente à vancomicina vem se tornando cada vez mais comum, e a taxa de mortalidade está aumentando.

Além disso, o problema da resistência bacteriana não se limita aos estafilococos. A pneumonia e a tuberculose resistentes a medicamentos também têm se tornado uma ameaça cada vez maior e mais perigosa. Para evitar o aumento dessas "superbactérias", a indústria da biotecnologia precisará desenvolver tratamentos inovadores.

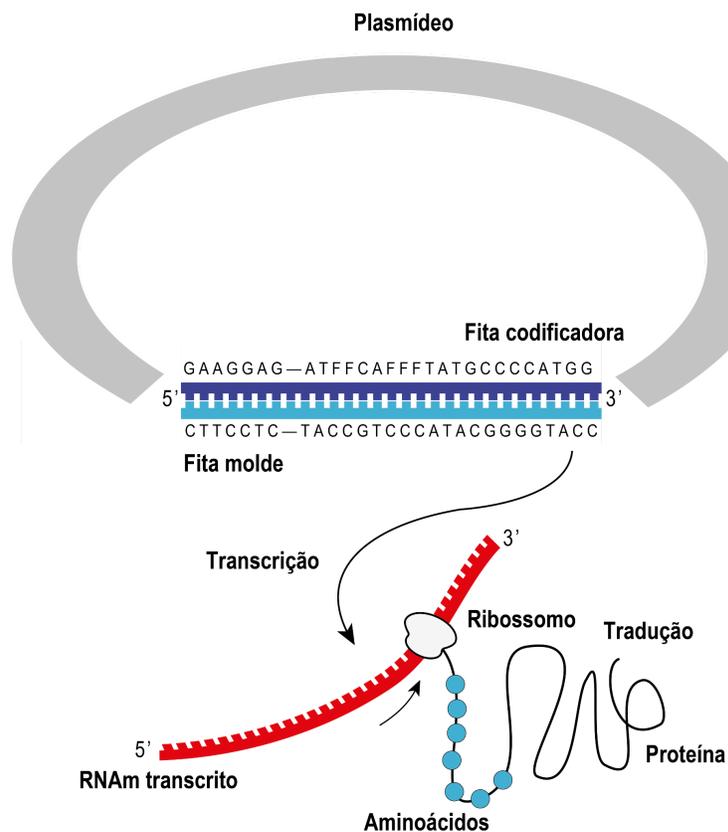
## DO DNA PLASMIDIAL À PROTEÍNA

Assim que o plasmídeo recombinante entra na célula bacteriana, a RNA-polimerase inicia a replicação no sítio *ori*, e o plasmídeo se replica usando as enzimas de replicação de DNA. Agora, essas múltiplas cópias de plasmídeos são capazes de produzir uma grande quantidade da proteína de interesse, como a insulina ou o

hormônio do crescimento humano. Nesse processo, as informações codificadas no DNA humano são transferidas do DNA para a proteína usando a estrutura de transcrição e tradução da célula (veja a **Figura 5A.2**). Então, a proteína altera os traços observáveis do organismo.

A engenharia genética só é possível porque genes de organismos diferentes podem ser expressos em bactérias. Na Terra, todos os seres vivos estão relacionados, e o modo de codificar informações no DNA é universal. Como você já deve saber, as proteínas são formadas por subunidades menores chamadas **aminoácidos**, e uma sequência de três nucleotídeos no DNA codifica um único aminoácido. Essas sequências de três nucleotídeos são chamadas **códons**. Por exemplo, o códon TTG codifica o aminoácido triptofano e o códon AAG codifica o aminoácido lisina. Em muitos casos, mais de um códon é capaz de codificar o mesmo aminoácido. Por exemplo, o códon AAA também codifica a lisina. Além disso, existem muitos códons de informação, como o **códon de início** (ATG) e o **códon de parada** (TTA), que mostram onde a codificação da proteína começa e termina na sequência de DNA.

**Figura 5A.2: Expressão gênica de um plasmídeo na célula bacteriana**



## VOCÊ SABIA?

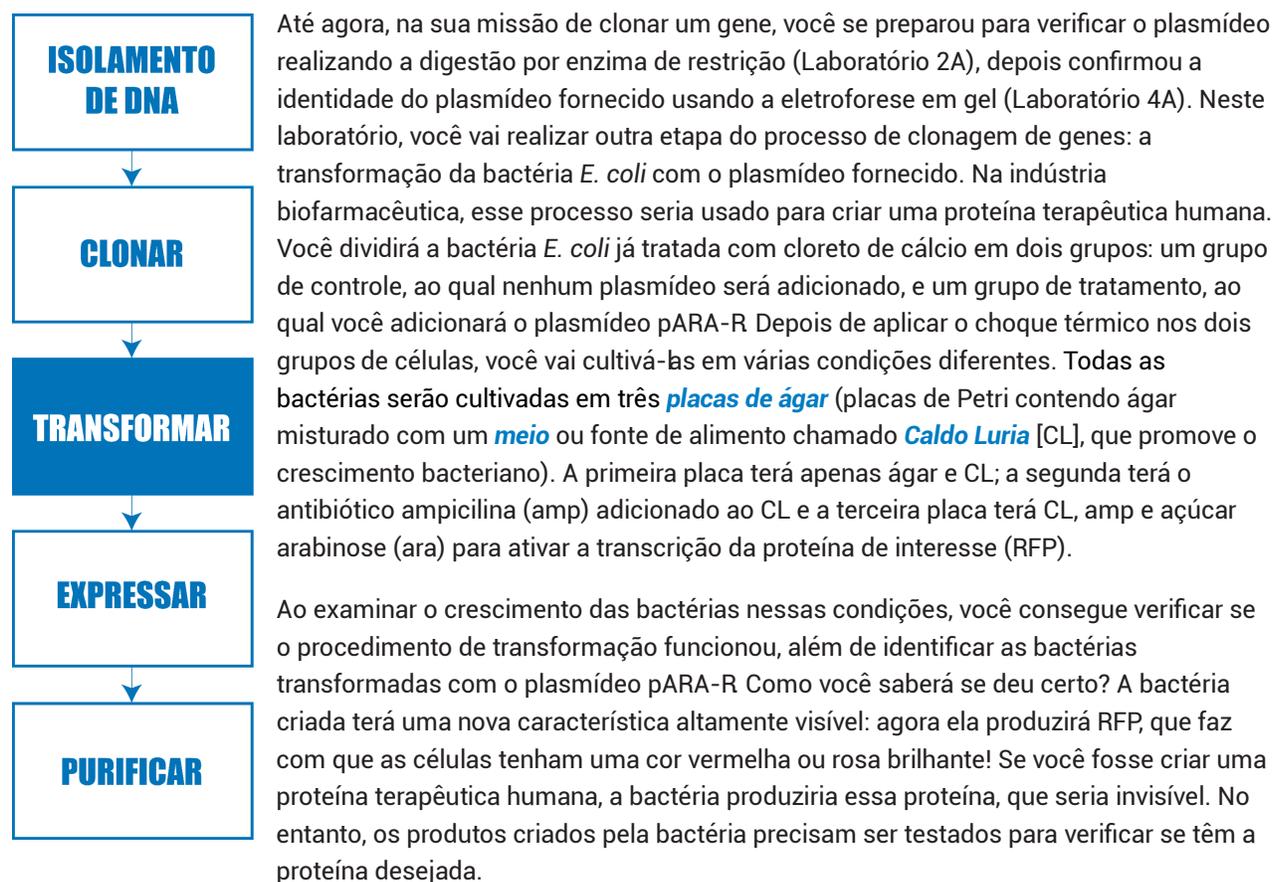


### Produção de DNA a partir do RNA

Embora o código do DNA seja o mesmo em todas as formas de vida, a transcrição e tradução de genes em células **eucarióticas** e **procarióticas** têm diferentes enzimas e estruturas. (As células humanas são eucarióticas e as células bacterianas são procarióticas). Uma diferença importante é que os genes das células eucarióticas têm sequências não codificadoras chamadas **íntrons**. A RNA-polimerase transcreve o gene, produzindo um RNA mensageiro precursor grande com íntrons e **éxons**, que são as sequências codificadoras. Em seguida, o RNA passa pelo **splicing (processamento)**, com a remoção dos íntrons e união dos éxons, convertendo-se em um RNA mensageiro maduro.

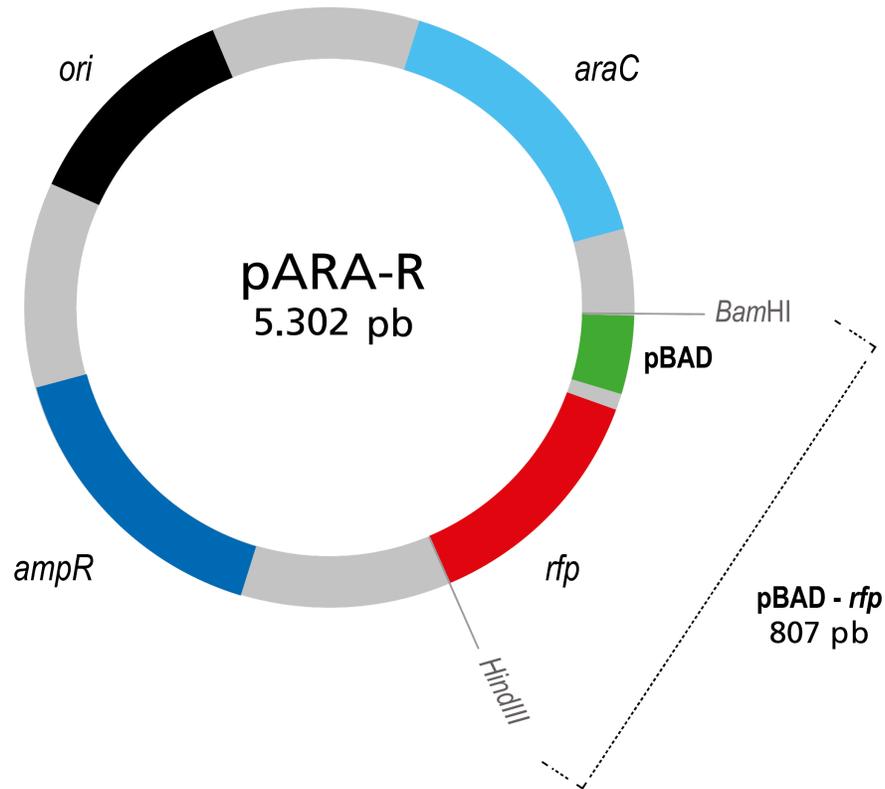
As células procarióticas não conseguem realizar o *splicing* dos íntrons. Para resolver esse problema, os cientistas usam uma enzima, a **transcriptase reversa** (que consegue copiar o RNA para o DNA), para produzir um DNA complementar (cDNA) a partir do RNA mensageiro de uma proteína específica. O cDNA, que tem apenas as sequências de éxons, é inserido no vetor plasmidial. É assim que são preparados os genes humanos clonados usados para produzir proteínas terapêuticas humanas.

## LABORATÓRIO 5A: COMO TRANSFORMAR BACTÉRIAS COM O PLASMÍDEO pARA-R



O plasmídeo pARA-R, que você analisou no Capítulo 2A, é mostrado novamente na **Figura 5A.3**.

Figura 5A.3: O plasmídeo pARA-R



Os componentes relevantes desse plasmídeo são o gene da proteína reguladora (*araC*), que funciona como ativador na presença de arabinose, o promotor (pBAD), o gene *rfp* e o gene de resistência à ampicilina (*ampR*).

Suas funções são:

- *araC*: o gene *araC* codifica uma proteína reguladora que ativa o promotor na presença de arabinose, um açúcar simples. (O ativador é uma proteína que regula a transcrição de um gene, ligando-se a uma sequência próxima ao promotor, permitindo que a RNA-polimerase se ligue ao promotor e inicie a transcrição do gene. As proteínas ativadoras são usadas em alguns plasmídeos recombinantes para controlar a produção da proteína de interesse.)
- pBAD: pBAD é um promotor.
- *rfp*: o gene *rfp* codifica a expressão da proteína fluorescente vermelha.
- *ampR*: o gene *ampR* confere resistência ao antibiótico ampicilina.

Na presença de arabinose (açúcar), a proteína ativadora do gene *araC* ativa o promotor. Em seguida, a RNA-polimerase se liga ao promotor e começa a transcrição do gene *rfp*. Quando o gene *rfp* é expresso, a bactéria fica rosa brilhante. O gene *ampR* é um marcador selecionável e confere resistência ao antibiótico ampicilina; somente as bactérias com esse gene sobreviverão a um antibiótico. Apenas as bactérias com o gene de resistência a antibióticos, além do gene *araC*, do promotor pBAD e do gene *rfp*, sobreviverão e terão a cor rosa brilhante.

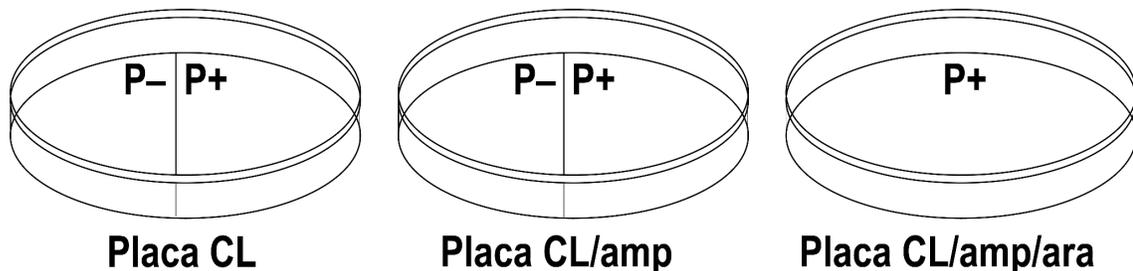
## FOLHA DE ATIVIDADES

- Previsões do crescimento bacteriano (Anexo 5 - Guia do Educador)

### ANTES DO LABORATÓRIO

Discuta com seu grupo as perguntas a seguir e se prepare para compartilhar suas respostas com a turma.

1. A ampicilina é um antibiótico que mata as células bacterianas, interrompendo a formação das paredes celulares. O plasmídeo pARA-R<sub>1</sub> no entanto, tem o gene de resistência à ampicilina, que produz uma proteína que destrói a ampicilina. Qual é o objetivo de cultivar uma bactéria que foi transformada na presença de ampicilina?
2. O que acontecerá quando as células bacterianas contendo o plasmídeo pARA-R<sub>1</sub> não forem submetidas à presença de arabinose?
3. No laboratório, você adicionará amostras do grupo de controle P- e do grupo de tratamento P+ às placas contendo várias combinações de Caldo Luria (CL), ampicilina (amp) e açúcar arabinose (ara). As placas devem ser organizadas da seguinte forma:



Usando a legenda na folha de exercícios Previsões do crescimento bacteriano (Anexo 5 - Guia do Educador), mostre suas previsões para o crescimento de cada combinação. Em seguida, preencha a **Tabela 1** e a **Tabela 2** no trabalho a ser entregue, descrevendo as possíveis conclusões no caso de um crescimento conforme o previsto e de um crescimento diferente do previsto.

4. Vá até a seção *Métodos*, leia as páginas 67 a 71 e faça uma breve descrição das etapas usando palavras e um fluxograma.

**SEGURANÇA:** tome todas as precauções e use vestimentas de segurança adequadas para atividades em laboratório de ciências. Siga as instruções do seu educador.



**SEGURANÇA:** cuidado ao manipular a bactéria *E. coli*. e não se esqueça das *técnicas de assepsia*.



As técnicas de assepsia são um conjunto de procedimentos que garantem a proteção da pessoa que está trabalhando no laboratório e das amostras de bactérias, o que é essencial para o sucesso do experimento.

**Atenção!**

- Não toque em nada que teve ou terá contato com a bactéria *E. coli*. Estudantes que manipularem equipamentos que entrem em contato com a bactéria devem usar luvas.
- Tente evitar vazamentos ou contaminação de superfícies com qualquer coisa que tenha entrado em

contato com a bactéria *E. coli*. Em caso de vazamento ou contaminação, informe imediatamente seu educador.

- Ao terminar de usar os tubos de microcentrífuga, ponteiras e alças para espalhar células (alça de Drigalski), coloque-os imediatamente no saco de lixo ou no coletor de resíduos biológicos, conforme orientação do seu educador.
- Faça o mesmo com o descarte das placas de Petri, conforme orientação do seu educador.
- Lave as mãos muito bem com sabão depois de utilizar o laboratório.

## MATERIAIS

### Reagentes

- Um suporte contendo:
  - ♦ Tubo de microcentrífuga com o plasmídeo pARA-R(pR-5A)
  - ♦ Tubo de microcentrífuga com Caldo Luria (CL)
- Tubo de microcentrífuga com 100 µL de células competentes de *E. coli* resfriadas (CC)

**ATENÇÃO:** o tubo CC deve ser mantido no gelo o tempo todo.

- 3 placas de Petri com ágar<sup>1</sup>:
  - ♦ 1 de CL
  - ♦ 1 de CL/amp
  - ♦ 1 de CL/amp/ara

### Equipamentos e suprimentos

- Copo de isopor com gelo picado

**ATENÇÃO:** antes de pegar um tubo CC, encha um copo com um pouco do gelo picado que está no recipiente onde os tubos CC são mantidos resfriados. Você vai precisar manter o tubo CC no gelo o tempo todo.

- 2 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
- Marcador permanente
- Luvas descartáveis
- Micropipeta P-20
- Micropipeta P-200
- Caixa de ponteiras descartáveis
- Pacote com alças para espalhar células (serão compartilhadas entre os grupos)
- Banho-maria a 42 °C com suporte flutuante para tubo de microcentrífuga (será compartilhado entre os grupos)
- Cronômetro ou relógio (será compartilhado entre os grupos)
- Fita adesiva colorida (será compartilhada entre os grupos)
- Incubadora a 37 °C (será compartilhada entre os grupos)
- Saco de lixo para resíduos biológicos para os materiais que entrarem em contato com as células de *E.*

---

<sup>1</sup> N. do E.: nessas placas, “amp” refere-se ao antibiótico Ampicilina. Se você tem alergia a qualquer tipo de antibiótico ou a Benzetacil (que é um antibiótico injetável), avise seu educador e evite entrar em contato com as placas de Petri.

- *coli* (será compartilhado entre os grupos)
- Coletor de resíduos (será compartilhado entre os grupos)

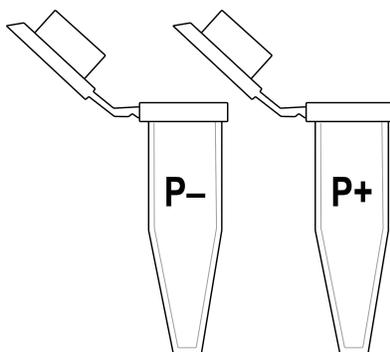
## MÉTODOS

1. Verifique se o suporte contém os tubos com todos os reagentes da lista.
2. Pegue um tubo CC do recipiente com gelo e coloque em um copo de isopor com gelo.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** para esta atividade, as células competentes devem ser mantidas resfriadas. Pegue os tubos pela borda superior para evitar aquecer as células com o calor das mãos.



3. Identifique dois tubos de microcentrifuga limpos com as letras "P-" e "P+".



4. Coloque os tubos P- e P+ no copo de isopor com o tubo CC.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** a transformação bacteriana requer técnicas estéreis. É essencial que essas orientações sejam seguidas rigorosamente.



5. Usando uma micropipeta P-200, adicione as células competentes do tubo CC aos tubos P- e P+.
  - a. Configure o volume de 50  $\mu\text{L}$  na micropipeta P-200.
  - b. Com muito cuidado, suspenda as células bacterianas no tubo CC novamente bombeando a pipeta duas vezes na solução.
  - c. Adicione 50  $\mu\text{L}$  de CC a cada um dos tubos vazios resfriados (P- e P+), segurando cada um deles pela borda para mantê-los resfriados. Depois, rapidamente, devolva o tubo ao gelo.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** para evitar a contaminação, não se esqueça de usar uma nova ponteira a cada adição.

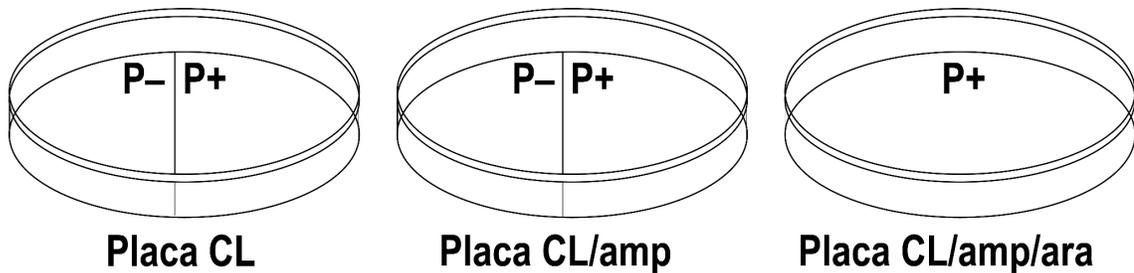


6. Usando uma nova ponteira e a pipeta P-20, adicione pR-5A ao tubo identificado como "P+".
  - a. Configure o volume de 10,0  $\mu\text{L}$  na micropipeta P-20.
  - b. Segure o tubo P+ resfriado pela borda superior e adicione 10,0  $\mu\text{L}$  de pR-5A. Misture as soluções bombeando a pipeta duas vezes nos líquidos e devolva o tubo P+ ao gelo.
7. Mantenha os tubos P- e P+ no gelo por 15 minutos.

**ATENÇÃO:** durante o intervalo de 15 minutos, compartilhe e discuta suas respostas à pergunta 3 da

**seção Antes do laboratório.**

8. Enquanto as células estão no gelo, prepare suas três placas de Petri com ágar. A primeira com CL, a segunda com CL/amp e a terceira com CL/amp/ara:
  - a. Identifique a parte de baixo de cada placa (a parte que contém o ágar) com o número do seu grupo e o período de aula. Use letras pequenas e escreva na borda da placa.
  - b. Com as placas fechadas, desenhe uma linha na parte de baixo da placa CL e da placa CL/amp, dividindo cada placa ao meio. Identifique uma metade de cada placa como "P-" e a outra metade como "P+" Identifique a placa CL/amp/ara como "P+". Você deve organizar as placas da seguinte forma:



9. Após os 15 minutos de incubação no gelo, leve os tubos P- e P+ (no copo com gelo) ao banho-maria a 42 °C. Coloque os 2 tubos no suporte flutuante em banho-maria por exatamente 45 segundos.
10. Depois do choque térmico de 45 segundos, devolva os tubos imediatamente ao gelo e deixe-os lá por pelo menos 1 minuto. Se a próxima turma não for usar os tubos imediatamente, guarde-os no refrigerador até o próximo uso.
11. Usando uma micropipeta grande P-200, adicione CL aos tubos P- e P+:
  - a. Configure o volume de 150 µL na micropipeta P-200.
  - b. Adicione 150 µL de CL ao tubo P-. Tampe o tubo e agite-o suavemente duas ou três vezes para misturar a solução.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** para evitar a contaminação, não se esqueça de usar uma nova ponteira para cada solução.



- c. Adicione 150 µL de CL ao tubo P+. Tampe o tubo e agite-o suavemente duas ou três vezes para misturar a solução.
12. Se houver tempo suficiente, deixe as células nos tubos P- e P+ incubando em temperatura ambiente por 15 minutos.

**PARE E PENSE:**

- Qual é a diferença no tratamento da cultura de bactérias do tubo P+ e da cultura de bactérias do tubo P-? (*Cultura* é uma população isolada de células.) Qual é o objetivo da cultura de bactérias do tubo P-?

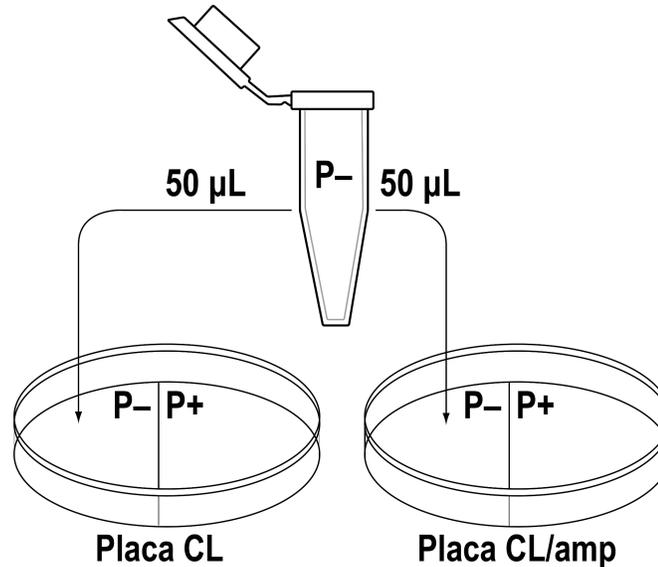


- Por que as células precisam de tempo para se recuperar após o choque térmico?
- Por que as células são incubadas a 37 °C?
- Você utilizou técnicas de assepsia nesta atividade. Por que isso é importante?

13. Adicione as células do tubo P- às placas CL e CL/amp:

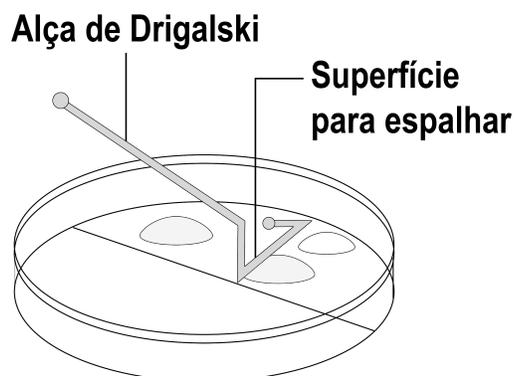
a. Configure o volume de 50 µL na micropipeta P-200.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** para evitar a contaminação, não se esqueça de usar uma nova ponteira para cada solução.



- Bombeie a pipeta delicadamente duas ou três vezes no tubo P- para suspender as células e aspire 50 µL das células do tubo P-.
- Abra a tampa da placa CL como se estivesse abrindo uma concha e adicione 50 µL das células do tubo P- à seção marcada como "P-". Feche a tampa.
- Mais uma vez, bombeie a pipeta delicadamente duas ou três vezes no tubo P- para suspender as células e aspire 50 µL das células do tubo P-.
- Abra a tampa da placa CL/amp como se estivesse abrindo uma concha e adicione 50 µL das células do tubo P- à seção marcada como "P-". Feche a tampa.

14. Espalhe as células do tubo P- nas placas CL e CL/amp:



- a. Abra o pacote de alças estéreis pela parte de cima, mais próximo das hastes. Retire somente uma alça e feche o pacote para manter as demais estéreis.
- b. Abra a tampa da placa CL como se estivesse abrindo uma concha e espalhe as células uniformemente por todo o lado P-da placa, com movimentos delicados sobre a superfície de ágar. (Mantenha as células no lado P-da placa). Feche a tampa.
- c. Use a mesma alça e a mesma técnica para espalhar as células do tubo P-com cuidado na placa CL/amp

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** Segure a alça pela haste e não deixe a parte dobrada tocar nenhuma superfície, porque isso contaminará a alça. Coloque a alça usada no saco de lixo para resíduos biológicos.

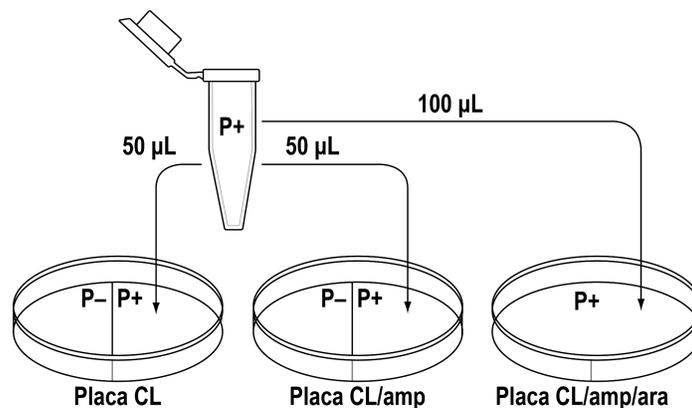


15. Usando uma nova ponteira, adicione as células do tubo P+ às placas CL, CL/amp e CL/amp/ara:
  - a. Não se esqueça de configurar o volume de 50 µL na micropipeta P-200.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** para evitar a contaminação, não se esqueça de usar uma nova ponteira para cada solução.

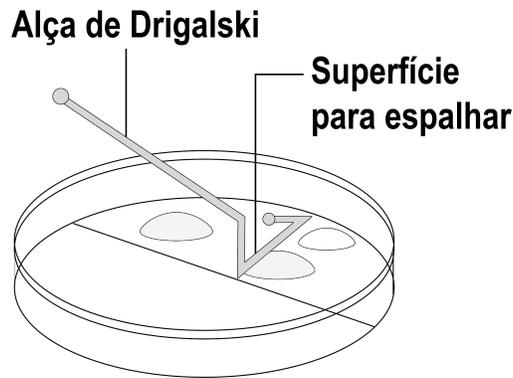


- b. Bombeie a pipeta delicadamente duas ou três vezes no tubo P+ para suspender as células e aspire 50 µL das células do tubo P+.
- c. Abra a tampa da placa CL como se estivesse abrindo uma concha e adicione 50 µL das células do tubo P+ à seção marcada como "P+". Feche a tampa.
- d. Mais uma vez, bombeie a pipeta delicadamente duas ou três vezes no tubo P+ para suspender as células e aspire 50 µL das células do tubo P+.
- e. Abra a tampa da placa CL/amp como se estivesse abrindo uma concha e adicione 50 µL das células do tubo P+ à seção marcada como "P+". Feche a tampa.
- f. Configure 100 µL na micropipeta P-200, bombeie a pipeta delicadamente duas ou três vezes no tubo P+ e aspire 100 µL das células do tubo P+.



- g. Abra a tampa da placa CL/amp/ara como se estivesse abrindo uma concha e adicione 100 µL das células do tubo P+ a várias áreas da superfície, não apenas em um único ponto. Feche a tampa.

16. Espalhe as células do tubo P+ nas placas CL, CL/amp e CL/amp/ara:



- a. Abra o pacote de alças estéreis pela parte de cima, mais próximo das hastes. Retire somente uma alça e feche o pacote para manter as demais estéreis.
- b. Abra a tampa da placa CL como se estivesse abrindo uma concha e espalhe as células uniformemente no lado P+ da placa (apenas nesse lado), com movimentos delicados sobre a superfície de ágar. Feche a tampa.
- c. Espalhe as células do tubo P+ com cuidado na placa CL/amp, usando a mesma alça e a mesma técnica.
- d. Use a mesma alça para espalhar as células do tubo P+ com cuidado na placa CL/amp/ara. Em seguida, gire delicadamente a placa embaixo da alça para que as células do tubo P+ possam se espalhar por toda a superfície da placa. Feche a tampa.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** segure a alça pela haste e não deixe a parte dobrada tocar nenhuma superfície, porque isso contaminará a alça. Coloque a alça usada no saco de lixo para resíduos biológicos.



17. Deixe as três placas descansando com o lado direito para cima por pelo menos cinco minutos ou até que o líquido penetre na placa.
18. Use a fita adesiva para unir as três placas e escreva na fita o número do seu grupo e o período de aula.
19. Coloque as placas na incubadora a 37 °C de cabeça para baixo para evitar que as gotículas da condensação caiam nos géis.
20. Coloque todos os tubos, ponteiros e alças no saco de lixo para resíduos biológicos.
21. Incube as placas entre 24 e 36 horas a 37 °C. Caso não haja uma incubadora, as placas devem ser armazenadas em temperatura ambiente por até 48 horas.
22. Examine as placas. Anote em seu caderno quanto houve de crescimento em cada metade da placa.
23. Descarte as placas de Petri no saco de lixo para resíduos biológicos, conforme orientação do seu educador.

## CAPÍTULO 5A: PERGUNTAS

1. Veja os resultados de sua transformação. Os resultados reais são iguais aos resultados previstos? Se não, que diferenças você observou e quais seriam as explicações para essas diferenças?
2. Quantas colônias vermelhas havia na placa CL/amp/ara?
3. Por que as colônias vermelhas apareceram apenas na placa CL/amp/ara e não na placa CL/amp?
4. Os plasmídeos recombinantes são produzidos para que consigam se replicar na célula, independentemente da replicação cromossômica. Por que é importante ter várias cópias de um plasmídeo recombinante em uma célula?
5. Como as informações codificadas no gene *rfp* são expressas na forma de traços? Use seus conhecimentos sobre expressão gênica e a relação entre DNA, RNA, proteína e traços.
6. Por que as bactérias conseguem produzir proteína humana, como a insulina, ou uma proteína da anêmona-do-mar, como a RFP?

### VOCÊ SABIA?



#### Relação entre genes e proteínas

Como os cientistas conseguiram mostrar que um gene codifica uma proteína? Em 1941, George Beadle e Edward Tatum realizaram um experimento em que expuseram o mofo (fungo) do pão à irradiação UV, um procedimento que causa **mutações** (alterações) nos genes. Beadle e Tatum criaram cepas mutantes de mofos que haviam perdido a capacidade de sintetizar uma vitamina necessária. Ao alimentar as cepas mutantes individualmente com os precursores da vitamina, Beadle e Tatum conseguiram determinar que elas não tinham apenas uma única enzima catalisadora para uma reação.

Então, Beadle e Tatum investigaram para saber se um único gene provocou a perda da única enzima por cruzamentos genéticos entre os mutantes e a cepa selvagem. Depois de fazer a cultura do descendente, eles descobriram que metade tinha o mesmo defeito que a cepa mutante parental e que metade não tinha, confirmando que um único gene havia sofrido mutação. A partir desses resultados, Beadle e Tatum realizaram uma proposição segundo a qual os genes eram responsáveis pela codificação das proteínas de um organismo e que uma alteração em um gene poderia resultar na produção de uma proteína defeituosa que, por sua vez, afetaria os traços daquele organismo. Em 1958, Beadle e Tatum receberam o Prêmio Nobel por esse trabalho.

Entender a relação entre os genes e as proteínas é essencial para o avanço da biotecnologia. Quanto mais conhecimento os pesquisadores tiverem sobre os genes que afetam as proteínas envolvidas em uma doença específica, maior será a eficácia do combate a essa doença.

## CAPÍTULO 5A: GLOSSÁRIO

**Aminoácido:** bloco construtor de proteínas. Existem 20 tipos de aminoácidos e cada um é uma substância orgânica com 2 grupos ligados a ele: o grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) e o grupo carboxila ( $\text{COOH}$ ).

**Caldo Luria:** meio rico em nutrientes que promove o crescimento de bactérias.

**Choque térmico:** mudança brusca de temperatura.

**Códon:** sequência de três bases nitrogenadas de RNAm que codificam um único aminoácido.

**Códon de início:** o primeiro códon do RNAm traduzido por um ribossomo, geralmente AUG ou GUG.

**Códon de parada:** trio de nucleotídeos no RNAm que sinaliza o término da tradução. Podem ser UAG, UGA ou UUA.

**Competente:** diz-se da célula bacteriana capaz de ser transformada geneticamente pela incorporação do DNA do ambiente.

**Conjugação bacteriana:** processo pelo qual duas células bacterianas se unem e transferem material genético entre si.

**Cultura:** população isolada de células que foram cultivadas em um meio de nutrientes preparado de maneira específica.

**Eucarionte:** organismo com genes dentro de um núcleo e vários cromossomos lineares.

**Éxon:** segmento de um gene que codifica uma proteína. Os éxons são transcritos e traduzidos.

**Expressão de proteína:** a forma como as proteínas são sintetizadas, modificadas e reguladas nos organismos vivos.

**Expresso:** quando as informações codificadas em um gene são primeiramente convertidas em RNA mensageiro, depois em uma proteína. Esse processo se chama expressão.

**Íntron:** segmento de um gene que não codifica uma proteína. Os íntrons são transcritos em RNAm, mas são removidos antes que os éxons (o restante do gene) sejam traduzidos em uma proteína.

**Meio:** solução, como o Caldo Luria, que contém substâncias que promovem o crescimento de microrganismos. O meio pode ser solidificado pela adição de ágar.

**Mutação:** mudança ou dano em uma seção do DNA que altera os produtos ou processos associados a essa seção.

**Placa de ágar:** placas de Petri contendo ágar misturado com um meio ou fonte de alimento chamado Caldo Luria (CL) que promove o crescimento bacteriano.

**Procarionte:** célula ou organismo com um único cromossomo e ausência de membrana nuclear. As bactérias

são procariontes.

**Splicing:** processo que modifica o RNA mensageiro para a tradução, removendo os íntrons e unindo os éxons.

**Técnica de assepsia:** conjunto de procedimentos e condições controladas cuidadosamente para evitar a contaminação por patógenos.

**Tradução:** processo pelo qual as informações codificadas no RNA mensageiro são decodificadas e transformadas em proteína.

**Transcriptase reversa:** enzima que catalisa a formação de DNA a partir de um RNA modelo na transcrição reversa.

**Transformação:** processo que insere na célula o DNA estranho, como o plasmídeo.

## **CAPÍTULO 6**

# **COMO CONSEGUIR O QUE PRECISAMOS**

# INTRODUÇÃO

A engenharia genética é utilizada para produzir proteínas terapêuticas. Por exemplo, para desenvolver um tratamento para diabetes, um plasmídeo recombinante é modificado para incorporar o gene de insulina humana clonado. A bactéria incorpora o plasmídeo recombinante e expressa o gene, produzindo insulina. Até agora, você realizou todas ou algumas dessas etapas usando o gene *rfp* clonado em vez de um gene humano que produziria uma proteína terapêutica.

A etapa final do processo é conseguir a proteína. Para isso, a bactéria é tratada com um reagente que faz a **lise celular** (rompimento de suas paredes celulares), e a proteína é separada do conteúdo celular por um método chamado **cromatografia em coluna**. (A cromatografia é um método para separar substâncias semelhantes, dissolvendo-as e, em seguida, escoando a solução sobre um material que liga as substâncias em diferentes graus. A cromatografia em coluna utiliza uma coluna repleta de esferas revestidas de um material ligante.)

Neste capítulo, você realizará essa etapa final. Você fará a lise celular da bactéria que transformou no Capítulo 5 e, em seguida, utilizará uma coluna que separa as proteínas de acordo com a solubilidade em água para obter a RFP produzida pelo gene *rfp* clonado. Esse mesmo processo seria usado para isolar uma proteína terapêutica humana.

## CAPÍTULO 6: OBJETIVOS

Ao final deste capítulo, você saberá:

- Descrever as condições favoráveis ao crescimento de bactérias
- Explicar como a **conformação** (forma tridimensional) de uma proteína está relacionada à sua função
- Explicar como ocorre o **enovelamento de proteínas** (processo físico pelo qual a proteína assume sua estrutura tridimensional característica, essencial à sua função)
- Explicar como a cromatografia em coluna separa as proteínas

## O QUE VOCÊ JÁ SABE?

Discuta com seu colega as perguntas a seguir e anote suas ideias no caderno. Prepare-se para discutir suas respostas com a turma. Não se preocupe se você não souber todas as respostas. Discutir essas perguntas ajudará você a refletir sobre seus conhecimentos a respeito do crescimento de bactérias e de proteínas.

1. Como as bactérias se reproduzem?
2. Por que às vezes as proteínas são chamadas de moléculas “burro de carga”?
3. Como a conformação (forma ou enovelamento) de uma proteína pode ser importante para sua função? Concentre-se em uma das seguintes funções da proteína: agir como enzima (acelerar as taxas de reação), transportar moléculas, sinalizar ou formar estruturas.
4. O **polipeptídeo** é uma molécula linear longa quando é formado, mas imediatamente se enovela assumindo uma conformação tridimensional específica, que chamamos de proteína. Quais propriedades dos aminoácidos de uma proteína controlam o processo de enovelamento?

# COMO PRODUZIR A PROTEÍNA DE INTERESSE

Depois de transformar a bactéria para que ela tenha o plasmídeo com o gene de interesse, você precisa fazer com que ela se reproduza e expresse esse gene (ou seja, produza a proteína codificada pelo gene).

## REPRODUÇÃO DE BACTÉRIAS

Quais fatores afetam a reprodução das bactérias, que também é chamada de crescimento bacteriano? A última etapa do Capítulo 5 foi colocar a bactéria transformada com o plasmídeo pARA-Rem em uma **cultura de suspensão** em um frasco de agitação. As células foram suspensas em um caldo nutriente e, em seguida, agitadas para misturar o ar com a suspensão e evitar que a bactéria cresça fora da solução, proporcionando as condições favoráveis ao crescimento.

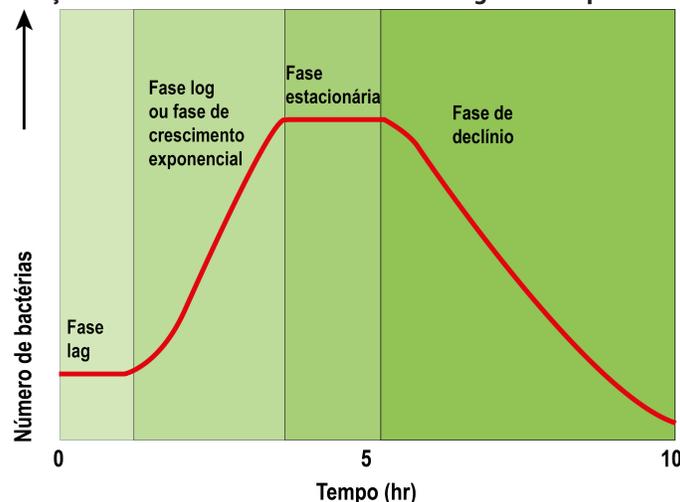
**REFLITA:** por que o frasco de agitação é melhor para promover o crescimento das células bacterianas do que uma placa?



Em condições ideais, como as do frasco de agitação, é possível prever o crescimento da população de bactérias (veja a **Figura 6.1**). O crescimento ocorre em quatro fases distintas:

- Na **fase lag**, a taxa de crescimento é zero. Não existem células novas nem células morrendo. As células se adaptam às novas condições, crescem e se preparam para a divisão celular.
- Na **fase log**, existe uma taxa de crescimento logarítmica. O número de células novas é maior que o de células que morrem. As células passam por uma divisão celular assexual e dobram de número aproximadamente a cada 20 minutos (que é o tempo médio de duplicação da *E. coli*; outras bactérias têm tempos de duplicação diferentes). Essa fase ocorre desde que os recursos necessários, como alimento e oxigênio, sejam ilimitados e não haja fatores incomuns que causem a morte celular.
- Na **fase estacionária**, a taxa de crescimento é zero. O número de células novas é igual ao de células que morrem. Essa fase ocorre quando os recursos, como alimento e oxigênio, se tornam limitados.
- Na **fase de declínio**, a taxa de crescimento é negativa. O número de células novas é menor que o de células que morrem. Essa fase ocorre quando os recursos se esgotam e os resíduos tóxicos se acumulam.

**Figura 6.1:** Variação do crescimento bacteriano ao longo do tempo no frasco de agitação



**REFLITA:** se o gene de interesse é controlado por um *operon*, como o operon arabinose, qual é o melhor momento para ativar o gene? Lembre-se:



- A produção de proteína retira energia do processo de crescimento celular e da divisão celular
- Um número maior de células produzirá mais proteínas
- As proteínas podem degradar com o tempo

## PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

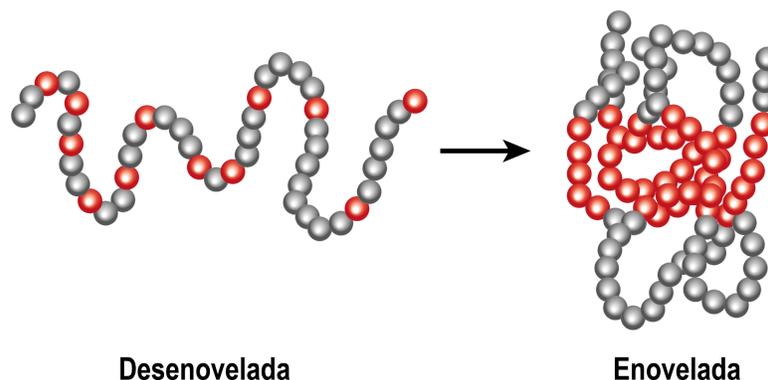
Quando a bactéria transformada é submetida a condições que permitam que ela cresça e se multiplique inúmeras vezes, ela é capaz de produzir proteínas terapêuticas suficientes para atender às necessidades dos pacientes. No entanto, a proteína terapêutica precisa ser purificada, o que requer separá-la dos outros componentes da célula, incluindo outras proteínas. (Uma bactéria típica pode ter mais de 1.000 tipos diferentes de proteínas). A cromatografia em coluna é um método de separação de proteínas.

Quais características físicas das proteínas permitem que elas sejam separadas pelo método da cromatografia em coluna? Embora todas as proteínas sejam compostas de aminoácidos, cada tipo de proteína tem uma função específica e uma conformação (forma) específica. A conformação está relacionada à função porque a superfície externa de uma proteína tem locais específicos que se ligam a outras moléculas. Esses locais são os *sítios de ligação*, e permitem que as proteínas se liguem a outras moléculas. É assim que as proteínas conseguem catalisar reações, transportar moléculas, fornecer sinais e formar estruturas.

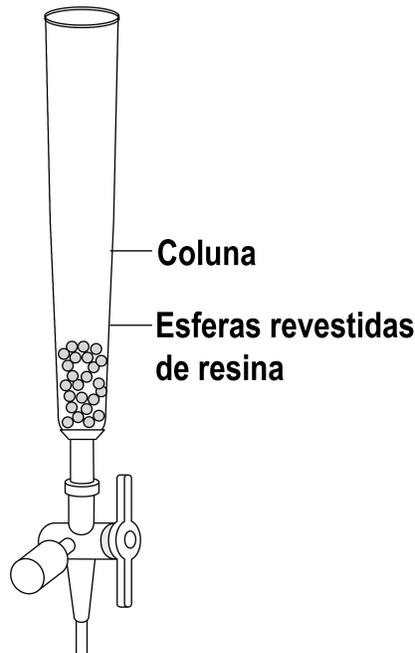
Quando um polipeptídeo é sintetizado pela primeira vez, sua forma inicial é de uma cadeia longa e flexível de aminoácidos. No entanto, logo atinge sua conformação tridimensional através de um processo chamado enovelamento de proteínas (veja a Figura 6.2). Uma vez enovelado, o polipeptídeo passa a ser chamado de proteína. Esse processo de dobramento depende das seguintes propriedades dos aminoácidos da proteína:

- Formação de ligações não covalentes fracas entre cadeias laterais de aminoácidos com carga positiva e carga negativa
- Tendência dos aminoácidos *hidrofóbicos* (insolúveis em água) de serem encobertos no interior da proteína, longe da água, e dos aminoácidos *hidrofílicos* (solúveis em água) de serem encontrados no exterior da proteína, onde há exposição à água
- Formação de ligações covalentes, chamadas *pontes dissulfeto*, que ocorre entre aminoácidos que contêm enxofre.

Figura 6.2: Enovelamento de proteínas



**REFLITA:** Se uma mutação altera um aminoácido, como essa alteração pode afetar o enovelamento da proteína e sua função?



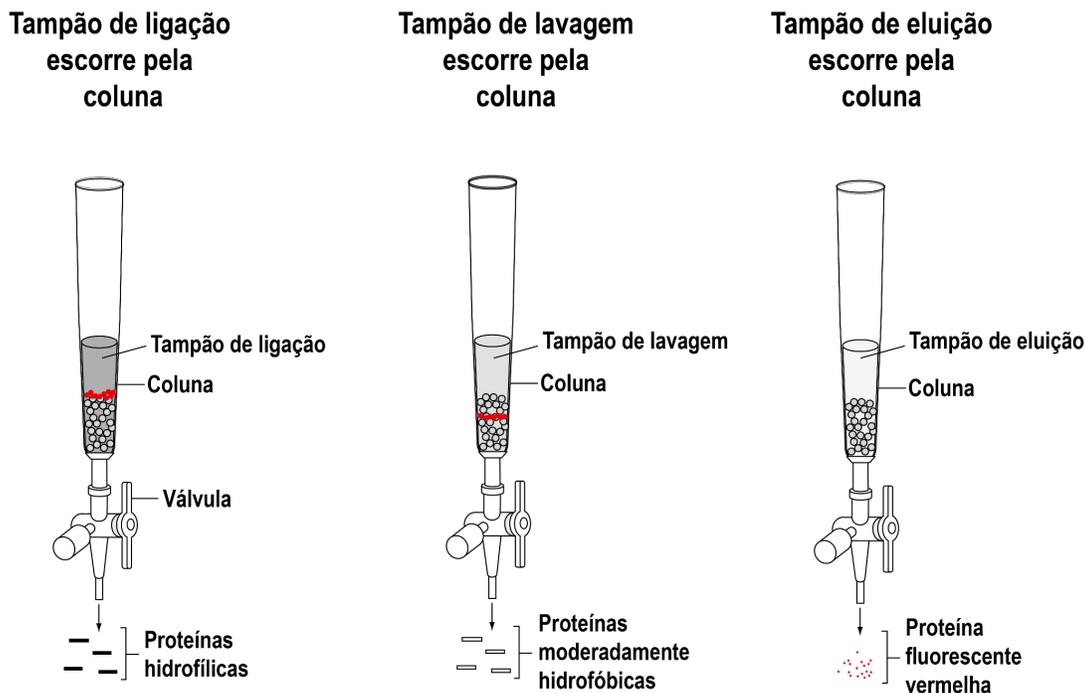
Proteínas específicas são hidrofóbicas ou hidrofílicas, dependendo da quantidade relativa de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que elas contêm. As proteínas hidrofóbicas e as hidrofílicas podem ser separadas por cromatografia em coluna. Nesse método, temos uma coluna repleta de pequenas esferas revestidas de um material chamado **resina**, que atrai os aminoácidos hidrofóbicos, e a mistura de proteínas é então dissolvida e escoada pelas esferas. Para que os aminoácidos hidrofóbicos se prendam à resina, as proteínas devem ser desenoveladas para que os aminoácidos hidrofóbicos sejam expostos à água, já que normalmente estão dentro da proteína. Certas soluções salinas, chamadas **tampões** (soluções que resistem a mudanças no pH), desenovelarão as proteínas em graus variados.

Podemos usar uma série de tampões com concentrações diferentes de sal para separar muitas proteínas umas das outras.

Por exemplo, para separar uma proteína RFP altamente hidrofóbica em uma coluna, usamos um tampão de ligação para desdobrar todas as proteínas, de modo que as proteínas hidrofóbicas se prendam à resina e as hidrofílicas passem pela coluna. Despeja-se um tampão de lavagem na coluna para desprender da resina as proteínas moderadamente hidrofóbicas, e, em seguida, um tampão de eluição (utilizado para extrair uma substância que está ligada a outra, lavando-a com uma solução) é usado para extrair a RFP da resina. Tanto o tampão de lavagem quanto o tampão de eluição têm uma concentração de sal menor que o tampão de ligação, por isso eles fazem com que as proteínas ligadas se enovelm e comecem a cobrir seus aminoácidos hidrofóbicos. Dependendo da extensão do dobramento, as proteínas se desprendem das esferas.

A **Figura 6.3** ilustra esse processo.

Figura 6.3: Uso de três tampões para separar a proteína fluorescente vermelha



**REFLITA:** Se você fosse tentar usar a cromatografia em coluna para separar a insulina de uma mistura de proteínas, você usaria os mesmos tampões de ligação, lavagem e eluição usados para a RFP ou usaria tampões com diferentes concentrações de sal? Explique sua resposta.



## VOCÊ SABIA?



### Proteínas recombinantes

Como você já sabe, quando proteínas recombinantes são produzidas para uso terapêutico em humanos, as células hospedeiras precisam ser cultivadas em grandes quantidades para que a produção da proteína recombinante seja capaz de atender à **demanda de tratamento** (as necessidades dos pacientes). A proteína recombinante é isolada, purificada e analisada de acordo com a atividade e a qualidade antes de ser lançada no mercado.

Nem sempre, porém, basta produzir uma proteína com a ordem adequada de aminoácidos. Às vezes é necessário realizar um processamento ou modificação adicional para obter uma proteína ativa ou completamente funcional. Muitas proteínas humanas são **glicosiladas**, o que significa que possuem um padrão específico de moléculas de açúcar ligadas a elas. Se uma proteína for traduzida, mas não glicosilada corretamente, isso pode comprometer seu funcionamento correto. Outra modificação envolve a adição de um grupo fosfato - processo conhecido como **fosforilação**. A fosforilação de uma proteína pode agir como uma espécie de interruptor, permitindo que a proteína se torne menos ou mais ativa, ao cobrir ou expor seus sítios de ligação. Além dos grupos de sacarídeos (açúcar) e fosfatos, outros grupos químicos podem ser adicionados a uma proteína para alterar sua função.

As proteínas recombinantes para uso terapêutico incluem **vacinas** (que fazem com que o sistema imunológico do corpo produza anticorpos que se ligarão a uma bactéria, ou produza um vírus para combater uma doença), **hormônios** (substâncias que agem como mensageiros químicos no corpo), **anticorpos monoclonais** (proteínas que se ligam a substâncias no corpo e são produzidas por clones de uma célula criada em laboratório) e os **fatores de crescimento hematopoiético** (um grupo de proteínas que promovem o crescimento, diferenciação e atividade das células sanguíneas) para o tratamento de doenças, entre elas câncer, aids, alergias e asma. O número de proteínas recombinantes aumentou consideravelmente nos últimos anos, à medida que as tecnologias utilizadas para sua produção e purificação avançaram.

# LABORATÓRIO 6: PURIFICANDO A PROTEÍNA FLUORESCENTE



No capítulo anterior, você transformou, depois selecionou as bactérias que incorporaram o plasmídeo de interesse (que incluiu o gene para *rfp*), colocando as células nas placas que continham CL, ampicilina e arabinose. Todas as colônias de bactérias que cresceram nessas placas tinham o gene *rfp*, porque ele foi emparelhado com o gene de resistência à ampicilina. A sua turma ou seu professor selecionou uma colônia (grupo do mesmo tipo de organismos que vivem juntos, geralmente beneficiando-se mutuamente) e a cultivou em um frasco de agitação para criar uma grande população de células idênticas, todas contendo o plasmídeo recombinante. Próximo ao fim da fase log de crescimento bacteriano, as células receberam arabinose para ativar os genes *rfp* de modo que produzissem RFP. Na primeira parte deste laboratório, você usará um reagente chamado tampão de lise para lisar (destruir) as células. Na segunda parte, você usará a cromatografia em coluna para isolar (purificar) a RFP. Esse é o mesmo processo que seria usado para isolar uma proteína terapêutica humana.

## ANTES DO LABORATÓRIO

Discuta com seu grupo as perguntas a seguir e se prepare para compartilhar suas ideias com a turma.

1. Na cromatografia em coluna, de que modo as soluções com diferentes concentrações de sal, que desdobram as proteínas em graus diferentes, podem ser usadas para ajudar a purificar a RFP?
2. Vá até a seção Métodos, Parte A (páginas 83 e 84) e Parte B (páginas 85 e 86), e faça uma breve descrição das etapas usando termos e um fluxograma.

**SEGURANÇA:** tome todas as precauções e use vestimentas de segurança adequadas para atividades em laboratório de ciências. Siga as instruções do seu educador.



**SEGURANÇA:** cuidado ao manipular a bactéria *E. coli* e não se esqueça das técnicas de assepsia.



As técnicas de assepsia são um conjunto de procedimentos que garantem a proteção tanto da pessoa que está trabalhando no laboratório quanto das amostras bacterianas, o que é essencial para o sucesso do experimento.

Atenção!

- Não toque em nada que teve ou terá contato com a bactéria *E. coli*. Segure os tubos de microcentrífuga e as placas de Petri pela parte de fora e não manuseie de forma alguma as ponteiras das pipetas.
- Tente evitar derramamentos ou contaminação de superfícies com qualquer coisa que tenha entrado em contato com a bactéria *E. coli*. Em caso de derramamento ou contaminação, informe imediatamente seu educador.

- Ao terminar de usar os tubos de microcentrífuga e as ponteiros das pipetas, coloque-os imediatamente no saco para resíduos biológicos.
- Faça o mesmo com o descarte das placas de Petri, conforme orientação do seu educador.
- Lave as mãos muito bem com sabão depois de utilizar o laboratório.

## PARTE A: CULTIVO DE CÉLULAS LISADAS NO FRASCO DE AGITAÇÃO

### MATERIAIS

#### Reagentes

- Suporte para tubos de microcentrífuga, contendo:
  - Tubo de microcentrífuga com cultura de *E. coli* em CL/amp/ara (EC)
  - Tubo de microcentrífuga com tampão de eluição (TE)
  - Tubo de microcentrífuga com tampão de lise (TL)
- 1.000 µL (1 mL) adicionais de cultura de *E. coli* em CL/amp/ara (pegar com o professor na etapa 6)

#### Equipamentos e materiais

- Microcentrífuga (será compartilhada entre os grupos)
- Coletor para resíduos líquidos
- Micropipeta P-200
- Caixa de ponteiros descartáveis
- Marcador permanente
- Recipiente de resíduos (será compartilhado entre os grupos)
- Saco de lixo para resíduos biológicos para os materiais que entrarem em contato com as células de *E. coli* (será compartilhado entre os grupos)

### MÉTODOS

- Verifique se o seu suporte contém os tubos com todos os reagentes listados para a Parte A.
- Examine o tubo com *E. coli* (EC) e anote a cor no seu caderno.
- Antes de lisar as células, você precisará separá-las do meio de crescimento. Para isso, centrifugue o tubo EC na microcentrífuga por cinco minutos.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** distribua os tubos uniformemente na microcentrífuga de modo que o peso fique equilibrado, dispondo dois tubos com o mesmo volume diretamente opostos um ao outro.



**PARE E PENSE:** como é possível determinar onde está a RFP em cada etapa de separação?



- Remova com cuidado o tubo EC da microcentrífuga para evitar a movimentação do precipitado sólido que contém as células bacterianas.
- Configure 800 µL na micropipeta P-1000, coloque uma nova ponteira e, cuidadosamente, remova do tubo

EC o **sobrenadante** (o líquido claro encontrado no topo do precipitado sólido após a centrifugação da mistura) sem movimentar o precipitado celular. (Você pode dispensar o sobrenadante no coletor de resíduos líquidos.)

- Leve o tubo EC ao seu professor, que vai adicionar 1.000  $\mu\text{L}$  (1 mL) de cultura de *E. coli* em CL/amp/ara ao seu tubo EC.
- Repita as etapas 3 a 5 (centrifugue o tubo por cinco minutos e remova o líquido).

**PARE E PENSE:** qual é a cor do sobrenadante? E do precipitado? Quais são os componentes de cada um?



- Usando a micropipeta, remova com cuidado a maior quantidade de líquido possível sem movimentar o precipitado e descarte o líquido no coletor de resíduos líquidos.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** não se esqueça de usar uma nova ponteira para cada reagente a fim de evitar contaminação.



- Utilizando uma nova ponteira e a pipeta P-200, adicione 150  $\mu\text{L}$  de TE ao precipitado celular no tubo EC.
- Feche bem a tampa do tubo EC e deslize o tubo vigorosamente sobre a superfície do suporte para tubos de microcentrífuga para ressuspender as células. Examine o tubo EC com atenção. Se houver aglomerados de células visíveis, deslize o tubo pela superfície do suporte novamente.
- Usando a pipeta P-200, adicione 150  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (TLis) ao tubo EC. Feche firmemente a tampa do tubo EC e deslize o tubo vigorosamente sobre a superfície do suporte para tubos de microcentrífuga duas vezes para misturar.
- Faça a identificação do tubo EC com o número do seu grupo e o período de aula e dê ao seu educador. Seu educador incubará as células em temperatura ambiente de um dia para outro.
- Coloque todos os tubos e ponteiras no saco de lixo para resíduos biológicos.

## PARTE B: SEPARAÇÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERMELHA PELA CROMATOGRAFIA EM COLUNA

### MATERIAIS

#### Reagentes

- Suporte para tubos de microcentrífuga com tubo de células lisadas (EC, da Parte A deste laboratório)
- Recipientes contendo:
  - Tampão de ligação (TLig)
  - Tampão de lavagem (TLav)
  - Tampão de eluição (TE)
  - Tampão de equilíbrio da coluna (TEqC)

## Equipamentos e materiais

- 2 tubos de microcentrífuga de 1,5 mL
- Coletor de resíduos líquidos
- Micropipeta P-1.000
- Caixa de ponteiros descartáveis
- Coluna de cromatografia
- Microcentrífuga (será compartilhada entre os grupos)
- Recipiente de resíduos (será compartilhado entre os grupos)

## MÉTODOS

1. Atribua tarefas aos integrantes do seu grupo. Uma pessoa será responsável por verificar se os materiais estão prontos (etapas 2 e 3), outra vai preparar a coluna de cromatografia (etapas 4 e 5) e outra vai centrifugar as células lisadas e remover o sobrenadante (etapas 6 e 7).
2. Verifique se você tem todos os reagentes da lista.
3. Rotule dois tubos de microcentrífuga limpos como "SUPER" e "RFP".
4. Prepare a coluna de cromatografia conforme orientação do seu professor. Cuidado para não tirar do lugar a válvula fixada na parte inferior do tubo.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** não deixe a coluna secar.



5. Prepare a coluna:
  - a. Posicione o coletor de resíduos líquidos embaixo da válvula.
  - b. Cuidadosamente, abra a coluna girando a válvula e permitindo que o líquido escoe no coletor de resíduos líquidos.
  - c. Quando restar cerca de 1 a 2 mm de líquido sobre a camada de resina, feche a válvula.
  - d. Verifique se não há líquido escorrendo da coluna para o coletor de resíduos líquidos.
6. Centrifugue o tubo EC na microcentrífuga por cinco minutos para criar um precipitado dos restos celulares.

**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** distribua os tubos uniformemente na microcentrífuga de modo que o peso fique equilibrado, dispondo dois tubos com o mesmo volume diretamente opostos um ao outro.



**PARE E PENSE:** você usará três tampões neste laboratório: tampão de ligação (TLig), tampão de lavagem (TLav) e tampão de eluição (TE). Qual é a função de cada um?



7. Examine o tubo. Você deve ver um sobrenadante e um precipitado sólido.

**PARE E PENSE:** qual é a cor do sobrenadante? E do precipitado? Quais são os componentes de cada um?



**TÉCNICA DE LABORATÓRIO:** não se esqueça de usar uma nova ponteira para cada reagente a fim de evitar a contaminação.



8. Utilizando a pipeta P-1.000, remova cuidadosamente 200  $\mu$ L do sobrenadante de EC sem movimentar o precipitado de restos celulares. Em seguida, dispense o sobrenadante no tubo SUPER. Se você movimentar o precipitado de restos celulares, terá que centrifugar o tubo novamente.
9. Usando uma nova ponteira, adicione 200  $\mu$ L de TLig ao tubo SUPER. Misture bombeando a solução delicadamente para dentro e para fora da ponteira.
10. Utilizando a mesma ponteira, mas com um volume diferente, adicione 400  $\mu$ L da mistura do tubo SUPER à coluna de cromatografia. Dispense com cuidado a solução na lateral da coluna para não movimentar a superfície da camada de resina.
11. Abra a válvula e deixe a solução na coluna escorrer para o coletor de resíduos líquidos. Quando restar cerca de 1 a 2 mm de líquido sobre a camada de resina, feche a válvula.
12. Examine a coluna e localize a RFP. Ela está espalhada pela camada de resina ou parece estar restrita a uma única faixa? Anote suas observações no caderno.
13. Usando uma nova ponteira, dispense 1.000  $\mu$ L (1 mL) de TLav delicadamente na lateral da coluna de cromatografia. Tente não movimentar a resina.
14. Abra a válvula e deixe a solução na coluna escorrer para o coletor de resíduos líquidos. Quando restar cerca de 1 a 2 mm de líquido sobre a camada de resina, feche a válvula.
15. Examine a coluna e localize a RFP. A localização da RFP na camada de resina mudou?
16. Usando uma nova ponteira, delicadamente dispense 1.000  $\mu$ L de TE duas vezes (2 mL no total) na lateral da coluna de cromatografia.
17. Coloque o tubo RFP embaixo da válvula. Abra a válvula e deixe a parte do *eluato* (a solução que faz a lavagem) que está vermelha escorrer para o tubo RFP. Feche a válvula e tampe o tubo quando tiver terminado.
18. Coloque o coletor de resíduos líquidos embaixo da válvula novamente. Abra a válvula e deixe o restante do eluato escorrer para o coletor de resíduos líquidos. Quando restar cerca de 1 a 2 mm de líquido sobre a camada de resina, feche a válvula.
19. Usando uma nova ponteira, adicione 1.000  $\mu$ L de TEqC duas vezes (2 mL no total) à coluna de cromatografia para prepará-la para a próxima aula. Feche bem a coluna.
20. Despeje o conteúdo do coletor de resíduos líquidos no ralo da pia.
21. Compare seu tubo RFP com os tubos RFP dos outros grupos. Existe alguma diferença na intensidade da cor entre as amostras? Anote suas observações no caderno.

## CAPÍTULO 6: PERGUNTAS

1. Por que a conformação de uma proteína é importante para que ela realize sua função?
2. Quais propriedades dos aminoácidos de uma proteína estão relacionadas ao enovelamento?
3. O eluato contendo RFP é menos ou mais brilhante do que no lisado celular após a centrifugação? Se houver uma diferença notável na intensidade da cor vermelha, o que poderia justificar isso?
4. Qual característica da RFP é usada como base da separação por cromatografia em coluna?
5. Como o procedimento de cromatografia em coluna pode ser ajustado ou modificado para aumentar a pureza da amostra de RFP?

### VOCÊ SABIA?



#### Proteínas quiméricas

Quando você determinou quais bactérias haviam incorporado o plasmídeo recombinante que tinha o gene *rfp*, você conseguiu ver a colônia transformada porque as bactérias emitiam uma cor vermelha fluorescente quando exposta à luz. A capacidade que uma proteína fluorescente (PF) tem de “brilhar” é uma ferramenta poderosa que está revolucionando a biologia celular e as pesquisas biomédicas. Inúmeras PFs de diferentes organismos foram isoladas e até mesmo modificadas para fornecer um conjunto de “marcadores” de PF. As PFs podem se ligar a outras moléculas para monitorar processos que ocorrem dentro das células e no organismo como um todo.

A função de uma proteína está diretamente relacionada à sua conformação, que é o resultado do enovelamento da proteína. Outras informações importantes que esclarecem o papel de uma proteína são sua distribuição, movimento, interações e associação com outras proteínas. Para visualizar esses aspectos de uma proteína, cientistas criam uma molécula, conhecida como **proteína de fusão** ou **proteína quimérica** (quimera é um animal mitológico com partes de diferentes animais), que contém tanto a proteína de interesse quanto uma PF fundidas. Os cientistas conseguem medir a fluorescência a partir de uma única PF, tornando as proteínas de fusão poderosas ferramentas de visualização. No entanto, esse procedimento funciona apenas se a PF não interferir na função da proteína, por isso são realizados testes para garantir que uma proteína funcione sempre do mesmo jeito, com ou sem o marcador de PF.

## CAPÍTULO 6: GLOSSÁRIO

**Anticorpo monoclonal:** tipo de proteína que se liga a substâncias no corpo e é produzida por clones de uma célula criada em laboratório.

**Colônia:** grupo de organismos vivos do mesmo tipo que vivem juntos de maneira mutuamente benéfica. Dentro de uma colônia de bactérias, os organismos são descendentes de um único ancestral e geneticamente idênticos (exceto no caso das mutações e de contaminação).

**Conformação:** forma ou estrutura tridimensional de algo.

**Cromatografia em coluna:** método de separação de substâncias em que elas são dissolvidas em um líquido que escorre por uma coluna de vidro com pequenas esferas. As esferas são revestidas de um material que liga as substâncias em diferentes graus.

**Cultura em suspensão:** método de cultivo de células em um meio líquido de crescimento que é agitado. O movimento de agitação mistura o ar com a suspensão e impede que a bactéria cresça fora da solução.

**Demanda de tratamento:** a necessidade dos pacientes.

**Eluato:** solução que faz a lavagem (por exemplo, a solução que goteja de uma coluna de cromatografia).

**Eluição:** processo de extração de uma substância que está ligada a outra, em que a primeira é lavada com uma solução.

**Enovelamento da proteína:** processo físico pelo qual um polipeptídeo se enovela assumindo sua estrutura tridimensional característica, essencial à função da proteína.

**Fase de declínio:** período de crescimento bacteriano em uma cultura quando a bactéria fica sem nutrientes e morre.

**Fase estacionária:** período do crescimento bacteriano em uma cultura em que a população permanece a mesma porque as taxas de divisão celular e morte celular são as mesmas. Geralmente, isso ocorre devido a um fator limitador de crescimento, como o esgotamento de um nutriente essencial.

**Fase lag:** período do crescimento bacteriano em uma cultura em que as bactérias se adaptam às condições de crescimento; as bactérias individuais estão amadurecendo e não conseguem se dividir.

**Fase log:** período do crescimento bacteriano em uma cultura em que o número de células bacterianas duplica em um período fixo (também conhecido como a fase logarítmica ou exponencial).

**Fator de crescimento hematopoietico:** grupo de proteínas que promovem o crescimento, a diferenciação e a atividade das células sanguíneas.

**Fosforilação:** processo em que um composto orgânico incorpora um ácido fosfórico ou um grupo contendo fósforo, ou é combinado com um deles.

**Glicosilação:** processo em que um carboidrato é ligado a outra molécula por meio de uma ligação covalente.

**Hidrofílico:** que gosta de água; dissolve-se na água; polar. O açúcar e o sal são exemplos de substâncias hidrofílicas.

**Hidrofóbico:** não gosta de água; não se dissolve na água; apolar. O óleo, a cera e a RFP são exemplos de substâncias hidrofóbicas.

**Hormônios:** substâncias que agem como mensageiros químicos no corpo.

**Lisar:** destruir.

**Operon:** conjunto de genes localizados em sequência no DNA e cuja transcrição é iniciada por um mesmo promotor.

**Polipeptídeo:** uma molécula linear longa que se enovela imediatamente assumindo uma conformação tridimensional específica que chamamos de *proteína*.

**Ponte dissulfeto:** ligação covalente simples entre os átomos de enxofre e dois aminoácidos.

**Proteína de fusão:** veja "*Proteína quimérica*".

**Proteína quimérica:** proteína criada pela união de dois ou mais genes que originalmente codificavam proteínas separadas.

**Resina:** material usado na coluna de cromatografia para revestir as esferas.

**Sítio de ligação:** área de uma biomolécula que se liga a uma substância específica ou parte de uma substância.

**Sobrenadante:** líquido claro encontrado em cima de um precipitado sólido após a centrifugação de uma mistura.

**Tampão:** solução resistente a mudanças no pH que contém um ácido fraco e seu sal ou uma base fraca e seu sal.

**Vacina:** mistura com bactérias ou vírus mortos ou enfraquecidos que leva o sistema imunológico do corpo a produzir anticorpos que vão se ligar a uma bactéria ou produzir um vírus para combater uma doença.