



Clonagem e expressão das endonucleases de restrição *EcoRI* e *NotI* em *Escherichia coli*

Victor Calebe Alves da Costa
Universidade Federal do Amazonas
victorcadcosta@gmail.com

Edson Júnior Carmo
Universidade Federal do Amazonas
edsonjuniorbio@yahoo.com.br

RESUMO

Endonucleases de restrição são enzimas responsáveis pela proteção de bactérias contra DNAs virais invasores. Essas enzimas apresentam inestimável valor para a tecnologia do DNA recombinante, uma vez que permitem manipulação laboratorial do material genético. Neste estudo, o intuito é isolar os genes codificantes de *EcoRI* e *NotI*, transferi-los para um vetor por meio do protocolo de clonagem e posteriormente expressar, purificar e analisar a atividade dessas endonucleases de restrição para clivagem de sequências gênicas de interesse, mantendo a autossuficiência do estoque de enzimas de restrição do Laboratório de Tecnologias de DNA.

Palavras-Chave: Endonucleases de restrição; DNA recombinante; Clonagem; *EcoRI*; *NotI*.

1. INTRODUÇÃO

Nathans & Smith descobriram e caracterizaram as endonucleases de restrição. Essas são endodesoxirribonucleases que reconhecem sequências nucleotídicas de DNA e clivam as fitas do duplex (NATHANS & SMITH, 1975). O grupo BioBricks Foundation promove o acesso a materiais para pesquisadores em instituições e regiões do mundo menos privilegiadas e proporciona aos investigadores e suas instituições o crédito por materiais disponibilizados abertamente.

As bactérias utilizam endonucleases contra vírus. As enzimas clivam o DNA invasor em sítios de reconhecimento (SAMSON et al. 2013), enquanto metiltransferases (MTases) metilam o DNA próprio da bactéria contra a ação das endonucleases (SEED, 2015). Endonucleases são altamente eficientes e específicas (ZOU et al. 2022). Yang, ao citar Pingoud, resume que as endonucleases de restrição identificam e se ligam a sequências específicas de DNA, cortando as ligações fosfodiéster em sítios determinados (PINGOUD et al. 2014 apud YANG et al. 2021).

As endonucleases de restrição fazem parte dos Sistemas de Restrição-Modificação (RM), que são classificados em quatro tipos (I, II, III e IV), considerando composição, alvo, cofatores e método de clivagem do DNA (BOWER, 2018).

Os sistemas de Arber e Meselson, agora chamados de tipo I, reconhecem sequências específicas de DNA, mas clivam DNA aleatoriamente, tornando-os inadequados para clonagem e mapeamento (ROBERTS, 2005). Endonucleases de restrição Tipo II formam um conglomerado de proteínas que compartilham a habilidade de clivar o DNA em posição fixa próxima à sequência de reconhecimento (PINGOUD, 2014). Enzimas de tipo III requerem interação com duas sequências de DNA não-metilado em orientações invertidas para eficiente clivagem em local específico, compartilhando com as de Tipo I uma atividade ATPase específica da sequência (RAO et al., 2013). As enzimas de restrição de tipo IV, que incluem várias famílias não relacionadas, restringem bases metiladas numa sequência fracamente especificada, conferindo vantagem adicional contra fagos



(PICTON et al., 2021; LOENEN et al., 2013).

Os nomes das enzimas de restrição seguem uma nomenclatura que inclui a primeira letra do gênero, as duas primeiras letras do epíteto de espécie e cepa, seguidas do algarismo romano indicativo do número da enzima, exemplificado pela EcoRI, isolada de *Escherichia coli* com fator de resistência R (KIM, 2019; ROBERTS, 2003). A EcoRI, pertencente ao sistema restrição-modificação tipo II, cliva moléculas de DNA em sequências GAATTC (KUPIEWSKI et al., 2004). Já a NotI, uma enzima de restrição do tipo III, isolada de *Nocardia otitidiscaviarum*, reconhece a sequência de DNA 50 -GC/GGCCGC-30. Utilizada para gerar grandes fragmentos genômicos e mapear o estado de metilação do DNA, a NotI pode representar um intermediário evolutivo entre endonucleases móveis e as de restrição canônicas (QIANG & SCHILDKRAUT, 1987; LAMBERT et al., 2008).

Isolando enzimas de restrição bacteriana, manipula-se DNA, essencial para a clonagem de DNA recombinante (Heckmann & Paradisi, 2020). Nesse ínterim, o presente estudo tem o intuito de clonar e expressar enzimas, mediante técnicas de Engenharia Genética, tendo também a proposta de otimizar a produção e estoque dessas enzimas para uso do laboratório de Tecnologia de DNA do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas.

2. OBJETIVO GERAL

Clonar e expressar endonucleases de restrição recombinantes produzidas em *Escherichia coli*.

3. METODOLOGIA

(5.1) Para a transformação genética, células eletrocompetentes foram misturadas com 50 ng dos plasmídeos EcoRI e NotI, seguido por pulso elétrico e recuperação das células. A incubação e a semeadura em placas com meio LB-Agar e ampicilina foram realizadas para garantir colônias, utilizando seis placas com alíquotas variadas. (5.2) Colônias bem-sucedidas foram inoculadas em meio LB, incubadas e, após 18 horas, o DNA plasmidial foi extraído e analisado por gel de eletroforese. (5.3) O isolamento dos genes de interesse, EcoRI e NotI, foi realizado por PCR usando vetores freegens como template. Os produtos foram resolvidos em gel de agarose, purificados e clonados no vetor de expressão pGSM. (5.4) A subclonagem no vetor pGSM, envolvendo a liberação dos genes do vetor pGEMT por restrição com EcoRI e NotI, enfrentou dificuldades na purificação do gel. Todas as manipulações genéticas, transformação, PCR, clonagem, restrição são baseadas em Sambrook e Russel (2001). (5.5) Na produção das enzimas em *E. coli*, clones recombinantes foram cultivados, induzidos com IPTG, e as enzimas foram extraídas do espaço periplasmático. A análise das amostras foi realizada por SDS-PAGE. (5.6) Utilizando uma coluna HisTrap™ HP, as enzimas foram purificadas por cromatografia de afinidade. Frações foram coletadas, quantificadas e analisadas por eletroforese desnaturante. (5.7) Na reação de digestão, combinando DNA de interesse, enzimas de restrição, buffer e BSA, os resultados foram visualizados por gel de eletroforese. Produção de proteína e purificação são baseadas em Ganguly et al (2019).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na transformação bacteriana (5.1), a maioria das placas mostrou colônias transformadas, indicando sucesso na introdução dos plasmídeos. Contudo, a ausência de crescimento em uma placa com 100 µL requer investigação adicional. No cultivo em meio líquido (5.2), a eletroforese confirmou a presença dos plasmídeos com os genes de interesse (Figura 4). Durante o isolamento dos genes (5.3), a amplificação inicial do gene EcoRI falhou, mas otimizações subsequentes



resultaram em sucesso (Figura 5). Testes de digestão (5.7), inicialmente problemáticos, foram bem-sucedidos com alíquotas adequadas, destacando a importância da otimização. Após a ligação dos genes ao vetor (5.5), a transformação bacteriana produziu colônias recombinantes confirmadas por eletroforese (Figura 7). No entanto, o aumento de populações bacterianas não-desejadas indica a necessidade de ajustes. Infelizmente, a síntese e purificação das enzimas (5.6) não foram concluídas no prazo, destacando a importância de considerar contingências temporais. Apesar do sucesso em várias etapas, a não conclusão da fase final destaca a complexidade e a necessidade de planejamento flexível. Os resultados até agora fornecem base para futuras explorações na produção e purificação das enzimas EcoRI e NotI.

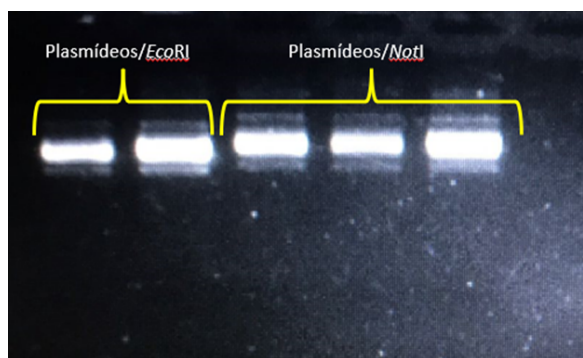


Figura 1:

Figura 1: Recuperação de plasmídeos carreando os genes das enzimas de restrição EcoRI e NotI.

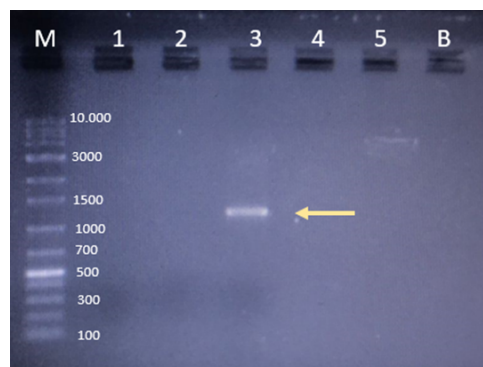


Figura 2:

Figura 2: PCR dos genes das endonucleases de restrição. M= Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus/M119, 1-3= Amplificação do gene da enzima NotI, 4 -5= amplificação do gene da enzima EcoRI, B= Branco da reação de PCR. Note a amplificação do gene da enzima NotI na canelleta 3 apontado pela seta.

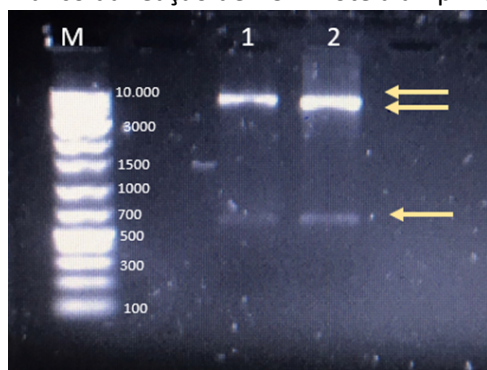


Figura 6: Análise de restrição do vetor de expressão pGSM1. M= Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus/M119 (Sinapse); 1 e 2= Vetor pGSM/tGH clivado com EcoRI e NotI comerciais. Note a liberação do gene do hormônio de crescimento com aproximadamente 700 pb (seta simples) do vetor de expressão pGSM (setas duplas).

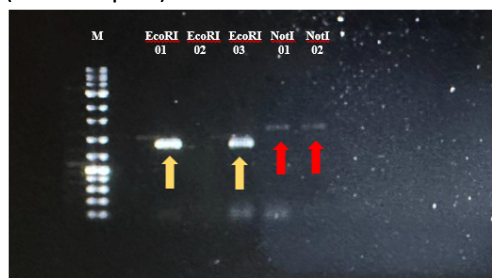


Figura 7: Análise de plasmídeos recombinantes. M= Marcador de massa molecular 1 kb ladder plus/M119 (Sinapse); EcoRI 01, 02 e 03, bem como NotI 01 e 02, são resultado de amplificação por PCR das amostras a



partir das colônias recombinantes.

Limitações incluem a falha inicial na amplificação do gene EcoRI (5.3), demandando otimizações subsequentes. A não conclusão da produção e purificação das enzimas (5.6) destaca a complexidade e a necessidade de planejamento flexível.

5. CONCLUSÕES

As etapas realizadas no projeto proporcionaram resultados positivos, evidenciando êxito na transformação bacteriana, amplificação por PCR e validação da recombinação nas colônias recombinantes. As análises de eletroforese confirmaram a presença dos genes de interesse nas colônias, representando um avanço concreto. Embora a seleção de cepas desejadas tenha apresentado desafios, a obtenção de resultados nas etapas concluídas estabelece uma base sólida para futuras investigações voltadas para a produção e purificação das enzimas de restrição.

REFERÊNCIAS

- Bower, E. K. M., Cooper, L. P., Roberts, G. A., White, J. H., Luyten, Y., Morgan, R. D., ... Dryden, D. T. F. (2018). A model for the evolution of prokaryotic DNA restriction-modification systems based upon the structural malleability of Type I restriction-modification enzymes. *Nucleic Acids Research*, 46(17), 9067–9080. doi:10.1093/nar/gky760.
- Ganguly, D. R.; Rhodes, T; Khin, N. C.; Tee, E. E.; Chan, K. X. 2019. Escherichia coli protein expression and purification V.1. Unversidade de pensilvania. dx.doi.org/10.17504/protocols.io.p89drz6.
- Kim, S.-K. (2019). *Essentials of Marine Biotechnology*. Springer.
- Lambert, A. R., Sussman, D., Shen, B., Maunus, R., Nix, J., Samuelson, J., ... Stoddard, B. L. (2008). Structures of the Rare-Cutting Restriction Endonuclease NotI Reveal a Unique Metal Binding Fold Involved in DNA Binding. *Structure*, 16(4), 558–569. doi: 10.1016/j.str.2008.01.017.
- Loenen, W. A. M., & Raleigh, E. A. (2013). The other face of restriction: modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 56–69. doi:10.1093/nar/gkt74.
- Nathans, D., & Smith, H. O. (1975). Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules. *Annual Review of Biochemistry*, 44(1), 273–293. doi:10.1146/annurev.bi.44.070175.
- Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7489–7527. doi:10.1093/nar/gku447.
- Qiang, B.-Q., & Schildkraut, I. (1987). [3] NotI and SfiI: Restriction endonucleases with octanucleotide recognition sequences. *Recombinant DNA Part F*, 15–21. doi:10.1016/0076-6879(87)55005-4.
- Rao, D. N., Dryden, D. T. F., & Bheemanaik, S. (2013). Type III restriction-modification enzymes: a historical perspective. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 45–55. doi:10.1093/nar/gkt616.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3a Ed.
- Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 675–687. doi:10.1038/nrmicro3096.
- Yang, X., Jiang, J., Li, Z., Liang, J., & Xiang, Y. (2021). Strategies for mitochondrial gene editing. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 3319–3329. doi: 10.1016/j.csbj.2021.06.003.
- Zou, R. S., Gavrilov, M., Liu, Y., ... Zhang, N. (2022). Improving the specificity of nucleic acid detection with endonuclease-actuated degradation.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha gratidão à FAPEAM pelo apoio financeiro fundamental, à UFAM pela infraestrutura essencial e ao Laboratório de Tecnologias de DNA pela parceria valiosa. Meu orientador, Edson Júnior Carmo, merece um agradecimento especial pela orientação excepcional. Aos colegas Naruan, Samanta, Leissandra, Vinicius e Isabelle, obrigado pela colaboração e companheirismo.