

## Engenharia genética: Golden gate

Luísa Ribeiro, 49294; Raquel Gonçalo, 49233; Rita Henriques, 49344 ; Sabrina Brito, 49003

Golden Gate Cloning é uma estratégia simples e rápida de subclonagem usada para transferir qualquer fragmento de DNA de interesse para um vetor sem deixar cicatrizes no DNA, para isto são utilizadas enzimas do tipo IIs.

As enzimas de restrição do tipo IIS são as únicas que clivam fora da sua sequência de reconhecimento a uma distância definida que depende do tipo de enzima usada e que pode variar entre 4 a 7 nucleótidos. Da ação destas enzimas podem resultar extremidades coesivas ou cegas, dependendo mais uma vez da enzima usada. A Bsal é a enzima de restrição mais usada nesta técnica por apresentar um melhor funcionamento conjugado com o tampão e por manter a sua atividade durante um longo período de tempo a temperaturas elevadas, a Bsal permite ainda o bom funcionamento da ligase. No caso desta enzima observa-se a formação de uma extremidade com 4 nucleótidos que ficam disponíveis para ligação, este número, ainda que pareça pequeno, produz um elevado número de combinações nucleotídicas diferentes e conseqüentemente uma enorme variabilidade. Como essas projeções não fazem parte da sequência de reconhecimento elas podem ser personalizadas para direcionar a montagem de fragmentos de DNA. Quando projetados corretamente, os locais de reconhecimento não aparecem na construção final, permitindo a clonagem precisa e sem locais de recombinação no DNA.

Além disso, esta estratégia permite clonar mais do que um inserto num vector. Os vectores são selecionados com uma marca de resistência, por exemplo a um antibiótico, para que possa ser detectado posteriormente através de meios seletivos. Dado que todas as estruturas a clonar têm a sequência de reconhecimento para a mesma enzima de restrição e sendo que o local de corte é afastado do local de reconhecimento, vai ser possível a manipulação nucleotídica de modo a favorecer a ordem de entrada pretendida dos fragmentos.

Na aplicação desta técnica utilizando a enzima Bsal o tubo é colocado a 40°C durante 10 minutos para permitir a cisão do DNA por parte da Bsal (a temperatura óptima é mais elevada (50°C) mas temos que comprometer para não desativar a t4 ligase) , depois coloca-se a 16°C para que a t4 ligase possa facilitar a ligação das extremidades compatíveis. O processo pode ser repetido para aumentar a sua eficiência, sem correr o risco de ser novamente clivado porque no produto recombinado não vão existir marcas de reconhecimento para a Bsal.

O tubo vai então ser submetido a uma temperatura de 50°C durante 10 minutos que vai linearizar alguns fragmentos restantes, e finalmente, é feita a inativação que consiste num aumento da temperatura para os 80°C durante mais 10 minutos, que vai prevenir uma possível religação. O produto final destes processos é posteriormente transferido para células competentes para realizar a detecção do plasmídeo recombinante.

### Exemplo:

Foi desenvolvida uma técnica de marcação de proteínas com recurso a enzimas de restrição de tipo IIS, tendo os resultados demonstrado que este método é altamente eficiente e pode fundir com precisão um tag, não sendo posteriormente visíveis cicatrizes de clonagem. Constitui assim um método alternativo para integrar uma matriz de tags em construções proteicas.

A marcação tradicional introduz sequências indesejadas devido à junção das extremidades que se caracterizam por serem o local de reconhecimento da enzima de restrição flanqueadora.

É um procedimento demorado e pouco eficaz quando uma proteína necessita de uma variedade de tags que frequentemente requerem sequências de enzimas de restrição flanqueantes diferentes. Este método permite então a eliminação de sequências indesejadas, e conseqüentemente uma maior eficácia.

O Golden Gate é um dos métodos mais simples de clonagem porque permite realizar todo o processo num único passo e num único tubo, sendo que a formação do produto de ligação desejado é irreversível porque a construção final não conserva os locais de reconhecimento da enzima. Algumas das vantagens do método passam pelo facto da eficácia do processo de ligação se encontrar próxima de 100% e ainda o seu baixo custo. Contudo tem também as suas limitações, nomeadamente se o produto final pretendido for o resultado da montagem de 10 ou mais fragmentos. Surgem ainda alguns problemas caso se verifique uma percentagem de guaninas e citosina reduzidas nos terminais do fragmento, ou ainda quando o processo de clonagem não é bem sucedido, porque é difícil identificar qual dos passos não correu como esperado (visto que o método não se realiza propriamente por passos o seu controlo torna-se difícil).

## Referências

Biolabs, New England. "Bsal." New England Biolabs: Reagents for the Life Sciences Industry. Accessed March 18, 2019. [https://www.neb.com/products/r0535-bsai#Product Information](https://www.neb.com/products/r0535-bsai#Product%20Information).

Gearing, Mary. "Plasmids 101: Golden Gate Cloning." Addgene Blog Share Science. August 27, 2015. Accessed March 18, 2019. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-golden-gate-cloning>.

Biolabs, New England. 2019. "Golden Gate Assembly." *New England Biolabs: Reagents for the Life Sciences Industry*. Accessed March 18. <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/golden-gate-assembly>.

Kimura, Yuki. "BBa\_K1057012." Registry of Standard Biological Parts. September 16, 2013. Accessed March 18, 2019. [http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K1057012](http://parts.igem.org/Part:BBa_K1057012).

Biolabs, New England. "NEB® Golden Gate Assembly Mix." New England Biolabs: Reagents for the Life Sciences Industry. Accessed March 18, 2019. [https://international.neb.com/products/e1600-neb-golden-gate-assembly-mix#Product Information](https://international.neb.com/products/e1600-neb-golden-gate-assembly-mix#Product%20Information).

Lee, J. H., P. M. Skowron, S. M. Rutkowska, S. S. Hong, and S. C. Kim. "Sequential Amplification of Cloned DNA as Tandem Multimers Using Class-IIIS Restriction Enzymes." *Genetic Analysis : Biomolecular Engineering*. December 1996. Accessed March 18, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9117889>.

Engler, Carola, Romy Kandzia, and Sylvestre Marillonnet. "A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability." *PLoS One*. November 5, 2008. Accessed March 18, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18985154>.

Cermak, Tomas, Erin L. Doyle, Michelle Christian, Li Wang, Yong Zhang, Clarice Schmidt, Joshua A. Baller, Nikunj V. Somia, Adam J. Bogdanove, and Daniel F. Voytas. "Efficient Design and Assembly of Custom TALEN and Other TAL Effector-based Constructs for DNA Targeting." *Nucleic Acids Research*. July 14, 2011. Accessed March 18, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21493687>.