

UFABC

Bacharelado em Biotecnologia

Enzimas de Restrição

Proteínas recombinantes

Sergio Daishi Sasaki

(NHZ6006-18)



Universidade Federal do ABC

O que são enzimas de restrição?

- ▶ Enzimas de restrição– tesouras moleculares para cotar o DNA



Como as Enzimas de restrição trabalham?

- ▶ Geralmente corta o DNA em um “palíndromo” como

GAATTC.

- ▶ Palíndromo – palavra ou frase quando pronunciada de trás para frente tem a mesma pronúncia.

Ex. AMA

Socorram-me subi no ônibus em Marrocos.

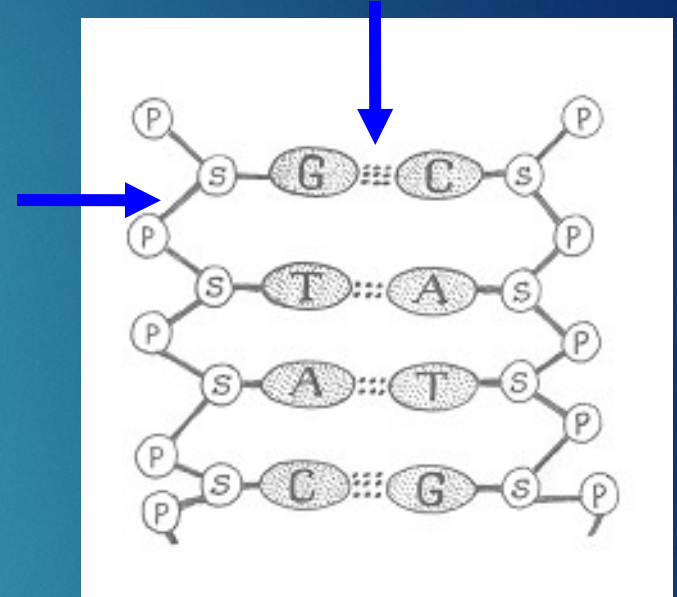


← “Sítio de restrição”
ou

“Sequencia de reconhecimento”

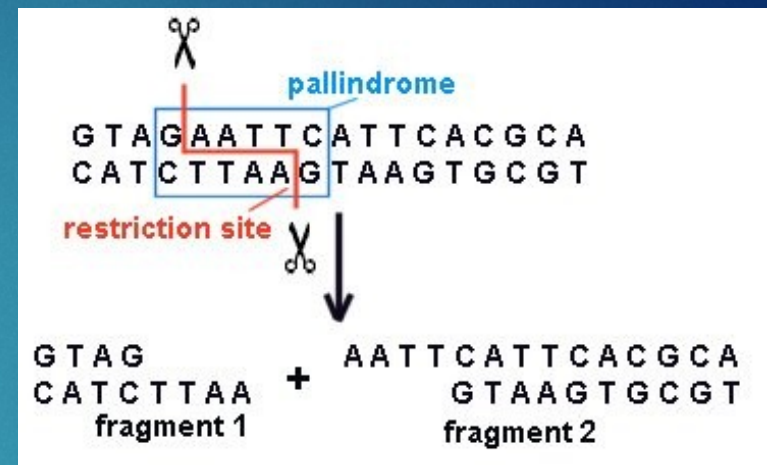
Como as enzimas de restrição trabalham?

- ▶ Cortam o DNA nas ligações fosfodiéster e ligações de hidrogênio.



Como as enzimas de restrição trabalham?

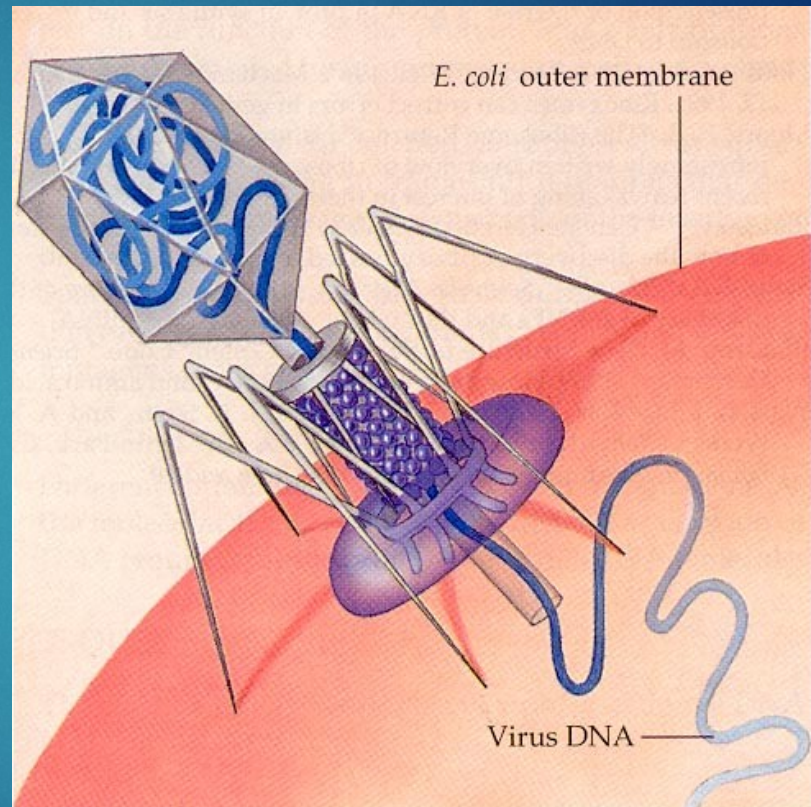
- ▶ Geram dois diferentes tipos de cortes:
- ▶ - Extremidades cegas.
- ▶ - Extremidades coesivas.



5'...CCC'GGG...3'
3'...GGG'CCC...5'

Qual a origem das enzimas de restrição?

- ▶ Bactérias
- ▶ Origem na resposta Contra bacteriófagos (virus que infectam bactérias como Lambda).



Como são nomeadas?

- ▶ Nome da bactéria que as produzem

EcoRI

HindIII

BamHI

- ▶ Gênero

Escherichia

Haemophilus

Bacillus

- ▶ Espécie

coli

influenzae

amylo.

- ▶ Cepa

R

d

H

- ▶ Ordem isol.

I

III

I

Sítio de restrição

G[^]AATTC

A[^]AGCTT

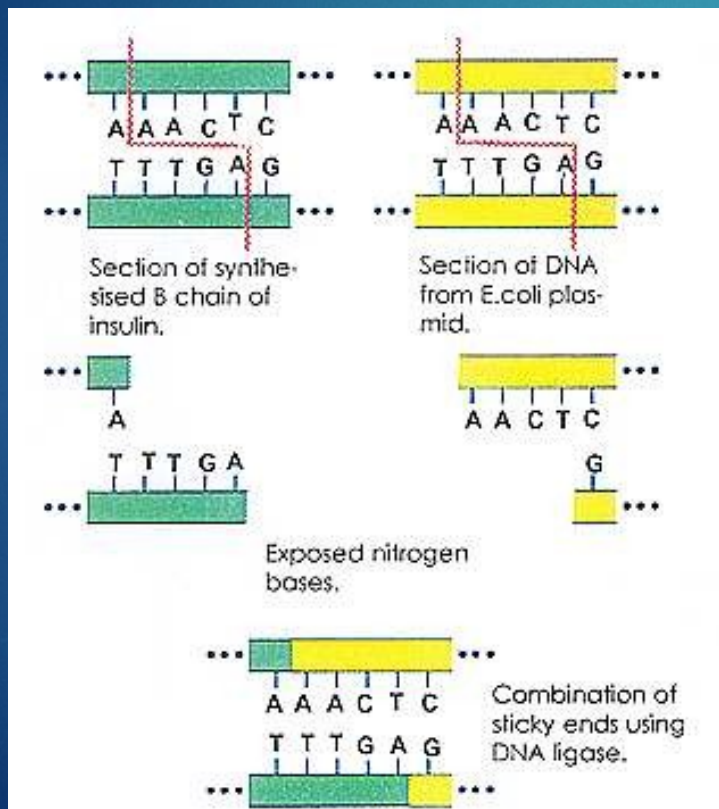
G[^]GATGC

Como as enzimas de restrição trabalham?

- ▶ Deve haver a temperatura ótima e tampão correto (concentração de sais e pH) para cada enzima.
- ▶ Mimetizando as condições da bactéria de origem.

Como as enzimas de restrição trabalham?

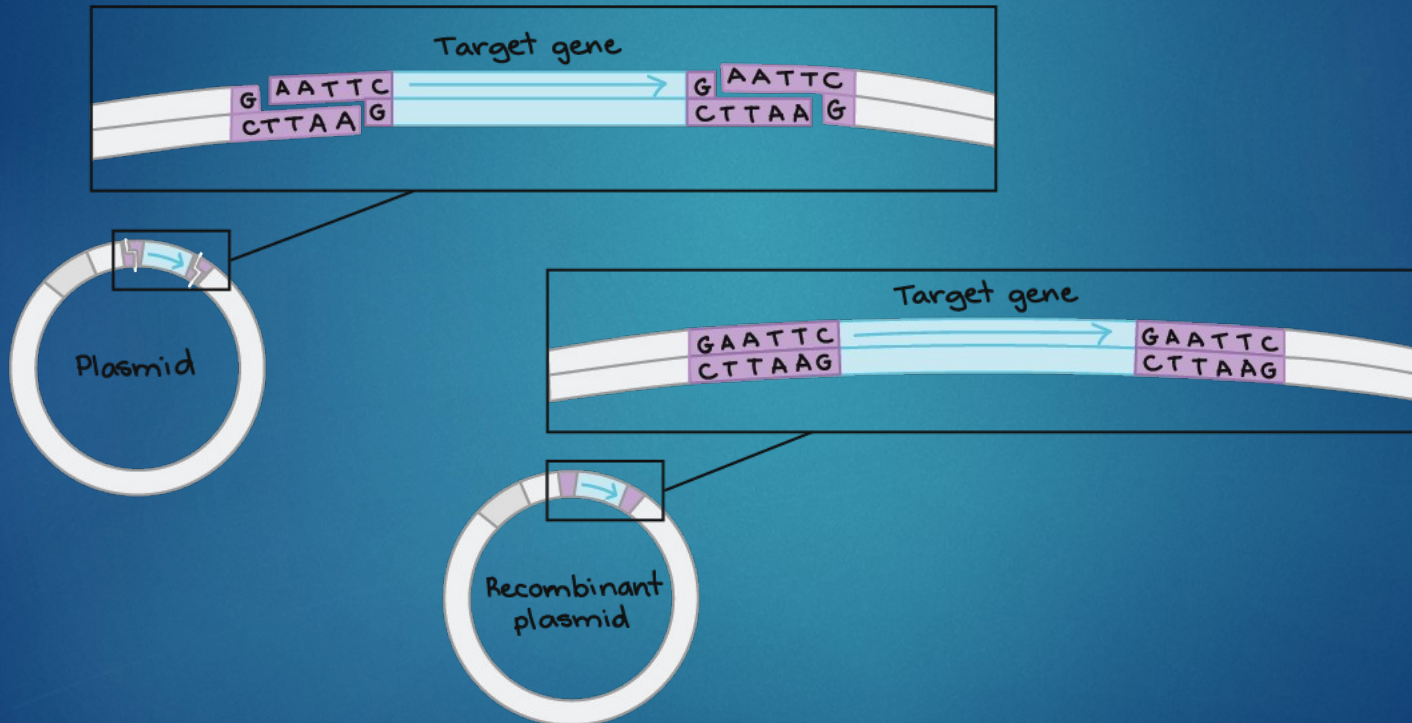
- O que é melhor? Enzimas que geram extremidades coesivas ou cegas?



Sticky Ends		Blunt End																																
5' Overhang	3' Overhang																																	
<table><tr><td>G</td><td>A</td><td>A</td><td>T</td><td>T</td><td>C</td></tr><tr><td>C</td><td>T</td><td>T</td><td>A</td><td>A</td><td>G</td></tr></table>	G	A	A	T	T	C	C	T	T	A	A	G	<table><tr><td>G</td><td>A</td><td>G</td><td>C</td><td>T</td><td>C</td></tr><tr><td>C</td><td>T</td><td>C</td><td>G</td><td>A</td><td>G</td></tr></table>	G	A	G	C	T	C	C	T	C	G	A	G	<table><tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr><tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr></table>	G	G	C	C	C	C	G	G
G	A	A	T	T	C																													
C	T	T	A	A	G																													
G	A	G	C	T	C																													
C	T	C	G	A	G																													
G	G	C	C																															
C	C	G	G																															

Como o DNA é religado?

- ▶ Ligase – outra enzima reconecta as ligações fosfodiéster.



Análise de restrição

Boophilus microplus mRNA for boophilin, isoform H2

GenBank: AJ304447.1

GenBank Graphics

>AJ304447.1 Boophilus microplus mRNA for boophilin, isoform H2

ATTGGCCAGGCACTCAAGATGAAGTGCATCATTCTTCTAGCCGTTCTAGGAACAGCGTTTGCGCAGAGAA
ATGGATTCTGCCGACTGCCGGCAGATGAAGGCATCTGCAAGGCCCTCATACCTCGCTTCTACTTCAACAC
TGAAACCGGAAAATGTACCATGTTTTCTATGGAGGCTGTGGAGGCAACGAGAACAACCTTCGAGACCATA
GAGGAGTGTCAAAGGCGTGCGGAGCTCCGGAGCGAGTGAACGACTTCGAAAGCGCCGATTTCAAGACTG
GCTGTGAGCCGGCGGCCGACAGCGGCTCTTGCGCTGGTCAACTGGAGCGCTGGTTTTACAATGTTCAATC
GGGAGAGTGCGAGACATTCGTCTACGGGGGCTGCGGGGGCAACGACAACAATTACGAAAGCGAGGAGGAG
TGTGAACTCGTCTGCAAGAACATGTAATTATCCATACCTAGCGGACTTCAAAGTGCCTTCCCTCATGGAT
CGCATCATGCGTCATAAAGATACCGAAGTGACCTTGTGAATAAAATGAA

Análise de restrição

<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php>

Análise de restrição

<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php>

The abbreviations for nucleotides are:

A: Adenine

C: Cytosine

G: Guanine

T: Thymine

U: Uracil

The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) also uses single-letter codes to represent multiple nucleotides:

B: C or G or T

D: A or G or T

H: A or C or T

K: G or T

M: A or C

N: A or C or G or T

R: A or G

S: C or G

V: A or C or G

W: A or T

Y: C or T