

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JÉSSICA SILVA TAPIA

**CONSTRUÇÃO DE UM GENE REPÓRTER DE MEMBRANA USANDO
SEQUÊNCIA DO TIPO STREP-TAG**

**São Gabriel
2015**

JÉSSICA SILVA TAPIA

**CONSTRUÇÃO DE UM GENE REPÓRTER DE MEMBRANA USANDO
SEQUÊNCIA DO TIPO STREP-TAG**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia, Universidade federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como requisito necessário à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Andrés Delgado Cañedo

**São Gabriel
2015**

JÉSSICA SILVA TAPIA

**CONSTRUÇÃO DE UM GENE REPÓRTER DE MEMBRANA USANDO
SEQUÊNCIA DO TIPO STREP-TAG**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de
Conclusão do Curso de Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa —
UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 22 de Janeiro de 2015

Banca examinadora:



Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Orientador
(Unipampa)



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

(Unipampa)



Dr. Gabriel da Luz Wallau

(Unipampa)

SÃO GABRIEL

2015

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Andrés Cañedo Delgado, pela orientação, pelo apoio, paciência, prontidão e pelos ensinamentos. Por ter confiança em mim, por me auxiliar no amadurecimento pessoal e profissional. Obrigada!

A todos os professores, pelo aprendizado, dedicação, por estarem dispostos a tirar dúvidas e a me incentivar a buscar por águas mais profundas.

Agradeço a minha família, pela oportunidade de realizar essa graduação, sem vocês eu não seria nada. Por todo carinho, afeto e suporte e amor incondicional que me ajudaram durante esta caminhada. Pela atenção e palavras na hora do desespero, pela compreensão nas mudanças de humor, pelos ensinamentos que me deram por toda a vida, me mostrando as escolhas certas a fazer e por acreditarem em mim quando desejei trilhar meu próprio caminho.

Agradeço com muito amor ao meu pai Sandro, pelas palavras que me fizeram encontrara a racionalidade nos momentos de desespero, pelos incontáveis ensinamentos, correções e pela mão amiga. Por mostrar que sempre me protegeria, e que a qualquer momento estaria ali.

Com toda a admiração do mundo, a minha mãe Angela, por ser minha amiga, meu colo de acalanto, por me ouvir durante horas e me mostrar que seguir em frente era o melhor. Por não me deixar cair, por me fazer rir e por ser a melhor pessoa do mundo. Por estar ao meu lado e ser incentivadora dos meus sonhos e desejos. Obrigada a vocês, por fazerem o impossível para que isto pudesse se concretizar. Não há amor maior em minha vida, sem vocês não seria nada, sem vocês não estaria aqui. De todo o meu coração, muito obrigada! Eu amo vocês.

Aos meus irmãos, Rafael e Gabriel por me fazerem rir, pelas inúmeras visitas que me recarregavam de energia, por serem meu ponto forte e meu ponto fraco. Vocês são tudo para mim, sou orgulhosa de ter vocês como irmãos.

Ao Rafael Gama de Simão, por todo carinho, amor, apoio, paciência, compreensão, por estar ao meu lado em todos os momentos e não me deixar desistir e me dar forças para seguir em frente. Em especial também a toda a sua família por também ser minha família aqui.

A Maria Carolina Paleari, Mariana Costa, Dione Larissa, Viviane Ulbrich, Bruna Torres, pela ajuda nos experimentos, pelas horas de paciência e pelo companheirismo. E a todos colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para este trabalho ser possível.

As minhas amigas, Darlene, Lays, Mariele, Polyana e todas as outras que eu fiz nesse caminho, que me fizeram ajudaram e se fizeram presente em todos os momentos dessa caminhada! Obrigado por estarem comigo!

Enfim a todos que contribuíram para este caminho ser trilhado, dentro e fora de universidade. Muito Obrigada!

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.” (Galileu Galilei)

RESUMO

A transferência gênica é uma ferramenta biotecnológica amplamente utilizada em estudos de biologia celular e molecular. A metodologia se baseia na introdução de genes exógenos em células alvo, usando como mediadores vetores que carregam este material genético. Devido ao fato de que a eficiência de transformação celular não atinge a totalidade das células, é necessário que as células transformadas sejam separadas daquelas não transformadas, utilizando como base suas características físicas, químicas ou biológicas. Na atualidade, dois mecanismos são utilizados para a realização de tais processos, sendo um deles a seleção por antibióticos. No entanto, este procedimento é demorado, dificultando o uso da metodologia como técnica de seleção acessível. A outra metodologia está baseada no uso de genes repórteres fluorescentes e posterior isolamento das células pela técnica de *sorting* utilizando citometria de fluxo. Porém, nem todos os laboratórios dispõem deste equipamento, devido seu elevado custo. O gene repórter desenvolvido no presente trabalho, batizado pelo nosso grupo como L7, codifica uma proteína quimérica formada por um domínio de transmembrana e um domínio extracelular de nove aminoácidos que tem alta afinidade pela streptavidina. O gene assim formado tem um tamanho aproximado de 300 pb que fornece a este gene um amplo potencial de uso em experimentos de transferência gênica.

Palavras-chave: Streptavidina. Gene repórter. Superposição de oligonucleotídeos. Streptag. Seleção Celular. Biologia sintética

ABSTRACT

Gene transfer is a biotechnological tool widely used in cell and molecular biology studies. This methodology is based on the introduction of exogenous genes into target cells, using vectors carrying this genetic material as mediators. Because cellular transformation does not reach all the cells, it is necessary to separate the transformed cells from those not transformed, using their physical, chemical or biological characteristics. Currently, two mechanisms are used to carry out such processes, one of them is the selection by antibiotics resistance. However, this procedure is time consuming, difficult to use the methodology as affordable selection of techniques. The other method is based on the use of fluorescent reporter genes and subsequent isolation by cells sorting technique using flow cytometry. However, not all laboratories have this equipment, due to its high cost. The reporter gene developed in the present work, named as L7, encodes a chimeric protein formed by a protein transmembrane domain and a nine amino acid extracellular domain with high affinity for streptavidin. The gene thus formed has an approximate size of 300 pb providing a large potential for use in gene transfer experiments.

Keywords: Streptavidin. Gene reporter. Oligonucleotide superposition. Streptag. Cell selection. Synthetic biology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - A figura descreve o modo de montagem do gene com extremidade extracelular de streptatag e um domínio de transmembrana único..... 24
- Figura 2** - PCR de construção dos fragmentos que darão origem ao L7. Amplificação positiva das duas moléculas de 150pb. A, fragmento 1 e B o fragmento 2..... 25
- Figura 3** - PCR de união dos fragmentos de 150pb, gerando um terceiro fragmento de 300pb. A, produto Oli1; B, produto Oli2; C, L7 26
- Figura 4** - PCR para fusão das sequências IRES GFP á L7. A: fragmento L7 e fragmento IRES GFP antes da PCR, com 300pb e 1500pb respectivamente; B produto de PCR depois de 15 ciclos sem adição de primers, apresentando a união dos fragmentos pela banda com peso de 1700pb. D, produto de PCR final com 30 ciclos e os primers específicos..... 26
- Figura 5** - Amplificação para confirmação da presença do inserto desejado..... 27

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μl – Microlitros

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético

HCl – Ácido clorídrico

KCl – Cloreto de potássio

NaOH – Hidróxido de Sódio

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia de polimerase

SDS – Dodecilsulfato sódico

IRES – Internal ribosome entry site

GFP – Green Fluorescent Protein

DNA - Ácido desoxirribonucleico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
	1.1 Transferência Gênica	12
	1.2 Construção do DNA recombinante	13
	1.3 Seleção Celular	13
2	JUSTIFICATIVA	16
3	OBJETIVOS	17
	3.1 Objetivo Geral:	17
	3.2 Objetivos específicos:	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
	4.2 Desenho do gene	18
	4.3 Síntese de L7	18
	4.4 Síntese de IRES GFP	19
	4.5 Síntese do fragmento final	19
	4.6 Purificação	20
	4.7 Resolução Eletroforética	21
	4.8 Clonagem no sistema TOPO TA	21
	4.9 Eletroporação e plaqueamento	21
	4.10Crescimento em meio líquido e Extração do plasmídeo	22
	4.11Confirmação da presença do inserto	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO, DIFICULDADES E PERSPECTIVAS FUTURAS	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transferência Gênica

Naturalmente, a transferência gênica é a troca de material genético entre células de uma mesma ou de diferentes espécies. (BROWN, 2003). A transmissão pode ser horizontal quando a troca ocorre entre espécies diferentes, ou seja, quando o receptor não é seu descendente, ou transferência vertical, quando o organismo recebe material genético do seu antecessor. Este processo ocorre quando material genético exógeno, DNA ou RNA, são introduzidos em uma célula alvo (KLUG et. al, 2010). O processo de transferência genica é uma técnica importante para o estudo e desenvolvimento da terapia gênica e as tecnologias de DNA recombinante. A transferência gênica depende em grande parte da eficiência de introduzir o material genético nas células alvo. Tal processo é mediado por vetores que “transportam” o material gênico para o interior celular. Estes vetores são selecionados de acordo com características essenciais para realizar o carregamento dos genes (BEYER, TEIXEIRA, SILVA, 2002).

Os vetores possuem algumas propriedades relevantes que influenciam na sua escolha. Algumas características dos principais vetores de transferência são a capacidade de acomodação do gene, expressão estável do transgene, baixa citotoxicidade, capacidade de adentrar na célula (BEYER, TEIXEIRA, SILVA, 2002). Os vetores atualmente disponíveis não são perfeitos, ou seja, não possuem todas essas características, portanto são selecionados de acordo com a necessidade de cada evento.

Tais vetores podem ser sintéticos, como os lipossomos, ou advir de natureza biológica, como as partículas virais que possuem sua natureza modificada, evitando assim que se repliquem no hospedeiro causando algum efeito adverso no processo de transferência gênica. Os primeiros vetores virais usados foram os bacteriófagos, capazes de usar de seus mecanismos naturais de infecção para inserir e transportar mais eficientemente as sequências para o interior da célula (STEPHENS et. al 2009).

Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares que são encontrados em bactérias, no entanto, tem replicação independente do genoma desses microrganismos. São formados por DNA de fita dupla circular e possuem os elementos

essenciais para sua replicação. Seu tamanho varia de 1 a 250 kpb, podendo ser de cópia única ou múltipla dependendo da célula em que se encontram. São considerados uma ferramenta básica da engenharia genética e das tecnologias de DNA recombinante. Um bom plasmídeo é definido pela presença de dois ou mais sítios de clivagem, uma origem de replicação na célula hospedeira, possuir um gene que codifica um produto que distingue a célula transformada da célula não transformada, dentre outras características. (SANTOS, 2013).

1.2 Construção do DNA recombinante

O início do processo envolve a obtenção do DNA a ser clonado e transferido a uma nova célula. Os métodos mais comuns para obtenção de moléculas de DNA recombinante são baseados na utilização de clonagem de sequências exógenas pelo método que envolve enzimas de restrição e DNA ligase (YOLOV & SHABAROVA, 1990).

A reação em cadeia de polimerase, conhecida como PCR, foi desenvolvida em 1983 por Kary Mullis (BARTLETT & STIRLING, 2003) e também pode ser utilizada para fundir fragmentos com precisão e rapidez, tendo em vista que os métodos anteriores ofereciam algumas limitações para esse tipo de reação (SHEVCHUK et. al. 2004). Novos ensaios revelaram métodos para realizar a fusão de fragmentos mais longos e com maior flexibilidade. No ensaio, o termociclador aquece e arrefece os tubos de reação para alcançar as temperaturas desejadas em cada passo da reação (RAHMAN.et al., 2013). Neste processo rápido ocorre a amplificação enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA. Na presença de enzima, dNTPs e oligonucleotídeos que hibridizam especificamente com a sequência, a molécula a ser amplificada é desnaturada por aquecimento a fim de começar a síntese de uma nova molécula (AUSUBEL et.al., 2003).

A técnica de clonagem por PCR recebe vários nomes, dentre eles PCR circular. A PCR circular consiste em usar oligonucleotídeos que irão se fundir durante a PCR pela superposição de bases nas suas extremidades. Esta é uma técnica livre de endonucleases e ligase e vem se mostrando muito eficiente (QUAN & TIAN,2009).

1.3 Seleção Celular

O evento de transformação na transferência celular não atinge a totalidade das células, desta forma torna-se necessário que as células transformadas sejam separadas daquelas não transformadas. Os métodos para seleção celular baseiam-se nas características da própria célula, sejam elas adquiridas ou não. Alguns tipos celulares são suficientemente diferentes para permitir a separação baseada nas suas características físicas, aderência, massa, entre outras. Leucócitos e hemácias, por exemplo, podem ser separados por centrifugação em gradiente de densidade por equilíbrio, já que apresentam densidades diferentes (LODISH et. al 2014).

Atualmente os mecanismos mais utilizados para a seleção de células transformadas são a resistência a antibióticos e a metodologia que se baseia em transformação com genes repórteres fluorescentes e posterior separação com citômetro de fluxo dotado com sistema de *cell sorting*.

A técnica de seleção por resistência a antibiótico consiste em transformar as células com um marcador selecionável, alguma característica que permita diferenciá-las das demais células. Tendo em vista que os plasmídeos são capazes de portar genes responsáveis por diversas características, são introduzidos genes responsáveis pela resistência a antibióticos. A escolha deste marcador varia de acordo com cada experimento; no entanto, todo o processo depende da inserção do material genético nas células alvo, o que pode tornar mais demorado e até inviável, dependendo do sistema usado.

A citometria de fluxo pode ser definida como uma ferramenta para estudo de células com a capacidade de avaliar e diferenciar diversas características celulares como receptores de superfície, conteúdo de DNA e RNA, além de permitir a separação das células por características físicas e biológicas (BACAL & FAULHABER, 2003). A separação rápida e purificada das células é feita em uma suspensão heterogênea de material, por um processo denominado *sorting*.

O fundamento básico desta metodologia resume-se na capacidade de mensurar propriedades de células individuais, com emprego de laser atuando sob substâncias celulares que emitem luz num comprimento de onda diferente ao recebido e que será captado por um sensor do tipo PMT (fotomultiplicador), permitindo interpolar as informações biológicas, químicas e/ou moleculares do material (FERRAZ, 2007). A luz captada é convertida em sinais eletrônicos, onde os recursos de informática realizam a análise dos resultados por meio de software específico. O

resultado é emitido em forma de gráficos de acordo com a fluorescência emitida, que é então comparado com as características particulares das células, permitindo avaliar os mais diversos tipos celulares, que vão desde células humanas até células bacterianas.

O *sorting* é um processo de alta especificidade, podendo ser utilizado em pesquisa básica ou áreas clínicas. É cada vez mais aplicado devido à capacidade de isolar as populações celulares de forma relativamente eficiente. A amostra é injetada no citometro de fluxo de forma ordenada. Apenas uma célula de cada vez é interceptada pelo laser, e marcações prévias da célula fornecem as informações a seu respeito (RAHMAN, 2006).

No entanto, a técnica de *sorter* para separação de células fluorescentes se torna difícil no dia a dia devido ao elevado custo do equipamento que não está disponível para todos os laboratórios.

Frente a essas adversidades o trabalho tem por objetivo construir um gene com potencial uso em experimentos de transferência gênica para permitir o processo de seleção celular baseado no método da streptavidina ligada a esferas magnéticas. O gene repórter sintetizado codifica uma proteína quimérica formada por um domínio proteico de transmembrana e um domínio extracelular de nove aminoácidos que tem alta afinidade pela streptavidina.

A streptavidina é uma proteína tetramérica que se caracteriza pela elevada afinidade com a biotina (HONG LING et al., 2011). As interações biotina-streptavidina tem uma das mais fortes interações covalentes conhecidas transformando-a num produto biotecnológico de uso amplo.

A partir deste novo método de separação o processo de seleção de recombinantes se tornará mais fácil e eficiente, já que dispensaria equipamentos caros, tornando os experimentos científicos desta área muito mais dinâmicos.

2 JUSTIFICATIVA

Na atualidade o uso de experimentos de transferência gênica tem se tornado essencial para diversos tipos de ensaios nas mais diversas áreas. As técnicas de DNA recombinante são destinadas ao estudo de doenças, criação de novas linhagens de organismos ou células. No entanto, para que tais estudos sejam realizados com sucesso é necessário que os experimentos sejam realizados com mais eficiência e rapidez, além de acessíveis. Técnicas que tornem o processo mais acessível simultaneamente incentivam e aceleram o número de pesquisas em diversas áreas que envolvem tais experimentos. O presente trabalho procurou desenvolver um novo gene repórter que ofereça estas características aos protocolos de seleção celular pós-transformação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Construção de um novo gene repórter com uso potencial em experimentos de transferência gênica, que permita rapidez e simplicidade ao processo de seleção celular a partir da utilização do método da streptavidina ligada a esferas magnéticas.

3.2 Objetivos específicos:

- Desenhar um novo gene repórter com potencial em experimentos de transferência gênica e seleção celular;
- Construir um novo gene repórter a partir de métodos de biologia sintética;
- Testar a eficiência do gene repórter construído.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2 Desenho do gene

Todo o desenho experimental do gene repórter, batizado com o nome de L7, foi realizado a partir do uso da ferramenta de bioinformática pDRAW32 1.0 (ACACLONE software). O gene em questão tem tamanho de 300 pb e possui uma sequência líder no extremo aminoterminal da proteína seguido de um domínio STREPTA-TAG descrito por Lamla e Erdmann (2003). O gene foi sintetizado portando um domínio transmembrana de passagem única e uma pequena cauda citoplasmática, do mesmo gene a partir do qual foi obtida a sequência transmembrana, eliminando grande parte do domínio carboxiterminal desta proteína (por motivo de confidencialidade a origem destas sequências não será descrita no texto).

Uma sequência IRES (Internal Ribosome Entry Site) e a sequência que codifica a proteína GFP (Green Fluorescent Protein) foi desenhada a jusante o gene repórter sintético para permitir a visualização da célula transformada durante o processo de separação.

4.3 Síntese de L7

A construção do fragmento correspondente ao gene L7 se deu através de amplificação de oligonucleotídeos sintéticos pela técnica de PCR. Os oligonucleotídeos foram desenhados de modo a amplificar dois fragmentos individuais de 150 pb que após fusionados por PCR geraram um fragmento final de 300 pb. Todas as reações de PCR foram realizadas em volume de 25 µl.

A reação de PCR para a amplificação do Oligo1 e Oligo2 foi realizada com 2,5 µl de tampão de amostra 10 X (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM KCl; 1 mM DTT; 0.1 mM EDTA; estabilizadores e 50 % (v/v) glicerol – (Sigma), 1µl de dNTP 5 mM (Invitrogen), 1 µl de cada primer específico, 1µl do oligonucleotídeo oligo1 (1 pmol/ µl), 0,5 µl da enzima *AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, high fidelity* (Sigma) e 18 µl de água ultrapura estéril.

A amplificação foi realizada em um termociclador SureCycler 8800 (Agilent), sob as seguintes condições: desnaturação à 95 °C durante 30 segundos; hibridização a 60 °C por 30 segundos; extensão à 68 °C durante 30 segundos, por 30 ciclos. Ao final da reação de PCR, uma alíquota de 5 µL do produto de amplificação foi depositada e resolvida em gel de agarose a 1% corado com GelRed (Biotium), como descrito no item 4.7.

4.4 Síntese de IRES GFP

A construção do fragmento de IRES:GFP, se deu através de amplificação por PCR. Os *primers* foram desenhados de modo a amplificar um fragmento de 1331 pb.

A reação de PCR foi realizada em volume de 25µl, contendo 2,5µl de tampão de amostra 10X (600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, thermostable AccuPrime™ protein, 10% glicerol.), 1µl de dNTP 10mM (Invitrogen), 1µl do primer PCR-IRES-GFP R, 1µl do primer PCR-IRES-GFP D, 1µl da amostra do plasmídeo pLR2 (VARGAS et. al. 2012) 0,5µl da enzima enzima AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase, high fidelity (Sigma) e 18 µl de água ultrapura estéril.

A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador, sob as seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 30 segundos; hibridização a 60°C por 30 segundos; extensão a 68°C durante 2 minutos e extensão final à 68°C por 5 minutos, por 30 ciclos. Ao final da reação de PCR, uma alíquota de 5µL do produto de amplificação foi depositada e resolvida em gel de agarose à 1% corado com GelRed (Biotium), como descrito no item 4.7.

4.5 Síntese do fragmento final

Para construção do fragmento final, foram utilizadas as amostras purificadas, do fragmento L7 e de IRES GFP para sua amplificação. O fragmento resultante desta amplificação tem aproximadamente 1500pb.

A reação de PCR foi realizada em volume de 25µl, contendo 2,5µl de tampão 10 X (600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, thermostable AccuPrime™ protein, 10%

glicerol.), 1µl de dNTP 10mM (Invitrogen), 3µl de amostra de IRES:GFP purificado, 5µl da amostra de L7 purificado, 1µl do primer PCR-IRES-GFP R, 1µl do primer L7 ext D., 0,5µl da enzima enzima AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase, high fidelity (Sigma) e 11 µl de água ultrapura estéril.

Nesta primeira amplificação realizada em termociclador, sob as seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 1 minuto; hibridização a 60°C por 1 minuto; extensão a 68°C durante 2 minutos e extensão final a 68°C por 5 minutos, por 30 ciclos. Ao final da reação de PCR, uma alíquota de 5µL do produto de amplificação foi depositada e resolvida em gel de agarose a 1%, como descrito no item 3.6. Esta amplificação utiliza os primers acima especificados.

Uma segunda amplificação foi efetuada, baseando-se na complementariedade de base das amostras. Nesta, a reação de PCR foi realizada em volume de 25µl, contendo 2,5µl de tampão de amostra 10X (600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, thermostable AccuPrime™ protein, 10% glycerol.), 1µl de dNTP 10mM (Invitrogen), 3µl de amostra de IRES GFP purificado, 5µl da amostra de L7 purificado, 0,5µl da enzima enzima AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase, high fidelity (Sigma) e 13 µl de água ultrapura estéril.

Esta amplificação não utiliza primers, seguindo o protocolo acima citado. Realizada em um aparelho termociclador, sob as seguintes condições: desnaturação a 95°C durante 1 minuto; hibridização a 60°C por 1 minuto; extensão a 68°C durante 2 minutos e extensão final a 68°C por 5 minutos, por 15 ciclos. Ao final da reação de PCR, uma alíquota de 5µL do produto de amplificação foi depositada e resolvida em gel de agarose a 1%, como descrito no item 4.7.

4.6 Purificação

Todas as amostras foram purificadas com o kit “Agencourt AMPure XP PCR Purification” (Beckman-Coulter), seguindo as especificações do fabricante, onde para cada 1,0µl de amostra deveria ser adicionado 1,8µl de AMPure, sendo no experimento aqui presente a alíquota de 15µl de amostra correspondente a 27µl de AMPure.

Para a purificação das amostras de Oligo1 e Oligo2, os dois produtos de PCR

foram purificados em uma mesma reação, onde para 30µl de amostra foram adicionados 54µl de AMPure do kit de purificação.

4.7 Resolução Eletroforética

Todas as amostras de DNA, para análise de resultados, foram resolvidas em gel de agarose. À amostra em questão foi adicionado tampão de amostra 1X, contendo o corante GelRed (Biotium), e o mesmo foi resolvido em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X. As resoluções eletroforéticas foram realizadas a 150 Volts. O DNA foi visualizado e fotografado em fotodocumentador dotado com transiluminador UV.

O tamanho dos fragmentos foi estimado a partir da comparação com marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

-*TBE (0,5X)*: 100 mL de TBE 5X (54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 - 8,5; água destilada q.s.p 1L) em água destilada q.s.p 1L.

-*Tampão de amostra*: Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X. GelRed 1:700.

4.8 Clonagem no sistema TOPO TA

As amostras purificadas foram submetidas ao procedimento de preparação para eletroporação e clonagem. Para realização deste protocolo num tubo de 0,2ml foram adicionados 0,5µl de Solução salina diluída seguindo protocolo do fabricante, 0,5µl de pCR3.1-TOPO TA e 2µl de amostra. A alíquota foi misturada e repousou em temperatura ambiente por 30 minutos. O Kit usado foi o pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen).

4.9 Eletroporação e plaqueamento

Nesta etapa 1,5 µl do produto da ligação, foi adicionado a uma cubeta de 2mm juntamente com 2010µl de bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5α eletrocompetentes. As amostras foram submetidas a um pulso de 1,8 kW utilizando o protocolo pré-estabelecido no eletroporador *GenePulser Xcell™* (BIO-RAD).

Imediatamente após o pulso, as células foram cobertas por 1ml de meio LB e incubadas por 45 minutos a 37°C até se plaqueamento.

As células eletroporadas foram plaqueadas em meio LB-Agar contendo ampicilina (100µg/ml), previamente preparado. As amostras (100 µl) foram espalhadas nas placas com auxílio de uma alça de Drigalski.

As placas foram mantidas em estufa por um período de 24h a temperatura de 37°C, após este período as colônias resistentes foram avaliadas.

4.10 Crescimento em meio líquido e Extração do plasmídeo

10 ml de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/ml) foi colocado em tubos estéreis de 15ml. Para cada tubo adicionou-se uma colônia de cada placa deixada em crescimento posteriormente. Os tubos foram deixados em agitação em uma estufa a 37°C por um período de 24h. E posteriormente a seu crescimento se procedeu a extração de plasmídeo

Uma alíquota de 2ml da amostra de crescimento em meio líquido foi transferida a microtubos de 2ml e destinada à extração de plasmídeo (*miniprep*). As amostras de 8 colônias foram centrifugadas, separadamente, durante 1 minuto a 12.000 rpm. O processo de extração foi realizado de acordo com indicações do fabricante do Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit (Invitex).

4.11 Confirmação da presença do inserto

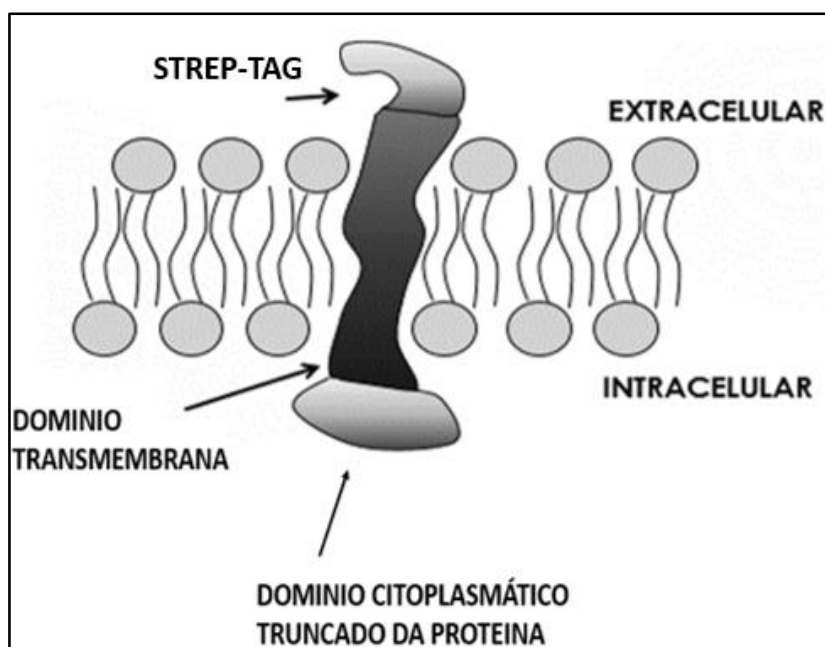
A fim de confirmar a presença do inserto de interesse e seu tamanho molecular, uma PCR foi realizada com 1ng de cada plasmídeo extraído.

A reação de PCR foi realizada em volume de 25µl, contendo 2,5µl de tampão de amostra 10X (600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dCTP, thermostable AccuPrime™ protein, 10% glicerol.), 1µl de dNTP 10mM (Invitrogen), 3µl de amostra de IRES GFP purificado, 5µl da amostra de L7 purificado, 1µl do primer PCR-IRES-GFP R, 1µl do PCR-IRES-GFP D., 0,2µl da enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e 17,3µl de água ultrapura estéril.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi construímos um gene repórter sintético a fim de expressar uma proteína de membrana que apresenta uma sequência Strep-tag localizada na região aminoterminal (extracelular) a qual possui afinidade pela streptavidina, porém não tão forte como a biotina. O *Strep-tag*, foi utilizado por ser curto, biologicamente inerte, proteoliticamente estável e não interferir com a translocação da membrana ou o dobramento de proteínas, sendo assim uma ferramenta versátil para experimentos de seleção celular (THOMAS SCHMIDT GM, ARNE SKERRA, 2007). Na síntese optou-se por usar domínio transmembrana de uma proteína com domínio simples de transmembrana sem interação de dimerização relatada e uma pequena cauda citoplasmática, eliminando grande parte do domínio carboxiterminal desta proteína (Figura 1). Sendo assim, seria possível a realização da seleção das células transformadas usando o sistema de streptavidina conjugada com *beads* magnéticas.

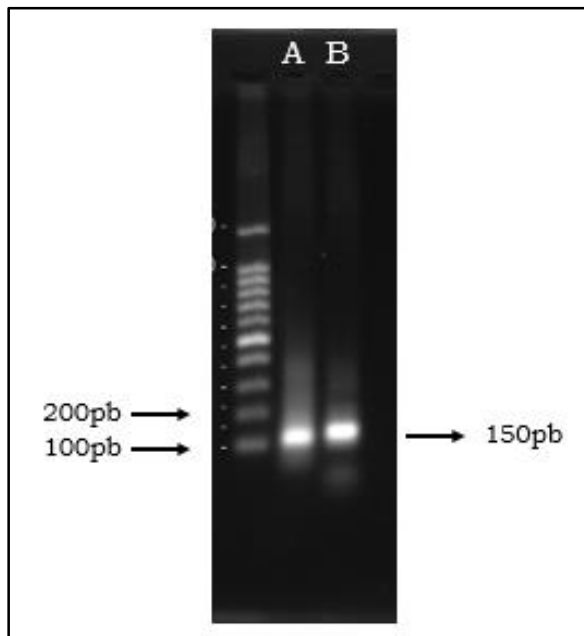
Figura 1 - Modo de montagem do gene com extremidade extracelular de streptatag e um domínio de transmembrana único.



Fonte: Jéssica Silva Tapia (2014)

Para realizar a “costura” dos fragmentos, procedimentos de PCR foram realizados utilizando os iniciadores que permitissem a união dos fragmentos por superposição. Conforme apresentado na figura 2, os fragmentos Oli1 e Oli2 de L7 foram amplificados com o tamanho esperado, ou seja, 150pb.

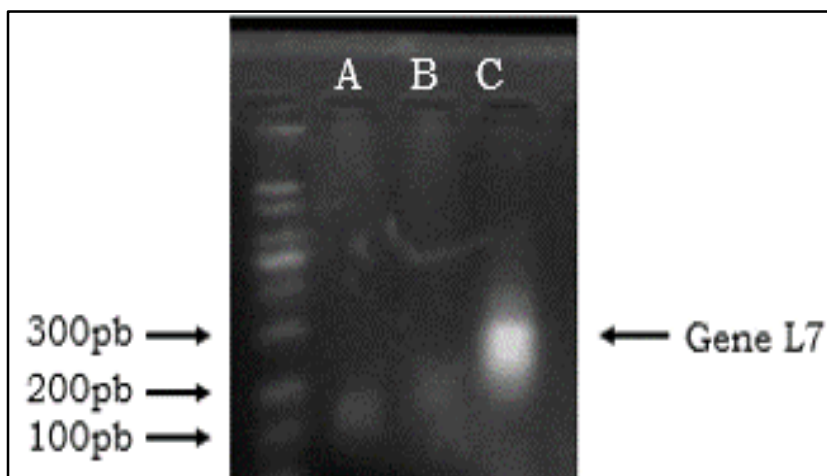
Figura 2 – PCR de construção dos fragmentos que darão origem ao L7. Amplificação positiva das duas moléculas de 150pb. *A*, fragmento 1 e *B* o fragmento 2.



Fonte: Jéssica Silva Tapia (2014)

Seguindo a técnica de costura de oligonucleotídeos, realizou-se a formação do gene L7 a partir dos dois fragmentos Oli1 e Oli2 mostrados na figura 2. Usando os primers adequados conseguiu-se amplificar o fragmento de 300pb que pode ser visto na figura 3 indicado pela letra C, resultado da amplificação conjunta dos fragmentos Oli1 e Oli2.

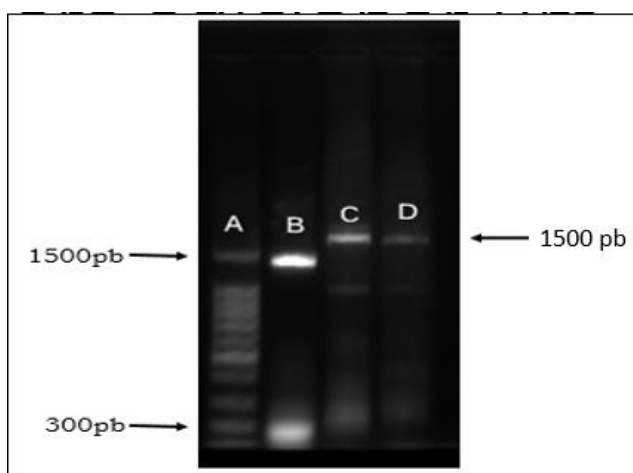
Figura 3 - PCR de união dos fragmentos de 150pb, gerando um terceiro fragmento de 300pb. A, produto Oli1; B, produto Oli2; C, L7.



Fonte: Jéssica Silva Tapia (2014)

Os fragmentos de L7 e GFP já purificados foram destinados a uma nova PCR para fusioná-los. A figura 4 demonstra o sucesso no processo de junção do gene L7 e a sequência IRES-GFP. O melhor resultado foi encontrado no ciclo 15 de amplificação, demonstrado pela coluna indicada com letra C.

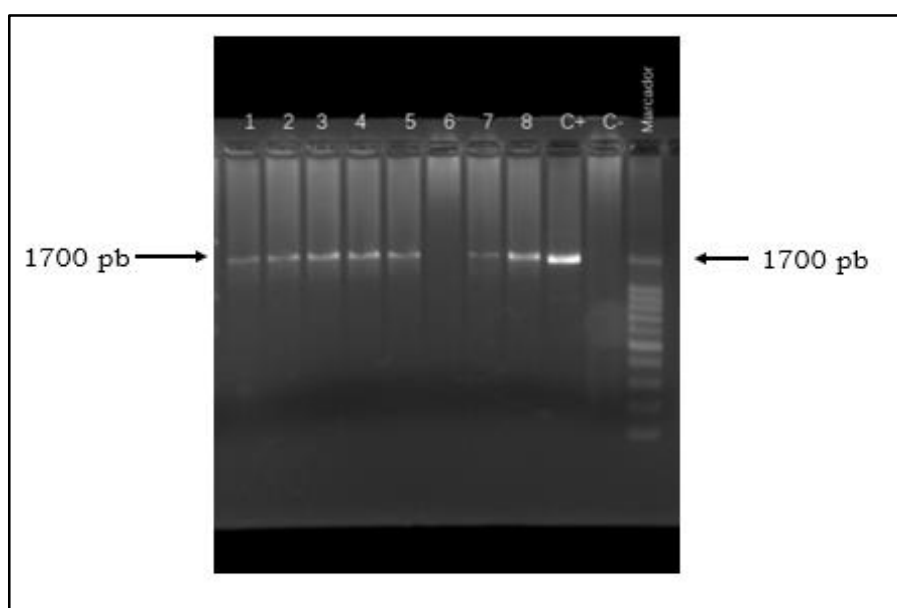
Figura 4 - PCR para fusão das sequências IRES GFP á L7. **A:** fragmento L7 e fragmento IRES GFP antes da PCR, com 300pb e 1500pb respectivamente; **B** produto de PCR depois de 15 ciclos sem adição de primers, apresentando a união dos fragmentos pela banda com peso de 1700pb. D, produto de PCR final com 30 ciclos e os primers específicos.



Fonte: Jéssica Silva Tapia (2014)

Após o processo de construção do gene, ele foi destinado a clonagem em plasmídeo de expressão em células de mamíferos pcDNA3.1. As colônias obtidas foram submetidas a purificação de plasmídeo e estas a PCR para confirmação da incorporação do inserto desejado, demonstrado por amplificação positiva. A figura 5 indica a presença do inserto em 7 das 8 amostras de colônias analisadas. Os iniciadores usados para essa amplificação foram PCR-IRES-GFP R e PCR-IRES-GFP R.

Figura 5 - Amplificação para confirmação da presença do inserto desejado.



Fonte: Jéssica Silva Tapia (2014)

6 CONCLUSÃO, DIFICULDADES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos até o presente momento, podemos identificar com sucesso a fusão dos fragmentos desejados, desta forma sendo possível sua análise em estudos celulares, a fim de visualizar sua funcionalidade como gene repórter de seleção celular.

Atualmente estamos aguardando a confirmação dos produtos da clonagem por sequenciamento. Os procedimentos de transfecção celular serão repetidos devido a erros técnicos.

Com isso é descrita uma ferramenta de grande valia para experimentos de transferência gênica e seleção celular, que poderá auxiliar experimentos laboratoriais e demais atividades da área, tornando o processo mais rápido e eficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., EDS., **Current protocols in molecular biology**. John Wiley & Sons, New York, 2003

BACAL N.S, FAULHABER M.H.W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. Editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2003

BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D.; **A Short History of the Polymerase Chain Reaction**. PCR Protocols; 226. pp. 3-6 Edição 2, 2003.

BEYER N.B., TEIXEIRA L.A.K., SILVA E.F.A. **Gene therapy**. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. Revista . Saúde Pública vol.33 n.3 São Paulo, Junho 1999 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101999000300009>> Acesso em: 09 de janeiro de 2015

BERTHO A.L. **Citometria de fluxo**. Núcleo de Citometria de Fluxo do Lab. de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. 2007 Disponível em: <picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc> Acessado em: 07 de janeiro de 2015.

BROWN, T. A., **Clonagem gênica e análise de DNA**, 4ª edição, editora Artmed, 2003.

FERRAZ R. **Citometria de Fluxo Cell Sorting fundamentos e aplicações**. Plataforma de Citometria de Fluxo Núcleo de Purificação Celular (Sorting). Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. 2007

KLUG,W.S.; CUMMINGS, M.R.;SPENCER, C.A.; PALLADINO M.A., **Conceitos de Genética** Editora: ARTMED EDITORA; Ano de Edição: 2010

LAMLA T.; ERDMANN A.; **The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins**, Science Direct, Berlin, Germany, 2003.

LODISH H., BERCK A., KAISER A. C., KRIEGER M. BRETCHER A., PLOEGH H., AMON A. **Biologia Celular e Molecular - 7ed.** Artmed Editora, 402-403. 2014

QUAN J., TIAN J. **Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways.** PLoS ONE. Instituto Butantan, Brazil, 2009

RAHMAN M.T, UDDIN M.S, SULTANA R.; MOUE A.; SETU M.; **Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review.** Disponível em: <<http://www.banglajol.info/index.php/AKMMCJ/article/viewFile/13682/9836>> Acesso em: 09 de janeiro de 2015

SANTOS D. **Plasmídeos.** Disponível em: <<https://djalmasantos.wordpress.com/2013/06/04/plasmídeos>> Acesso em 10 de janeiro de 2015.

SHEVCHUK N.A.; BRYSKIN A.V.; NUSINOVICH Y.A.; CABELLO F.C.; NIKOLAI A.; SUTHERLAN M.; LADISCH S., **Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously**, US National library of medicine national institutes of health, Estados Unidos da América, 2004.

STEPHENS S.R.P OLIVEIRA M.B.S.C.O; RIBEIRO C.R.; CARNEIRO L.A.D **Virologia**, Capítulo 2. Disponível em: <<http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/cap2.pdf>> Acesso em: 12 de janeiro de 2015

VARGAS J.E., SALTON G., SODRÉ C.L.A., PIRES T.D., BONAMINO M., LENZ G., DELGADO C. A., **pLR: A lentiviral backbone series to stable transduction of bicistronic genes and exchange of promoters.** Elsevier, pages 179–185 Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Campus São Gabriel RS, Brasil, 2002

YOLOV A.A, SHABAROVA Z. A. **Constructing DNA by polymerase recombination.**
Journal: Nucleic Acids Research - NAR , vol. 18, no. 13, pp. 3983-3986, 1990
Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/18/13/3983>> Acesso em: 12 de janeiro de 2015