

Imersão no CNPEM - 3^o Semestre

Relatórios III e IV Imersão no CNPEM

Caio Eduardo Paltin de Souza

31/03 e 14/04

1 Sinopse (31/03)

No dia 31/03 foi nos apresentado a algumas técnicas de mutagêneses importantes para biologia molecular. Essas técnicas permitem a modificação de proteínas recombinantes para facilitar sua produção, purificação, identificação, separação e modificação de função, podendo ser usadas em diversas aplicações, incluindo pesquisa básica, biotecnologia e medicina. Por exemplo a QuickChange, Q5 mutagenesis e In Vivo Assembly, mutagêneses usadas cotidianamente nos laboratórios do LNBio.

2 Mutagêneses e Vetores

Em biologia, um vetor é qualquer agente, organismo ou objeto que pode ser usado para transportar, transmitir ou transferir material biológico de um lugar para outro. Existe um colossal número de técnicas usadas na manipulação de sequências de DNA e produção de proteínas recombinantes, as abordadas no dia foram QuickChange, Q5 mutagenesis e In Vivo Assembly, com ênfase exatamente neste último, pois era a mais utilizada na linha de pesquisa da DDX3X, com o objetivo de criar um grande número de cepas com tais níveis de complexidade. Nessa linha de pesquisa é utilizado o pET 28a(+) que é um dos vetores de expressão mais populares para a produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* (*E. coli*) e outras bactérias. Ele é amplamente usado em pesquisas, pois permite a expressão e purificação de grandes quantidades de proteínas recombinantes de interesse em um curto período. Além disso, o pET 28a(+) é compatível com uma variedade de outros vetores de clonagem e sistemas de expressão heteróloga(o ato de produzir proteínas recombinantes em um organismo hospedeiro diferente daquele em que a proteína é naturalmente encontrada), o que o torna uma ferramenta versátil para a manipulação de DNA em laboratório.

2.1 QuickChange

A técnica de QuickChange é uma técnica simples e rápida para a introdução de mutações pontuais em sequências de DNA. A eficiência de mutagênese é geralmente alta, e ela pode ser usada para produzir várias mutações simultaneamente. No entanto, a mutagênese pode levar à produção de produtos não desejados, como mutações em locais indesejados, e a técnica pode ser trabalhosa para a produção de mutações em sequências de DNA grandes ou múltiplas mutações.

2.2 Q5 Mutagenesis

A técnica de Q5 Mutagenesis permite a introdução precisa de mutações em uma sequência de DNA específica. É eficiente na produção de mutações pontuais e pode ser usada para a produção de mutações em sequências de DNA grandes e complexas. Entretanto, a mutagênese pode levar à produção de produtos não desejados, como mutações em locais indesejados, e a técnica pode ser trabalhosa, especialmente para a produção de mutações em sequências de DNA grandes.

2.3 In Vivo Assembly

A técnica de In Vivo Assembly é uma técnica relativamente simples. Ela evita a necessidade de clonagem em etapas separadas, permitindo a produção de construções genéticas grandes e complexas, mas pode ser difícil controlar a precisão da montagem, o que pode levar à produção de construções genéticas não desejadas, e pode haver baixas eficiências de montagem em alguns casos.

2.4 Conclusão Sobre as Técnicas

Vimos então que a escolha da técnica ideal dependerá do objetivo do experimento, da complexidade da sequência de DNA e das condições experimentais. Todas as técnicas têm suas próprias vantagens e desvantagens, e é importante considerá-las cuidadosamente antes de selecionar a técnica mais apropriada para o experimento em questão. O vetor utilizado para a fabricação da DDX3X é um plasmídeo, pequenas moléculas circulares de DNA que podem ser facilmente manipuladas e transferidas para células hospedeiras permitindo que sejam replicados independentemente do cromossomo da célula hospedeira, e genes de seleção, fazendo com que sejam selecionadas e cresçam em meios de cultura específicos. Os plasmídeos da DDX3X foram alterados com sítios de restrição para permitir a clonagem de fragmentos de DNA de interesse.

3 Sinopse (14/04)

No dia 14/04 observamos o final e o começo do processo de transformação de uma clonagem, a aplicação das bactérias Rosetta no pré-inóculo e inóculo, onde

nós fizemos o pré-inóculo em meio solido e colhemos um inoculo “over night”, realizando a extração dos paletes condidos nele logo em seguida.

4 Transformação e Coleta

A transformação é um processo em que o material genético é transferido de uma célula para outra. Especificamente, na transformação bacteriana, o DNA estranho é introduzido em uma bactéria e incorporado ao seu genoma. A transformação pode ser realizada por métodos naturais ou artificiais. Da transformação até a inoculação é um processo um pouco demorado, então fora nos deixando coletar as paletes de inóculos cultivados no inicio da semana, acabando por coletar tanto amostras de paletes selvagens e mutantes.

4.1 Método e IPTG

A bactéria utilizada foi a Rosetta, uma linhagem de *Escherichia coli* (*E. coli*) que foi geneticamente modificada para expressar uma série de proteínas auxiliares que melhoram a expressão e a solubilidade de proteínas heterólogas.

Para selecionar apenas as bactéria com o vetor de interesse é adicionado Kamissina e Clorofenicol, antibióticos para selecionar somente as bactérias com resistência, ou seja aquela com contem o esse vetor.

Após a inoculação for finalizada o IPTG é adicionado a colonia de bactéria. IPTG é um composto químico frequentemente usado em biologia molecular para induzir a expressão de genes em sistemas de expressão heteróloga, principalmente em bactérias como a *Escherichia coli* (*E. coli*). O IPTG é um análogo da lactose e pode ser utilizado para ativar o promotor do operon lac, que é um sistema de regulação genética presente em bactérias que controla a expressão de genes envolvidos no metabolismo da lactose. Portanto utilizamos o IPTG para varar bloqueadores e iniciar a produção de DDX3X, sendo após isso a coleta do palete para futuramente a purificação dela.