

Clonagem de genes de interesse¹

Para se estudar a estrutura e função de um gene em nível molecular, é preciso que se tenha uma grande quantidade desse gene em uma forma pura. Uma maneira de se obter isso é pela **tecnologia do DNA recombinante**, que é, simplesmente, qualquer molécula de DNA composta de sequências de diferentes fontes. Esta tecnologia é usada, então, na **clonagem de DNA**, que permite que os pesquisadores preparem grande quantidade de moléculas idênticas de DNA.

A clonagem de um fragmento de DNA, como um gene de interesse, por exemplo, tem como ponto principal a ligação desse fragmento em uma molécula de DNA vetor, a qual pode replicar em uma célula hospedeira. Depois que uma única molécula de DNA recombinante, composta de um vetor mais um fragmento de DNA clonado, é introduzida em uma célula hospedeira, o DNA inserido é replicado junto com o vetor, produzindo um grande número de moléculas de DNA idênticas.

Uma das células hospedeiras mais utilizadas são as da bactéria *Escherichia coli*, e os vetores mais utilizados são os plasmídeos, que replicam junto com a célula hospedeira, e os vetores do bacteriófago λ , que replicam como vírus líticos, matando as células hospedeiras e empacotando seu DNA em vírions.

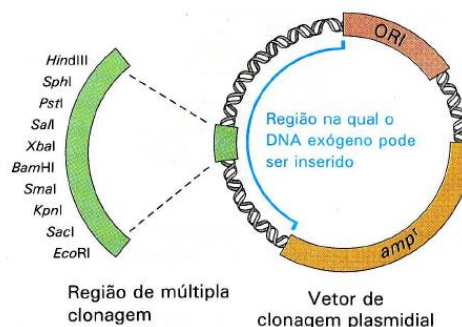
Como os vetores de clonagem disponíveis permitem apenas a inserção de fragmentos relativamente pequenos, as moléculas de DNA muito longas devem ser clivadas em pequenos fragmentos. Assim, para facilitar a produção de tais moléculas de DNA recombinantes, é necessária a utilização das enzimas de restrição (para fragmentar as moléculas de DNA) e das enzimas DNA ligases (para ligar cada fragmento de DNA em um vetor).

Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA de dupla fita circulares separados do DNA cromossomal celular. Esses DNAs extracromossomais, os quais ocorrem naturalmente nas bactérias e nas células eucariontes inferiores (por exemplo, levedura), são parasitas ou simbioses da célula hospedeira. Como o DNA cromossomal da célula hospedeira, o DNA plasmidial é duplicado antes de cada divisão celular, permitindo, assim, a propagação dos plasmídeos através das gerações sucessivas da célula hospedeira.

Os plasmídeos são manipulados pelos pesquisadores para otimizar o seu uso como vetores na clonagem do DNA. Por exemplo, a remoção de porções desnecessárias dos plasmídeos que ocorrem naturalmente na *E. coli* dão origem a vetores plasmidiais com cerca de 1,2 a 3 kb de circunferência, que contêm três regiões essenciais para a clonagem: uma região designada origem de replicação (ORI), que é essencial para a sua replicação e que assim assegura a sua transmissão à descendência da célula bacteriana (é crucial que esta região não seja alterada no processo de clonagem); uma região que codifique proteínas de genes marcadores de seleção (normalmente um gene de resistência a drogas); e o local múltiplo de clonagem (Multiple Cloning Site), ou seja, vários sítios específicos para cada enzima, justapostos.

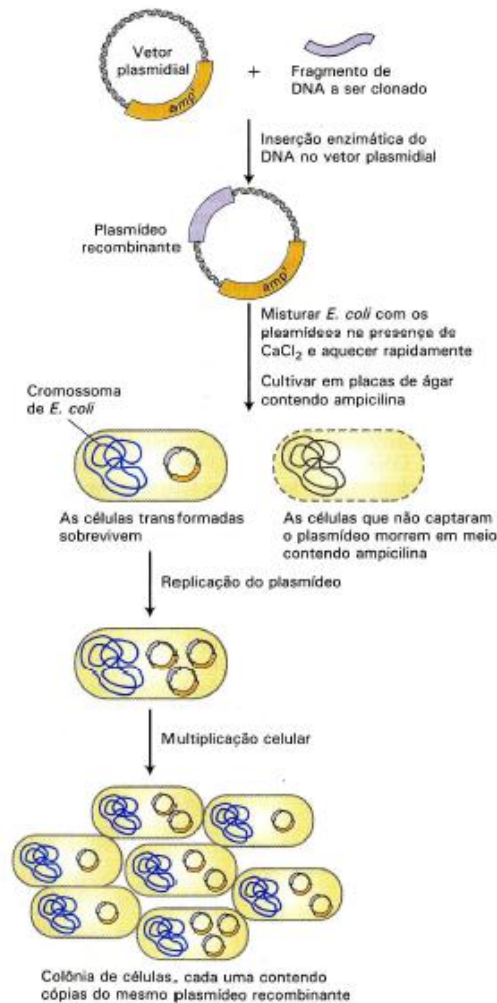
Nos plasmídeos podem ser inseridos fragmentos de DNA de 100 a 10.000 pares de bases. Os plasmídeos podem conter promotores de transcrição fortes para expressar proteínas dentro de outros organismos, sendo chamados assim de plasmídeos de expressão.



Quando as células de *E. coli* são misturadas com o DNA do vetor recombinante sob certas condições, uma pequena fração de células irá capturar o DNA plasmidial, em um processo que é conhecido como **transformação**. Tipicamente, uma célula entre cerca de 10 mil incorpora uma única molécula de DNA plasmidial, e se transforma.

Após o vetor plasmidial ser incubado com *E. coli*, as células que capturaram o plasmídeo podem ser facilmente selecionadas entre outras células. Por exemplo, se o plasmídeo portar o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, as células transformadas podem ser selecionadas cultivando-as em meio que contenha ampicilina. Assim, todas as células da progênie de *E. coli* resistentes ao antibiótico, derivadas da célula inicial transformada, irão conter plasmídeos com o mesmo DNA inserido. Dessa forma, o fragmento de DNA inicial inserido no vetor é replicado na colônia de células em inúmeras cópias idênticas. Como todas as células em uma colônia surgem de uma única

célula parental transformada, elas constituem um **clone** de células e o fragmento de DNA inicialmente inserido no plasmídeo parental é referido como **DNA clonado** ou um **clone de DNA**.



¹Lodish et al., 2005. Biologia Celular e Molecular, 5ed.

Outros tipos de vetores de clonagem:

Fagos (ou bacteriófagos)

Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias. Para serem utilizados como vetores são retiradas do seu material genético determinadas seqüências que são substituídas pela seqüência de interesse. A molécula recombinante é introduzida em fagos “vazios” que são então utilizados para infectar bactérias e propagar o DNA de interesse. Permitem a clonagem de fragmentos de DNA de até 20.000 pares de bases.

Cosmídeos

Os cosmídeos são muito semelhantes a plasmídeos, possuindo porém uma seqüência de fago, que possibilita seu posterior “empacotamento” em cápsulas virais. Permitem a clonagem de fragmentos de DNA de 35.000 a 50.000 pares de bases.

BACs (Bacterial Artificial Chromosome). São cromossomos artificiais baseados em cromossomos bacterianos. Permitem a clonagem de fragmentos de DNA de 75.000 a 300.000 pares de bases

YACs (Yeast Artificial Chromosome). Os YACs são, como o nome já diz, cromossomos artificiais de leveduras e geralmente são usados quando se quer ter um grande pedaço de DNA exógeno dentro de uma levedura. Possuem seqüências centroméricas e teloméricas para que funcione perfeitamente como um cromossomo. Permitem a clonagem de fragmentos de DNA de 100.000 a 1.000.000 pares de bases.

Caracterização e uso dos fragmentos de DNA clonados

Após a replicação dos plasmídeos contendo o DNA de interesse, os mesmos devem ser retirados das células transformadas (mini prep). O método de Lise Alcalina permite a separação dos plasmídeos do restante dos componentes celulares. Porém, para que possam ser manipulados ou seqüenciados, os fragmentos clonados de DNA devem ser, primeiro, separados do DNA do vetor. Isto pode ser feito pela clivagem do clone de DNA recombinante com a mesma enzima de restrição usada para produzir o vetor recombinante original. O DNA clonado e o DNA do vetor são, então, submetidos à eletroforese, um método eficaz para a separação de moléculas de DNA de diferentes tamanhos.