



SAU-41 ESTUDOS PRELIMINARES PARA CONSTRUÇÃO DE GENES QUIMÉRICOS CODIFICADORES DE INSULINA HUMANA.

Oliveira, E. A. O.¹; Hansen, E. E. T.²; Cruz, M. A. L.³; Ribeiro, J. M.⁴

¹Fundação Centro de Ciências e Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro – CEDERJ, Resende, Brasil. ²Laboratório de Biotecnologia (LBT), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brasil. ³TECNORTE/FENORTE, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brasil. ⁴Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Semi-Árido, Petrolina, Brasil
eduardobio@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO: O crescente avanço do diabetes na população mundial gera a procura por tratamentos menos dolorosos e de baixo custo. A partir da tecnologia do DNA recombinante, podem ser construídos genes quiméricos que, uma vez inseridos em vetores de expressão em plantas, podem ser utilizados para a produção de plantas transgênicas (Haq et al., 1995; Mason et al., 1992 e 1996 e Nykiforuk et al., 2006), que sintetizem quantidades elevadas de insulina humana. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a construção de genes quiméricos contendo o gene da insulina humana sob controle de um promotor com forte atividade em plantas. Os vetores utilizados para construção dos genes quiméricos possuem o promotor RbcS1 da enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase (RUBISCO) que é uma enzima chave no processo fotossintético, sendo expressa em grandes quantidades, além de ser diretamente regulada pela luz. Adicionalmente, os vetores utilizados neste trabalho possuem seqüências de endereçamento de proteínas para subcompartimentos celulares distintos (citoplasma, secreção via retículo, retículo endoplasmático, mitocôndrias e cloroplastos).

MATERIAL E MÉTODOS: A amplificação do gene *ProINS* foi realizada por PCR, utilizando como DNA molde o plamídeo pBSK contendo o cDNA da proinsulina humana, cedido pelo Prof. Graeme I. Bell, Howard Huges Medical Institute, The University of Chicago. Foram utilizados 100 ng do DNA plasmidial, 0,5 pmol L⁻¹ dos iniciadores 3' e 5', tampão da enzima 1 vez concentrado, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP e 0,2 U de *Taq* Polimerase. As condições do PCR foram 95 °C por 2 minutos (desnaturação), seguida de 30 ciclos de 96 °C por 1 minuto (desnaturação), 65 °C por 1 minuto (anelamento) e 73 °C por 1 minuto (síntese) e, finalmente, 72 °C por 7 minutos (síntese). Visando a obtenção de extremidades coesivas com os vetores de clonagem, realizou-se uma restrição do gene *ProINS*, amplificado por PCR, utilizando-se 250 ng do gene, 2 µL do tampão das enzimas *NotI* e *BamHI* (concentrado 10 vezes), 3 U de cada uma das enzimas e água ultrapura q.s.p 20 µL. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C durante 16 horas. Os vetores de clonagem utilizados foram da série ImpactVector[®], sendo eles o pRbcS 1.1 e o pRbcS 1.1-tag, os quais retêm a proteína sintetizada no citoplasma, o pRbcS 1.2 e o pRbcS 1.2-tag, que endereçam a proteína para a via de secreção via retículo endoplasmático. A denominação “tag” refere-se a uma seqüência codificadora de uma cauda polihistidina, que facilita a purificação da proteína via cromatografia de afinidade. Para a linearização dos vetores, foram utilizados 250 ng de DNA plasmidial, 2 µL do tampão das enzimas *NotI* e *BamHI* (concentrados 10 vezes), 3 U de cada uma das enzimas e água ultrapura q.s.p 20 µL. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C durante 16 horas. Na reação de ligação do gene *ProINS* nos vetores de clonagem, cada vetor de foi incubado juntamente com o inserto. Foram utilizados 1 U de T4 DNA Ligase, 2 µL do tampão da enzima (10 vezes concentrado), 250 ng de cada vetor, 250 ng do inserto e água ultrapura q.s.p 20 µL. Os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, células competentes de *E. coli* (cepa DH5α) foram transformadas por choque térmico, plaqueadas em meio LB com ampicilina e o DNA plasmidial das mesmas foi extraído. A ligação do inserto nos vetores de clonagem foi verificada por meio de PCR nas mesmas condições citadas acima, utilizando o DNA plasmidial extraído de *E. coli* como molde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O plamídeo pBSK contendo o cDNA da proinsulina humana foi utilizado como molde em reação de PCR, na qual foram utilizados iniciadores específicos para as extremidades do gene *ProINS*. A Figura 1 mostra a amplificação de um fragmento de DNA com tamanho correspondente ao inserto (300 bp).

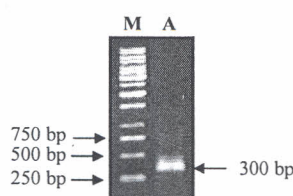


Figura 1: Amplificação do fragmento do cDNA da insulina humana. (M) Marcador de peso molecular 1Kb (Biotools) e (A) cDNA da insulina humana amplificado.

Após a reação de ligação do inserto nos vetores de clonagem, realizou-se PCR com os iniciadores complementares ao gene *ProINS*. A Figura 2, raias 1 a 17, mostra não ter havido nenhuma amplificação de fragmento de DNA com tamanho correspondente ao gene *ProINS* (300 bp), indicando não ter ocorrido a ligação do inserto em nenhum dos vetores de clonagem utilizados.

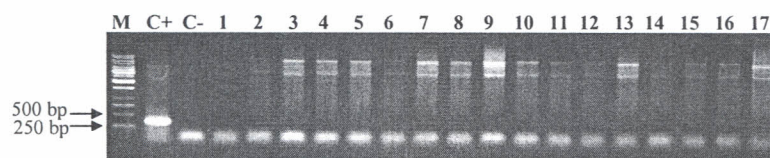


Figura 2: Gel de agarose (0,8%) correspondente a uma reação de PCR para confirmação de clonagem. (M) Marcador de peso molecular 1Kb (Biotools); (C+) controle positivo (pBSK); (C-) controle negativo (reação sem DNA) e (1-17) DNA plasmidial de colônias obtidas após a reação de ligação.

A análise das seqüências dos iniciadores HUIN3'*NotI* (5'-CAGCGGCCGCTTAAATGTATACCCAGAGACA-3') e HUIN5'*BamHI* (5'-CAGGATCCATGGCCCTGTGGATGCGCTT-3') sugere que a não obtenção de plasmídios recombinantes pode ter ocorrido devido a quantidade de nucleotídeos flanqueando o sítio de restrição *NotI* na extremidade 5'. Existem relatos de que seis nucleotídeos flanqueando este sítio ao lado 5' são suficientes para uma restrição bem sucedida com posterior clonagem do fragmento gerado (Pando et al. 2003). Porém, de acordo com o catálogo do fabricante das enzimas utilizadas - New England Biolabs Inc. (New England Biolabs 2002-2003 Catalog & Technical Reference), a enzima *NotI* necessita de no mínimo uma seqüência adicional de dez nucleotídeos (AAGGAAAAA) situada ao lado 5' da seqüência reconhecida pela enzima para obter uma clivagem de 90% das moléculas com sítio *NotI* em uma reação incubada durante vinte horas a 37° C.

CONCLUSÕES: Os iniciadores HUIN3'*NotI* e HUIN5'*BamHI* são eficientes para amplificação do gene *ProINS* a partir do plasmídeo pBSK, nas condições de PCR descritas acima. - A estratégia de utilizar seqüências flanqueadoras nos iniciadores precisa ser revista, uma vez que o resultado esperado não foi obtido. Talvez procurar uma alternativa à endonuclease *NotI*.

AGRADECIMENTOS: À Alyne de Oliveira Silva, José Santos Gomes Filho, FAPERJ e TECNORTE.

REFERENCIAS

- Haq, T. A., Mason, H. S., Clements, J. D., Arntzen, C. J. (1995). *Science*; 268(5211): 714-717.
- Mason, H. S, Lam, D. M-K., Arntzen, C. J. (1992). *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*; 89: 11745-11749.
- Mason, H. S., Ball, J. M., Shi, J-J., Jiang, X., Estes, M. K., Arntzen, C. J. (1996). *E Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*; 93: 5335-5340.
- Nykiforuk, C. L.; Boothe, J. G.; Murray, E. W.; Keon, R. G.; Goren, H. J.; Markley, N. A.; Moloney, M. M. (2006). *Plant Biotechnology Journal*; 4(1): 77-85.
- Pando, M. J.; Gardiner, C. M; Gleimer, M.; McQueen, K. L.; Parham, P. (2003). *The Journal of Immunology*; 171: 6640-6649.