

Os métodos de clonagem de DNA são ferramentas essenciais para a investigação biológica e biotecnologia. Percebe-se portanto a importância do desenvolvimento de métodos com a finalidade de clonar fragmentos de DNA de interesse. Os métodos convencionais requerem geralmente várias etapas para gerar uma construção. Em cada etapa, um único fragmento de DNA é transferido de um plasmídeo dador ou produto de PCR para um vetor recetor. Nos últimos anos, foram concebidos novos métodos para facilitar e acelerar este processo, sendo um deles o método de clonagem Golden Gate [1], que difere da clonagem tradicional essencialmente por possibilitar a inserção de múltiplos fragmentos de DNA de uma só vez.

Esta múltipla inserção é possível devido à utilização de enzimas de restrição do tipo IIS em vez das clássicas enzimas do tipo II. Ambos os tipos de enzima de restrição cortam o DNA através de duas incisões, uma em cada cadeia, e são classificadas em diferentes tipos de acordo com a sua estrutura e consoante o seu local de corte, ou seja, consoante o corte seja no mesmo local de reconhecimento ou caso o local de reconhecimento e o local de clivagem não são coincidentes. Sabemos então que cada enzima do tipo II reconhece uma sequência específica, que é geralmente palindrômica, e onde procede ao corte gerando tanto extremidades coesivas como cegas. Assim, quando a clonagem é feita com enzimas de restrição do tipo II, parte da sequência de reconhecimento faz parte da sequência de DNA que pretendemos clonar. Pelo contrário, a utilização de enzimas de restrição do tipo IIS na clonagem de Golden Gate, permitem um corte fora da sequência de reconhecimento, gerando extremidades coesivas apenas contendo a sequência do DNA de interesse. Este facto permite a ligação a outros fragmentos de DNA por complementaridade de bases através de uma DNA ligase, resultando num único segmento sem que esteja presente nenhuma parte da sequência de reconhecimento.

Dando um exemplo prático simples: consideremos dois plasmídeos, um com resistência à canamicina, Kan^R, em bactérias (onde a nossa sequência de interesse está presente) e outro com resistência à carbenicilina, Carb^R, (que será o nosso vetor recetor). A sequência de interesse é flanqueada por uma sequência de reconhecimento para a enzima do tipo IIS Bsal. Também o plasmídeo que servirá de vetor recetor contém uma sequência de reconhecimento para essa mesma enzima. Entre os dois locais de corte no vetor recetor encontra-se o operão lac, o que implica que num meio com X-Gal a bactéria crescerá com cor azul. A enzima Bsal corta então a sequência de interesse do primeiro plasmídeo e corta também o operão lac do segundo, criando extremidades coesivas compatíveis entre a sequência de interesse e o plasmídeo recetor. Em consequência da ação de uma DNA ligase a sequência liga-se ao plasmídeo recetor totalmente livre de zonas de reconhecimento da Bsal. É possível perceber que esta sequência não poderá voltar a ser cortada pela mesma enzima Bsal, uma vez que o local de reconhecimento já não está presente.

Consequentemente, uma grande vantagem deste método é o facto de a enzima de restrição, a ligase e todos os plasmídeos necessários à clonagem - quer sejam dois como neste exemplo, ou mais em exemplos mais complexos - podem ser simultaneamente adicionados ao tubo de reação. No entanto, este facto pode também ser considerado como uma desvantagem porque se posteriormente pretendermos alterar o plasmídeo de interesse já não poderemos usar a mesma enzima, visto que a sua zona de reconhecimento já não estará presente. Este inconveniente agrava-se caso perto do gene de interesse não exista uma zona de reconhecimento para outra enzima.

Prosseguindo com o exemplo previamente abordado, o procedimento passaria por serem colocados os dois plasmídeos, Kan^R e Carb^R, juntamente com Bsal, T4 ligase e Buffer com ATP (energia necessária ao funcionamento da ligase) num único tubo de reação. Após sucessivas digestões e através de um meio seletivo com carbenicilina verifica-se que não crescem bactérias com o plasmídeo de resistência à canamicina (Kan^R) e crescem poucas colónias azuis, ou seja, plasmídeos que contêm o vetor recetor intacto (Carb^R). Este baixo número deve-se à elevada eficiência deste método, sendo que a maioria das bactérias que crescem apresentam cor branca, ou seja, contêm o plasmídeo com o nosso gene de interesse. Deparamo-nos assim com a segunda grande vantagem deste método: a sua grande eficiência, uma vez que as sucessivas digestões permitem uma maior probabilidade de interação da enzima de restrição com a sua sequência de reconhecimento. Essas digestões não interferem com o plasmídeo já assembledo, uma vez que esse não contém a sequência de reconhecimento, como já referido. [2]

A clonagem através de Golden Gate não é 100% independente da sequência. Para evitar uma digestão indesejada, o local de reconhecimento da enzima do tipo IIS não deve estar presente na sequência que desejamos montar. Caso existam, uma solução para este problema passa por recorrer a amplificação por PCR de forma a criar mutações pontuais silenciosas dentro do local de corte com o objetivo de eliminá-las do gene de interesse. Se o nosso gene de interesse contiver várias zonas de restrição esta solução torna-se pouco eficiente, sendo necessário recorrer a outro método de clonagem.

Para estudar a função génica em *Bacillus anthracis*, este método de clonagem foi usado para construir um vetor “knockout” de modo a permitir uma elevada eficiência numa subclonagem em apenas um passo, sem a necessidade de inclusão de nenhum nucleótido adicional no produto final clonado [3].

Referências

- [1] Engler C, Marillonnet S (2014) Golden Gate Cloning. In: Valla S., Lale R. (eds) DNA Cloning and Assembly Methods. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), Vol 1116. Humana Press, Totowa, NJ
- [2] DNA Assembly Techniques - TSL SynBio – short online course - [Internet] citado em 22 de março, disponível em: <http://synbio.tsl.ac.uk/docs/item/324585f4-0d75-42d9-96ba-97eabf568564>
- [3] Wang, T, Wang D, Lyu Y, Feng E, Zhu L, Liu C, Wang Y, Liu X, Wang H, (2018), Construction of a high-efficiency cloning system using the Golden Gate method and I-SceI endonuclease for targeted gene replacement in *Bacillus anthracis*. *Journal of Biotechnology*, Vol 271: 8-16.