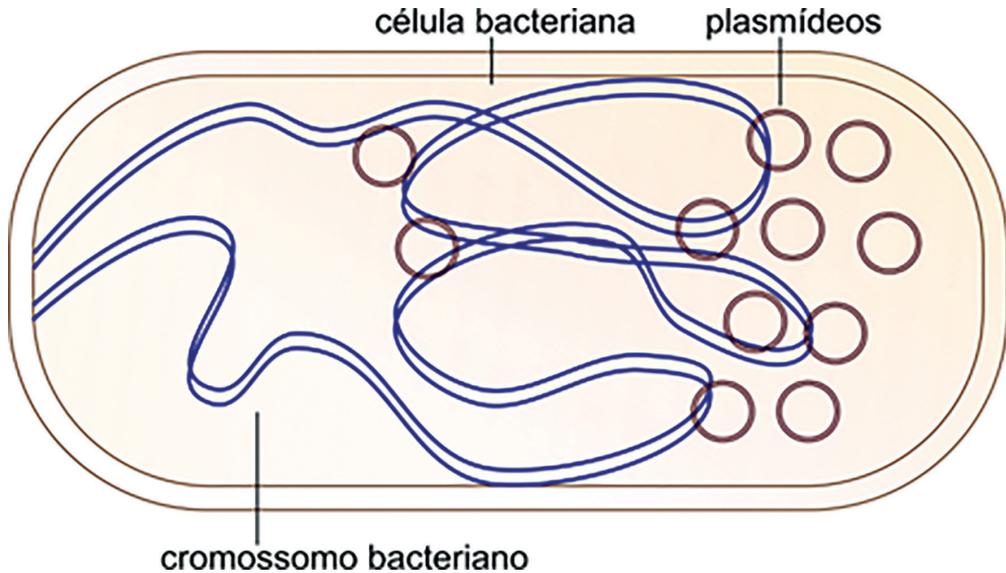


PRODUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

DIGESTÃO E DESFOSFORILAÇÃO DO PLASMÍDEO, ANELAMENTO E FOSFORILAÇÃO DOS RNAs GUIAS E REAÇÃO DE LIGAÇÃO AO VETOR

Para utilização do sistema CRISPR/Cas9, diversas técnicas de Biologia Molecular são empregadas, sendo que as primeiras a serem colocadas em prática, serão as ferramentas que permitem a construção de uma molécula de DNA recombinante. A princípio, é preciso ter em mãos os plasmídeos e os *primers* correspondentes à sequência gênica (gRNAs) na qual se deseja realizar a edição. Plasmídeos são moléculas de DNA dupla fita e circulares, que estão naturalmente presentes em bactérias, replicam independentemente do cromossomo bacteriano e, na maioria das vezes, conferem resistência a algum antibiótico ou produzem outras moléculas importantes para a sobrevivência do micro-organismo (Figura 4).

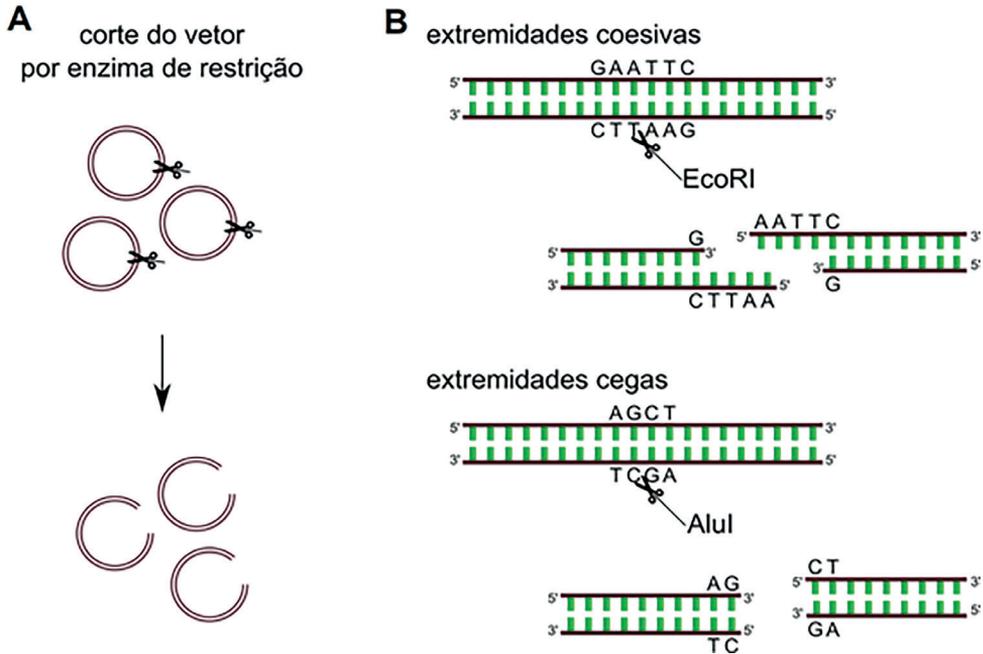
Figura 4. Célula bacteriana com seu DNA cromossomal e seus plasmídeos.



Muitos desses plasmídeos naturalmente presentes em bactérias foram modificados para sua utilização em Biologia Molecular. Adotaremos como exemplo, na descrição dos próximos passos, a estratégia de nocauteamento por inativação gênica (onde um único plasmídeo e um único RNA guia são utilizados) e por deleção gênica (na qual dois plasmídeos e dois RNAs guias são utilizados), metodologias consolidadas em nosso grupo de pesquisa.

O(s) plasmídeo(s) utilizado(s) devem apresentar uma marca de seleção, a qual é importante para selecionar, futuramente, as células que sofreram a edição gênica. Citaremos como exemplo dois tipos de plasmídeos que podem ser utilizados. O primeiro, plasmídeo pL-CRISPR.EFS.GFP (*Addgene*), apresenta, como marca de seleção, uma sequência gênica responsável pela produção da proteína fluorescente verde (GFP) (Figura 5A). Já o segundo plasmídeo, pL-Lenti.CRISPR-V2 (*Addgene*), apresenta, como marca de seleção, um cassete de resistência ao antibiótico puromicina (Figura 5B). Esses dois plasmídeos apresentam outras regiões importantes para seu funcionamento, a saber: a) um sítio codificador da β -lactamase (enzima que catalisa a degradação do antibiótico ampicilina), conferindo resistência a este antibiótico (necessário para a etapa de seleção do vetor recombinante); b) a sequência que codifica a endonuclease Cas9, e outros elementos necessários para a

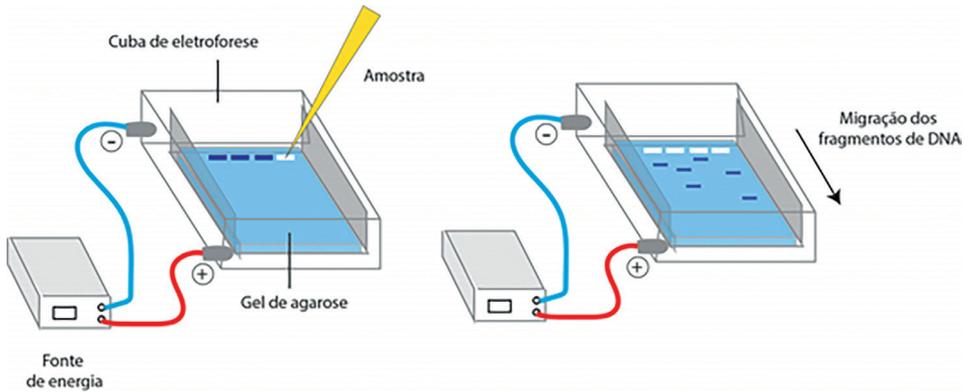
Figura 6. Digestão do plasmídeo.



A) Abertura do plasmídeo com enzimas de restrição. B) Extremidades cegas e coesivas geradas pela clivagem através de enzimas de restrição.

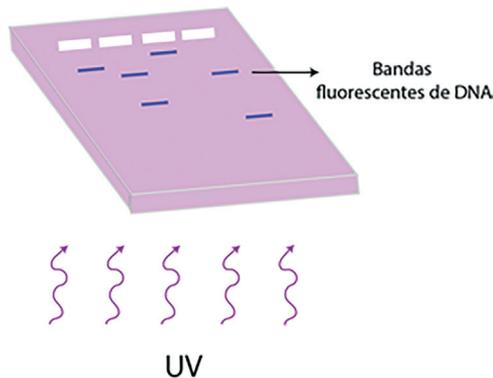
Antes de avançar para as etapas seguintes de preparação do vetor, é importante confirmar se este foi, de fato, digerido. Para tanto, deve-se realizar uma eletroforese em gel de agarose para observar o padrão de migração do vetor, o qual, se digerido, deverá migrar com maior facilidade do que o vetor não digerido. A eletroforese é uma técnica de separação que leva em consideração a taxa de migração de moléculas carregadas quando um campo elétrico é aplicado. Devido à presença do grupamento fosfato, o DNA possui carga negativa, portanto, ao ser aplicado um campo elétrico, a molécula de DNA migrará para o polo positivo. Usualmente, utiliza-se agarose que, quando solidificada, forma uma rede porosa pela qual a molécula migrará. Quanto maior a concentração de agarose, menor será o diâmetro dos poros formados. Dessa forma, fragmentos maiores ou lineares de DNA, encontrarão maior dificuldade em migrar, enquanto os fragmentos menores ou circulares, encontrarão menor dificuldade em migrar pela malha porosa (Figura 7).

Figura 7. Migração do DNA em gel de agarose.



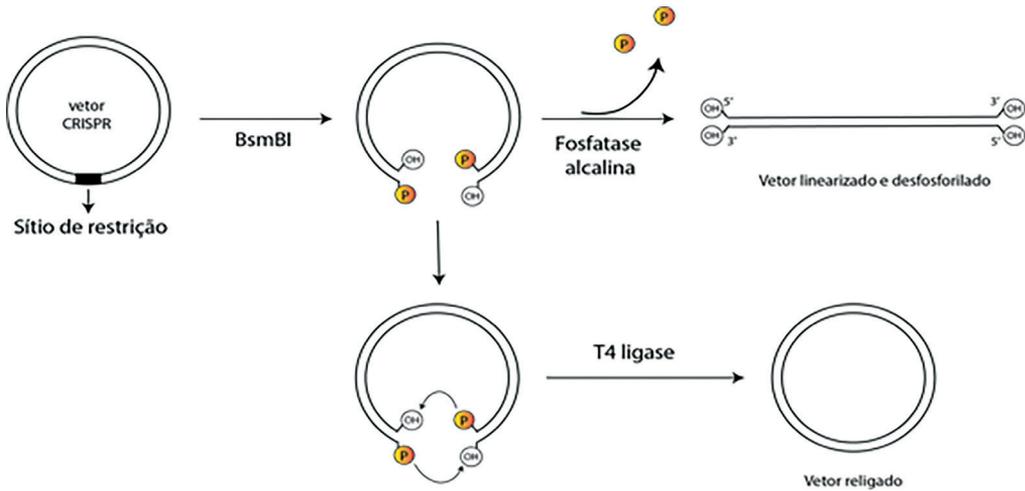
Para possibilitar a visualização do DNA, é adicionado brometo de etídio (EtBr) ao gel de agarose. O EtBr se intercala na dupla fita do DNA e fluoresce quando atingido por radiação UV (Figura 8). Assim, é possível visualizar e realizar outros procedimentos, como o corte da banda gerada para posterior extração do DNA presente no gel.

Figura 8. Visualização das bandas de DNA em gel de agarose contendo brometo de etídio após incidência de radiação UV.



Na etapa seguinte, é realizada a desfosforilação do vetor. Isso se faz necessário pois a abertura do vetor irá gerar extremidades com grupamentos fosfato e hidroxila livres. Caso o grupamento fosfato das extremidades 5' não seja retirado, o vetor irá assumir novamente a conformação circular, antes da inserção do RNA guia (Figura 9). Essa modificação na extremidade do vetor é feita utilizando-se a enzima fosfatase alcalina.

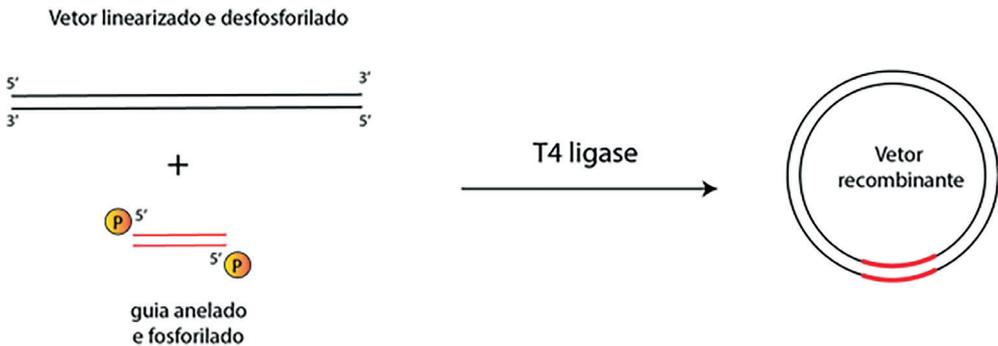
Figura 9. Desfosforilação do vetor.



O próximo passo é a fosforilação e anelamento dos RNAs guias (forward + reverse), de modo que assumam a configuração de dupla fita. A fosforilação é essencial, pois permite que os grupamentos fosfato adicionados nas extremidades dos guias se liguem aos grupamentos hidroxilas livres do vetor. A fosforilação é catalisada por quinases específicas.

Por fim, a última etapa da construção do plasmídeo recombinante é a reação de ligação que, como o próprio nome já diz, realiza a união entre o vetor e o RNA guia, restabelecendo a ligação fosfodiéster (Figura 10). Para esse fim, utiliza-se uma DNA ligase usualmente purificada a partir de *E. coli* infectada com o fago T4.

Figura 10. Reação de ligação do gRNA ao vetor.



PROTOCOLO 2

1. Digestão dos plasmídeos lentivirais utilizados na edição gênica

Exemplos: pL-CRISPR.EFS.GFP e pL-CRISPR-V2

Reação para volume final de 50 uL:

- X uL dos plasmídeos (10 ug de DNA plasmideal);
- 1,5 uL de enzima BsmBI (Esp3I) 10 U/uL;
- 5 uL do Buffer Tango 10X;
- X uL de água deionizada;
- Incubar no termociclador, a 37 °C, overnight. No dia seguinte, inativar a enzima a 65 °C por 20 min.

2. Desfosforilação dos plasmídeos digeridos com a enzima *BsmBI*

Reação para volume final de 80 uL:

- X uL do plasmídeo digerido (~10 ug do plasmídeo);
- 6 uL de Alkaline Phosphatase Buffer 10x FastAP (Fermentas);
- 10 uL da enzima Alkaline Phosphatase FastAP (Fermentas #EF0691);
- X uL de água deionizada;
- Incubar a 37 °C por 30 min e inativar a enzima por 5 min a 75 °C;
- Quantificar os plasmídeos com auxílio de um espectrofotômetro através da Absorbância a 260 nm e sua pureza através da razão A260 nm/A280 nm, valor que deve ser próximo de 2,0;
- Correr um gel de agarose 1% para verificar digestão total do plasmídeo (cerca de 4 uL dos plasmídeos fechados e digeridos);
- Não é necessário realizar a purificação da reação, pois o volume utilizado será muito pequeno em relação às reações de ligação.

3. Anelamento dos RNAs guias

Reação para volume final de 10 uL:

- 1 uL do RNA guia *forward* (100 uM);
- 1 uL do RNA guia *reverse* (100 uM);
- 1 uL de T4 Ligation Buffer 10X (Fermentas);
- 1 uL de T4 Polynucleotide Kinase 10 U/uL (Fermentas, #EK0032);
- 6 uL de água deionizada;
- Incubar a 37 °C por 30 min; 95 °C por 5 min; *ramp down* para 25 °C com a taxa de 5 °C por min;
- Diluir o *duplex* dos RNAs guias 1:100 (1 uL dos RNAs guias anelados + 99 uL de água deionizada).

4. Reação de ligação do RNA guia ao vetor

Reação para volume final de 20 uL:

- X uL de cada plasmídeo digerido e desfosforilado (~230 ng do DNA plasmídeo);
- 2 uL do *duplex* 1:100 dos *primers* diluídos;
- 2 uL de T4 DNA Ligase Buffer 10X (NEB);
- 1 uL da T4 DNA Ligase (NEB, #M0202S);
- X uL de água deionizada;
- Incubar a 16 °C, overnight. No dia seguinte, inativar a enzima a 65 °C por 10 min.

5. Precipitação do plasmídeo recombinante

Reação para precipitar 10 uL da reação de ligação:

- 2 uL de glicogênio em 10 uL de ligação;

- 20 uL de isopropanol;
- Deixar 30 min no gelo;
- Centrifugar por 10 min, 11.000 RPM, a 4 °C;
- Retirar o sobrenadante;
- 20 uL de etanol 70%;
- Centrifugar por 5 min, a 11.000 RPM, a 4 °C;
- Ressuspender em 15 uL de água deionizada.

