Desenvolvimento

Parte 1

**Relação entre a Engenharia Genética e o DNA Recombinante**

A Engenharia Genética em primeiro plano é definida como a tecnologia do DNA recombinante na qual por meio dos avanços das tecnologias desenvolvidas ao longo dos anos foi possível ter um vasto desenvolvimento nesta área. E um desses avanços foi a clonagem molecular.

**Retrospectiva Histórica da clonagem de DNA**

No cotidiano em geral, quando se ouve a palavra “clonagem”, as pessoas normalmente associam a clonagem de um organismo inteiro, como é o caso famoso da ovelha Doly em 1996, no qual foi o primeiro mamífero a ser clonado com sucesso a partir de uma célula somática (adulta);

Porém clonar significa fazer uma cópia geneticamente exata. E em um laboratório de genética molecular por exemplo, o que é clonado com maior frequência são partes específicas de DNA (gene, entre outros).

Tendo isso em vista, houve muitas outras tentativas de clonagem de DNA antes da ovelha Doly, e foi a partir dessas tentativas que a engenharia genética se desenvolveu com o passar do tempo, de forma que foram sendo criadas novas técnicas que visavam otimizar cada vez mais tal processo.

**Etapas da clonagem**

E com todo esse desenvolvimento, foi possível se desenvolver técnicas cada vez mais avançadas para facilitar o processo de clonagem, e essas etapas consistem em:

1 – Isolar o gene de interesse

Escolha da sequência específica a ser isolada, logo após faz-se necessário isolar o fragmento de DNA de interesse que passa a ser chamado de inserto.

E para que se tenha o DNAr, de duas origens diferentes, é necessário utilizar as enzimas de restrição para realizar a clivagem (corte da sequência específica), pois as mesmas têm capacidade de reconhecer a sequência alvo específica e realizar o corte seletivo do fragmento que será utilizado.

2 – Unir o gene ao vetor: DNA recombinante

Já na segunda etapa, é feita a ligação entre o inserto, que contêm o gene de interesse com o vetor, e a união dos dois forma uma molécula de DNAr. Comumente são utilizados plasmídeos como vetores para clonar fragmentos de DNA.

Dessa forma, o fragmento do gene alvo se une ao vetor, através da DNA Ligase, formando o plasmídeo recombinante contendo o gene de interesse. Nessa etapa a DNA Ligase é responsável por selar as lacunas do eixo do DNA;

3 – Transformação

A molécula de DNAr produzida é introduzida em um organismo hospedeiro compatível (em sua maioria em bactérias), que seja capaz de ser replicada.

E tal processo é conhecido como transformação, pois a célula que recebeu o DNAr sofre muitos ciclos de divisão, e por meio dessa divisão acaba produzindo várias cópias desse material genético modificado.

E o que ocorre nesse processo, é que as células hospedeiras copiam o DNA do vetor juntamente com o próprio DNA, criando múltiplas cópias do DNA inserido. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de transformante ou célula transformada.

Alguns exemplos de células hospedeiras que são comumente utilizadas são as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

E é importante levar em conta que na prática esse procedimento gera uma certa mistura de construções recombinantes. De forma que algumas células vão conter o gene clonado de interesse, ao passo que outras não. E para fazer essa verificação de quais bactérias terão o DNAr, tem-se a quarta etapa:

4 – Seleção dos clones recombinantes

Nessa etapa, com o objetivo de se selecionar apenas as células de interesse, o vetor possui um marcador selecionável que permite a identificação de moléculas recombinantes.

Os marcadores que normalmente são utilizados são os marcadores de resistência a antibiótico, dessa forma uma célula hospedeira sem o vetor morre quando exposta a um determinado antibiótico, enquanto o hospedeiro com o vetor sobrevive e se multiplica, pois é resistente aquele determinado antibiótico ao qual foi exposto.

Um plasmídeo geralmente tem um gene de resistência aos antibióticos, o que permite que as bactérias que o tenham sobrevivam na presença de um antibiótico específico.

Assim, as bactérias portadoras de plasmídeo podem ser [selecionadas](https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/bacterial-transformation-selection) em placas com nutrientes contendo o antibiótico.