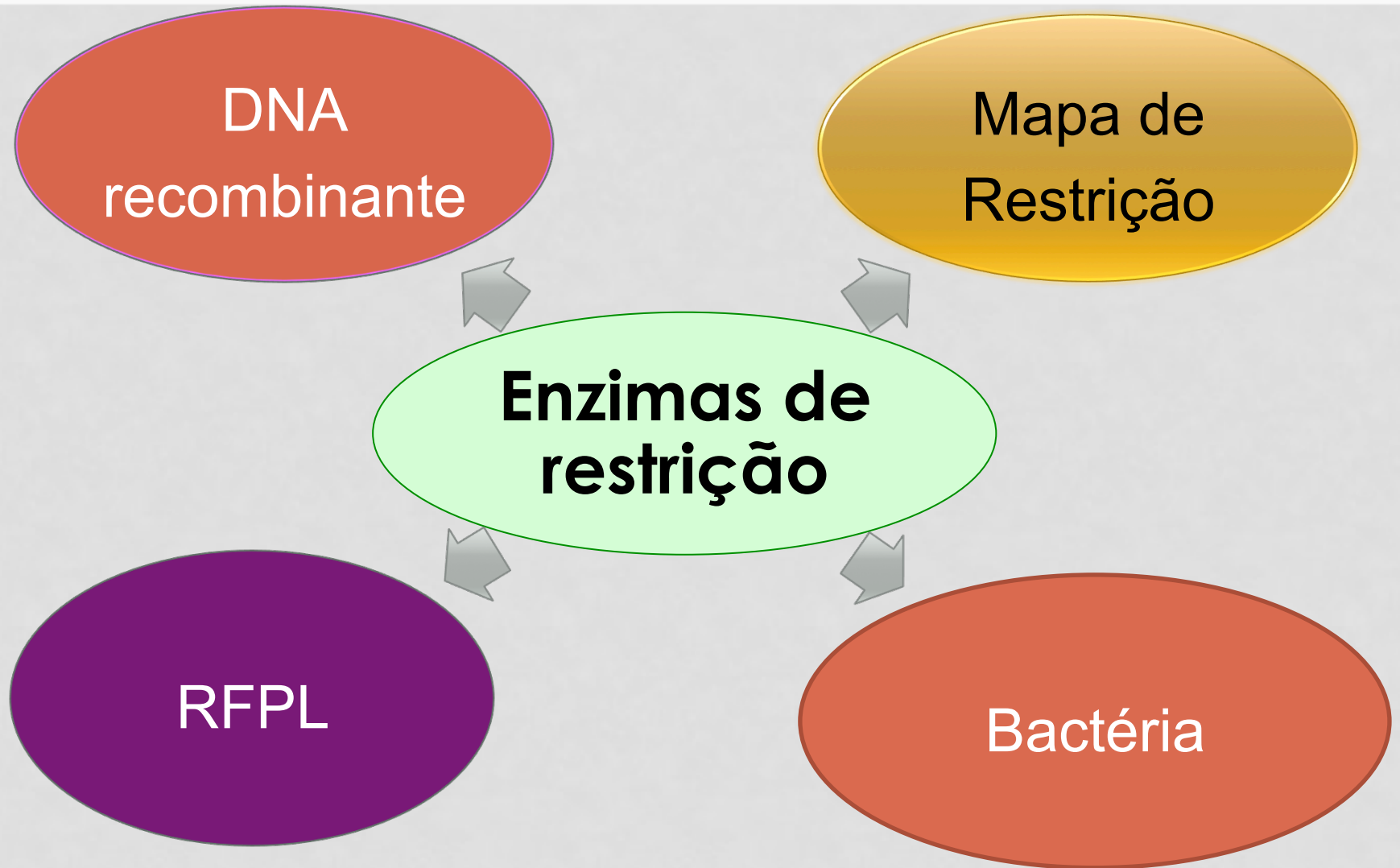


PRINCÍPIOS DE CLONAGEM GÊNICA

APARECIDA MARIA FONTES

17 de Março de 2017

CONCEITOS ASSOCIADAS COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO



DEFINIÇÕES

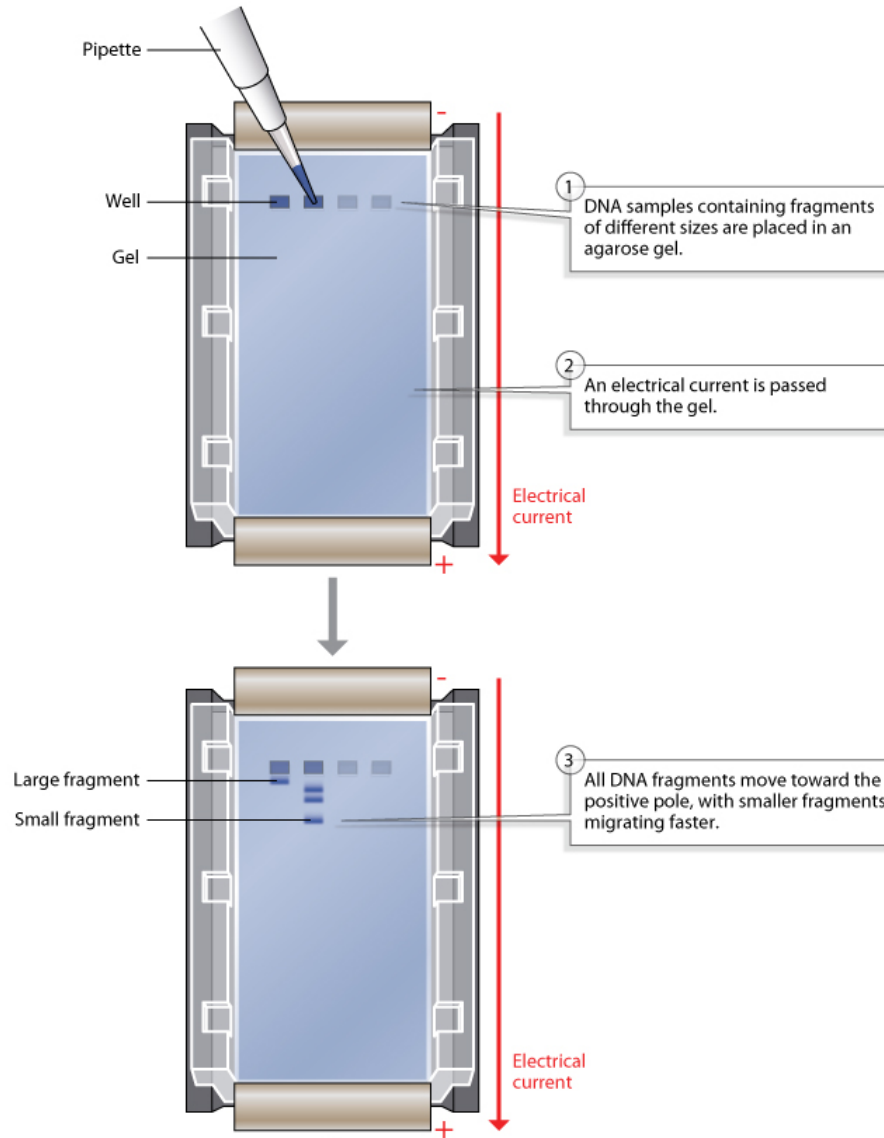
O Que é Enzima de restrição?

- ☐ É uma enzima que reconhece uma sequência de bases no DNA e corta o DNA fita dupla em uma sequência específica ou em um local próximo.

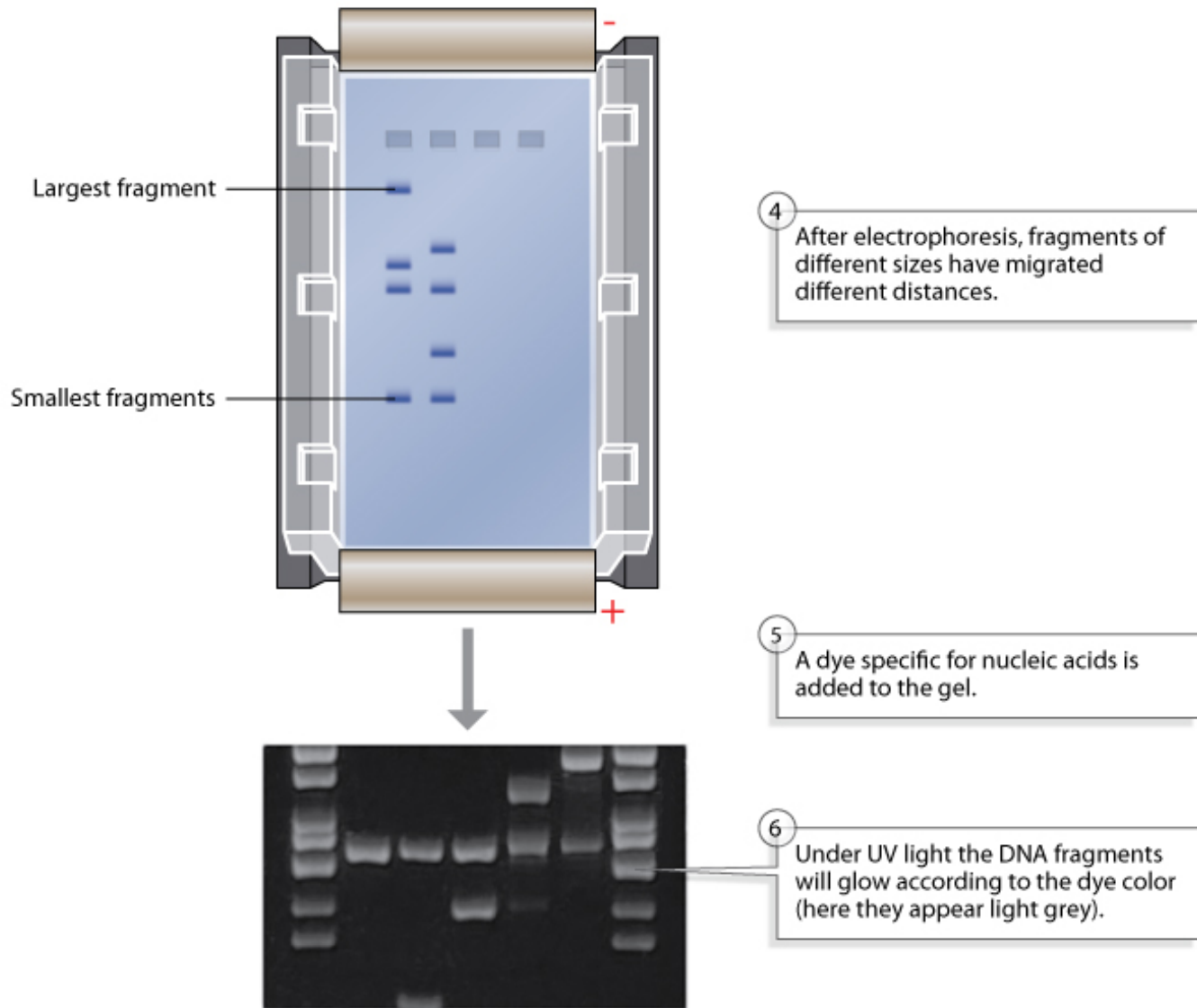
O Que é Mapa de Restrição?

- ☐ Método utilizado para mapear um segmento de DNA desconhecido, após a digestão em fragmentos e em seguida identificando os locais das quebras.

MAPA DE RESTRIÇÃO: ANÁLISE DO DNA DIGERIDO



MAPA DE RESTRIÇÃO: ANÁLISE DO DNA DIGERIDO



É possível prever o número de sítios de restrição em um determinado organismo?

Como realizar?

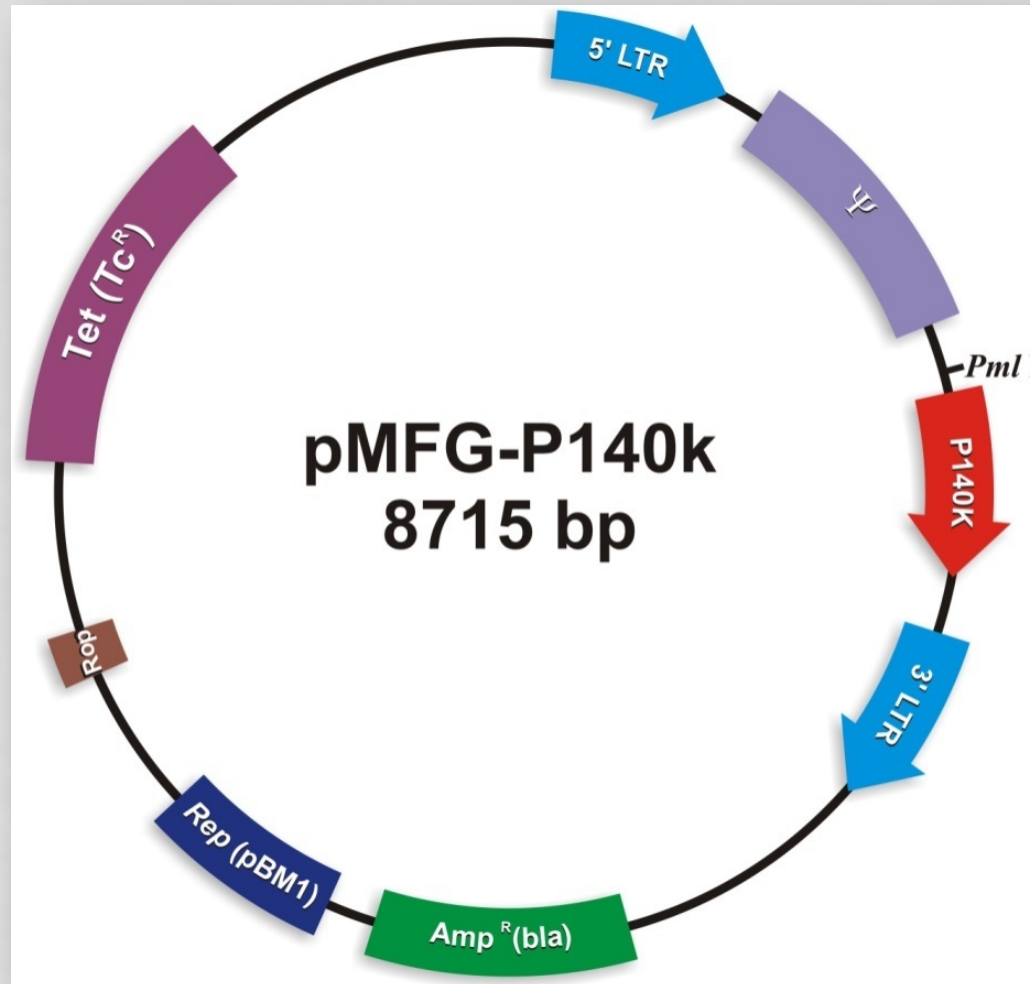
- ☐ Considerando o vetor retroviral pMFG-P140K apresenta 8715 bp, cuja frequência de CG é 52,1% e o sítio de restrição para EcoRI 5'- GAATTC – 3'.
- ☐ Qual o número esperado de sítios de restrição para *EcoRI* do vetor pMFG-P140K?.

É possível prever o número de sítios de restrição em um determinado organismo?

Como realizar?

- ❑ Determinar a porcentagem de A, T, C e G no vetor.
 - $C+G = 52\%$, logo $\%G = \%C = 52\%/2 = 26\%$.
 - $A+T = 100 - 52\% = 48\%$ e $\%A = \%T = 48\%/2 = 24\%$.
- ❑ Probabilidade de encontrar a sequência GAATTC = $0,26 \times 0,24 \times 0,24 \times 0,24 \times 0,24 \times 0,26 = 0.0002429706$
- ❑ O número médio de sítios GAATTC é 0.0002242806 multiplicado pelo tamanho do vetor = 1.95.

Isso é verdadeiro para o vetor pMFG-P140K?



Isso é verdadeiro para o vetor pMFG-P140K?

- ☐ Realizar no software Geneious.
- ☐ Realizar no Software Snap Gene.
- ☐ Realizar no site New England BioLabs: www.neb.com/tools-and-resources
- ☐ Local: TOOLS - NEBCutter

Quantos sítios *EcoRI* foram encontrados?

N=1 sítio *EcoRI*

DEFINIÇÕES

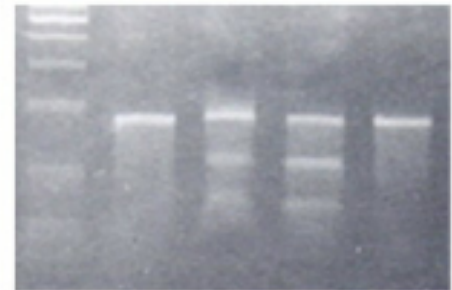
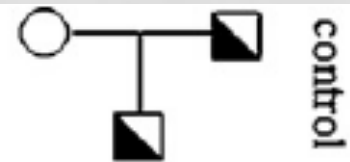
O Que é RFLP?

- ❑ Do inglês: **R**estriction **f**ragment **l**ength **p**olymorphisms são diferenças entre indivíduos no tamanho dos fragmentos de DNA clivados pela enzima de restrição.
- ❑ Se dois indivíduos tem diferenças em suas sequências, em um sítio de restrição específico, os tamanhos dos fragmentos de DNA resultantes serão diferentes.
- ❑ Também podem existir diferenças no número de fragmentos entre dois ou mais indivíduos.
- ❑ Pode ser utilizado como um teste genético para identificar se determinado indivíduo apresenta a mutação para determinada doença.

RFLP

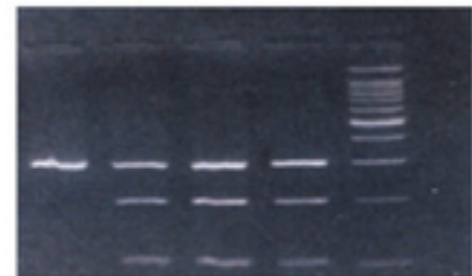
Wild type 3' **TCG CCG CTT ACG TAG**5'
Ser Gly Glu Cys Ile

Mutated 3' **TCG ACG CTT ACG TAG**5'
Ser Cys Glu Cys Ile



Wild type 5' **GAC CCC CAC ACG AAG**3'
Asp Pro His Thr Lys

Mutated 5' **GAC CCC CAC ATG AAG**3'
Asp Pro His Met Lys



ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Qual a função normal das enzimas de restrição?

Além da enzima de restrição, qual é outra enzima que a bactéria deve apresentar para proteger da clivagem de seu próprio DNA?

Qual a nomenclatura padrão das enzimas de restrição?

- ❑ As enzimas de restrição devem conter três letras e um algarismo romano:
 - A primeira letra maiúscula do gênero bacteriano
 - As outras duas letras minúsculas da espécie bacteriana
 - Número romano para distinguir as diferentes enzimas da mesma linhagem.

NOMENCLATURA DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

❑ Exemplo: **EcoRI** = E*scherichia* co*li*, linhagem RY13

- Denota a primeira enzima de restrição a ser relatada para a *Escherichia coli* RY13
- Reconhece a sequência 5'-GAATTC-3'

❑ Exemplo: **HindIII** = H*aemophilus* in*fluenza*, linhagem Rd

- Denota a terceira enzima de restrição a ser relatada para a *Haemophilus influenza*
- Reconhece a sequência 5'-AAGCTT-3'

TIPOS DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

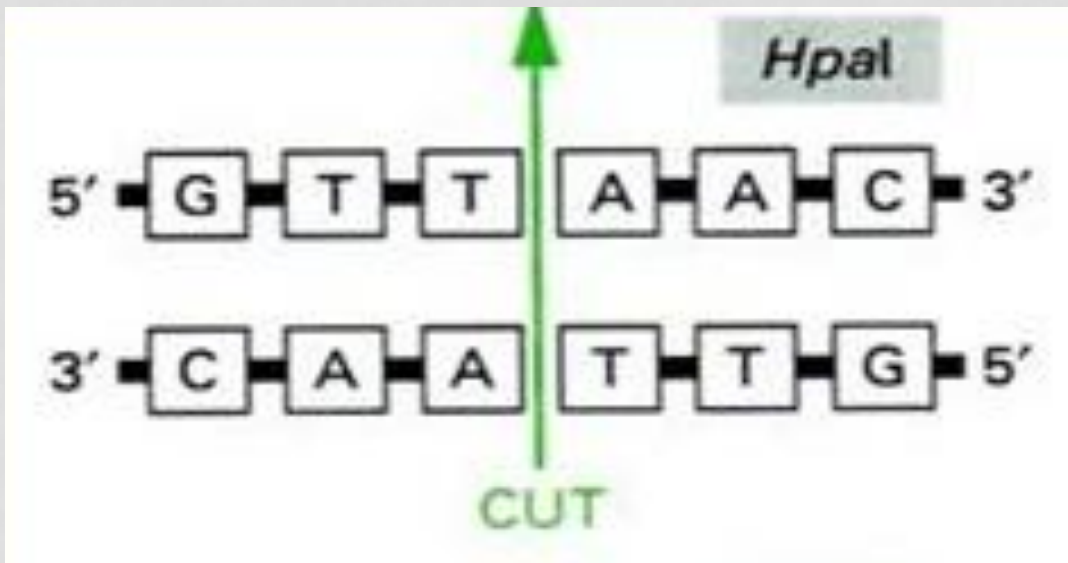
Quais os tipos de enzimas de restrição?

- ❑ **Tipo I** = Corta o DNA cerca de 1000 bp distantes do sítio de reconhecimento. Em geral são enzimas grandes com várias subunidades
- ❑ **Tipo II** = A sequência de reconhecimento possui 4 a 8 bp e cliva o DNA em posição definida. **É utilizada para clonagem gênica.**
- ❑ **Tipo III** = Corta o DNA cerca de 25 bp distantes do sítio de reconhecimento

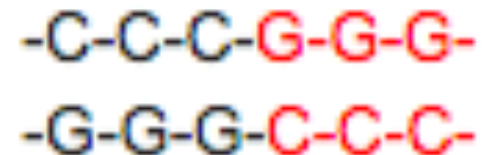
TIPOS DE CORTES DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO TIPO II

Quais os tipos de corte enzimas de restrição?

- ❑ **Produção de extremidades bruscas ou terminais cegos** = como o nome diz gera extremidades não coesivas.



SmaI

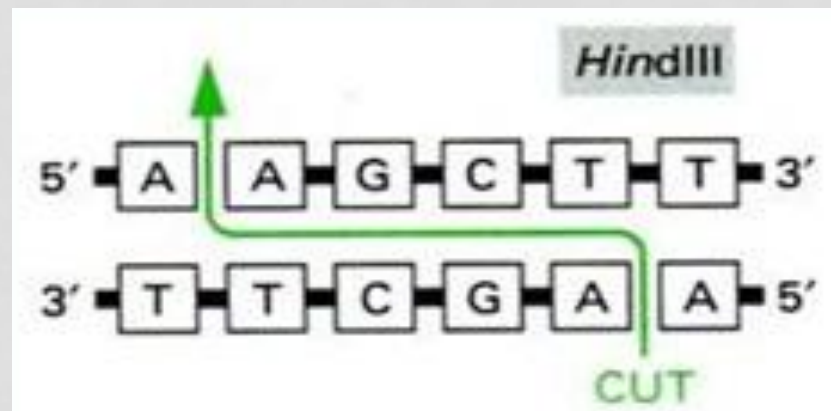
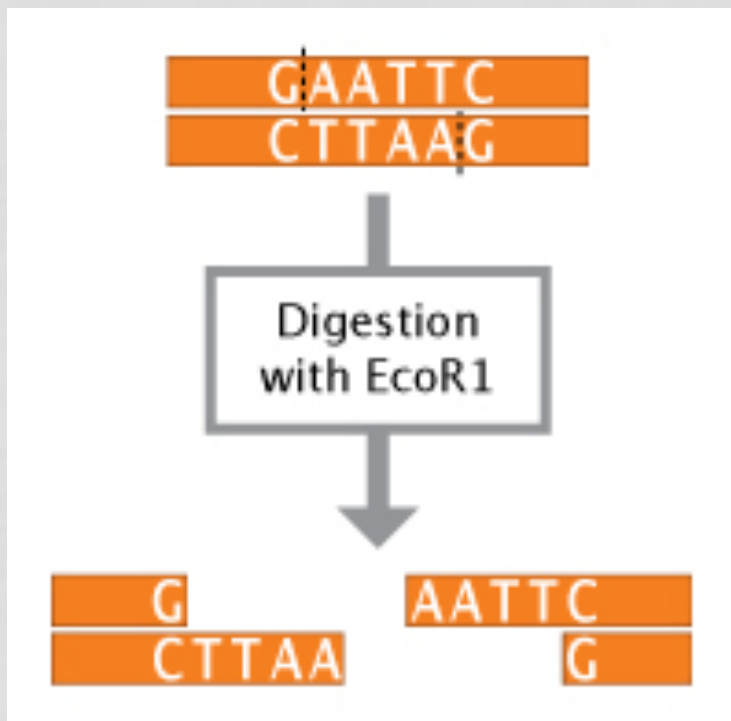


Serratia marcescens

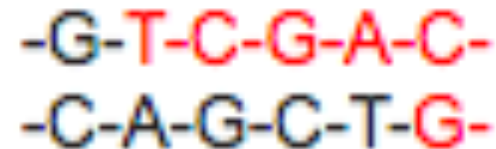
TIPOS DE CORTES DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO TIPO II

Quais os tipos de corte enzimas de restrição?

- ❑ **Produção de extremidades 5'** = gera extremidades coesivas



Sall

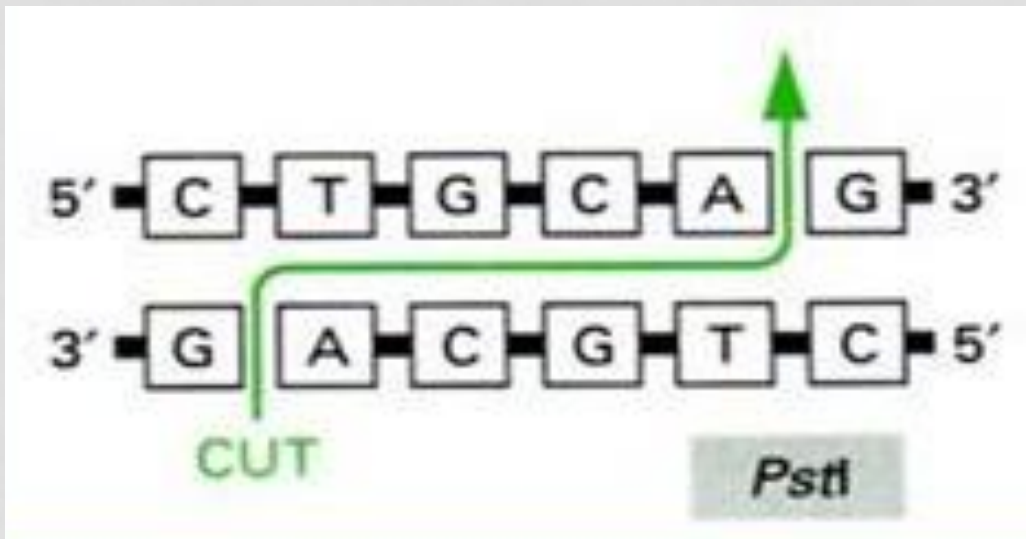


Streptomyces albue

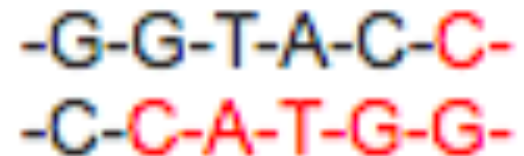
TIPOS DE CORTES DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO TIPO II

Quais os tipos de corte enzimas de restrição?

- ❑ **Produção de extremidades 3' = gera extremidades coesivas.**

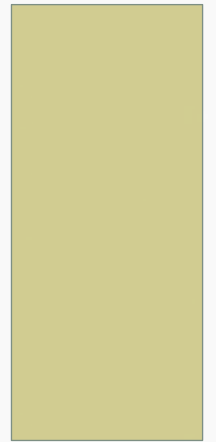


SmaI



Serratia marcescens

CLONAGEM GÊNICA



DEFINIÇÕES

O Que são vetores de DNA?

- ☐ Uma molécula de DNA utilizada como veículo para carregar um material genético exógeno em outra célula.

Quais os tipos de vetores?

☐ **Plasmídeos.**

☐ **Vetores Virais.**

☐ **Cosmídeos.**

☐ **Cromossomos artificiais.**

DEFINIÇÕES

Quais as principais características de um vetor?

- ☐ **Origem de Replicação**
- ☐ **Capacidade de se auto-replicar e produzir múltiplas cópias**
- ☐ **Marcadores de seleção em bactéria**
- ☐ **Sítio de restrição para clonagem**
- ☐ **Fácil isolar e purificar**

DEFINIÇÕES

Como os vetores podem ser classificados?

- ☐ **Vetor de Clonagem**
- ☐ **Sítio de Expressão**

Quais as principais diferenças entre eles?

Quais os exemplos mais conhecidos no dia a dia para clonagem gênica?

DEFINIÇÕES

❑ Vetor de Clonagem

✧ Molécula de DNA que apresenta elevada capacidade de transformação e a capacidade de clonar fragmentos exógenos de DNA (até 8 Kb).

✧ Aplicações: Construção de bibliotecas

Preparo de fragmentos de DNA

Exemplos: **pBR327**

pCR-TOPO

pUC18

pENTR

pGEM

DEFINIÇÕES

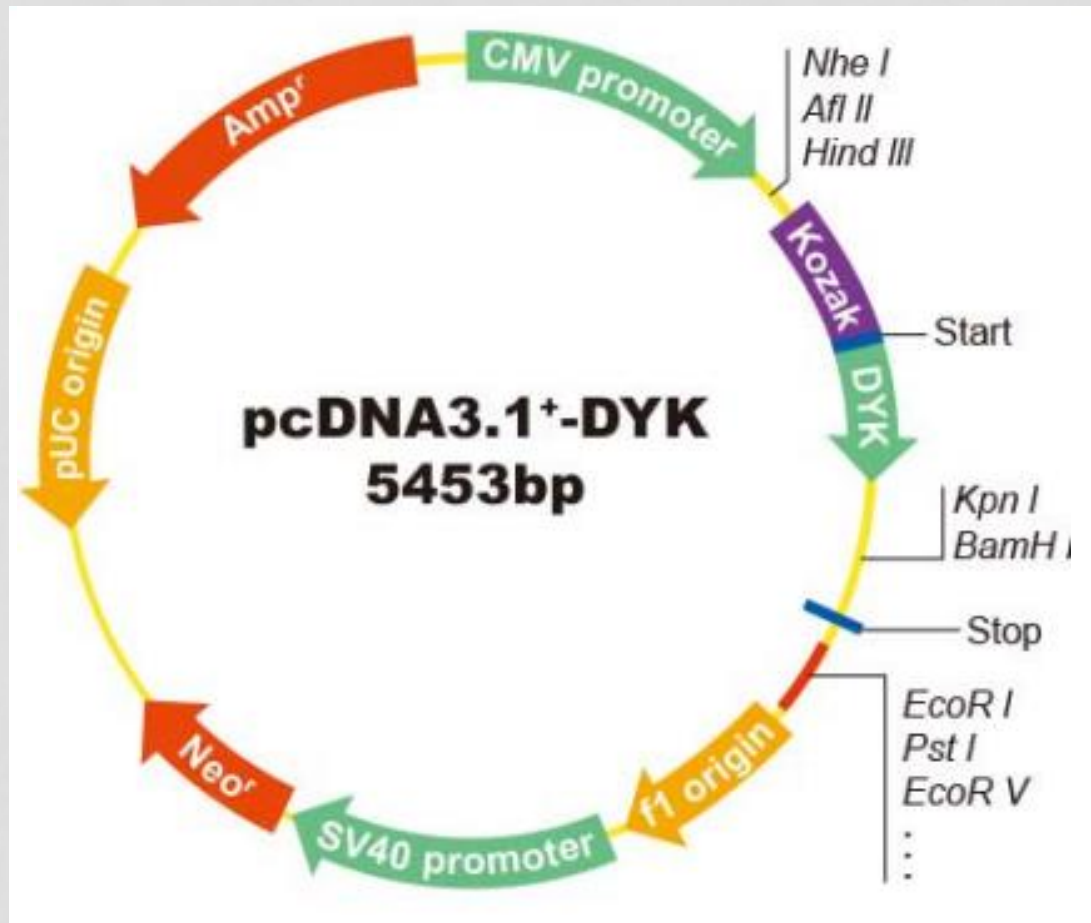
❑ Vetor de Expressão

- ✧ Molécula de DNA que permite a clonagem do gene de interesse e sua expressão na célula alvo.
- ✧ Exemplos: podem ser plasmídeos convencionais ou derivados de retrovirus (plasmídeos retrovirais); derivados de lentivirus (plasmídeos lentivirais).

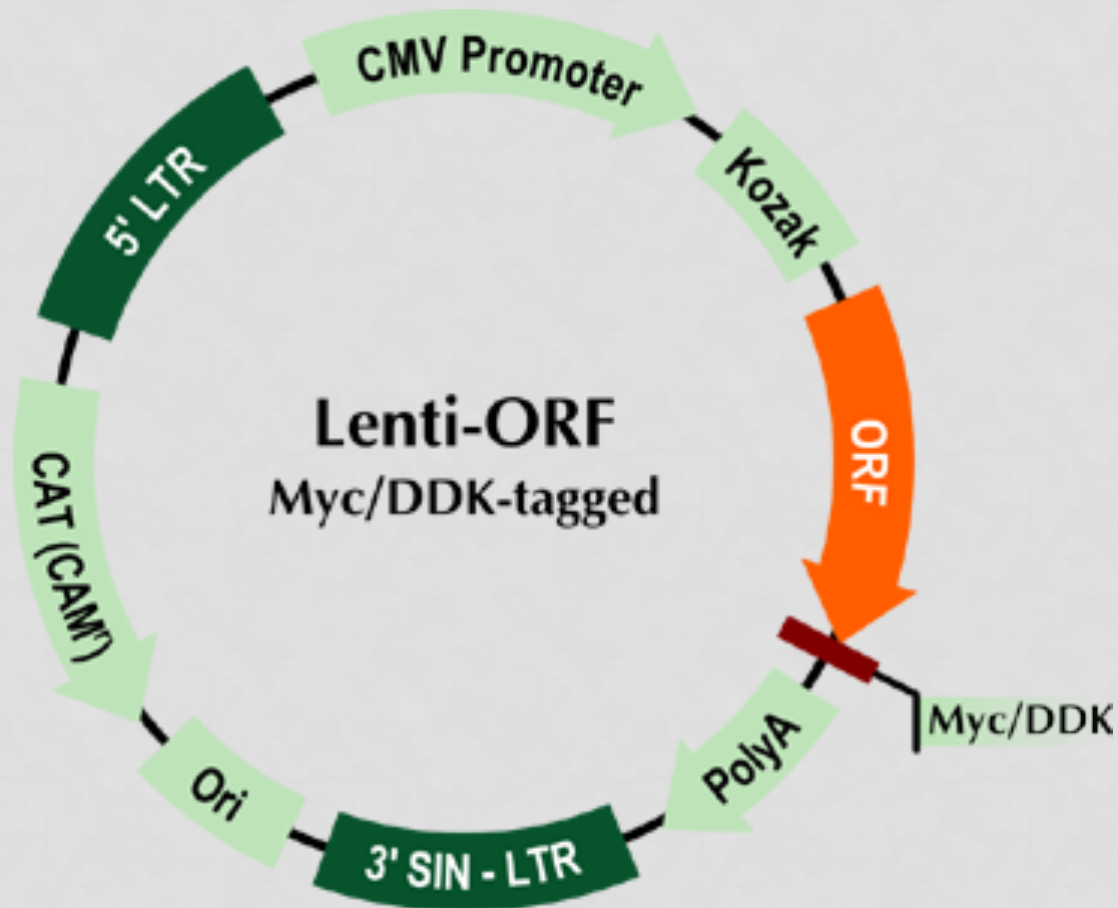
pcDNA3.1

pMX-GFP

VETOR DE EXPRESSÃO PLASMIDIAL TÍPICO



VETOR DE EXPRESSÃO LENTIVIRAL TÍPICO



SOFTWARES QUE AUXILIAM A CLONAGEM GÊNICA

- ◆ SnapGene
- ◆ APE (a plasmid editor)
- ◆ Vector NTI
- ◆ DNASTrider
- ◆ Geneious
- ◆ Serial Cloner
- ◆ VectorFriends
- ◆ pDRAW
- ◆ PlasMapper

Other tools:

- ◆ NEB cutter
- ◆ Addgene Analyze Sequence

MARCADORES PARA SELEÇÃO/ RASTREAMENTO

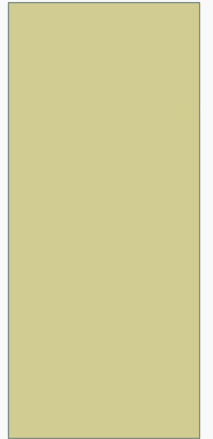
Host	Selection Markers
Prokaryotic cells	Ampicillin, Kanamycin, tetracycline, chloramphenicol
Mammalian cells	Neomycin; Puromycin; Hygromycin; Zeocin;
Yeast	HIS4, Zeocin Auxotrophy: URA3, TRP1, LEU2, HIS3
Host	Screening Markers
Prokaryotic cells	Lacz for Blue-white screening
Prokaryotic OR Eukaryotic cells	Fluorescent Proteins (GFP, mCherry) Luciferase

MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO GÊNICA

Host	Commonly used methods to introduce expression construct (plasmid)	
Prokaryotic cells	Transformation via	<ul style="list-style-type: none"> • CaCl_2 + heatshock • electroporation
Yeast cells	Transformation via	<ul style="list-style-type: none"> • LiAc/PEG/ssDNA • Electroporation • <i>spheroplasts, biolistics, glass beads</i>
Plant cells	Transformation via	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Agrobacterium</i>-mediated transformation • Gene gun
Mammalian cell lines	Transfection via	<ul style="list-style-type: none"> • Liposomes • Electroporation • <i>calcium phosphate, nanoparticles</i>
Mammalian (primary) cells	Transduction via	<ul style="list-style-type: none"> • lentivirus
<i>in vivo</i> delivery into live animals	Transduction via	<ul style="list-style-type: none"> • adenovirus • AAV

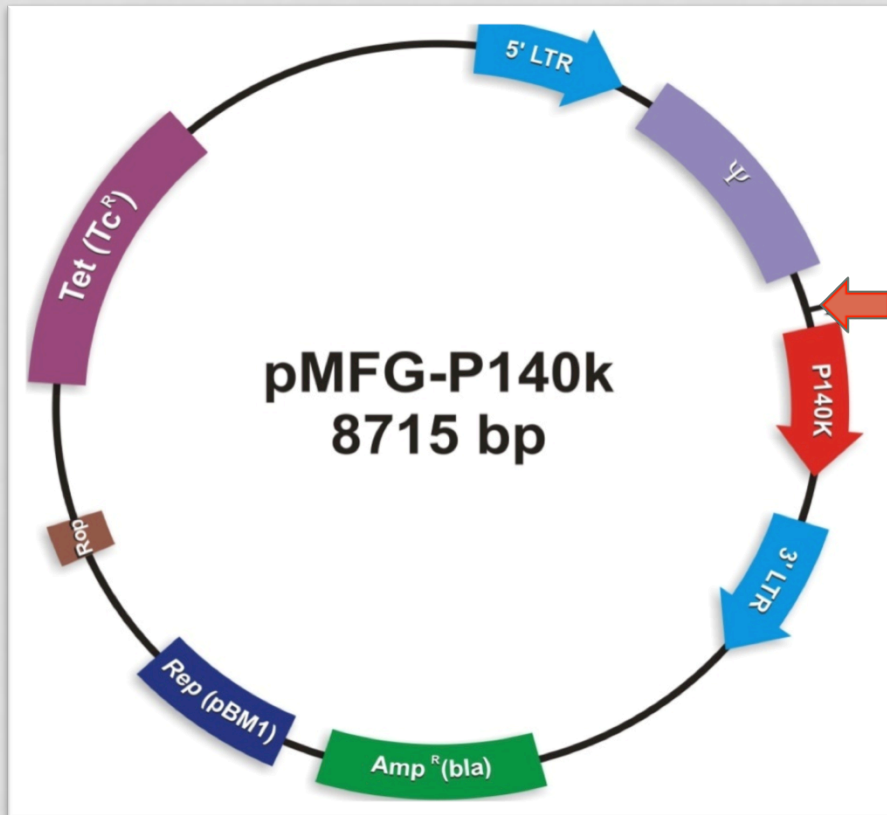
CLONAGEM DO GENE GFP

EXERCÍCIO



OBJETIVO

- ❑ Gerar um vetor retroviral bicistrônico portador do gene GFP a partir do vetor pMFG-P140K



- ❑ Por que esse vetor é denominado é retroviral de expressão e não plasmdial de expressão?

O que é vetor monocistrônico ou bicistrônico?

Como converter vetor monocitrônico em bicitrônico?

- ☐ **Uso do elemento IRES**

- ☐ **Uso do 2A peptides**

- ☐ **O que é elemento IRES?**

- ☐ **O que é fragmento 2A peptides?**

- ☐ **Qual a vantagem do uso dos mesmos?**

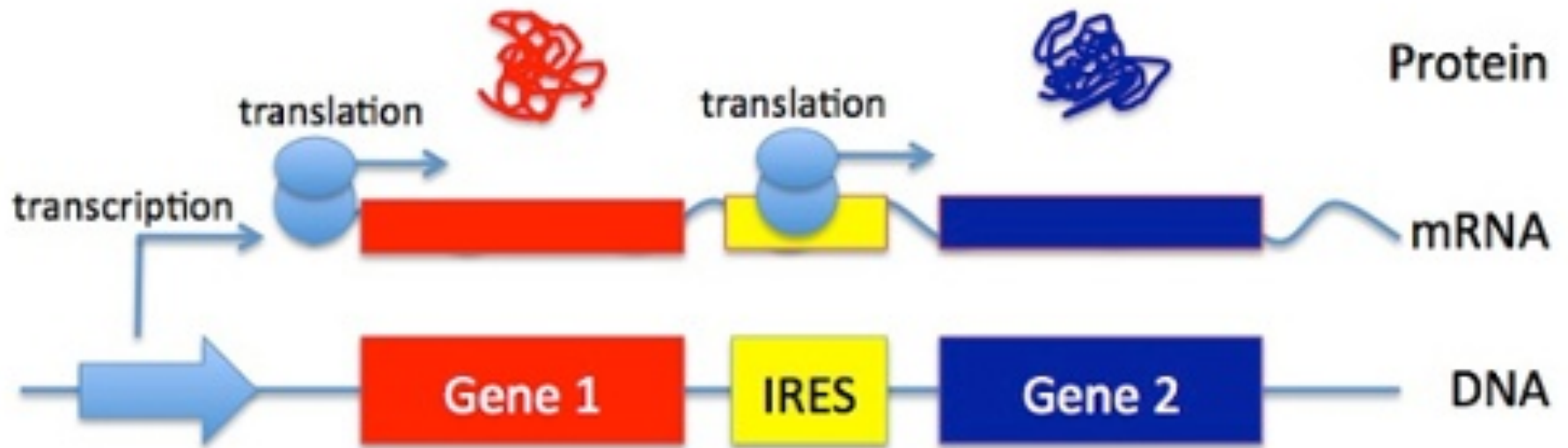
DEFINIÇÕES

O Que são elementos IRES?

- ❑ Do inglês: Internal Ribosome Entry Site – age como um sítio de recrutamento do ribossomo e portanto permite a co-expressão de duas proteínas a partir de um único RNA
- ❑ Originalmente descobertos no RNA de poliovirus que permite a tradução do genoma viral na célula eucariota.
- ❑ Sua principal desvantagem é o tamanho. São elementos grandes: entre 500 – 600 bp.
- ❑ Outra limitação: em geral permite a expressão eficiente de apenas 2 mRNAs.

DEFINIÇÕES

O Que são elementos IRES?



DEFINIÇÕES

O Que são as sequências 2A Peptides?

- ❑ Do inglês: “*Self-Cleaving*” **2A peptides** – age como um elemento hidrolase que age *in cis* e realiza a clivagem entre duas proteínas.
- ❑ Originalmente descobertos no RNA de picornavirus e permite a separação entre o término da sequência 2A e o próximo peptídeo downstream.
- ❑ Sua principal vantagem é o pequeno tamanho.
- ❑ Outra vantagem: em geral permite a expressão eficiente de apenas do que 2 mRNAs.
- ❑ A principal desvantagem é que a sequência peptídica 2A permanece ligada ao C-terminal da proteína “upstream”.

DEFINIÇÕES

O Que são as sequências 1A Peptides?

Peptide	Amino acid sequence*
T2A:	(GSG) EGRGSLLTCGDVEENPGP
P2A:	(GSG) ATNFSLLKQAGDVEENPGP
E2A:	(GSG) QCTNYALLKLAGDVESNPGP
F2A:	(GSG) VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

Sítio de
clivagem

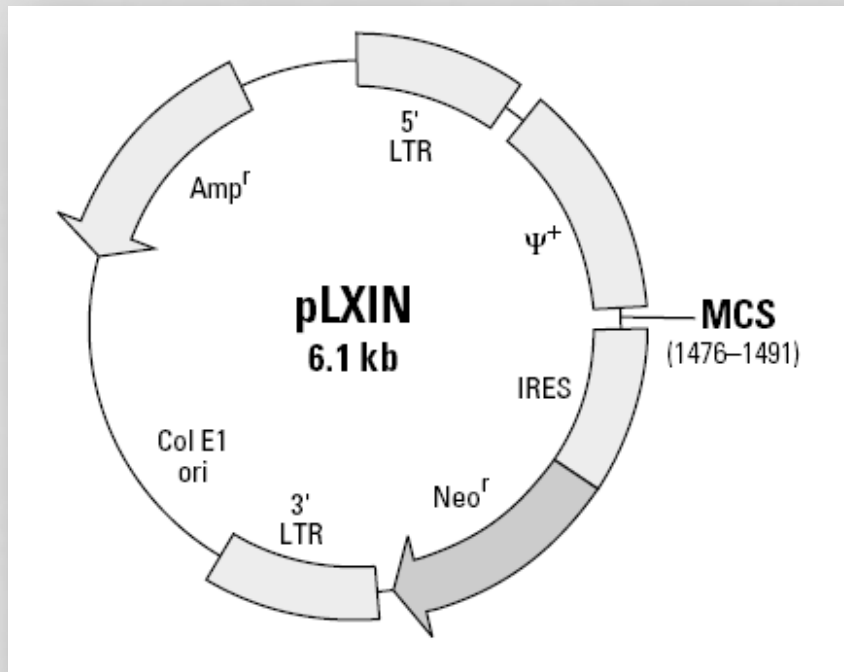


* (GSG) residues can be added to the 5' end of the peptide to improve cleavage efficiency.

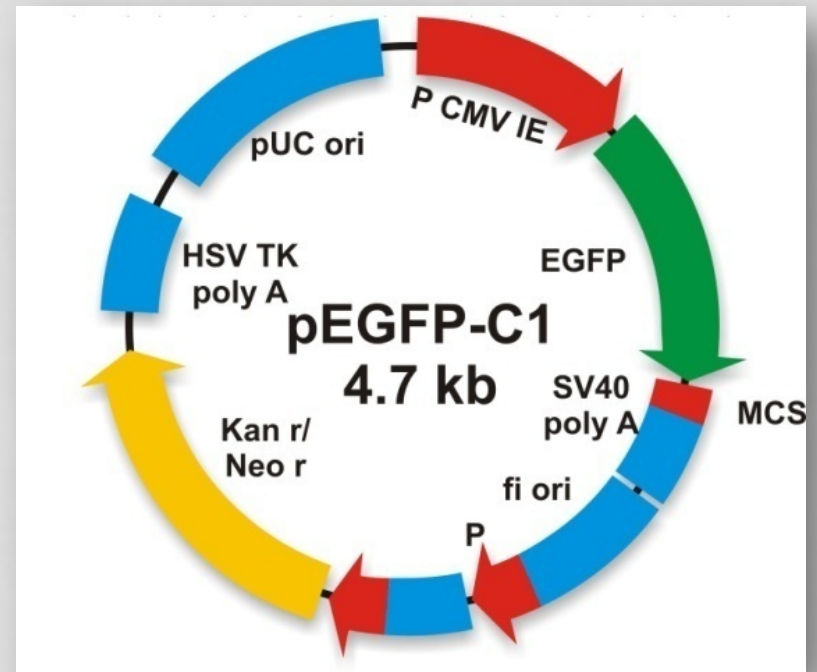
EXERCÍCIO: GERAR VETOR BICISTRÔNICO PORTADOR DE GFP

Quais os DNAs “templates”?

❑ pLXIN (Clontech)



❑ pEGFP-C1 (Clontech)



EXERCÍCIO: GERAR VETOR BICISTRÔNICO PORTADOR DE GFP

Qual é o Primeiro Passo?

- ☐ Verificar se após a geração do vetor retroviral bicistrônico com o gene de interesse, o tamanho resultante é compatível com a formação de partículas retrovirais estáveis.

Qual é o Tamanho Limite?

- ☐ Entre 10 e 15 kb.

EXERCÍCIO: GERAR VETOR BICISTRÔNICO PORTADOR DE GFP

Qual é o tamanho de nosso vetor final: pMFG-EGFP-IRES-P140K?

- ☐ Elemento IRES ~ 600 bp
- ☐ Gene GFP ~ 800 bp
- ☐ Vetor mMFP-P140K = 8715 bp



Vetor Final ?



Tamanho ~ 10.000 bp

EXERCÍCIO: GERAR VETOR BICISTRÔNICO PORTADOR DE GFP

Qual é o Segundo Passo?

- ☐ Conhecer o Mapa de Restrição do Vetor Retroviral.
- ☐ Estabelecer qual será o sítio de Clonagem.

Qual é o Terceiro Passo?

- ☐ Estabelecer a estratégia para clonagem de IRES.

Qual é o Quarto Passo?

- ☐ Estabelecer a estratégia para clonagem de GFP.

SEQUÊNCIA DO VETOR pMFG-P140K

TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAAGTAAAGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATA
ACTGAGAAATGAAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCT
GTGGTAAGCAGTTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAGAAACAGATGAGTGTCCAGATCGGGTCAGCCCTCAGCA
GTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTCCCAAGAGCTGAAGATGACCTGTGCTTGTGTAACATA
ACCAATCAGTTGCTTCTGCTTCTGTCGCGGCTTCTGCTCCCGAGCTCAATAAAAAAGGCCAACACCC
TCACTCGGCGGCGGACCTCTCCGATGATCAGTGAAGTCCGCGGAGTACCGGTGATTCACATAAAACCTCTTGCAAT
TGCACTGCACTGTGTTGGTCTGCTGTTGCTTGGAGGGTCTCCTCTGAGTGAATGACTACCCGTCAAGCGGGGT
CTTTCAITTTGGGGGCTGTGCGGAGTCGGAGAACCCCTGCCAGGGAACACGACCCACACCGGAGGTGAAG
CTGGCAGCAACATATCTGTGCTGTGCGGATGTGTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCTCGCTGTGGTAC
TAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGAACCGGTGGTGAATGACGAGTTGTGGAACACCGGCGCGCAAC
CTGGGAGACGCTCCAGGACTTCCGGGGCGGTTTTGTGGCCGACCTGAGTCAAAAAATCCGATCGTTTTG
GACTCTTTGGTGACCCCCCTAGAGGAGGGATATGTGGTTCTGTGTAGGAGACGAGAACCTAAAAACAGTTCCC
GCCCTCGCTGAATTTTGTCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCGGCTCTTGTCTGTGTCAGCATCGTT
CTGTGTTGCTCTGTCTGACTGTGTTTTCTGTATTTGTCTGAAAAATATGGGCGCGCGCGGGGCGGACAGTGT
TACCACTCCCTTAAGTTTGAACCTTAGTCTAGTCACTGGAAGATGTGAGCGGATGCTCTACAACAGTCGGTAGAT
CTCAAGAGAGAGCTGTGGTTACCTTCTGCTCTGAGAAATGGCCAACTTTTAACTCGGATGGCCGCGAGAGC
GCACCTTTAAACGAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGCTCTTCTACCTGGCCGATGACACACAGA
CCAGGTCCTCCATCTGTCGATCGGGAAGCCTTGGCTTTTACGCCCCCTCTGGGTGCAAGCCCTTTTGTACAC
CCTAAGCTCCGCGCTCTTCTCTCATCCGCCCCGTCTCTCCCTCTGAACTCCTCTGTGACCCGCGCTC
GATCCCTCCCTTATCAAGCCCTCACTCCTCTCTAGGCGCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGG
ACCCCGGCTGTGTTAAATCTTCCCTGACCTGTACATGACAAAGATTAACAACAGCCCTCTCTCAAGCTCAC
TTACAGGCTCTCTACTTAGTCTCAGCAGCAAGTCTGGAGAGCTCTGGGCGGACCTTACAGAAACAGCTGGAC
GACCGGTGGTATCTCACCTTCTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCGACACAGCACTAAGAACTAGA
ACCTCTGCTGAAAGAGCTTACACAGTCTGTGACACCCCCACGCCCTCAAAATAGACGGCATCGCAGCT
TGGATACGCGGCCACGTGAAGGCTCGCGACCCCGGGGGTGAACATCTCTACGTACGCTCTGACAGAGT

ACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAA
GAGCACTCGGTCCGCGCATACACTATTTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAAGTCACAGAAAAGCATC
TTACGGATGGCATGACAGTAAAGAAATATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATTAACACTCGGCCCAACT
ACTTCTGACAAAGATCGGAGGACGAAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAAATGGGGGATCATGTAACCTGC
CTTGTATCTGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCATACAAACGACGAGCTGACACACGATGCTCGACGAA
TGGCAACAACTGTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTCTAGCTTCCGCGCAACAAATTAAGACTG
GATGGAGCGGATAAAGTTGCGAGGCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGTGATGAA
TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGGGATCATTTGACAGCACTGGGGCAGATGGTAAGCCCTCCGTATGCT
TAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATGCTGAGATAGGTGCTC
ACTGATTAAGCAITTTGGTAACGTGTGACAGCAAGTTTACTCATATATCTTTAGATTGATTTAAACCTCATTT
TAATTTAAAGAGTCTAGGTGAAGATCTTTTTGATATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTCTGT
TCCACTGAGCGCTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAAGGATCTCTTGTAGATCTTTTTTTCTGCGCGTAACTGT
CTGCTGTGCAAAACAAAAAACACCGCTACACGCGGTGGTTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTT
CCGAAGGTAACTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAATACTGCTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCAAC
ACTTCAAGAGCTCTGTAGACCGCTCATATACCTCGCTCTGTAATCTGTATACAGTGGCTGCTGCCAGTGG
CGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGCTCGGCTGAACG
GGGGGTTCTGTCACACAGCCGAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAATGAGATCACTCAGCGGTGAGCTAT
GAGAAAGCGCGGCTTCCGAAAGGGAAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGACGGGTGCGACAGGAGA
CGCAGCGAGGAGCTTCCAGGGGGAAGCCGTGTGATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCCGCACTCTGACCT
GAGCTGATTTTTGTGTGATCTCTGACGGGGCGGAGCCTATGGAAGAAACCGCAGCAACGCGGCTTTTTCT
CTGCTTCCGCGCTTTTGTGCTGCTTTTTGCTCATGATGTTCTTCTCGGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCG
TAITTCAGGCTTTGAGTGAGCTGATACGCTCGCGCGAGCGGAGCGAGCGAGCGAGCTGAGCGAG
GAAGCGGAAGAGCGCTGATGCGGATTTTTCTCTTACGCACTGTGCGGATTTTACACCGCATATATGGT
CTCTCTGATCAATCTGCTCTGATGCGCATAGTTAAGCCGATATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGT
TATGCGTCTCGCCGACACCCGCGCAACCGCTGACGCGCTTACGCGGCTGTGCTGCTCCGCGCATCTCCG
TTACAGCAAGCTGTGACCGCTTCCGGGAGCTCATGTGTGAGAGGTTTTACCGCTCATACCGAAACGCGCG
AGGACGCTCGGTTAAGCTCATCAGCGTGGTGTGAAGCAATTCACAGATCTGCTGCTGTTATCCGCGCTTTC
GCTGTTGATTTTTCTCCGAAGCGTTAATGTCTGGCTCTGATTAAGCGGGGCAITTAAGGGCGGTTTTCT
CTGTTTGTGCTACTTGTATGCTCTCGGTGTAAGGGGGAATTTCTGTTTCAITGGGGTAAATGATACGATGAAGAG
AGAGGATGTCACGATACGGGTTACTGATGAACATGCCGCTTACTGAAACGTTGTGAGGTTAAACAACT
GGCGTATGGAATCGCGCGGACAGAGAAAAATCACTCAGGCTCAATGCCAGCGCTTCTGTTAATACAGATGA
GGTGTTCACAGGGTAGCCGACGACATCTCGATGCGATCCGGAACATATGGTGAAGGCGCTGACTTCC
GCGTTTCCAGACTTTTACGAACACGGAACCGAAGACCAATCATGTTGTGCTCAGGTCCGAGCGTTTGTGA
GCAGCAGTCCGTTACGTTGCTCGCTATCGGTGATTCATCTGCTTAACGATAGGCAACCCCGCAGCT
AGCCGGGCTCTCAACGACAGGACGATCATGCGCACCGGTGCCAGGACCCAGCGTCCCGAGATGCGCC
CGTCCGGCTCTTGAGATGCGCGAGCGATGATGATTTCTGCGCAAGGTTGGTTTTCGCAITTCAGGTTT
CCGAGAGATTTGATGCTCAATTTCTGGAATGTTGAATCGGTAGCGAGGTGCGCGCGCTTCCATTCAGT
CTGACCGCCCGGCTTCACTGACCCGCGACCGGAGCGGAGGAGGAGCAAGATATAGGGCGGCGCTCAAT
CTTATCCCAACCGTTTCATGTGCTCGCGAGCGGCAATAAATCGCGTGACATCAGCGGTCAGTGATGAA
GTGCGGTTGTGAAGCGCGGAGGATCTTTGAGTGTCTGATGTTGCTGATCTACTCTGCTGAGCAGCA
TGGCTCTCAACGCGGCGCATCCGATGCTCGCGGGAAGCAGAGAAATCATTAATGGGGAAGGCCATCAGCTCTG
CTGCTCGAAGCGCAGCAGAGCTGAGCCGAGCGGTGCGCGCCATGCGCGGATATGAGCTGCTTCTCGCG
AAAGCTTTGTGGCGGGACAGTGACGAAGGCTTGAAGCGGCGGTGCAAGATCCGCAAGCGGACGA
TGGCGATCATCTGCGCTCTCAGCGAAGCGGCTCTCGCGAAAAATGACCCAGGCGCTGCGCGACCTGTGC
TAGAGTGTGATGATGAAGAGACAGTATAGTGTGCGGCGAGATGATCATGCCCGCGCCACCGGAAGGAG
CTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGCGATCGGTGACGCTCTCCCTTATGCGACTCTGCTCATAGGAAGCG
CCAGGTAGTATGTTGAGGCGTTGAGCACCGCGCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCACAG
CTCCTGCGAAGCGGCGGCTGCCACCATACCCAGCGGAAACAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGCCGCA
TCTCTCCCATCGGTGATGTGCGGCATATAGGCGCGCAGCAACCGCACTGTGCGCGCGGTGATGCGGCGCAG
TGCTGCTCGAGCTAGAGGATGATCCACAGAGCGGTTGGTGGCCATGATCGGTAGTGCATATGAGGCTCAA
GTACGACAGCGAGCAGGACTGGGCGCGGCGCAAGCGGTGCGACATGCTCGAGAAAGGGTGCGCATAGAA
TTGCTCAACGCTATAGCGCTAGCAGCAGCCATAGTACTGCGGATGCTGTGCGAATGAGCATATCCCG
AAGGCGCGGCGAGCTCGCGCAATAAACAGCTATGCGCTACAGCATCAAGGTTGACGTTGCGGAGATGACA
TAGCGGCTATTTAGATTTCATACAGCGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAAGCTGTGATAAATCCCGATTA
AGGTTTGTCTTAGGATTTCTCAATACATCCCAAACTCAAAATATAAAGCAITTTGACTTGTCTTATGCC
TAGGCGGGGGGGGAGGCTAAGCAGCTTTTTTAACTTTAAATGTTAATTTCAITTTTAAATGACAGATG
TTTTTTTATTAAGGGTTTCAITGTGATGATGATGCTGCAATATCTCTTACCAAGCTAGTATAAATAA
ATAGATAAAGCTGCAATAATTTCTAGAGTTTCTGCTCATTAAGCTTTTCTCTCAGTTGACCAATAAATGCC
TGCTGAGAGAGCAGTTTGTGATCTGTGAGGATCAATTTCCCAATATGCGAGTCATATTAATTAAGTCAATTA
GTTGATTTTTATTTTTCGACATATACATG

Qual será o sítio de clonagem?

Quais as características desse sítio de clonagem?

SEQUÊNCIA DO ELEMENTO IRES E REGIÕES FLANQUEADORAS

```

                                     CCC 1400
1401 TTGAACCTCC TCGTTCGACC CCGCCTCGAT CCTCCCTTTA TCCAGCCCTC 1450
1451 ACTCCTTCTC TAGGCGCCGG AATTCGTAA CTCGAGGATC CACTAGTAAC 1500
1501 GGCCGCCAGA ATTCGCCCT CTCCCTCCCC CCCCCTAAC GTTACTGGCC 1550
1551 GAAGCCGCTT GGAATAAGGC CGGTGTGCGT TTGTCTATAT GTGATTTTCC 1600
1601 ACCATATTGC CGTCTTTTGG CAATGTGAGG GCCCGGAAAC CTGGCCCTGT 1650
1651 CTTCTTGACG AGCATTCCTA GGGGTCTTTC CCCTCTCGCC AAAGGAATGC 1700
1701 AAGGTCTGTT GAATGTCGTG AAGGAAGCAG TTCCTCTGGA AGCTTCTTGA 1750
1751 AGACAAACAA CGTCTGTAGC GACCCTTTGC AGGCAGCGGA ACCCCCCACC 1800
1801 TGGCGACAGG TGCCTCTGCG GCCAAAAGCC ACGTGTATAA GATACACCTG 1850
1851 CAAAGGCGGC ACAACCCAG TGCCACGTTG TGAGTTGGAT AGTTGTGGAA 1900
1901 AGAGTCAAAT GGCTCTCCTC AAGCGTATTC AACAAGGGGC TGAAGGATGC 1950
1951 CCAGAAGGTA CCCCATGTGA TGGGATCTGA TCTGGGGCCT CGGTGCACAT 2000
2001 GCTTTACATG TGTTTAGTCG AGGTTAAAAA AGCTCTAGGC CCCCCGAACC 2050
2051 ACGGGGACGT GGTTTTCTT TGAAAAACAC GATGATAATA TGGGATCGGC 2100
```

**Qual será a
estratégia para
clonagem?**

**Quais serão os
primers para o
screening do clone
positivo e em
orientação correta?**

SEQUÊNCIA DO GENE GFP E REGIÕES FLANQUEADORAS

601 CCGGTCGCCA CCATGGTGAG CAAGGGCGAG GAGCTGTTCA CCGGGGTGTT 650
651 GCCCATCCTG GTCGAGCTGG ACGGCGACGT AAACGGCCAC AAGTTCAGCG 700
701 TGTCCGGCGA GGGCGAGGGC GATGCCACCT ACGGCAAGCT GACCCTGAAG 750
751 TTCATCTGCA CCACCGGCAA GCTGCCC GTG CCCTGGCCCA CCCTCGTGAC 800
801 CACCCTGACC TACGGCGTGC AGTGCTTCAG CCGCTACCCC GACCACATGA 850
851 AGCAGCACGA CTTCTTCAAG TCCGCCATGC CCGAAGGCTA CGTCCAGGAG 900
901 CGCACCATCT TCTTCAAGGA CGACGGCAAC TACAAGACCC GCGCCGAGGT 950
951 GAAGTTCGAG GGCGACACCC TGGTGAACCG CATCGAGCTG AAGGGCATCG 1000
1001 ACTTCAAGGA GGACGGCAAC ATCCTGGGGC ACAAGCTGGA GTACA ACTAC 1050
1051 AACAGCCACA ACGTCTATAT CATGGCCGAC AAGCAGAAGA ACGGCATCAA 1100
1101 GGTGA ACTTC AAGATCCGCC ACAACATCGA GGACGGCAGC GTGCAGCTCG 1150
1151 CCGACCACTA CCAGCAGAAC ACCCCCATCG GCGACGGCCC CGTGCTGCTG 1200
1201 CCCGACAACC ACTACCTGAG CACCCAGTCC GCCCTGAGCA AAGACCCCAA 1250
1251 CGAGAAGCGC GATCACATGG TCCTGCTGGA GTTCTGTACC GCCGCCGGGA 1300
1301 TCACTCTCGG CATGGACGAG CTGTACAAGT CCGGACTCAG ATCTCGAGCT 1350

Qual será a estratégia para clonagem?

Quais serão os *primers* para o screening do clone positivo e em orientação correta?

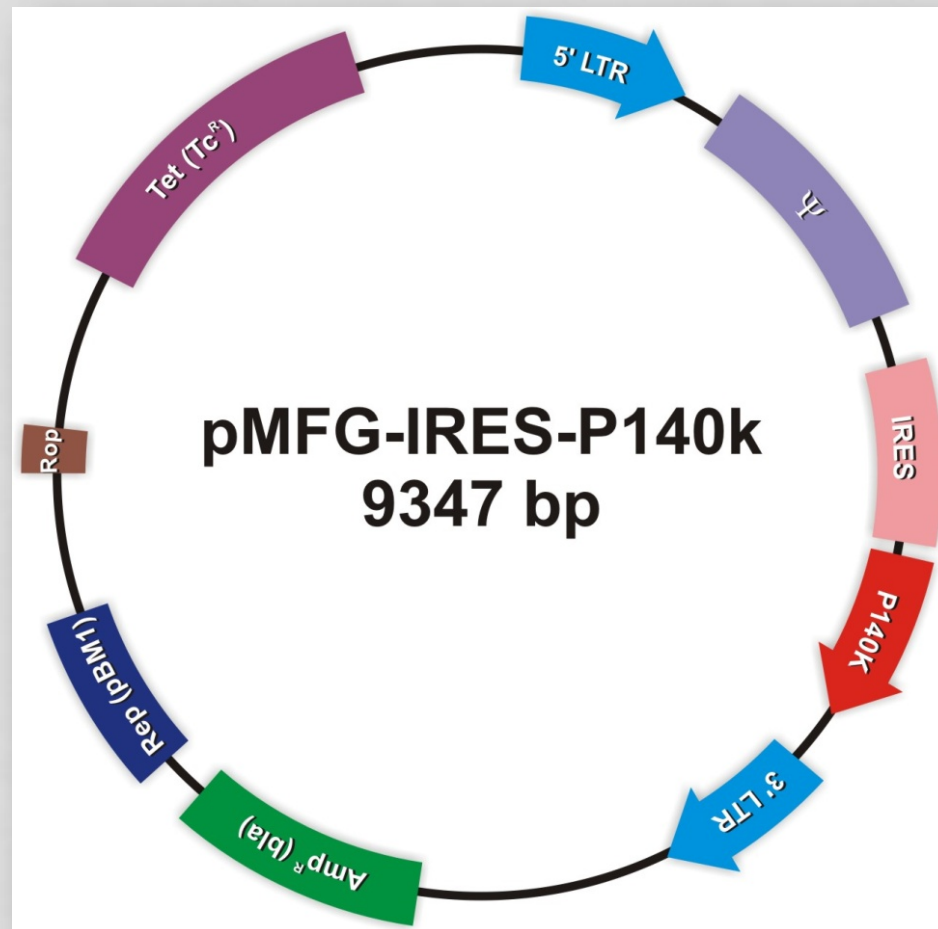
MAPA DO VETOR PMFG-IRES-GFP-P140K



Colocar no stoa sua estratégia de clonagem para:

- 1. Converter o vetor monocistrônico em bicistrônico e**
- 2. Clonar o cDNA relativo ao GFP**

MAPA DO VETOR PMFG-IRES-P140K



MAPA DO VETOR PMFG-IRES-EGFP-P140K

