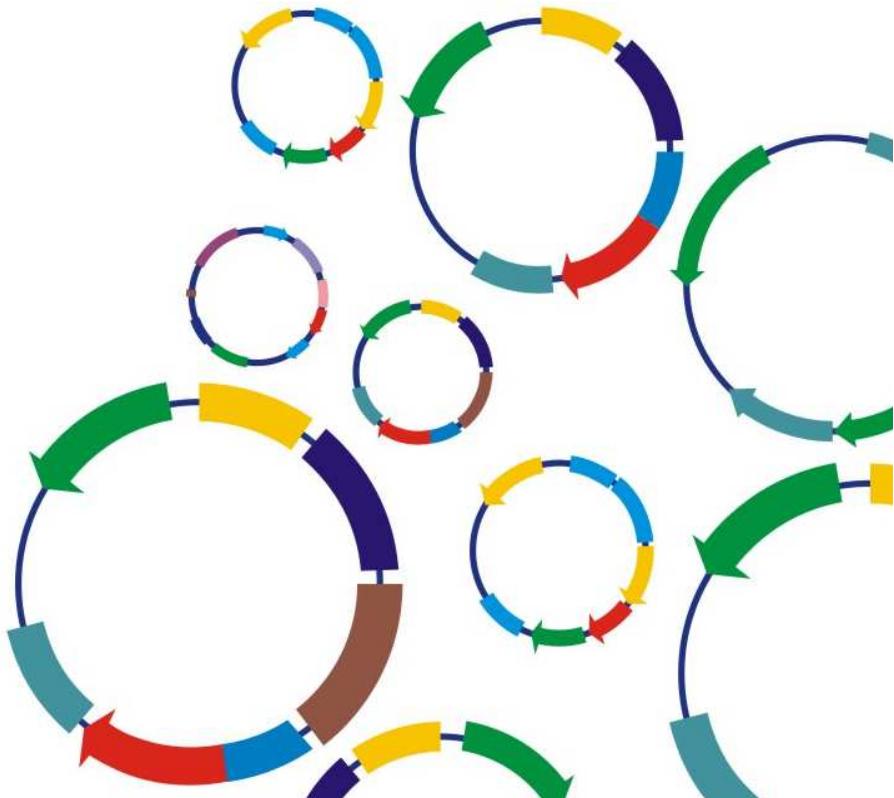


Manual de Construção de Vetores de Expressão

*Naiara Cristina Pulzi Saito Vedoveli
Virgínia Picanço e Castro*



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO -
FUNDHERP

MANUAL DE CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO

Naiara Cristina Pulzi Saito Vedoveli
Virgínia Picanço e Castro

Ribeirão Preto - 2016

V416m

Vedoveli, Naiara Cristina Pulzi Saito

Manual para a construção de vetores de expressão./
Virgínia Picanço e Castro.— Ribeirão Preto: FUNDHERP
2016.

42p.: il.

ISBN: 978-85-92708-00-9

1. Vetores de expressão. 2. Biologia molecular. 3.
Manual. 4. Tecnologia do DNA recombinante. 5. Clonagem
molecular. I. Picanço-Castro, Virgínia. II. Título.

CDU 602.64

Prefácio

O presente manual descreve como gerar um vetor para expressão de uma proteína ou de um domínio e busca facilitar o trabalho do pesquisador que pretende construir um vetor de expressão. Ele apresenta de forma prática as etapas a serem utilizadas e sugestões de ferramentas que podem ser usadas para guiar o trabalho. Os procedimentos aqui descritos baseiam-se em algumas técnicas básicas da Biologia Molecular, portanto os mesmos procedimentos podem ser plenamente aplicáveis para qualquer construção que se deseja expressar, com algumas pequenas modificações. Lembre-se que cada passo pode ser realizado de diferentes maneiras. Este manual descreve a maneira como nosso laboratório trabalha. Você deve escolher os métodos, reagentes e kits de acordo com sua disponibilidade e conhecimentos.

Neste manual os vetores lentivirais foram escolhidos como exemplo, porém outros vetores de expressão disponíveis no mercado também podem ser utilizados. Também são fornecidos os protocolos utilizados para cada etapa e alguns *links* importantes, como apoio aos protocolos e análises. Ainda assim, a consulta a outros materiais é pertinente para sanar dúvidas sobre os procedimentos e analisar o processo caso alguma coisa dê errado. O livro “*Molecular Cloning*” (título em inglês) de Sambrook & Russel, do qual vários dos protocolos aqui utilizados foram adaptados, consiste em uma ótima fonte de consulta, bem como o livro “*Current Protocols in Molecular Biology*” de Wiley & Sons, e a série “*Methods in Molecular Biology*”, da editora Humana Press.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
I. PLANEJAMENTO DA CONSTRUÇÃO	4
a) Análise de restrição	7
b) Desenho dos <i>primers</i>	8
c) Escolha do vetor de expressão	13
II. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM	16
a) Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	16
b) Análise dos produtos de PCR.....	21
c) Purificação do fragmento amplificado	23
d) Clonagem em vetor de clonagem.....	25
III. SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO	32
a) Preparo de inserto e vetor de expressão para subclonagem.....	32
b) Ligação.....	34
IV. ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES	36
a) Análise por restrição	36
b) Sequenciamento	37
c) Confeção de estoques.....	39
V. ANÁLISE FUNCIONAL	41

INTRODUÇÃO

A metodologia para construção de um vetor de expressão tem por base técnicas de Biologia Molecular, em particular a tecnologia do DNA recombinante, sendo composta por etapas que se complementam. Por mais que pareça simples, o papel do pesquisador em cada etapa desse processo é fundamental, visto que uma etapa bem planejada e desenvolvida prepara e facilita as subsequentes.

O desenvolvimento de um vetor de expressão envolve basicamente as seguintes etapas:

1. Planejamento da construção e escolha do vetor

– O planejamento deve ser cuidadosamente pensado, tanto antes de se iniciar o processo quanto ao longo de todo o trabalho. A sequência a ser ligada e o vetor de expressão a ser utilizado devem ser cuidadosamente analisados para definição de uma estratégia de amplificação e facilitar a posterior ligação. O vetor de expressão já deve ser escolhido, com base em suas características e estrutura, para que a construção possa ser corretamente clonada e posteriormente expressa na célula hospedeira.

2. Amplificação da sequência-alvo

– A sequência a ser recombinada deve ser isolada. A amplificação pela técnica de PCR facilita e agiliza o processo. É necessário cuidado com a técnica e utilização de *primers* bem planejados, para que amplifique especificadamente a sequência que se deseja, por completo, e de forma que facilite a posterior ligação.

3. Clonagem e confirmação

– A sequência isolada deve ser clonada em vetor de clonagem e transformada em bactéria competente. Colônias transformadas devem ser isoladas e expandidas para obtenção de mais material. Para confirmação da

clonagem, é possível utilizar reação de restrição enzimática, PCR ou sequenciamento.

4. Recuperação do inserto e subclonagem em vetor de expressão

- O inserto é recuperado do vetor de clonagem por restrição enzimática e ligado ao vetor de expressão escolhido. O vetor também deve ser previamente preparado para a ligação. A construção deve ser transformada em bactéria competente.

5. Seleção de clones positivos e verificação da construção

- Os clones que incorporaram o vetor de expressão com a construção são selecionados. A construção deve ser verificada e então os clones positivos são estocados sob baixa temperatura.

6. Teste de expressão

- Por fim, para testar a efetividade da construção, pode-se realizar a transdução ou transfecção do vetor em uma linhagem e induzir sua expressão, de forma a verificar a viabilidade do vetor produzido.

Uma visão geral do processo é apresentada na figura 1.

É necessário que o pesquisador tenha todo o processo planejado desde o início e que esteja atento a cada etapa para que possa realizar ajustes e correções.

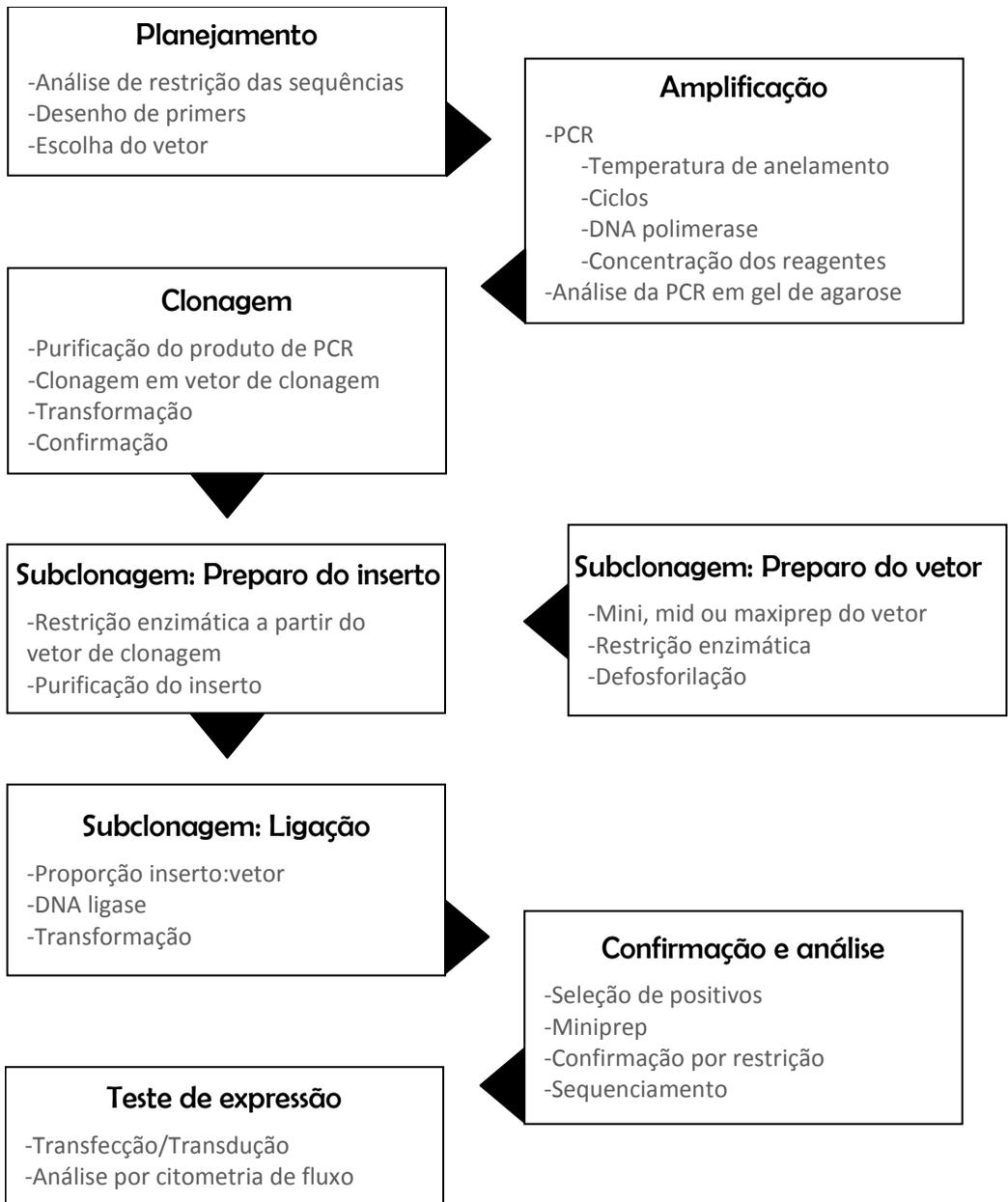


Figura 1. Visão geral das etapas para a construção do vetor de expressão

I. PLANEJAMENTO DA CONSTRUÇÃO

Este é talvez o passo mais importante de todo o processo e provavelmente você voltará nele muitas vezes durante a montagem do vetor. Na montagem de um vetor de expressão, todas as etapas a serem seguidas são dependentes e complementares, portanto o planejamento deve ser muito bem pensado antes do início do processo.

A forma mais fácil de expressar uma proteína é expressá-la de forma completa, de N- a C-terminal, sem cortes na sua estrutura. Se o objetivo é expressar parte de uma proteína, esta é uma tarefa mais difícil, pois é necessário determinar os limites dos domínios proteicos que se deseja expressar. Essa e outras perguntas devem ser bem pensadas e decididas antes do início da construção.

Ao planejar sua construção, vários aspectos devem ser levados em conta. O estudo, pesquisa, leitura e verificação dos materiais a serem usados são essenciais nessa etapa. Algumas perguntas a serem feitas a respeito da sua construção para auxiliar o processo de planejamento são:

O que eu desejo com meu vetor de expressão?

Um vetor de expressão pode ser usado para consecução de vários objetivos, como: expressar uma proteína recombinante, avaliar o papel de um promotor para controlar expressão de determinado gene, expressar um marcador para rastrear uma célula em um organismo etc. É necessário estabelecer com cuidado o objetivo da construção, para que o vetor de expressão seja corretamente desenhado.

Qual sequência eu desejo ligar no meu vetor de expressão?

Você deve conhecer toda a sequência nucleotídica que deseja utilizar (sequência de bases nitrogenadas), deve conhecer o tamanho da sua sequência e o organismo da qual ela será obtida. Deve avaliar ainda se a sequência a ser ligada corresponde a um gene ou uma região promotora. Se for um gene, qual proteína ele expressa, e se possui éxons e introns e quais células ou tecidos o expressam. Aqui você já deve ter em mente qual fonte utilizará para isolar sua sequência.

Qual vetor de expressão será utilizado?

Existem inúmeros vetores de expressão, que se diferenciam pelo tamanho de fragmento de DNA que é capaz de incorporar, pela capacidade de expressar em um determinado tipo celular e na durabilidade da expressão. É necessário escolher o tipo de vetor antes do início do processo, tendo em mente seu tamanho, em qual organismo deseja expressá-lo e como rastreará ou quantificará a expressão. Você deve ter conhecimento do mapa de ser vetor, que deve apresentar, no mínimo, a localização do promotor e dos sítios de restrição presentes no vetor. Quando disponível, o conhecimento de toda a sequência de bases nitrogenadas do vetor ajuda planejar melhor sua ligação e avaliar possíveis erros.

Como realizarei a ligação da minha sequência-alvo ao vetor?

Para ligar a sequência ao vetor, a reação de ligação catalisada pela enzima DNA-ligase é necessária. Porém é importante pensar em como tornar essa ligação mais eficiente, e como fazer para que a

sua sequência fique na orientação correta. A utilização de extremidades coesivas deixadas por algumas enzimas de restrição auxiliam esse trabalho, mas as enzimas a serem utilizadas devem ser bem escolhidas. Por isso a análise de restrição deve ser bem feita, de forma que as enzimas escolhidas não afetem a sequência ou o vetor.

Qual o hospedeiro em que o vetor de expressão será utilizado?

O hospedeiro ou organismo-alvo corresponde à célula ou organismo em que ocorrerá a expressão. Ele deve ser pensado junto com a escolha do vetor, pois estão intimamente relacionados. Alguns vetores são específicos de alguns tipos celulares, como células humanas ou leveduras, e os promotores presentes nos vetores respondem a determinados tipos de células. Se o vetor utilizado não corresponder ao tipo celular, a expressão não será satisfatória. Nessa fase, você já deve planejar como será feita a transfecção/transdução (inserção do seu vetor no organismo-alvo), a depender do vetor e organismo-alvo escolhidos.

Quais materiais, reagentes e/ou animais serão utilizados?

É de extrema importância avaliar qual será sua necessidade em termos de materiais e reagentes, e a avaliação da necessidade de uso de algum animal nos experimentos. Se o uso de animais for necessário, a aprovação do comitê de ética da instituição é imprescindível. Você deve fazer uma previsão da quantidade de animais necessários, trabalhando com o mínimo possível. Os materiais e reagentes também já devem ser pensados, pois os

trâmites burocráticos de compra de materiais podem atrasar seu trabalho.

É importante que todas essas questões sejam exaustivamente avaliadas, para que todas as etapas do processo de construção sejam bem executadas. Pensar sobre essas perguntas auxiliará na tomada de decisões e, durante todo o processo, elas podem ser reavaliadas. Uma vez definidas essas questões, é necessário iniciar as análises e escolhas de *primers* e vetores.

a) Análise de restrição

Ao planejar a construção, faz-se necessária uma ampla análise de restrição das sequências a serem utilizadas. Para isso, é necessário conhecer a sequência de bases nucleotídicas completa do fragmento a ser ligado e do vetor. Caso não seja possível conhecer toda a sequência do vetor (por motivos de patente, por exemplo) deve-se conhecer ao menos o mapa que indique a presença e localização dos sítios de restrição do mesmo.

Para o fragmento a ser ligado, um sítio de restrição pode ser adicionado às suas extremidades de forma a facilitar a posterior ligação. Isso pode ser feito com a utilização de *primers* desenhados especialmente com os sítios de restrição escolhidos, de forma que, durante a amplificação, esses sítios se localizem nas extremidades da sequência amplificada.

A análise de restrição auxiliará na escolha de enzimas a serem utilizadas. Existem vários programas computacionais que auxiliam nessa análise. Esses programas são capazes de analisar a sequência de bases fornecida em busca dos sítios de restrição para uma série de enzimas comercialmente disponíveis, e listar as

enzimas que realizam cortes, as que não realizam e qual a posição de cada sítio de restrição.

Um programa eficiente, gratuito e online a ser utilizado é o NEBCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), da empresa New England Biolabs®.

Para o vetor, é importante encontrar os sítios de restrição capazes de abrir sua estrutura no local correto para ligação da sua sequência, de forma que o vetor seja linearizado, mas não perca nenhuma estrutura essencial. Para a sequência, as enzimas que não apresentam sítios de restrição dentro da sequência são as melhores candidatas a serem colocadas nos *primers* para limitarem as bordas da sequência. Qualquer enzima que **não reconheça** o DNA a ser clonado e corte o vetor pode ser usada.

Caso a enzima a ser utilizada corte o fragmento, mas corresponde à enzima necessária para a ligação no vetor, pode-se procurar por enzimas similares, que reconhecem sequências diferentes, mas deixam a mesma extremidade coesiva. Por exemplo, as enzimas *XhoI* e *Sall*, que deixam uma ponta coesiva com as terminações TCGA, mesmo que reconheçam sequências levemente diferentes. A relação completa de enzimas que geram pontas coesivas complementares você pode achar no site da New England BioLabs (<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/compatible-cohesive-ends-and-generation-of-new-restriction-sites>).

b) Desenho dos *primers*

O desenho de *primers* é o passo chave para uma reação de PCR bem sucedida, além de ser uma valiosa ferramenta para adição dos sítios de restrição escolhidos. Porém, alguns cuidados

devem ser tomados, para que a amplificação com o par de *primers* escolhido ocorra de maneira satisfatória.

Quando se desenha *primers* para diversas aplicações, como clonagem, PCR multiplex, convencional ou até mesmo Real-time PCR, é essencial verificar o tamanho da sequência amplificada (amplicon) e selecionar sequências *sense* e *antisense* que não formem dímeros ou alças intramoleculares, para que a reação seja totalmente eficiente. Este processo requer a utilização de ferramentas de bioinformática e experiência na confecção de *primers*. Algumas ferramentas online que podem ser utilizadas para verificação dos *primers* são a “NetPrimer”, da Premier Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) e o Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

Algumas observações são essenciais para o desenho de *primers*:

- Evitar três ou mais bases nucleotídicas G ou C na terminação 3', pois pode diminuir a especificidade, uma vez que isso aumenta a estabilidade de hibridizações não específicas e a região 3' é crítica para a especificidade e sensibilidade do PCR.
- Algumas bibliografias sugerem a terminação do *primer*, na extremidade 3', com um único nucleotídeo C ou G, a fim de garantir que a terminação na qual a enzima taq-polimerase age esteja fortemente ligada à sequência-alvo
- Um tamanho de 18 a 22pb para os *primers* é suficiente para garantir a especificidade do mesmo
- Evitar complementaridade entre os *primers* (para evitar a formação de dímeros) e evitar complementaridade interna

em um mesmo *primer* (para evitar a formação de estruturas secundárias, como os “*hairpins*”)

- Tenha certeza que seu par de *primers* amplifique toda a região pretendida. O *primer sense* deve amplificar no sentido 5'→3' da sequência; o *primer antisense* deve amplificar em direção ao *primer sense*, ou seja, ele amplifica a fita complementar da região pretendida. Para isso, o *primer antisense* deve sempre ser o **reverso complementar** da sequência pretendida.

Quando deseja-se amplificar uma região gênica para ser posteriormente expressa, os *primers* devem ser desenhados de forma que amplifiquem toda a região codificante (CDS) do gene, desde o códon de iniciação (ATG) até o códon de finalização (TGA/TAA/TAG). Essa região pode ser identificada pela análise bioinformática da sequência do gene no site do grupo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para regiões promotoras, os *primers* devem amplificar a região 5' não transcrita do gene (5'UTR) que flanqueia o início da transcrição. A análise dessa região também pode ser feita através do site NCBI. É necessário que os *primers* amplifiquem a menor região possível que ainda apresente atividade promotora. Para isso é necessária a consulta à bibliografia pertinente.

Se é de interesse a adição de sítios de restrição à extremidade da sequência amplificada, isso já deve ser feito no desenho dos *primers*, após análise de restrição e escolha dos sítios de restrição a serem utilizados. Para isso, algumas dicas que deve-se ter em mente:

- Tenha a certeza que o DNA amplificado será inserido no vetor na orientação correta, ou seja, na fase de leitura correta. O sítio de restrição a ser ligado na extremidade 3' livre do vetor, onde encontra-se o promotor, deve ser colocado no *primer sense*, para que fique na extremidade 5' livre do inserto.
- Adicione nucleotídeos extras na extremidade 5' para garantir a clivagem pela enzima de restrição. A maioria das enzimas são menos eficientes quando o sítio de clivagem está próximo a extremidade 5'. Cinco a seis nucleotídeos são geralmente suficientes.

Quando adquiridos de empresa específica, os *primers* vêm dessalinizados e liofilizados. Como o DNA está sujeito a degradação em pH ácido, eles devem ser ressuspensos em água Milli-Q previamente esterilizada, nuclease-free e o pH ser ajustado para 7-8, ou ressuspensos em tampão TE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8). Essa solução, chamada solução-estoque, deve permanecer estocada em freezer -20°C e somente uma alíquota deve ser retirada para o trabalho, evitando sua contaminação. Para a solução-trabalho, que será utilizada nas reações de PCR, a concentração deve ser ajustada. Assim, deve-se diluir o *primer* para uma concentração de 10µM (10⁶µmol/µL ou 10µmol/µL). A solução-trabalho também deve ser estocada a -20°C e, quando em uso, deve ser mantida em gelo.

PROTÓCOLO1. Diluição dos *primers*

-solução-estoque: verificar na bula do *primer* recebido a quantidade (em nmol) informada, e calcular a concentração a partir da quantidade de água que foi adicionada a partir da fórmula:

$$C = \frac{n}{V}$$

Na qual: n = quantidade de matéria do *primer*
 V = volume final

Exemplo

Se a quantidade de primer recebida foi de 40nmol e foi adicionado 200µL de água, a concentração final da solução-estoque será de 0,2nmol/µL, ou 200pmol/µL

-solução trabalho: diluir a partir da solução estoque utilizando-se a fórmula:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Na qual: C₁= concentração da solução-estoque
 V₁= volume da solução estoque a ser diluída
 C₂= concentração desejada para a solução-trabalho
 V₂= volume final para a solução trabalho

Exemplo

Se a solução estoque encontra-se a 200pmol/µL e deseja-se a solução-trabalho a 10pmol/µL (10µM) e um volume final de 50µL, temos:

$$200.V_i = 10.50$$

V_i será portanto igual a 2,5µL, e para solução-trabalho deve-se diluir 2,5µl da solução-estoque em 47,5µL de água milli-Q estéril (para um volume final de 50µL).

c) Escolha do vetor de expressão

O vetor de expressão a ser utilizado deve ser escolhido já no planejamento e consiste em uma das ferramentas principais do trabalho. É necessário estabelecer qual será a estratégia de clonagem do inserto nesse vetor e em qual organismo ou célula deseja-se que a proteína seja expressa.

O vetor de expressão diferencia-se dos vetores de clonagem por apresentarem regiões promotoras que possam ser reconhecidas e ativadas pelo hospedeiro para que ocorra a transcrição do gene de interesse, permitindo que a construção gênica seja expressa pelo organismo hospedeiro. Para cada organismo hospedeiro diferente - *bactérias, fungos, células de insetos ou mamíferos* - existem vetores de expressão específicos, com características que permitam a expressão nesses tipos celulares.

Os vetores lentivirais, foco desse manual, são vetores utilizados para expressão de proteínas em células de mamíferos. Eles consistem na escolha de muitas instituições, dada sua capacidade de se integrar ao genoma da célula-hospedeira, garantindo uma transcrição duradoura do transgene. Existem vários vetores lentivirais, comerciais ou não. Sua escolha deve ser pensada com base em algumas características:

- **Promotor** - o promotor deve ser reconhecido e ativado pela célula hospedeira. Muitos vetores lentivirais apresentam como promotor o CMV (promotor do Citomegalovírus), que é um promotor forte e ativo em vários tipos celulares, útil quando deseja-se larga expressão de proteínas heterólogas. Se sua intenção é uma expressão controlada ou direcionada a um tipo celular, outro promotor deve ser escolhido, ou ainda, pode ser necessária a substituição do promotor. Se esse for o caso, é necessário conhecer os sítios de restrição que flanqueiam o promotor, para que esse possa ser retirado do vetor sem alteração de sua estrutura.
- **Sítio de Múltipla Clonagem** - o sítio de clonagem corresponde à região na qual o fragmento a ser expresso será inserido. Ele deve apresentar sítios de restrição únicos na sequência do vetor. Esses sítios devem ser conhecidos para seleção de enzimas e estabelecimento da estratégia de clonagem.
- **Marcador ou gene repórter** - é necessário que o vetor lentiviral tenha um marcador ou gene repórter que permita selecionar ou quantificar as células que incorporaram o vetor. O gene GFP, que codifica uma proteína verde-fluorescente, é bastante usado para esses casos. Em muitos vetores lentivirais, esse gene é co-expresso com o gene de interesse, transcrição mediada pelo mesmo promotor que permite a análise da expressão gênica. Se a intenção é utilizar o vetor de expressão em uma célula que já expresse GFP (se outro vetor de expressão com GFP já foi inserido nessa célula, por exemplo), é necessário um vetor com um

marcador diferente, como por exemplo, o gene de resistência a neomicina.

A construção de vetores de expressão é uma ferramenta importante no desenvolvimento científico e biotecnológico, visto que por esse meio é possível realizar o estudo da estrutura e função de genes, o estudo de regiões promotoras e reguladoras e a expressão de proteínas recombinantes.

II. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM

a) Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A reação de PCR permite a amplificação do fragmento de interesse a partir de uma amostra apropriada. A amostra deve ser escolhida com base no fragmento desejado. Se a intenção é a clonagem de uma sequência para ser expressa, é desejável que essa sequência não apresente introns, para que seja necessária a clivagem pela célula receptora (que poderia se dar da forma não desejada). Nesse caso, deve-se utilizar como amostra o cDNA (DNA complementar) produzido a partir do mRNA (RNA mensageiro) obtido de células que expressem o gene em questão. Se a intenção é a amplificação de uma região promotora, a amostra a ser utilizada deve ser de DNA genômico.

A reação é realizada em pequenos tubos de 200ul que contém todos os reagentes necessários para a amplificação e permite que o calor necessário para consecução de cada etapa seja transferido para reação. Em cada tubo, os seguintes reagentes devem ser adicionados:

- **Taq DNA-polimerase**
 - Realiza a extensão da nova fita de DNA a partir do DNA-molde
- **Tampão 10X (fornecido pelo fabricante)**
 - Tampão de ação específico para a DNA-polimerase
- **Cloreto de Magnésio - MgCl₂ (50Mm)**
 - Funciona como co-fator da enzima DNA-polimerase
- **Primers (concentração de 10μM)**
 - São os iniciadores, reconhecidos pela DNA-polimerase, para início da extensão

- **Mix de dNTP (deoxinucleotídeos tri-fosfato) (concentração de 10mM)**
 - Consistem em bases nucleotídicas trifosfatos utilizadas como substrato para produção da nova fita
- **Amostra de DNA molde**
- **Água milli-Q estéril**

Os reagentes devem ser adicionados na concentração correta, visto que muitos deles limitam a qualidade da reação. A reação de PCR deve ser submetida a um termociclador com etapas e temperaturas específicas, que farão a desnaturação da fita de DNA-molde, anelamento dos *primers* ao DNA-molde e extensão da nova fita pela DNA-polimerase. Cada uma dessas etapas tem uma temperatura específica de ação, que devem ser conhecidas e controladas.

PROTOCOLO 2. Polimerase Chain Reaction – PCR

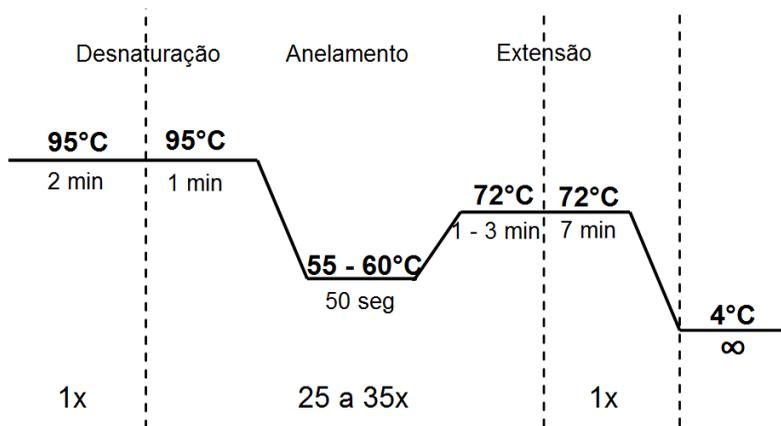
Para cada reação de PCR, o volume e concentração ideais são:

Reagente	Volume	Concentração final
Tampão 10X	5µL	1X
MgCl ₂ (50mM)	1,5µL	1,5mM
dNTP (10mM)	1µL	0,2mM
<i>Primer F</i> (10µM)	1µL	0,2µM
<i>Primer R</i> (10µM)	1µL	0,2µM
Taq DNA-polimerase	0,2 - 0,5µL	1u
DNA template	0,5 - 2µL	20ng
Água milli-Q estéril nuclease-free	q.s.p 50µL	-

Para várias amostras:

- Calcular a quantidade necessária de tampão, dNTPs, água, *primers* e DNA polimerase para todas as amostras, e misturá-los em um “*mix*”
**calcular 10% a mais de cada reagente, considerando eventuais perdas de pipetagem*
- Distribuir o volume necessário de “*mix*” para cada reação (descontando-se o volume de DNA-molde a ser utilizado)
- Distribuir o volume de DNA-molde em cada tubo de reação
- Submeter a reação a termociclador

Programa básico para reação de PCR:



A reação necessita apenas de alguns nanogramas de DNA-molde, portanto dilua o DNA original para não saturar a reação. A Taq DNA-polimerase é a enzima que fará a extensão e cópia da fita de DNA molde, e deve ser adicionada por último na reação. A

enzima Taq DNA-polimerase deve ser mantida em freezer -20°C até o momento de sua utilização, para aumentar sua vida útil. Muitas DNA-polimerase possuem atividade “*proofreading*”, corrigindo possíveis erros de inserção de bases durante a extensão. Isto faz com que a enzima introduza menos erros na síntese do DNA. No entanto, mesmo com a utilização da Taq comum, a maioria dos fragmentos são corretos. A enzima *proofreading* é recomendada para fragmentos grandes, maiores que 1000pb.

As enzimas não *proofreading* adicionam uma calda de nucleotídeos “A” no fim da extremidade 3’ do DNA, criando bases sem pareamento. Esta base pode ser utilizada para clonar o fragmento usando o pareamento A/T (kit topo TA). Enzimas *proofreading* não adicionam bases adicionais, e, portanto, geram produtos de pontas retas (*blunt ends*).

Outros fatores que afetam a qualidade do produto PCR incluem a qualidade do DNA-molde, as condições da reação (temperaturas), e número de ciclos. Como cada ciclo pode introduzir erros, é recomendado diminuir o numero de ciclos, geralmente 25 ciclos são suficientes.

Se você esta preparando muitas amostras, a realização de um *master mix* é recomendado. No *mix* são adicionados o tampão, dNTPs, água, *primers* e DNA polimerase, em volume total para todas as reações. O mix é dividido entre os tubos de reação e adicionado o DNA molde. Este procedimento acelera o trabalho e diminui a chance de erros de pipetagem e de contaminação dos estoques.

O tempo e as temperaturas da reação dependem do tamanho do fragmento a ser amplificado e a da composição dos *primers*. A regra básica recomenda a utilização de 1 minuto de extensão para cada 1Kb da sequência alvo e 58°C de temperatura

de anelamento para os *primers* com 24pb. Existem variações no cálculo da temperatura de anelamento dos *primers*, de acordo com diferentes autores. A composição de bases dos *primers* e a concentração desses e de sais na reação podem alterar a temperatura ideal para o anelamento. A temperatura de anelamento pode ser calculada a partir da Temperatura de “*Melting*” dos *primers*, temperatura em que metade da quantidade de *primers* encontra-se anelada, ficando 5°C abaixo dessa. Para esse cálculo, várias ferramentas podem ser utilizadas. Algumas ferramentas online estão disponíveis, como por exemplo a ferramenta da Applied BioSystems (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>), a da New England Biolabs (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator>) e da Thermo Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>). Esse cálculo dará uma base para iniciar o trabalho de amplificação, porém, na prática, será necessário analisar o resultado da amplificação e otimizar a temperatura de anelamento.

Se mesmo após otimização da temperatura de anelamento a PCR ainda resultar em amplificação inespecífica, alguns parâmetros podem ser alterados a fim de melhorar o anelamento dos *primers* e a amplificação, como:

- Aumentar a concentração de MgCl₂ - o aumento de cloreto de magnésio pode melhorar o anelamento dos *primers*, porém uma concentração muito alta pode inibir a atividade da Taq DNA-polimerase
- Adição de Tween-20 - a utilização de alguns detergentes não-iônicos, como o tween-20, estabiliza a ação da Taq DNA-polimerase e diminui a formação de estruturas secundárias. Cerca de 0,05% de tween-20 ajuda a evitar a

inibição da Taq DNA-polimerase por vestígios de SDS existentes na reação

b) Análise dos produtos de PCR

Os fragmentos de PCR podem ser avaliados por eletroforese em gel de agarose. A porcentagem do gel de agarose depende do tamanho do fragmento que será analisado, quanto maior a concentração do gel, maior a dificuldade que o fragmento encontrará em migrar através dele. Portanto géis mais concentrados são indicados para fragmentos pequenos, enquanto para fragmentos maiores são usados géis com menor porcentagem de agarose. Géis de 2% podem ser usados para fragmentos menores que 500pb. Géis de 1,5% para fragmentos de 1000pb e géis de 1% para fragmentos maiores. Quando deseja-se uma boa separação das bandas, para purificação de alguma delas, por exemplo, é necessário um gel mais concentrado e um tempo maior de corrida.

PROTOCOLO 3. Gel de agarose

- Diluir a massa apropriada de agarose em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40mmol/L, ácido acético 20mmol/L e EDTA 1mmol/L (pH 8,0)]. Aquecer até total dissolução da agarose

Calcular a porcentagem de gel de agarose em m/V, através da fórmula:

$$\% = m/V$$

Na qual: m = massa de agarose

V = volume final

Exemplo

Para um gel de agarose 1% de 100mL, deve-se diluir 1g de agarose em 100mL de TAE.

- Adicionar solução marcadora (Brometo de Etídeo, GelRed® ou similar) diretamente no gel em concentração apropriada, de acordo com as instruções do fabricante
- Verter o gel em cuba horizontal apropriada e aguardar até total polimerização

Uma vez finalizada a reação de PCR, 10-15 μL da reação pode ser submetida à eletroforese para análise da amplificação. Ao produto de PCR deve ser adicionado 10% do volume do Tampão de amostra (98% de glicerol, SDS 0,1% e azul de bromofenol), que dará densidade a amostra, para que possa se depositar no fundo do poço do gel. Em cada corrida é necessário aplicar um marcador de peso molecular, uma solução com fragmentos de DNA de pesos conhecidos, para comparação com o fragmento amplificado pela PCR.

As amostras e o marcador de peso molecular são aplicados no gel e a corrida é geralmente realizada a 80 volts até o corante chegar na parte inferior do gel. Como o DNA possui carga negativa ele migrará do polo negativo para o polo positivo. Certifique-se que a cuba foi conectada corretamente. Finalizada a eletroforese, o gel pode ser visualizado sob luz ultravioleta e fotografado. Aparelhos especiais são utilizados para isso.

c) Purificação do fragmento amplificado

Quando a amplificação por PCR não é específica, algumas bandas não correspondentes à esperada podem aparecer na reação. Essas bandas podem atrapalhar o processo de clonagem, visto que sequências inespecíficas podem se ligar ao vetor, conferindo perda de tempo e material. Por isso, quando isso ocorre, é importante purificar o produto PCR utilizando gel de agarose. O material da PCR é submetido à eletroforese em gel de agarose para separação das bandas. A banda de tamanho correspondente ao esperado é recortada do gel e o material genético presente nela é recuperado. É importante utilizar sempre uma lâmina nova, que não tenha sido contaminada com nenhum outro fragmento de DNA. A recuperação é feita com a utilização de kit específico, como por exemplo o Kit da GE “*Illustra GFX PCR DNA and band purification*”® ou o Kit da QIAGEN “*QIAEX II Gel Extraction Kit*”. Todos esses kits têm o mesmo princípio: a banda recortada do gel é solubilizada em tampão específico, a solução é submetida a um material na qual o DNA se ligará, separando-se do restante da solução. Por último, o DNA é eluído da coluna e recuperado. Esse mesmo procedimento é utilizado para purificação de fragmento digerido a partir do vetor de clonagem.

PROTOCOLO 4. Purificação de gel de agarose

KIT: QIAEX II Gel extraction Kit (QIAGEN®)

Prévio:

Separar o fragmento de interesse por eletroforese em gel de agarose

Processo:

- Recortar a banda de tamanho correspondente do gel, usando lâmina limpa, sob observação em luz UV.
- Dispor a banda em tubo limpo e calcular a massa da banda (banda = massa tubo vazio – massa do tubo cheio).
**NÃO colocar mais que 250mg por tubo!*
- Adicionar 3 volumes de tampão QX1 (para cada 100mg de gel, add 300 μ L de tampão)
- Ressuspender a suspensão QIAEX II em vortex por 30s. Adicionar ao tubo: 10 μ L (para \leq 2 μ g de DNA) ou 30 μ L (para 2-10 μ g de DNA)
- Incubar: 50°C por 10min. agitar a cada 2min para manter as partículas QIAEX II em suspensão. *Para fragmentos maiores que 10kB, não vortexar! *A solução deve ficar amarela. Caso não fique, corrigir pH com acetato de sódio 3M (ph 5,0)
- Centrifugar: 30s, 17900g (13000rpm)
- Remover sobrenadante gentilmente com uma pipeta
- Lavagem: adicionar 500 μ L de QX1 e ressuspender pellet
- Centrifugar: 30s, 17900g (13000rpm)
- Remover sobrenadante gentilmente com uma pipeta
- Lavagem: adicionar 500 μ L de tampão PE e ressuspender pellet
- Centrifugar: 30s, 17900g (13000rpm)
- Remover sobrenadante gentilmente com uma pipeta
- Repetir etapa de lavagem com tampão PE
- Deixar secar em temperatura ambiente por 10-15min, ou até o pellet ficar branco
- Eluição: adicionar 20 μ L de TE e ressuspender pellet
- Incubar por 5min a temperatura ambiente
- Centrifugar: 30s, 17900g (13000rpm)
- Transferir sobrenadante para tubo limpo e armazenar -20°C

d) Clonagem em vetor de clonagem

A clonagem corresponde ao passo na qual a sequência obtida por PCR é inserida em um vetor de clonagem, e esta construção deve ser transformada em bactéria competente. A partir daí, outras decisões podem ser tomadas: a sequência pode ser estocada, sequenciada ou ainda recuperada para construção do vetor de expressão.

Os vetores de clonagem são plasmídeos caracterizados por possuírem uma origem de replicação (ORI) e um gene de resistência a antibiótico, para seleção dos clones positivos. Quando inseridos no organismo hospedeiro, normalmente cepas de bactérias da espécie *E. coli*, a ORI é reconhecida e o plasmídeo é replicado, de forma independente DNA genômico da bactéria. Com a expansão clonal das colônias de bactérias, os plasmídeos são também replicados. As células cultivadas são então recuperadas e o DNA plasmidial, contendo seu fragmento, é extraído.

A clonagem implica portanto em três passos: 1 - ligação do fragmento amplificado ao vetor de clonagem; 2 - transformação em bactéria competente e cultivo e 3 - Extração de DNA plasmidial (miniprep).

Os vetores de clonagem comercialmente disponíveis apresentam-se como vetores linearizados que apresentam em suas extremidades uma base de timina (T) não pareada. Essa estratégia é utilizada para ligação do inserto ao vetor. A sequência a ser inserida, obtida por PCR, apresenta em sua extremidade 5' uma base de Adenina (A) livre, inserida pela DNA polimerase durante a extensão da cadeia. Assim o pareamento entre vetor e inserto é facilitado. A ligação ocorre pela ação da enzima DNA ligase. Alguns vetores de clonagem comercialmente disponíveis são os

vetores pGem T® e pGem T Easy® da Promega® e TOPO TA® da Invitrogen®.

Para a reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem, é importante manter uma proporção inserto : vetor de 3:1. A quantidade de inserto deve ser maior que a de vetor, pois a probabilidade de o inserto se ligar é baixa. Mantendo uma proporção maior de inserto, as chances são aumentadas. Essa concentração pode ser avaliada qualitativamente em gel de agarose, no qual o volume que se deseja utilizar de inserto e de vetor, cerca de 3 a 6µL de inserto e 0,5 a 1µL de vetor, é aplicado em gel e avaliado a intensidade das bandas obtidas. A intensidade indica a quantidade de material genético presente no volume aplicado, e a partir daí pode-se tomar a decisão de qual volume utilizar na reação. À reação deve ainda ser adicionado a DNA ligase, o tampão específico da enzima fornecido junto com o kit e água estéril. A reação deve ser conduzida em temperatura específica, de acordo com instruções do kit a ser utilizado.

O material obtido nessa ligação deve ser transformado em bactérias competentes, que serão cultivadas em meio contendo antibiótico. O vetor apresentam em sua estrutura um marcador de seleção, normalmente resistência a determinados antibióticos, como ampicilina. Quando a bactéria incorpora o vetor, ela passa a ser resistente a esse antibiótico, sendo capaz de crescer mesmo em sua presença. Dessa forma é possível selecionar as colônias de bactérias que incorporaram o vetor. Muitos vetores apresentam ainda artifícios para selecionar colônias as quais o vetor incorporou o inserto. A região na qual o inserto deve ser ligar fica dentro do gene da β-galactosidase (lac-Z), que confere à bactéria a capacidade de metabolizar alguns carboidratos. Se o vetor se religa sem o inserto, o gene é reestruturado e fica intacto, a bactéria será capaz

de metabolizar o carboidrato e conferindo fenótipo azul; se o inserto se liga ao vetor, o gene é interrompido e portanto não é expresso, a bactéria não será capaz de metabolizar o carboidrato e expressará o fenótipo branco. Dessa forma, somente colônias brancas devem ser selecionadas, pois as chances de que o inserto de interesse tenha se ligado aos vetores nelas presentes é maior.

PROTOCOLO 5. Transformação de bactérias competentes por choque térmico

*Todos os procedimentos devem ser realizados em fluxo e com os materiais em gelo

1. Descongelar tubo com alíquota de bactérias competentes em gelo
2. Adicionar cuidadosamente 3 a 7 μ L do material da ligação ao tubo. **NÃO** agitar ou pipetar para cima e para baixo!
**para plasmídeo ou vetor fechado, usar 0,5 μ L*
3. Deixar o tubo no gelo por 30min.
4. Colocar o tubo em banho-maria a 42°C por 45 segundos
5. Retirar do banho e colocar imediatamente em gelo, por 2 min
6. Adicionar cuidadosamente 250 μ L de meio SOC previamente aquecido a 37°C
7. Fechar bem o tubo e incubar horizontalmente em shaker a 37°C, por 1h, a uma rotação de 200-230rpm
8. Espalhar um volume de 25-100 μ L das bactérias transformadas em placas previamente preparadas, contendo meio NA-ágar, antibiótico e, se necessário, IPTG e x-Gal
9. Cultivar as placas invertidas em estufa a 37°C, overnight (16h)
10. Selecionar clones positivos

* O excedente de bactérias transformadas pode ser estocada a 4°C por 24h. Uma nova alíquota pode ser espalhada em nova placa no dia posterior

Após a seleção é necessária a confirmação da clonagem. Para isso, o material das colônias positivas selecionadas deve ser extraído. A extração de DNA plasmidial (miniprep) pode ser feita com base nos protocolos descritos por Sambrook & Russel em “*Molecular Cloning*”, ou com auxílio de Kits comerciais, que usam os mesmo princípios, mas agilizam e facilitam o trabalho. O Kit da QIAGEN “*QIAprep spin miniprep*” é o mais utilizado em nosso laboratório.

PROTOCOLO 6. Extração de DNA plasmidial – Miniprep

KIT: “QIAprep spin miniprep”, QIAGEN®

Prévio: Cultivar as colônias positivas selecionadas da transformação em 5mL de meio NA adicionado de antibiótico, em shaker a 37°C, rotação de 200-230rpm, overnight. Reservar 1mL da cultura para confecção de estoques

Obs: Todos os tampões são fornecidos pelo Kit
Todas as centrifugações são realizadas a 16000xg (cerca de 13000rpm) e temperatura ambiente

1. Centrifugar a cultura a 4000rpm por 20min
2. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 250µL de tampão P1. Homogeneizar e transferir para tubo de centrifuga (1,5mL)

3. Adicionar 250 μ L de tampão P2 e misturar por inversão, de 4 a 6 vezes, até que a solução fique homogênea. **NÃO** permitir que a reação ocorra por mais de 5min.! O kit vem com uma solução denominada “*Lyse Blue Reagent*”, que é adicionado ao tampão P2. Se esse for o caso, nesse passo, a solução ficará azul.
4. Adicionar 350 μ L de tampão N3 e misturar por inversão, de 3 a 6 vezes. Se estiver usando o *Lyse blue reagent*, a solução ficará clara
5. Centrifugar por 10min.
6. Coletar o sobrenadante, com cuidado para que os restos celulares depositados no fundo não sejam pipetados
7. Depositar o sobrenadante na coluna, acondicionada em tubo limpo e centrifugar por 60seg. O DNA fica retido na coluna.
8. Descartar o líquido e adicionar, à mesma coluna, 750 μ L de Tampão PE, para lavagem, e centrifugar por 60seg. O tampão retira o excesso de sais que restaram na coluna, mas não elui o DNA
**Tenha certeza de que o tampão PE foi adicionado de etanol previamente a essa etapa!*
9. Descartar o líquido e acomodar a coluna em tubo limpo. Adicionar Ao centro da coluna 50 μ L de tampão EB. Incubar por 1min e centrifugar por 60seg. O tampão EB eluí o DNA que ficou na coluna.
10. Armazenar o DNA obtido em freezer a -20°C

A confirmação pode ser feita de duas formas: PCR e restrição enzimática. A PCR deve utilizar os pares de *primers* desenhados para aquela sequência específica e deve ser conduzida nas mesmas condições otimizadas utilizadas para amplificação da sequência, porém utilizando como DNA-molde o DNA plasmidial obtido a partir das colônias selecionadas. O produto analisado por

eletroforese deve produzir uma banda com o tamanho do fragmento clonado.

Para a restrição enzimática, devem ser utilizadas as enzimas cujos sítios de restrição foram desenhados nos *primers* usados na amplificação. A reação e temperatura devem ser feitas de acordo com cada enzima. Após a restrição, o produto deve ser analisado por eletroforese, a qual deverá apresentar duas bandas, sendo uma do tamanho do vetor e outra do tamanho do inserto.

PROTOCOLO 7. Restrição enzimática

	Volume
Enzima *	1 μ L (10u)
Tampão 10X	5 μ L
BSA(10mg/mL) * *	0,5 μ L
DNA	1-2 μ g
Água milli-Q estéril	q.s.p 50 μ L

**Adicionar por último*

***Se necessário*

- Verificar o tampão específico de cada enzima e a necessidade de adição de BSA à reação.
- Submeter a reação à restrição por 4h, em temperatura de ação de cada enzima. Inativar por 15min.
- Para reações de dupla digestão, adicionar 1 μ L de cada enzima.

*Para digestão de diversas amostras utilizando a mesma enzima, é necessária a preparação de um “mix”, que contenha todos os reagentes EXCETO o DNA. O mix deve ser calculado com base na quantidade de amostras e com um excedente de

10% de cada reagente. O volume necessário é distribuído nos tubos e, então, o DNA para digestão é adicionado individualmente a cada tubo. Toda a preparação deve ser conduzida em gelo.

III. SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

a) Preparo de inserto e vetor de expressão para clonagem

A subclonagem consiste na retirada do inserto do vetor de clonagem e ligação no vetor de expressão escolhido. Para recuperação do inserto para ligação é realizada reação de restrição enzimática a partir do vetor de clonagem confirmado. Para isso, uma quantidade maior de DNA é submetido à restrição, e todo o volume é aplicado em gel de agarose, que realizará a separação do inserto digerido e do vetor. A banda correspondente ao tamanho esperado para o inserto é recortada do gel e purificada com a utilização de kit específico, e pode ser então ligada ao vetor de clonagem. Os protocolos envolvidos nesses procedimentos foram explicados acima (protocolos 7 e 4).

Os vetores de expressão normalmente apresentam-se fechados. Para que a ligação do inserto possa ser feita, o primeiro passo é linearizar o vetor de expressão. A linearização é realizada por restrição enzimática, utilizando a enzima ou enzimas já selecionadas na etapa de planejamento. A restrição deve ser capaz de abrir o vetor no ponto necessário para a ligação e de deixar a extremidade coesiva necessária para ligação do inserto. Assim as enzimas utilizadas na restrição do fragmento devem ser compatíveis com as enzimas utilizadas na restrição do vetor. É importante usar duas enzimas diferentes que apresentem sítios de restrição subsequentes no vetor, linearizando esse sem perder fragmentos mas deixando duas extremidades diferentes. Essa ação tem a finalidade de dificultar a re-ligação espontânea do vetor.

Ainda que o vetor tenha sido linearizado com enzimas diferentes, a probabilidade de religação ainda é alta, pois o vetor apresenta em sua extremidade 3' um grupamento fosfato que pode

fornecer a energia necessária para a ligação, favorecendo a religação do vetor vazio. Portanto, no preparo do vetor é necessário realizar a reação de defosforilação, para retirada desse fosfato. Essa reação é realizada por Fosfatases, enzimas capazes de catalisar a retirada do grupamento fosfato. Duas fosfatases comercialmente disponíveis são a enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) e a CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase). A inativação da enzima é importante, pois se não for feita corretamente, a enzima continuará ativa no momento da ligação, defosforilando o fosfato presente no inserto e dificultado a ligação.

PROTOCOLO 8 . Defosforilação

A defosforilação com a enzima SAP pode ser realizada de duas maneiras: Com a enzima agindo diretamente no tampão usado na restrição, ou após purificação do vetor do gel.

Direto na reação de restrição:

- Após conclusão da reação de restrição do vetor, adicionar 1 μ L de enzima SAP à 50 μ L de reação de restrição
- Incubar a 37°C por 1h
- Inativar a 75°C por 15min

Após purificação:

- Adicionar 30 μ L do vetor linearizado purificado
- Adicionar 1 μ L de enzima SAP
- Adicionar 4 μ L de tampão específico da enzima
- Incubar a 37°C por 1h
- Inativar a 75°C por 15min

b) Ligação

Com vetor e inserto preparados, a ligação pode ser feita. Todo o planejamento da construção tem por objetivo facilitar essa etapa. Se não foi bem executado, a ligação do inserto ao vetor de expressão não será possível. Se a construção foi bem planejada, nessa etapa já devemos ter o vetor e inserto digeridos com as mesmas enzimas, de forma que a extremidade deixada no vetor seja compatível com a deixada no inserto, facilitando a ligação. Caso contrário, a ligação torna-se praticamente impossível. As chances do vetor se religar sem o inserto são grandes e a probabilidade de um vetor incorporar o inserto será baixa. O trabalho deverá ser feito várias vezes para obtenção de sucesso, que nem sempre será possível.

Mesmo com tudo certo, planejado, e com vetor e inserto digeridos, a eficiência de ligação é baixa. Nessa etapa, é importante manter uma proporção inserto:vetor de 6:1 até 10:1. A proporção deve ser avaliada qualitativamente com antecedência por observação de intensidade de banda em gel de agarose. O mesmo volume, cerca de 3 μ L, de vetor e inserto devem ser aplicados em gel e comparado sua intensidade. Baseado nisso, o volume de cada componente da reação pode ser estabelecido.

Para catalisar a reação de ligação, a enzima T4 DNA ligase se faz necessária. Assim, à reação são adicionados: vetor e inserto em proporção previamente estipulada, enzima, tampão específico da enzima fornecido com o kit e água estéril. A temperatura e tempo de incubação devem variar de acordo com a enzima utilizada, de acordo com instruções fornecidas por cada fabricante. Alguns fabricantes sugerem que uma reação de ligação de 30min a 1h seja suficiente para adquirir uma quantidade satisfatória de colônias; outros sugerem ligações overnight.

PROTOCOLO 9. Ligação

	Volume
Vetor	1 μ L *
Inserto	3 μ L *
Tampão 10X	2 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L
Água milli-Q estéril	q.s.p 20 μ L

**Volume a depender da concentração aparente analisada em gel de agarose*

- Adicionar todos os reagentes a um tubo limpo
- Incubar em termociclador a 16°C (ou temperatura instruída pelo fabricante), overnight

A reação de ligação deve ser transformada em bactéria competente (vide protocolo 5), a qual deve ser plaqueada e cultivada em meio com marcador de seleção. Cada vetor de expressão apresentará marcadores de seleção, para selecionar as bactérias que o incorporaram. Normalmente correspondem à marcadores de resistência a antibióticos, como a ampicilina. Assim, as bactérias que incorporarem os vetores serão resistentes, sendo capazes de crescer em meio mesmo na presença do antibiótico. As colônias positivas devem ser selecionadas para posteriores análises e confirmação.

IV. ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES

a) Análise por restrição

A análise por restrição é uma análise em nível macroscópico: ela permite definir quais clones incorporaram a sequência e inferir quais estão com a construção desejada, porém não é possível definir se a sequência clonada corresponde à pretendida, o que pode ser confirmado somente no sequenciamento.

Para a análise de restrição, é importante ter em mente todo o processo realizado para escolha de enzimas viáveis. As enzimas usadas para a clonagem podem ser utilizadas. Elas devem digerir o fragmento, retirando-o do vetor e permitindo a verificação de sua incorporação. A digestão deve resultar em dois fragmentos: um referente ao tamanho do vetor e outro ao tamanho do fragmento.

Se para a clonagem foram usadas enzimas diferentes (ex: XhoI para o inserto e SalI para o vetor), durante a ligação o sítio de restrição é perdido. Portanto é necessária uma nova análise de restrição, agora do vetor + fragmento formado, para determinação de novas enzimas. Nesse caso, é importante selecionar enzimas que apresentem dois sítios, sendo um dentro da sequência ligada e outro no vetor. Se a sequência foi ligada corretamente, a restrição deve apresentar dois fragmentos. Caso a sequência não foi incorporada, a restrição apresentará apenas um fragmento, referente ao vetor aberto. Caso não exista uma única enzima com esse padrão de corte, pode-se realizar a escolha de duas enzimas compatíveis, ou uma enzima com três sítios de restrição. É importante não escolher enzimas com mais de três sítios, pois nesse caso os fragmentos formados terão tamanho muitos pequenos e variáveis e será mais difícil realizar inferências.

Essa estratégia de utilizar enzimas com corte no fragmento e no vetor pode ser utilizada também para checar a orientação do fragmento ligado. A análise de restrição deve evidenciar o padrão de fragmentos formados caso a ligação ocorra em sentido correto. O padrão de restrição caso o sentido de ligação for contrário deve ser ligeiramente diferente.

b) Sequenciamento

O sequenciamento permite a confirmação final da construção. Ele pode ser feito também durante a fase de clonagem, para verificação do fragmento clonado. No sequenciamento, é necessário definir os limites do fragmento que deseja-se sequenciar, para escolha de *primers* apropriados. O sequenciamento do vetor completo é um trabalho mais complexo, portanto deve-se definir uma sequência de cerca de 500 pb que possa confirmar a construção (ex: fragmento que mostre a região de ligação do inserto e vetor). Os *primers* devem localizar-se cerca de 50 pb antes e depois da região a ser sequenciada, pois as primeiras e últimas bases do sequenciamento não apresentam boa qualidade.

É importante sempre realizar as reações de sequenciamento em replicadas (duplicata ou triplicata), visto que cada sequenciamento pode errar ou não sequenciar algumas bases e cada reação apresenta bases não sequenciadas que são preenchidas pelas replicatas. O alinhamento das replicatas dará uma sequência mais provável para seu fragmento. O sequenciamento em replicata aumenta também a confiança das bases sequenciadas.

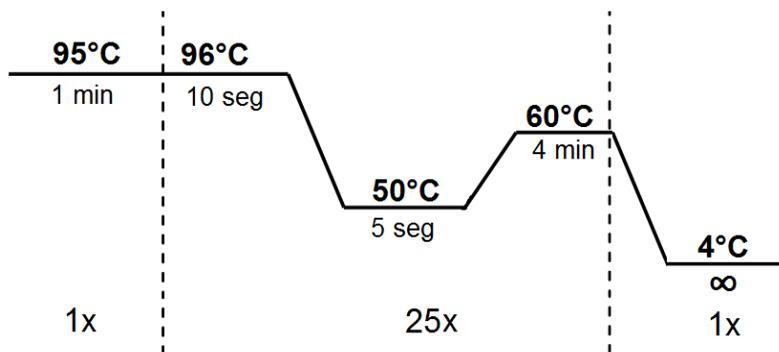
A reação de sequenciamento é feita em duas etapas: 1-PCR normal: utiliza como amostra o vetor a ser sequenciado e um par de *primers* que limite a região a ser sequenciada; 2-PCR para sequenciamento: utiliza como molde o material da 1ª PCR e,

SEPARADAMENTE, o *primers sense* OU *antisense* e kit específico que contenham ddNTPs (dideoxinucleotídeos), como o kit BigDye®.

PROTOCOLO 10. Sequenciamento

	Volume
Big Dye Terminator	2µL
Tampão 5X	2µL
<i>Primer</i> (10µM)	0,3µL
DNA-molde	1µL (Max.: 100ng)
Água milli-Q estéril	q.s.p 10µL

Proceder a reação ao seguinte ciclo:



É importante observar algumas coisas para que a reação de sequenciamento ocorra de maneira satisfatória: concentração do *primer*, pureza e concentração da amostra, qualidade dos materiais utilizados. A purificação da 1ª PCR para a reação de sequenciamento ajuda a melhorar a qualidade do mesmo, pois

elimina restos de *primers* e reagente que podem atrapalhar o sequenciamento.

A reação sequenciada é precipitada e ressuspensa em tampão, para aplicação em aparelho de sequenciamento. Os eletroferogramas gerados devem ser alinhados para formação de *contig* através de programa de análise de sequenciamento. O programa *Chromaspro*, da *Technelysium*, é um programa gratuito e de fácil manipulação.

O resultado gerado deve ser analisado pelo usuário. Os programas de alinhamento de sequências *Clustalw* e **BLAST** podem ser usados para determinar se a sequência obtida no sequenciamento corresponde à pretendida.

c) Confeção de estoques

Uma vez confirmada, o vetor produzido deve ser estocado. O estoque-mãe é realizado em bactérias. O vetor construído e confirmado é transformado em bactérias competentes. Clones positivos são selecionados para expansão em meio líquido e estoque.

O estoque é realizado adicionando-se a mesma proporção de meio contendo as bactérias e glicerol 70% (ex: 150µL de meio e 150µL de glicerol). Os estoques devem ser imediatamente submetidos a congelamento em freezer à -80°C.

O glicerol permite um congelamento gradual das bactérias, sem a formação de cristais de água no interior de seu citoplasma, o que levaria a morte das mesmas. Quando necessário, um vial de estoque pode ser descongelado e colocado em cultura, para expansão das bactérias e extração do material. É importante que o vial retirado do estoque seja prontamente substituído, pela confecção de um novo estoque, para que o banco nunca acabe.

O estoque em bactéria é importante pois: 1) pode ser mantido por diversos anos, sem morte das bactérias ou degradação do DNA, 2) é um estoque renovável.

V. ANÁLISE FUNCIONAL

O vetor de expressão lentiviral produzido e confirmado deve ser analisado quanto sua capacidade de expressar a construção clonada. Para tanto, ele deve ser inserido na célula-alvo e a expressão deve ser analisada. No caso de vetores lentivirais, a inserção pode ser feita de duas formas: por transfecção ou transdução.

A transfecção do vetor lentiviral é feita com auxílio de moléculas lipídicas, como a lipofectamina ou o PEI, que formam um complexo em torno do DNA, facilitando sua captação pela célula. A célula incorpora e ativa o vetor, porém esse não é integrado ao seu genoma e sua expressão é, portanto, passageira.

Na transdução, a inserção do vetor de expressão lentiviral é feita por um vírus. O vírus é produzido artificialmente pelo co-transfecção do vetor de expressão lentiviral e vetores acessórios em uma célula produtora, normalmente a Hek293T. Os vetores acessórios são responsáveis pela montagem das estruturas virais (capsídeo e envelope) e o vetor de expressão lentiviral que foi produzido será captado pelo vírus. Os vírus produzidos são recuperados e submetidos à cultura de células-alvo. Nesse processo, o vírus insere o vetor de expressão lentiviral na célula e media sua integração ao DNA genômico da célula. A expressão do vetor nesse processo é duradoura.

Os protocolos de transfecção e transdução são muito complexos e envolvem um grande conhecimento de cultura celular e produção/quantificação de vírus (título viral). Ao chegar nessa etapa, seu estudo deve ser aprofundado, usando outros materiais para apoio.

A análise da expressão pode ser feita pela quantificação de proteína produzida pelo gene repórter (ex: GFP), caso o vetor possua a transcrição do gene e do gene repórter sob controle do mesmo promotor, ou pela quantificação de proteína produzida, caso a proteína seja secretada pela célula.

A quantificação de células GFP positivas indica que o promotor está ativo e guiando a expressão desse gene, e portanto, também estará guiando a expressão do gene desejado. Ela pode ser feita por análise das células em citometria de fluxo. As células cultivadas e transfectadas/transduzidas devem ser coletadas e passadas pelo aparelho, que detectará a quantidade de células que expressam o GFP e o nível de expressão. É essencial a existência de um controle negativo (células não transformadas, que não produzem GFP), para indicar o nível de expressão basal da célula.

A detecção de proteínas secretadas pode ser feita através de ensaio de ELISA. É necessário a coleta do meio no qual as células foram cultivadas para o ensaio. O ELISA detecta proteínas com base na sua ligação a anticorpos imobilizados e a consequente ativação de um substrato cromático. A quantidade de substrato ativado indica a concentração de proteínas na amostra, com base em uma curva-padrão para concentração das amostras. Por utilizar anticorpos, o teste de ELISA é altamente específico, sendo necessário um teste específico para cada tipo de proteína que deseja-se detectar.

A realização dos testes de análise funcional são essenciais para estabelecer a funcionalidade do vetor produzido. Com tudo confirmado, o vetor pode então ser usado para produção de proteínas heterólogas, expressão de genes em um tipo celular ou o objetivo a que se destina

