



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

ISADORA ARCANJO GORI

***Lovelace's Note in Gene: Construção de um circuito de regulação
autônomo e temporal da expressão gênica***

Araraquara, SP

2023

ISADORA ARCANJO GORI

***Lovelace's Note in Gene: Construção de um circuito de regulação
autônomo e temporal da expressão gênica***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Danielle Biscaro Pedrolli

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Milca Rachel da Costa
Ribeiro Lins

Araraquara, SP

2023

G669I Gori, Isadora Arcanjo.
Lovelace's Note in Gene: Construção de um circuito de regulação autônomo e temporal da expressão gênica / Isadora Arcanjo Gori. – Araraquara, 2023.
69 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.
Coorientadora: Milca Rachel da Costa Ribeiro Lins.

1. Biologia sintética. 2. *BioBricks*. 3. Sistema biológico complexo.
4. Armazenamento de dados em DNA . I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Lins, Milca Rachel da Costa Ribeiro, coorient. III. Título.

ISADORA ARCANJO GORI

***LOVELACE'S NOTE IN GENE: CONSTRUÇÃO DE UM CIRCUITO DE REGULAÇÃO
AUTÔNOMO E TEMPORAL DA EXPRESSÃO GÊNICA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Aprovado em Araraquara, ____ de _____ de _____

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Danielle Biscaro Pedrolli, Presidente

Ms^ª. Laura Araujo da Silva Amorim, Membro

Ms. Guilherme Engelberto Kundlatsch, Membro

Dedicatória

Querida versão criança da Isadora,

Este trabalho de conclusão de curso é dedicado a você, que sempre sonhou em se tornar cientista e engenheira.

Ao longo desses anos, muitas coisas aconteceram, mas você sempre teve a coragem de se dedicar aos estudos e de enfrentar os desafios que surgiam em seu caminho, mesmo quando isso não era fácil.

Hoje, é com grande orgulho que dedico este trabalho a você. Espero que, ao ler este trabalho, você se sinta ainda mais motivada a continuar lutando por seus sonhos e a perseguir seus objetivos.

Acredito que a ciência pode transformar o mundo. O seu amor pela ciência e sua insaciável curiosidade é uma das suas maiores virtudes, e eu tenho certeza de que este trabalho seria impossível sem a sua inspiração.

Com amor,

Isadora.

Agradecimentos

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a pessoas muito especiais que estiveram ao meu lado em todos os momentos e contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus pais, Luciana e Reinaldo, agradeço por todo amor e suporte durante toda minha vida. Sempre me apoiando em todos meus sonhos e decisões, além de me incentivarem a dar o meu melhor e ser a melhor que eu puder. Sou muito grata por ter vocês como meus pais, inspirações e amigos.

A minha irmã, Julia, que é minha melhor amiga e maior incentivadora, agradeço por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, me motivar a perseguir meus objetivos e estar junto na jornada das bioengenharias comigo. Sua companhia e parceria são fundamentais para mim.

Ao Vítor, que esteve ao meu lado durante toda a graduação, inclusive, durante o processo de realização deste trabalho, agradeço por todo o amor, companheirismo e compreensão. Muito obrigada por ser aconchego e força, ao mesmo tempo.

Ao Buzz, desde que chegou esteve ao meu lado, agradeço por me alegrar nos momentos mais difíceis e por ser uma fonte constante de amor e carinho.

Aos meus avós, que sempre me inspiraram com suas histórias de vida e me deram exemplos de perseverança e determinação, agradeço por todo o amor, apoio e incentivo.

A todos vocês, minha família, agradeço por serem a minha base, minha fonte de amor e motivação em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, essa conquista não seria possível.

Agradeço também aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando e me proporcionando boas risadas e papos, dando suporte emocional e compartilhando conhecimentos ao longo da minha graduação, apesar de grande parte de vocês serem da pós-graduação. Sua amizade foi fundamental para tornar esta jornada acadêmica mais leve. Deixo aqui uma menção honrosa ao Celso, minha dupla de laboratório, com quem dividi conquistas e frustrações ao longo de dias inteiros durante quase 2 anos.

Ao Flávio Picheli, técnico do Laboratório de Engenharia Genética, que durante todos os longos dias que passei dentro do laboratório de Biologia Sintética me prestou todo tipo de suporte e ajuda.

Às minhas orientadoras, Danielle e Milca, por todo o suporte, paciência e dedicação durante a realização deste trabalho. Sem a orientação de vocês, não teria sido possível alcançar os resultados obtidos. Agradeço também pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de trabalhar com vocês.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e ao Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, que me forneceu educação gratuita e de qualidade durante 6 anos muito importantes para meu desenvolvimento acadêmico, social, pessoal e profissional. E ao CNPq pelo fomento à minha pesquisa.

Por fim, agradeço a todas as mulheres cientistas que lutaram e lutam diariamente por reconhecimento e igualdade de oportunidades na área da ciência. Continuem a inspirar e motivar outras mulheres, como eu, a seguir seus sonhos e a superar os desafios que a vida apresenta.

Meus sinceros agradecimentos e todo meu amor!

Resumo

A biologia sintética é um ramo interdisciplinar que mescla a biologia, engenharia e informática com o propósito de conceber sistemas biológicos artificiais que cumpram funções específicas. A estratégia para tal é a construção de partes biológicas modularizáveis e padronizadas, denominadas *BioBricks*, que possam ser utilizadas para criar organismos ou sistemas biológicos. Neste contexto, o presente trabalho de conclusão de curso buscou investigar como um sistema biológico complexo, produzido e expresso em *Escherichia coli*, pode atuar como *hardware* para o armazenamento de dados. Para tal, foram construídos os plasmídeos encarregados dos sistemas Ativador - Repressor e Repórter, e promovida a clonagem em bactéria. Os processos de ativação e repressão foram construídos com base na ferramenta CRISPR, o que permite que múltiplos processos de regulação sejam desenvolvidos de forma simples, rápida e programável. Em suma, a utilização da biologia sintética na construção de circuitos genéticos autônomos representa um potencial promissor para avanços na regulação temporal da expressão gênica.

Palavras-chave: Biologia sintética. *BioBricks*. Sistema biológico complexo. Armazenamento de dados em DNA.

Abstract

Synthetic biology is an interdisciplinary field that merges biology, engineering, and informatics to design artificial biological systems that perform specific functions. The strategy for this is the construction of modular and standardized biological parts, called BioBricks, that can be used to create organisms or biological systems. In this context, this undergraduate thesis aimed to investigate how a complex biological system, produced, and expressed in *Escherichia coli*, can act as hardware for data storage. To this end, plasmids responsible for the Activator - Repressor and Reporter systems were constructed and cloned into bacteria. The activation and repression processes were built based on the CRISPR tool, which allows multiple regulatory processes to be developed in a simple, fast, and programmable way. In summary, the use of synthetic biology in the construction of autonomous genetic circuits represents a promising potential for advancements in the temporal regulation of gene expression.

Keywords: Synthetic biology. BioBricks. Molecular biology. Complex biological system. DNA data storage.

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração esquemática dos módulos de controle e resposta.	23
Figura 2. Plasmídeo pSB1A3, com origem de replicação para <i>E. coli</i> , marca de resistência para ampicilina e as sequências referentes a PJ23100_tetR (sentido reverso) e Ptet_SpdCas9_AsiA.	30
Figura 3. Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para <i>E. coli</i> , marca de resistência para canamicina e as sequências referentes a target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_gRNA-0.	30
Figura 4. Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para <i>E. coli</i> , marca de resistência para canamicina e as sequências referentes a target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_RiboJ_gRNA-0.	32
Figura 5. Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para <i>E. coli</i> , marca de resistência para canamicina e as sequências referentes a target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_gRNA-1.	32
Figura 6. Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para <i>E. coli</i> , marca de resistência para canamicina e as sequências referentes a target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_RiboJ_gRNA-1.	32
Figura 7. Produtos da PCR da sequência Ptet_SpdCas9 (4327pb) analisados por eletroforese em gel de agarose.	33
Figura 8. Produto da PCR da sequência PJ23100_tetR (797pb) analisado em eletroforese em gel de agarose.	34
Figura 9. Análise em eletroforese dos produtos da digestão do plasmídeo pSB1A3 (2100bp) contendo as construções Ptet_SpdCas9 + PJ23100_TetR (5100pb).	35
Figura 10. Análise em eletroforese da reação de correção do gBlock.	36

Figura 11. Produtos de digestão do plasmídeo pSB1K3 (2,2kb) contendo 9.1 (248bp), 9.2 (322bp), 10.1 (248bp) e 10.2 (322pb) com enzimas EcoRI e PstI analisados em eletroforese de gel de agarose.....	37
Figura 12. Produtos resultantes da digestão com as enzimas EcoRI e PstI do plasmídeo pSB1K3 (2200pb) contendo as construções 9.1+11 (578pb) e 9.2+11 (652pb) após corrida de eletroforese.	38
Figura 13. Plasmídeo pSB1K3 (2200bp) 10.1+11 (578bp) 10.2+11 (652bp) digerido com as enzimas EcoRI e PstI e submetido a eletroforese em gel de agarose.....	39
Figura 14. Plasmídeo pSB1K3 (2200bp) contendo o fragmento 9.1+11+8 (877bp) foi digerido pelas enzimas EcoRI e PstI e analisado por eletroforese em gel de agarose.	40
Figura 15. Plasmídeo pSB1K3 (2200bp) com 9.2+11+8 (951bp) digerido pelas enzimas EcoRI e PstI, analisado por eletroforese em gel de agarose.....	41
Figura 16. Plasmídeo pSB1K3 (2200bp) com fragmento 102+11+8 (951bp), digerido pelas enzimas EcoRI e PstI e analisado por eletroforese em gel de agarose.....	42
Figura 17. Placas de petri para teste da resistência fornecida pelos plasmídeos pSB1A3 (ampicilina) e pSB1K3 (canamicina) presentes nas construções clonadas.	43
Figura 18. Produtos da digestão dos plasmídeos pSB1K3+9.1+8+11 (3000bp), pSB1K3+9.2+11+8 (3100bp), pSB1K3+10.2+11+8 (3100bp) e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA (7500bp) analisados em eletroforese em gel de agarose.	44
Figura 19. Curva de crescimento das bactérias <i>E. coli</i> BL21 sem construção e com as construções referentes a 9.1 e 9.2.....	45
Figura 20. Gráfico do desenvolvimento da densidade óptica (OD600) do cultivo de <i>Escherichia coli</i> BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.1+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA.....	45

Figura 21. Gráfico do desenvolvimento da fluorescência (FLU) basal do cultivo de *Escherichia coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.1+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA.....46

Figura 22. Gráfico do desenvolvimento da densidade óptica (OD) do cultivo de *Escherichia coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.2+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA.....46

Figura 23. Gráfico da evolução de fluorescência (FLU) basal em cultura de *E. coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+ 9.2+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA.47

Figura 24. a) Ilustração do funcionamento do sistema na construção correta (transcrição do RNA). b) Ilustração do funcionamento do sistema na construção incorreta (ausência da transcrição do RNA).....48

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1. Enumeração dos gBlocks.	24
Tabela 1. Protocolo de componentes da PCR.....	25
Tabela 2. Protocolo de ciclos PCR.	26
Tabela 3. Protocolo de componentes da reação de Golden Gate.....	26
Tabela 4. Protocolo de ciclos da reação de Golden Gate.....	27
Tabela 5. Protocolo de componentes da reação de digestão por enzimas de restrição.	27
Tabela 6. Protocolo de componentes da reação de ligação de plasmídeo + inserto. ...	28
Tabela 7. Protocolo de componentes da reação de transformação bacteriana.....	29

Lista de Abreviaturas e Siglas

AsiA – Inibidor A de Audrey Stevens

aTc – Anidrotetraciclina

BI – (Z)-3-((1H-benzo[d]imidazol-4-il)metil)-5-(3,5-difluoro-4-hidroxibenzilideno)-2-metil-3,5-di-hidro-4H-imidazol -4-um

bp – Pares de bases nitrogenadas

CRISPR-Cas9 – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Espaçadas) associado à proteína Cas9

CRISPRi – CRISPR de interferencia

CRISPRa – CRISPR de ativação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DFHO – 4-(3,5-difluoro-4-hidroxibenzilideno)-1-metil-5-oxo-4,5-di-hidro-1H-imidazol-2-carbaldeído oxima

E. coli – *Escherichia coli*

gBlocks – "Gapped Blocks" (Blocos Lacunados)

GFP – Proteína Verde Fluorescente

gRNA – Ácido ribonucleico guia

HD – *Hard Drives*

IDs – Identificação

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

kb – Quilopares de bases nitrogenadas

LacI – Proteína repressora lac

LB – Meio de cultura (caldo) de lisogenia

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RFP – Proteína vermelha fluorescente

RNA – Ácido ribonucleico

TetR – Proteínas Repressoras Tet

Sumário

Dedicatória.....	5
Agradecimentos.....	6
Resumo.....	8
Abstract.....	9
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas e Quadros.....	13
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	14
Sumário.....	15
1. Introdução.....	17
2. Revisão Bibliográfica.....	18
2.1. Sistema Ativador – Repressor.....	18
2.2. Sistema Repórter.....	19
3. Desenvolvimento.....	21
3.1. Materiais e Métodos.....	21
3.1.1. Construção das Sequências de DNA.....	23
3.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	25
3.1.3. Reação de Golden Gate.....	26
3.1.4. Reação de Digestão por Enzimas de Restrição.....	27
3.1.5. Reação de Ligação Plasmídeo + Inseto.....	28
3.1.6. Preparação de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetente.....	28
3.1.7. Transformação Bacteriana.....	28
3.1.8. Inóculo.....	29

3.1.9. Confirmação das Clonagens	29
3.2. Resultados	30
3.3. Discussão	49
4. Conclusão	51
Referências	52

1. Introdução

A possibilidade de modularizar e padronizar a biologia, assim como é feito na engenharia, é um tema de grande relevância e interesse para a comunidade científica. A biologia sintética surge como uma alternativa para alcançar essa meta, utilizando o ciclo de "Design - Construção - Teste - Aprendizado" e o conceito de portas lógicas, que manipulam moléculas como sinais de entrada e saída.

O avanço tecnológico e a crescente demanda por armazenamento de dados têm gerado preocupações em relação às reservas finitas de silício, principal material utilizado na fabricação de *Hard Drives* (HDs) (PLUMMER; GRIFFIN, 2001). Assim sendo, o uso do DNA como principal componente dos HDs tem grande potencial para ser o futuro, já que é a molécula com maior capacidade de armazenamento de dados conhecida, sendo ela de 455 exabytes por grama de DNA de fita simples, segundo Church *et al.* (2012), e sua aplicação em tecnologia de armazenamento pode ter um impacto significativo em diversos segmentos de desenvolvimento tecnológico.

Hoje, podemos armazenar dados em material genético devido aos avanços da biotecnologia. Esses avanços nos permitem usar ferramentas moleculares mais precisas e eficazes para controlar a expressão de genes e RNAs (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Uma dessas ferramentas é o sistema CRISPR-Cas9, que foi descoberto em bactérias como um mecanismo de defesa contra infecções virais (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). Esse sistema é composto pela enzima Cas9 e pelos RNAs CRISPR (crRNA) e trans-ativador (tracrRNA). Na engenharia genética, esses dois RNAs são combinados em um RNA guia (gRNA) com dois componentes (JINEK *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foram utilizadas técnicas de biologia molecular e os sistemas de CRISPRi e CRISPRa (GILBERT *et al.*, 2013) para criar um sistema autônomo e temporalmente controlado para emissão de fluorescência, que poderá ser interpretado como o código binário utilizado na computação atual. Este trabalho busca explorar o potencial do CRISPR-Cas9 como uma ferramenta para a criação de dispositivos biológicos para aplicações futuras através de como a biologia sintética tem revolucionado a forma como entendemos e manipulamos sistemas biológicos complexos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Sistema Ativador – Repressor

O sistema CRISPR-Cas é uma tecnologia de edição genética baseada na defesa imunológica de bactérias contra vírus e outros invasores genéticos. Esta ferramenta tem revolucionado a pesquisa em diversas áreas da biologia molecular, incluindo a biologia sintética, a engenharia genética, a biotecnologia, e a terapia gênica, desde sua descoberta em 2012 (MALI *et al.*, 2013). A proteína Cas9 é o componente central do sistema, que é guiada por um RNA guia para cortar sequências específicas de DNA, permitindo a modificação do genoma de maneira precisa e eficiente (DOUDNA *et al.*, 2014).

A Cas9 pode ser modificada com duas mutações em seus sítios ativos de clivagem para permitir a ligação a uma região de DNA sem realizar a clivagem, podendo ser usada como uma plataforma de direcionamento para controlar a expressão gênica (KIM *et al.*, 2016), tornando-se, então, uma ferramenta de ativação (CRISPRa) ou repressão (CRISPRi) gênica conhecida como dCas9 (DONG *et al.*, 2021).

Como estratégia para aumentar a expressão gênica de um gene, pode-se fusionar a proteína dCas9 a uma proteína ativadora, como é o caso da AsiA, uma proteína anti- σ^{70}

reguladora de genes que atua como um co-ativador de transcrição para os genes que codificam proteínas do bacteriófago T4. Essa fusão permite que a proteína AsiA seja direcionada especificamente para o promotor do gene desejado, onde se liga e aumenta em até 200 vezes sua atividade, resultando em maior produção de proteína a partir do gene desejado, como observado no estudo de Ho *et al.* (2020).

A enzima dCas9 é utilizada em técnicas de CRISPRi (CRISPR *interference*) e CRISPRa (CRISPR *activation*). No CRISPRi, a Cas9 é guiada por um gRNA à sequência de DNA do gene a ser silenciado, impedindo que a RNA polimerase se ligue e inicie a transcrição desse, ou bloqueando a passagem da polimerase. Essa função pode ser usada para estudar o papel de um gene em particular, já que a sua inibição pode ajudar a determinar a sua importância em diferentes processos biológicos. Já o CRISPRa promove a ativação da transcrição do gene-alvo, trazendo consigo proteínas ativadoras que se ligam à região promotora do gene para aumentar a sua expressão (CUI *et al.*, 2018). Para essa função foi utilizada a proteína asiA (*Inibidor A de Audrey Stevens*) (ORSINI *et al.*, 1993).

2.2. Sistema Repórter

A utilização de aptâmeros de RNA tem sido amplamente investigada devido às suas propriedades únicas. Essas moléculas de RNA de cadeia única possuem a capacidade de adotar conformações tridimensionais específicas, conferindo-lhes alta afinidade e seletividade para se ligarem a alvos moleculares, como proteínas, íons ou pequenas moléculas (ELLINGTON *et al.*, 1990). A versatilidade desses aptâmeros de RNA tem permitido sua aplicação em diversas áreas da pesquisa científica. Sua capacidade de ajustar especificidade e afinidade torna-os uma valiosa ferramenta para estudos em biotecnologia e medicina, abrindo novas possibilidades no desenvolvimento de terapias personalizadas, diagnósticos mais precisos (KANG *et al.*, 2012)

e, principalmente, a ação como repórteres, visando a detecção de moléculas alvo em um determinado sistema (ELLINGTON *et al.*, 1990; BAI *et al.*, 2020).

Quando um aptâmero de RNA se liga ao seu alvo, como um fluoróforo, sua estrutura tridimensional é alterada, podendo ser detectado pela emissão de fluorescência (EYDELER *et al.*, 2009). Essas propriedades fazem dos RNA repórteres formados por aptâmeros uma ferramenta valiosa para monitorar processos biológicos em tempo real e em vários contextos, incluindo células vivas e tecidos (SONG *et al.*, 2012).

Os aptâmeros de RNA em conjunto com os fluoróforos se mostram extremamente interessantes para a função de repórteres em aplicações que exigem alta resolução temporal e espacial, uma vez que o tempo para a emissão de sua fluorescência e seu tempo de vida são menores do que o de uma proteína fluorescente, como a proteína verde fluorescente (GFP), por exemplo. Além disso, segundo Toseland (2013), o espectro de excitação e emissão dos fluoróforos são mais amplos, seu tamanho é menor, possui maior foto-estabilidade e, em muitos casos, apresentam maior brilho.

3. Desenvolvimento

3.1. Materiais e Métodos

No presente trabalho, foram utilizadas técnicas de biologia molecular para a construção e testagem de um circuito gênico. Para tal, as bactérias *E. coli* Top10 foram utilizadas para a construção e replicação dos plasmídeos, enquanto a BL21 foi utilizada para a expressão e teste do circuito. Durante o processo, foi empregado meio de cultura de lisogenia (LB) (composição no apêndice 5) em proporção 10:10:5 tanto ágar quanto caldo, acrescido dos antibióticos ampicilina (50 mg/mL) e canamicina (50 mg/mL), individualmente ou em conjunto, quando necessário.

Os procedimentos empregados foram baseados em conhecimentos e técnicas de biologia molecular, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR) com enzima de alta fidelidade, digestão de DNA por enzimas de restrição, ligação de DNA pela T4 DNA ligase, transformação por choque térmico e eletroporação, reação de Golden Gate, eletroforese em gel de agarose e sequenciamento de Sanger. Todos esses processos foram descritos em detalhes nas subseções seguintes.

Os plasmídeos utilizados no presente estudo foram o pSB1K3 (AUSTIN CHE, 2020) e o pSB1A3 (RESHMA SHETTY, 2020), os quais apresentam origem de replicação de múltiplas cópias em *E. coli* derivada do plasmídeo pMB1 (SGORBATI *et al.*, 1982) e sítios de clonagem do tipo *BioBrick* prefixo e sufixo. Além disso, ambos os plasmídeos apresentam o gene para proteína vermelha fluorescente (RFP) como indicador de clonagem. A única diferença entre os plasmídeos é o gene de resistência a antibiótico, sendo o primeiro Canamicina e o segundo Ampicilina.

O sistema foi dividido em módulo de controle e módulo de resposta de um sistema CRISPRa – CRISPRi. O módulo de controle é responsável pela maquinaria de regulação do processo e é composto pela proteína de fusão dCas9-asiA, pela proteína repressora TetR (HILLEN; BERENS, 1996) e pelos RNAs guia (gRNAs). Este módulo é formado pelas seguintes unidades de transcrição: PJ23100_tetR, Ptet_dCas9-AsiA e PT7-lacO_gRNA-0 ou PT7-lacO_gRNA-1.

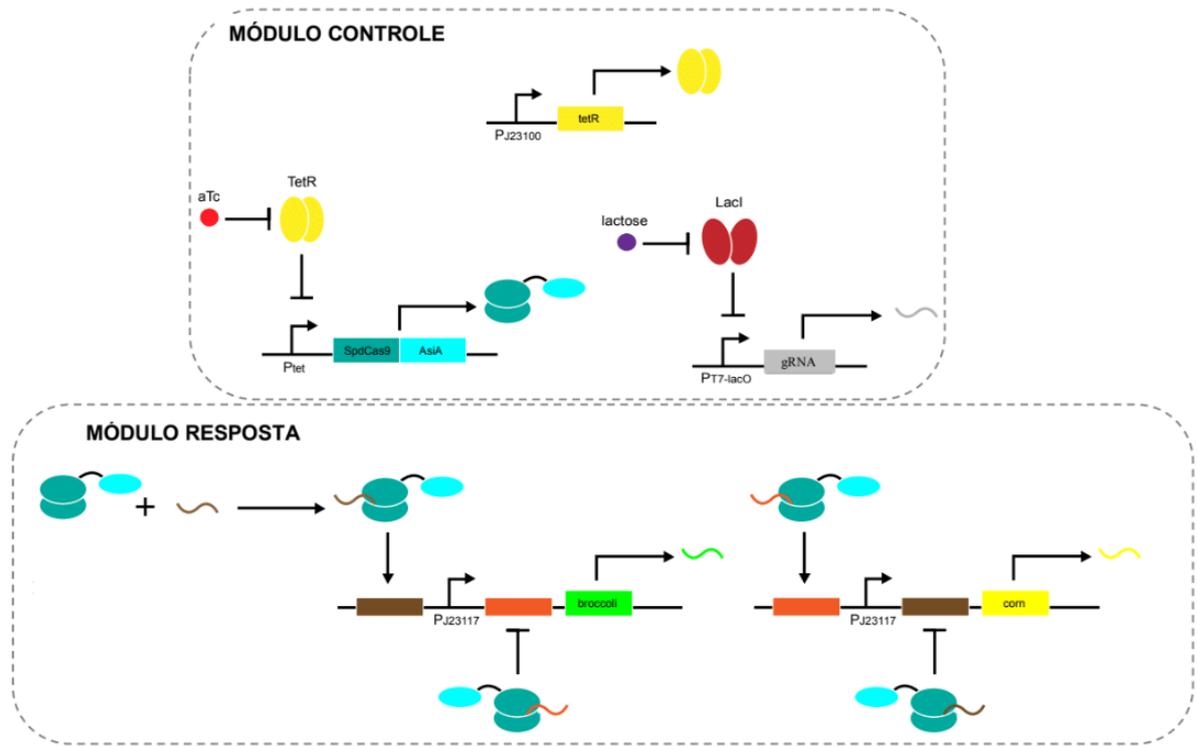
Já o módulo de resposta é responsável pela resposta do sistema e é composto pelos genes dos RNAs broccoli (FILONOV *et al.*, 2014) e corn (KIM *et al.*, 2019). Os RNAs formam aptâmeros capazes de se ligar a fluoróforos específicos. Diferentemente da forte fluorescência que apresentam quando ligados, os RNAs e os fluoróforos quando isolados não apresentam fluorescência representativa. Os RNAs broccoli e corn foram escolhidos por emitirem fluorescência em comprimentos de onda diferentes após conjugação com os fluoróforos.

Esse módulo é composto pelas seguintes unidades de transcrição: target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli e target-1a_PJ23117_target-0i_corn. Os alvos target-0a e target-1a são ativados pelo sistema CRISPRa, enquanto os alvos target-0i e target-1i são reprimidos pelo sistema CRISPRi. O promotor PJ23117 é um promotor fraco (com força de 6% em relação ao PJ23100 ([BBa_J23100](#))) da família de promotores constitutivos Anderson para *E. coli*.

Em resumo, o sistema CRISPRa – CRISPRi é composto pelo módulo de controle, responsável pela maquinaria de regulação do processo, e pelo módulo de resposta, responsável pela resposta do sistema. O sistema é composto por diversas unidades de transcrição que envolvem promotores constitutivos e regulados, proteínas repressoras e ativadoras, RNAs guia e aptâmeros capazes de emitir fluorescência.

Para melhor compreensão do funcionamento do sistema, o mesmo foi ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Ilustração esquemática dos módulos de controle e resposta.



No módulo de controle, a produção da proteína ativadora AsiA fusionada à dCas9 de *Streptococcus pyogenes* (*SpdCas9*) é induzida por aTc, enquanto a produção do gRNA (0 ou 1) é induzida por lactose. As cores correspondentes indicam a ligação entre os pares gRNA e seus alvos nos promotores. Já no módulo de resposta, os gRNAs-0 e -1 ativam e desativam os RNAs broccoli e corn, alternando suas atividades. Novamente, as cores dos gRNAs combinam com seus alvos nos promotores.

Fonte: próprio autor, 2023.

3.1.1. Construção das Sequências de DNA e dos Plasmídeos

Dois modelos de plasmídeo foram construídos, o primeiro deles é constituído pelo pSB1A3 como vetor e o gene resultante da fusão das proteínas *SpdCas9* (BBa_K3156891) e AsiA, controlado pelo promotor Ptet (BBa_R0040); o segundo é constituído pelo pSB1K3, como vetor, contendo a sequência codificadora de um dos RNAs guias, controlado pelo promotor PJ23117 contendo as sequências alvo de ativação ou inativação e os genes dos RNAs

broccoli e corn, cujos produtos, quando ligados aos fluoróforos BI e DFHO, respectivamente, emitem fluorescência.

O RNA broccoli é um aptâmero capaz de emitir fluorescência quando ligado ao fluoróforo DFHBI; enquanto o RNA corn é um aptâmero capaz de emitir fluorescência quando ligado ao fluoróforo DFHO. Ambos representam uma resposta mais rápida como repórteres, já que não precisam passar pelo processo de tradução e apresentam rápida degradação em bactérias (comparado às proteínas fluorescentes como repórteres) (TOSELAND, 2013).

A construção *in silico* das sequências de DNA foi realizada usando o software Benchling. Para simplificar a identificação das sequências dos insertos (gBlocks), elas foram enumeradas e os tamanhos em pares de bases (bp) foram registrados no Quadro 1. As sequências referentes aos IDs 7, 9.1, 9.2, 10.1, 10.2 e 11 sofreram adição de sítios de clonagem do padrão BioBrick, já as sequências de 8.1 e 8.2 foram projetadas no padrão Golden Gate (Weber *et al.*, 2011), com o sítio de restrição da enzima *BsaI*.

Quadro 1. Enumeração dos gBlocks.

ID	gBlock	Tamanho (bp)
7	AsiA	464
8.1	target-0a_J23117_target-1i_broccoli	234
8.2	target-0a_J23117_target-1i_broccoli	193
9.1	PT7lacO_gRNA0	260
9.2	PT7lacO_RiboJ-gRNA0	334

10.1	PT7lacO_gRNA1	260
10.2	PT7lacO_RiboJ-gRNA1	334
11	target-1a_PJ23117_target-0i_corn	375

Fonte: próprio autor, 2023

Ao gene da *SpdCas9* foi adicionado o terminador *rrnB T1* (BBa_B0010); já ao gene da *TetR* (BBa_C0040), um terminador bidirecional (BBa_B1006). Os genes dos RNAs Broccoli e Corn, e dos RNAs guias 0 e 1 receberam o terminador T0 (BBa_K864600).

A sequência de PJ23100, um promotor forte da família de promotores constitutivos Anderson para *E. coli.*, e da *TetR*, cuja ação pode ser revertida por tetraciclina ou anidrotetraciclina (aTc), foi construída na fita reversa dos plasmídeos, também com o padrão de clonagem BioBrick. Ao mesmo tempo que a *Ptet_SpdCas9* foi clonada com sítios das enzimas *SpeI* e *PstI*, de maneira a possibilitar a clonagem com fusão da proteína *asiA* na extremidade C-terminal da *Cas9*.

Todas as construções utilizadas neste trabalho de conclusão de curso foram confeccionadas pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies) no formato gBlocks.

3.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todas as PCRs foram realizadas baseando-se nas seguintes proporções para reação de 50µL:

Tabela 1. Protocolo de componentes da PCR.

Componente	Quantidade
------------	------------

Molde de DNA	40 – 250 ng
Tampão 5x	10µL
Primer Forward (10µM)	2,5µL
Primer Reverse (10µM)	2,5µL
dNTPs	1µL
DNA Polimerase	0,5µL
H ₂ O	Volume necessário para completar 50µL

Fonte: próprio autor, 2023.

E os ciclos de temperaturas foram realizados nos seguintes tempos e ciclos:

Tabela 2. Protocolo de ciclos PCR.

Passo do Ciclo	Quantidade de Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	1	98°C	30 segundos
Desnaturação	30	98°C	5 – 10 segundos
Anelamento		45-72°C	10 – 30 segundos
Extensão		72°C	15 – 30 segundos
Extensão Final	1	72°C	5 – 10 minutos

Fonte: próprio autor, 2023.

3.1.3. Reação de Golden Gate

Todas as reações de Golden Gate foram realizadas baseando-se nas seguintes proporções para reação de 40µL:

Tabela 3. Protocolo de componentes da reação de Golden Gate.

Componente	Quantidade
T4 DNA Ligase	1µL

T4 Tampão	4 μ L
<i>Bsa</i> I	1 μ L
DNA	400ng
H ₂ O	Volume necessário para completar 40 μ L

Fonte: próprio autor, 2023

E os ciclos de temperaturas foram realizados nos seguintes tempos e ciclos:

Tabela 4. Protocolo de ciclos da reação de Golden Gate.

Passo do Ciclo	Quantidade de Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação da Endonuclease	30-60	37°C	5 minutos
Ativação da Ligase	60	16°C	5 minutos
Inativação	–	65°C	5 minutos

Fonte: próprio autor, 2023.

3.1.4. Reação de Digestão por Enzimas de Restrição

Todas as reações de digestão por enzimas de restrição foram realizadas baseando-se nas seguintes proporções para reação de 50 μ L:

Tabela 5. Protocolo de componentes da reação de digestão por enzimas de restrição.

Componente	Quantidade
DNA	1000 ng
Enzima de restrição	1 μ L
FastAp	1 μ L (no caso de digestão de plasmídeos)
Tampão	5 μ L
H₂O	Volume necessário para completar 50 μ L

Fonte: próprio autor, 2023.

3.1.5. Reação de Ligação Plasmídeo + Inserto

Todas as reações de digestão por enzimas de restrição foram realizadas baseando-se nas seguintes proporções para reação de 10 μ L:

Tabela 6. Protocolo de componentes da reação de ligação de plasmídeo + inserto.

Componente	Quantidade
Plasmídeo	25ng
Inserto	Calculado através da plataforma Ligation Calculator (UNIVERSIDADE DE DUSSELDORF, 2021)
Ligase	1,0 μ L
Tampão	1,0 μ L
H₂O	Volume necessário para completar 10 μ L

Fonte: próprio autor, 2023

3.1.6. Preparação de *Escherichia coli* eletrocompetente

Incubou-se 5mL de pré-inóculo crescido overnight em 450mL de caldo de lisogenia até obter-se uma densidade óptica a 600 nm entre 0,5 e 0,7. Em seguida, as células foram mantidas em gelo por 20 minutos e centrifugadas a 4000 g durante 15 minutos a 4°C, para que depois o sobrenadante fosse descartado e as células ressuspensas em 500mL de glicerol 10%. Após a ressuspensão o passo de centrifugação e ressuspensão em glicerol 10% foi realizado por mais 4 vezes em 250mL, 20mL e 2mL (BIORAD, 2022). A suspensão de células 2mL foi aliqüotada em microtubos e armazenada em ultra-freezer.

3.1.7. Transformação Bacteriana

Todas as reações de transformação foram realizadas baseando-se nas seguintes proporções:

Tabela 7. Protocolo de componentes da reação de transformação bacteriana.

Componente	Quantidade
<i>Escherichia coli</i> eletrocompetente	40 μ L
Plasmídeo	2 μ L

Fonte: próprio autor, 2023.

Os componentes da reação foram adicionados em microtubos e mantidos em temperatura ambiente por 1 minuto, em seguida, transferidos para uma cubeta de 0,2cm de eletroporação gelada, que recebe uma descarga elétrica de 2,5kV (BIORAD, 2022), rapidamente 1mL de caldo SOC (composição no apêndice 5) foi adicionado e a suspensão devolvida para o microtubo. O conteúdo do microtubo foi incubado por 1 hora a 37°C e 220 rpm, e plaqueado em LB ágar suplementado com o devido antibiótico.

3.1.8. Inóculo

Todos os inóculos foram realizados através da coleta de uma colônia isolada proveniente da placa da transformação inoculada em 5mL caldo LB suplementado com 50mg/L do devido antibiótico.

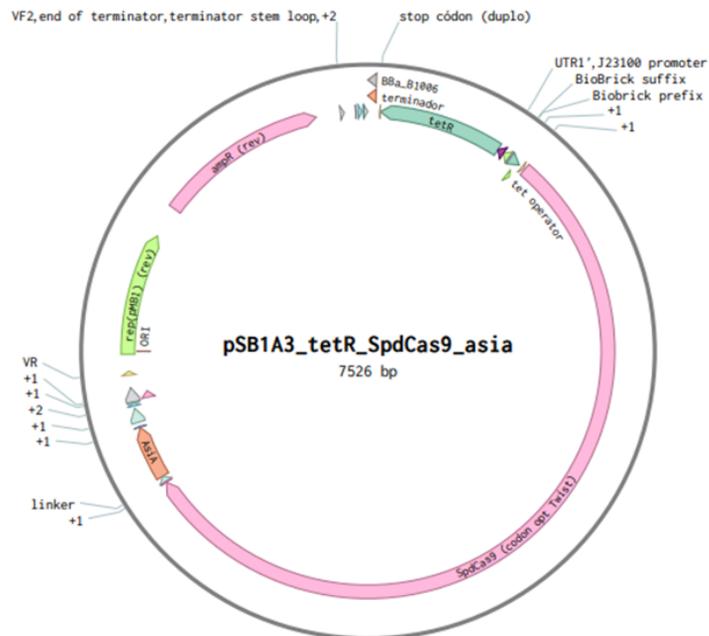
3.1.9. Confirmação das Clonagens

Para confirmar as clonagens, foi utilizado o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System da Promega para extrair o DNA plasmidial das células cultivadas em meio líquido. Os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão com enzimas de restrição adequadas para separar o inserto do plasmídeo, e, em seguida, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos.

3.2. Resultados

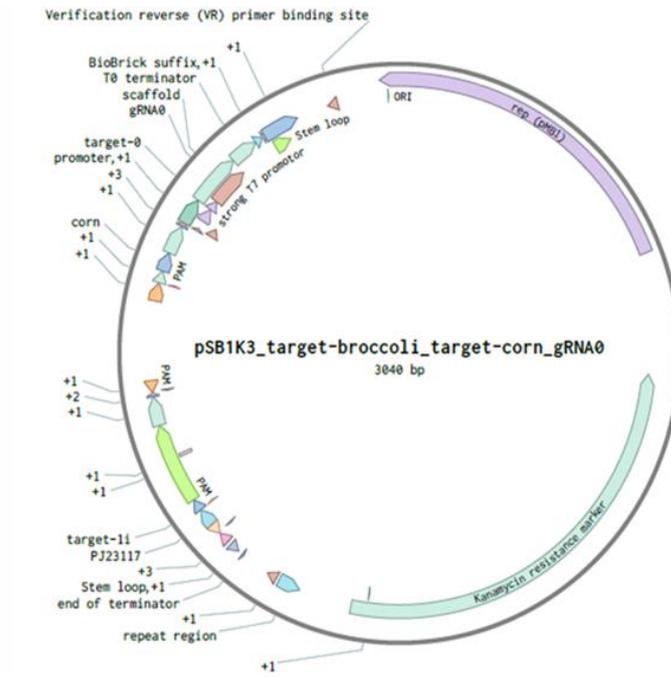
Os plasmídeos construídos com os insertos selecionados apresentaram-se como o primeiro resultado positivo obtido durante o estudo. A construção desses plasmídeos foi realizada utilizando a plataforma Benchling, que permitiu uma abordagem eficiente e precisa para o projeto de sequências genéticas. Os mapas dos plasmídeos resultantes foram gerados e apresentados nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6, fornecendo uma visualização clara da estrutura e dos elementos funcionais incorporados.

Figura 2. Plasmídeo pSB1A3, com origem de replicação para *E. coli*, marca de resistência para ampicilina e as sequências referentes a PJ23100_tetR (sentido reverso) e Ptet_SpdCas9_AsiA.



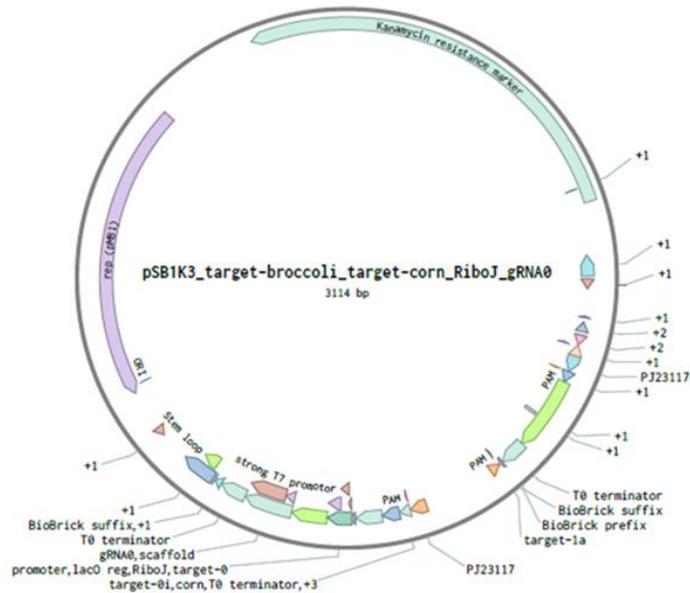
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 3. Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para *E. coli*, marca de resistência para canamicina e as sequências referentes a target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_gRNA-0.



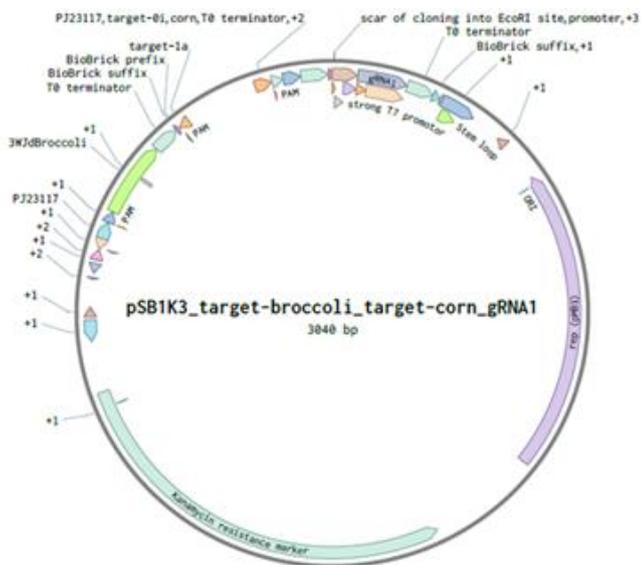
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 4. Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para *E. coli*, marca de resistência para canamicina e as sequências referentes a target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_RiboJ_gRNA-0.



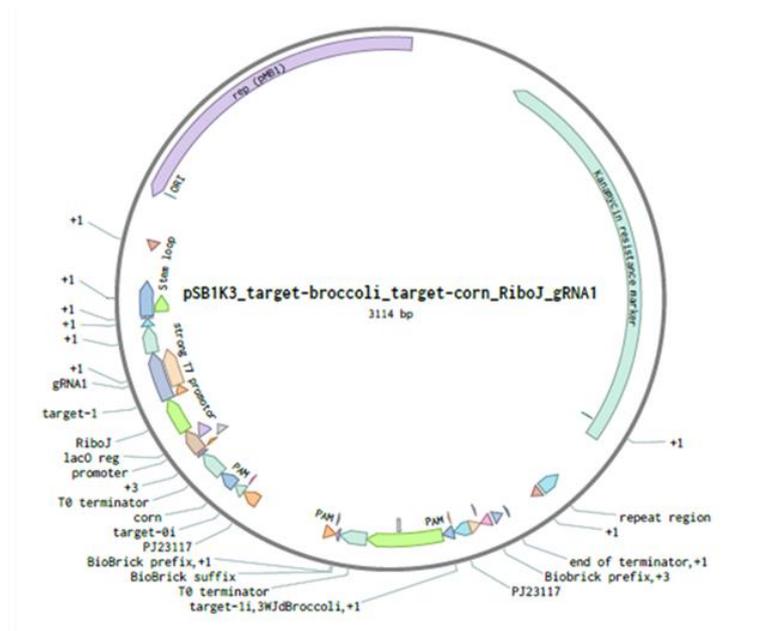
Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 5. Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para *E. coli*, marca de resistência para canamicina e as sequências referentes a target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_gRNA-1.



Fonte: próprio autor, 2023.

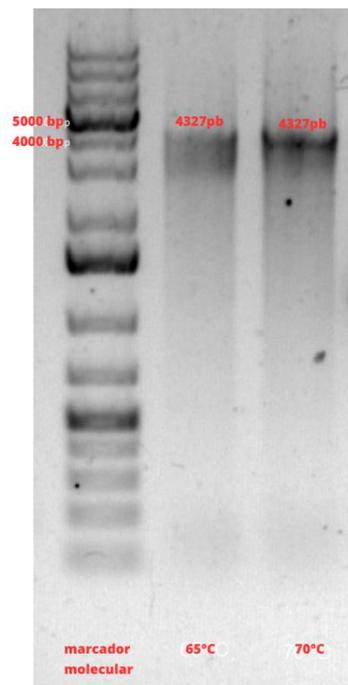
Figura 6. Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para *E. coli*, marca de resistência para canamicina e as sequências referentes a target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_RiboJ_gRNA-1.



Fonte: próprio autor, 2023.

Em seguida, através da reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos 601/602 e 626/627 (Apêndice 1), foi possível confirmar as ampliações da sequência *Ptet_SpdCas9* (4327pb) e *PJ23100_TetR* (797pb), como evidenciado pelas Figuras 7 e 8 após eletroforese em gel de agarose.

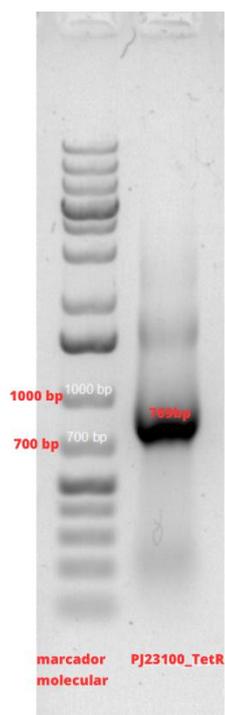
Figura 7. Produtos da PCR da sequência *Ptet_SpdCas9* (4327pb) analisados por eletroforese em gel de agarose.



Eletroforese realizada após reações desenvolvidas com temperaturas de anelamento de 65°C e 70°C (poços 2 e 3 da esquerda para a direita). O marcador de massa molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) se encontra no primeiro poço à esquerda.

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 8. Produto da PCR da sequência PJ23100_tetR (797pb) analisado em eletroforese em gel de agarose.

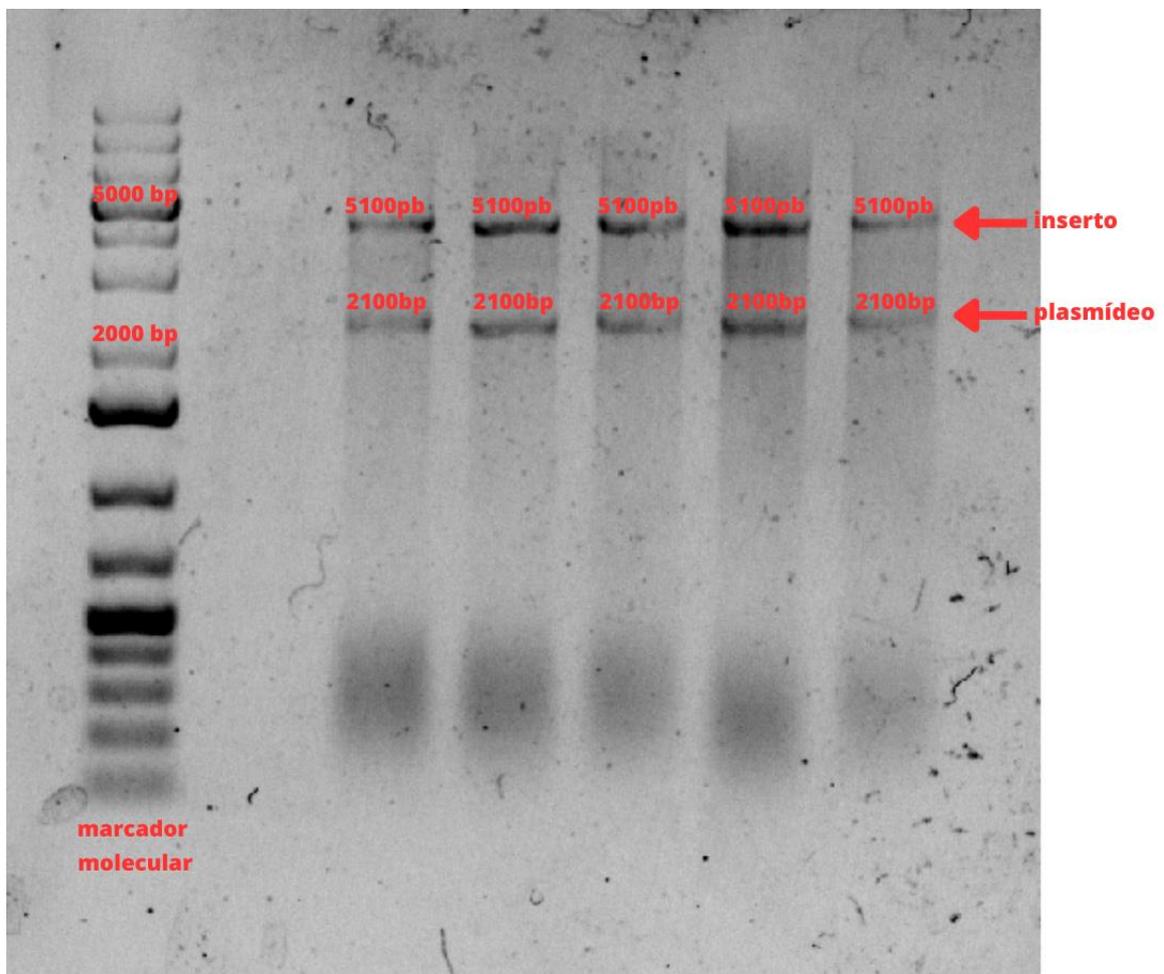


O produto da PCR da sequência PJ23100_tetR (797pb) foi analisado por eletroforese em gel de agarose e se encontra no poço 2 da esquerda para a direita. O marcador de massa molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) se encontra no primeiro poço à esquerda.

Fonte: próprio autor, 2023.

A verificação da clonagem da sequência Ptet_SpdCas9 + PJ23100_TetR (5100 bp) no plasmídeo pSB1A3 (2100 bp) foi realizada por meio da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI*, seguida da análise dos produtos por eletroforese em gel de agarose (Figura 9).

Figura 9. Análise em eletroforese dos produtos da digestão do plasmídeo pSB1A3 (2100bp) contendo as construções Ptet_SpdCas9 + PJ23100_TetR (5100pb).



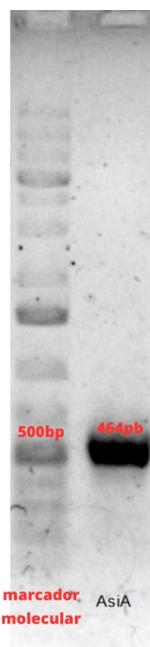
Os produtos da digestão do plasmídeo pSB1A3 (2100bp) contendo as construções Ptet_SpdCas9 + PJ23100_TetR (5100pb) pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* foram analisados por eletroforese em gel de

agarose, e se encontram nos poços 2 a 6. O marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) se encontra no primeiro poço à esquerda.

Fonte: próprio autor, 2023.

Posteriormente, foi planejado inserir a sequência da proteína ativadora *asiA* (464bp) no plasmídeo pSB1A3 contendo a sequência *Ptet_SpdCas9* + *PJ23100_TetR*. No entanto, o gBlock encomendado continha um nucleotídeo adicional, causando um erro de fase de leitura e gerando um códon de parada prematuro, verificado através do software Benchling. Para corrigir esse problema, uma nova reação de PCR contendo 1 ng de molde foi realizada com um novo oligonucleotídeo (635, Apêndice 1), com o objetivo de maximizar a razão entre o produto e o molde, que não poderiam ser separados ao final da reação. Para confirmar a efetividade da reação, uma eletroforese em gel de agarose foi realizada e apresentada na Figura 10.

Figura 10. Análise em eletroforese da reação de correção do gBlock.

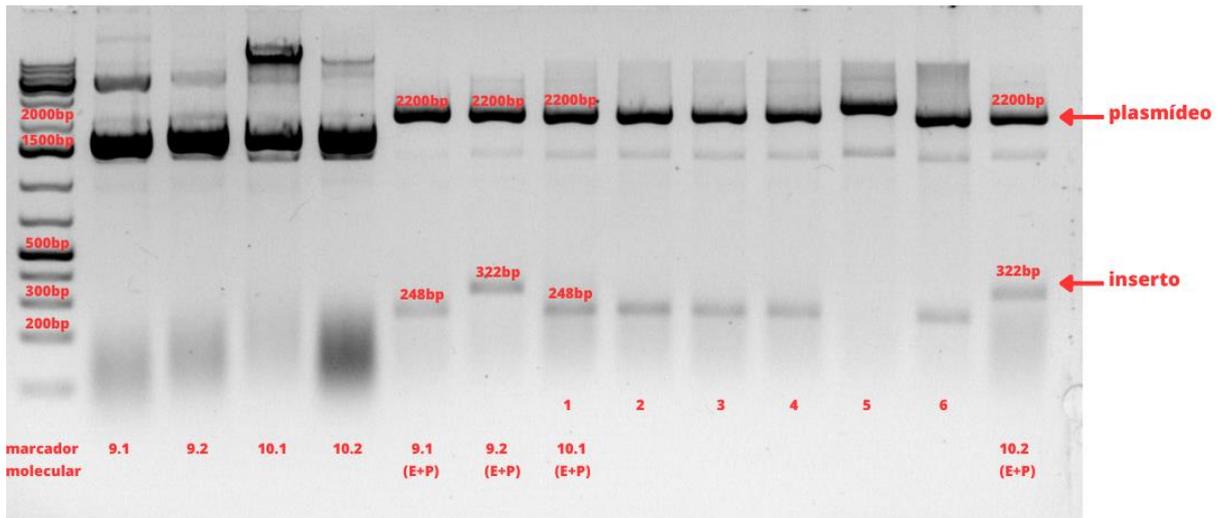


O produto da reação de PCR utilizada para corrigir o gBlock da proteína de ativação *asiA* (464pb) foi analisado por eletroforese em gel de agarose e está representado no segundo poço. O marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) é apresentado no primeiro poço à esquerda.

Fonte: próprio autor, 2023.

As sequências dos gRNAs 9.1, 9.2, 10.1 e 10.2 foram inseridas no plasmídeo pSB1K3. Para verificar a clonagem, o plasmídeo foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, e posteriormente foi realizada uma eletroforese em gel de agarose. O resultado da análise está apresentado na Figura 11, onde todos os poços estão positivos, exceto o poço identificado com o número 5.

Figura 11. Produtos de digestão do plasmídeo pSB1K3 (2,2kb) contendo 9.1 (248bp), 9.2 (322bp), 10.1 (248bp) e 10.2 (322pb) com enzimas *EcoRI* e *PstI* analisados em eletroforese de gel de agarose.

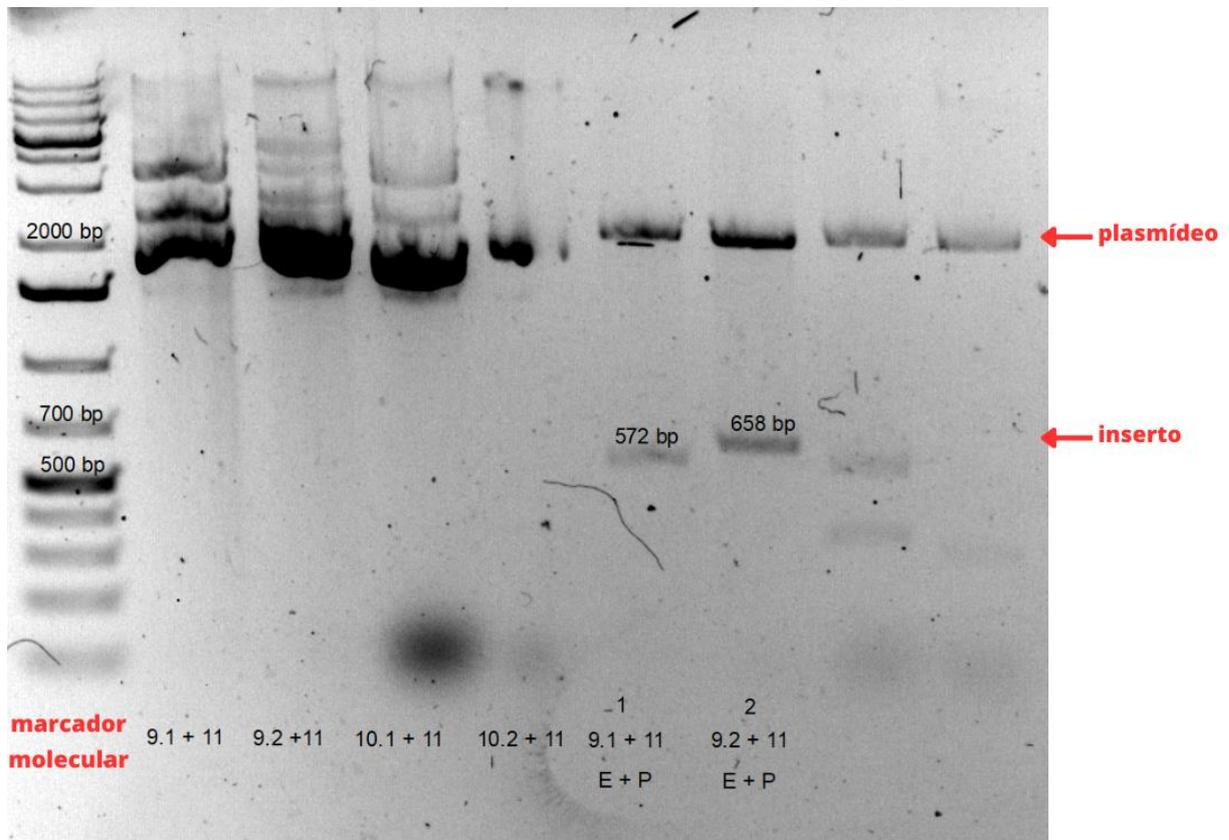


Os produtos da digestão com enzimas *EcoRI* e *PstI* do plasmídeo pSB1K3 (2200pb) contendo as sequências 9.1 (248bp), 9.2 (322bp), 10.1 (248bp) e 10.2 (322pb) foram analisados por eletroforese em gel de agarose. O marcador de massa molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) está no primeiro poço à esquerda e os controles negativos (plasmídeos não digeridos) nos quatro poços seguintes. Todos os poços foram positivos, exceto o indicado pelo número 5.

Fonte: próprio autor, 2023.

A partir das construções dos plasmídeos pSB1K3 com os RNAs guias 9.1, 9.2, 10.1 e 10.2, a sequência de ID 11, referente à ativação do guia 1 e inativação do 0, foi adicionada. Novamente, a confirmação da inserção foi realizada por digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, e uma eletroforese em gel de agarose foi realizada para verificar a clonagem. A Figura 12 mostra que as clonagens positivas foram as do poço indicados por “1 – 9.1+11 – E+P” e “2 – 9.2+11 – E+P”, referentes aos plasmídeos 9.1+11 (578pb) e 9.2+11 (652pb).

Figura 12. Produtos resultantes da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* do plasmídeo pSB1K3 (2200pb) contendo as construções 9.1+11 (578pb) e 9.2+11 (652pb) após corrida de eletroforese.

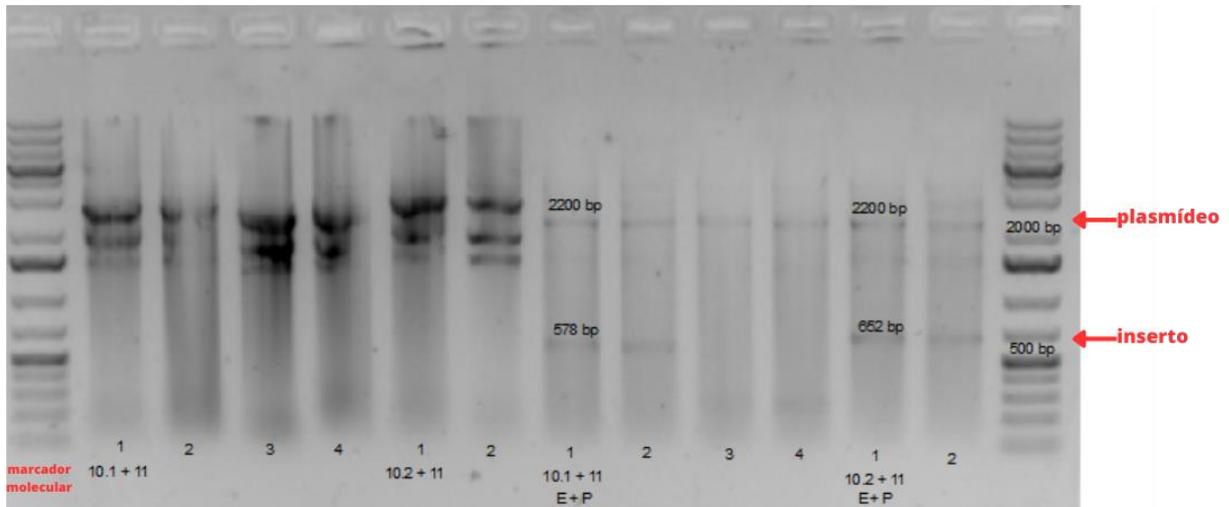


Produtos resultantes da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* do plasmídeo pSB1K3 (2200pb) contendo as construções 9.1+11 (578pb) e 9.2+11 (652pb) podem ser observados nos poços indicados por “1 – 9.1+11 – E+P” e “2 – 9.2+11 – E+P”, respectivamente, após corrida de eletroforese em gel de agarose. O primeiro poço à esquerda é ocupado pelo marcador de massa molecular GeneRuler™ 1kb DNA ladder, enquanto os próximos quatro poços são ocupados pelos controles negativos (plasmídeos não digeridos).

Fonte: próprio autor, 2023.

Depois disso, os plasmídeos pSB1K3 contendo os RNAs guias 10.1 e 10.2 foram utilizados para adicionar a sequência 11. Novamente, a confirmação das clonagens foi realizada por digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, seguida de eletroforese em gel de agarose. A Figura 13 mostra o resultado da corrida, onde as clonagens positivas de 10.1+11 são observadas nos poços indicados por “1 – 10.1+11 – E+P” e, logo em seguida, “2”, as positivas de 10.2+11 são observadas nos poços indicados por “1 – 10.2+11 – E+P” e, o subsequente, “2”.

Figura 13. Plasmídeo pSB1K3 (2200bp) 10.1+11 (578bp) 10.2+11 (652bp) digerido com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e submetido a eletroforese em gel de agarose.

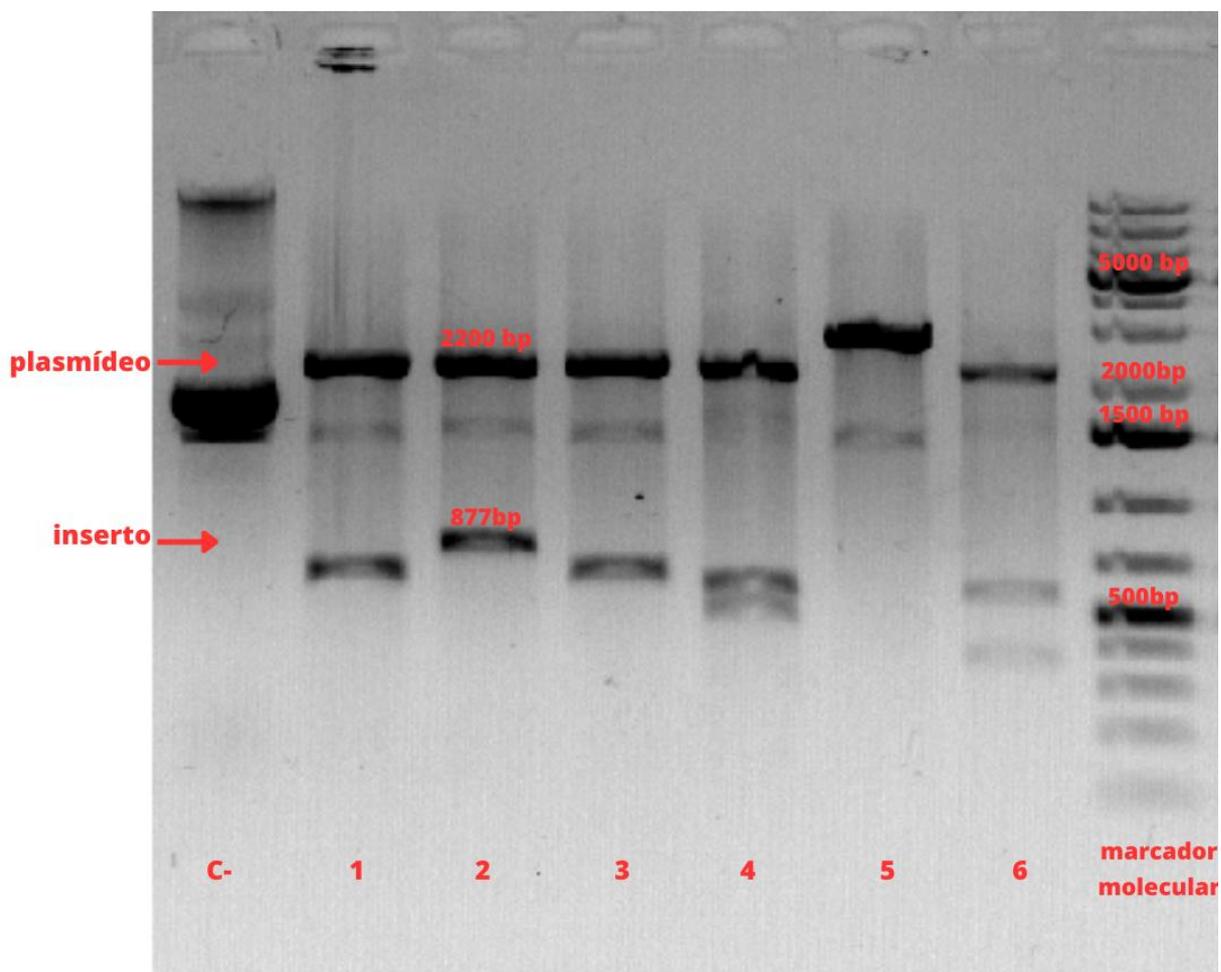


O plasmídeo pSB1K3 (2200bp) contendo 10.1+11 (578bp) indicados por “1 – 10.1+11 – E+P” e, o subsequente, “2” e 10.2+11 (652bp) indicados por “1 – 10.2+11 – E+P” e, o seguinte, “2”. foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e submetido a eletroforese em gel de agarose. O marcador de massa molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) é exibido nos primeiros poços à esquerda e à direita, enquanto os controles negativos (plasmídeos não digeridos) estão localizados nos poços a direita, indicados com “1 – 10.1+11”, “2”, “3” e “4”.

Fonte: próprio autor, 2023.

Os plasmídeos 9.1+11, 9.2+11 e 10.2+11 foram submetidos à adição da sequência 8 para concluir as clonagens e a replicação em *E. coli* Top10. Para confirmar as construções, foram utilizadas as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, seguidas de análise em gel de agarose por eletroforese. Os resultados foram apresentados nas Figuras 14, 15 e 16, evidenciando que as clonagens positivas se encontram no 3º poço para 9.1, nos poços 3 e 6 a 8 para 9.2, e nos poços 10, 11 e 13 para 10.2.

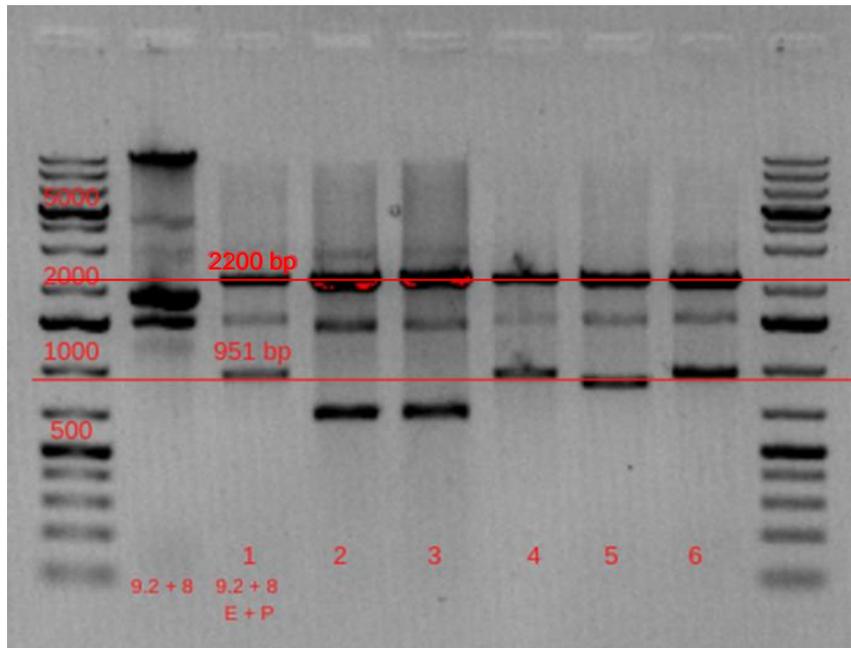
Figura 14. Plasmídeo pSB1K3 (2200bp) contendo o fragmento 9.1+11+8 (877bp) foi digerido pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* e analisado por eletroforese em gel de agarose.



O plasmídeo pSB1K3 (2200bp) contendo o fragmento 9.2+11+8 (877bp) foi digerido pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* e analisado por eletroforese em gel de agarose. O resultado da eletroforese pode ser visto nos poços indicados pelos números de 1 a 6, enquanto o marcador de massa molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) se encontra no primeiro poço à direita e o controle negativo (plasmídeo não digerido) indicado por C-.

Fonte: próprio autor, 2023.

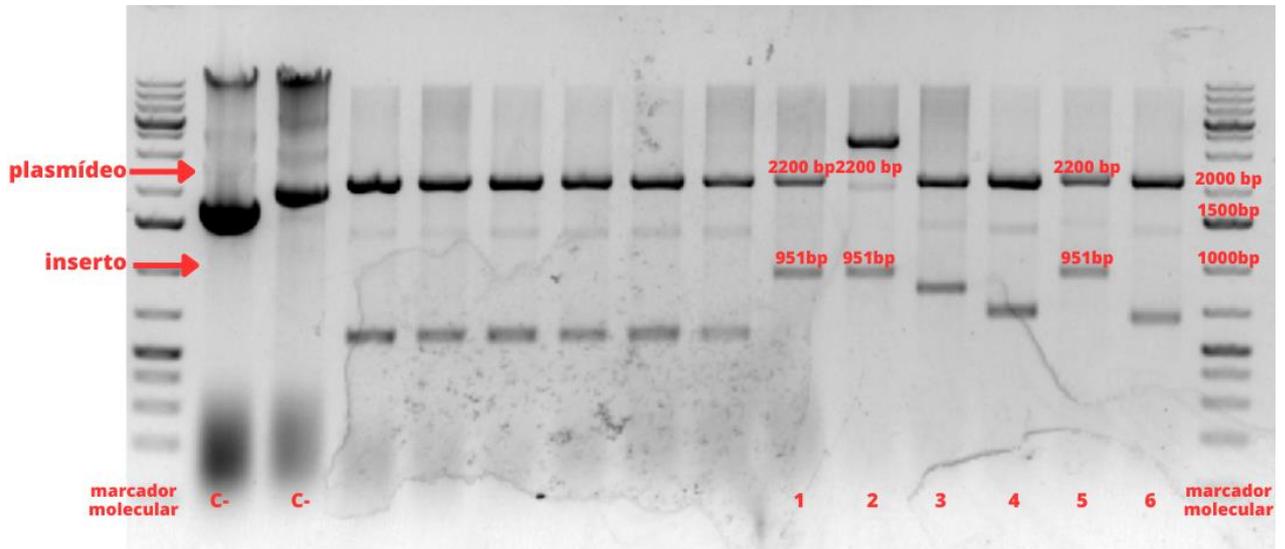
Figura 15. Plasmídeo pSB1K3 (2200bp) com 9.2+11+8 (951bp) digerido pelas enzimas *EcoRI* e *PstI*, analisado por eletroforese em gel de agarose.



O plasmídeo pSB1K3 (2200bp) com 9.1+11+8 (951bp) foi digerido pelas enzimas *EcoRI* e *PstI*, sendo o produto resultante analisado por eletroforese em gel de agarose. As clonagens positivas foram observadas nos poços indicados por “1 – 9.2+8 – E+P”, “4”, “5” e “6”, enquanto o marcador de massa molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) se encontra no primeiro poço à esquerda e o controle negativo (plasmídeo não digerido) indicado por “9.2+8”.

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 16. Plasmídeo pSB1K3 (2200bp) com fragmento 102+11+8 (951bp), digerido pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* e analisado por eletroforese em gel de agarose.



O plasmídeo pSB1K3 (2200bp), que contém o fragmento 10.2+11+8 (951bp), foi digerido pelas enzimas *EcoRI* e *PstI* e analisado por eletroforese em gel de agarose. As clonagens positivas se encontram nos poços indicados pelos números 1, 2 e 5, enquanto o marcador de massa molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) foi identificado nos primeiros poços à esquerda e à direita e o controle negativo (plasmídeo não digerido) nas colunas indicadas por “C-“.

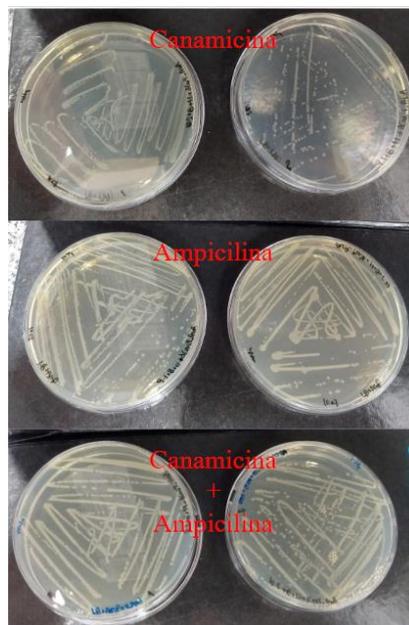
Fonte: próprio autor, 2023.

O processo de confirmação das clonagens realizadas foi essencial para garantir que os plasmídeos construídos apresentassem as características desejadas. Nesse sentido, a digestão e eletroforese em gel de agarose com as enzimas *EcoRI* e *PstI* foram utilizadas para confirmar as construções referentes a 9.1, 9.2, 10.2 e TetR_dCas9_AsiA. As imagens obtidas (3, 4 e 5) mostraram que as clonagens foram bem-sucedidas, visto que as bandas apresentaram tamanho coerente com as informações da Tabela 1.

Além da confirmação por eletroforese, as construções foram submetidas a sequenciamento de Sanger (resultados no apêndice 3), o que permitiu a dupla confirmação das clonagens referentes a 9.1+9, 9.2+11, 9.1+11+8, 10.2+11+8 e PJ23100_TetR+Ptet_SpdCas9-asiA. A dupla confirmação é importante para garantir que não ocorram erros de sequenciamento ou mutações indesejadas que possam afetar o desempenho dos plasmídeos.

Por fim, a eficiência das clonagens também foi confirmada através de testes de expressão eletroporando o plasmídeo PJ23100_TetR+Ptet_SpdCas9-AsiA em *E. coli* BL21, que possibilita a expressão através do sistema da T7 RNA polimerase, e adicionando plasmídeos contendo os RNAs guias 9.1, 9.2 e 10.2. Os testes de estriamento em placas de petri com meio LB-ágar com a adição dos antibióticos para os quais os plasmídeos fornecem a resistência, juntamente com a corrida de eletroforese em gel de agarose com a linearização dos plasmídeos, permitiram a confirmação da eficiência das clonagens.

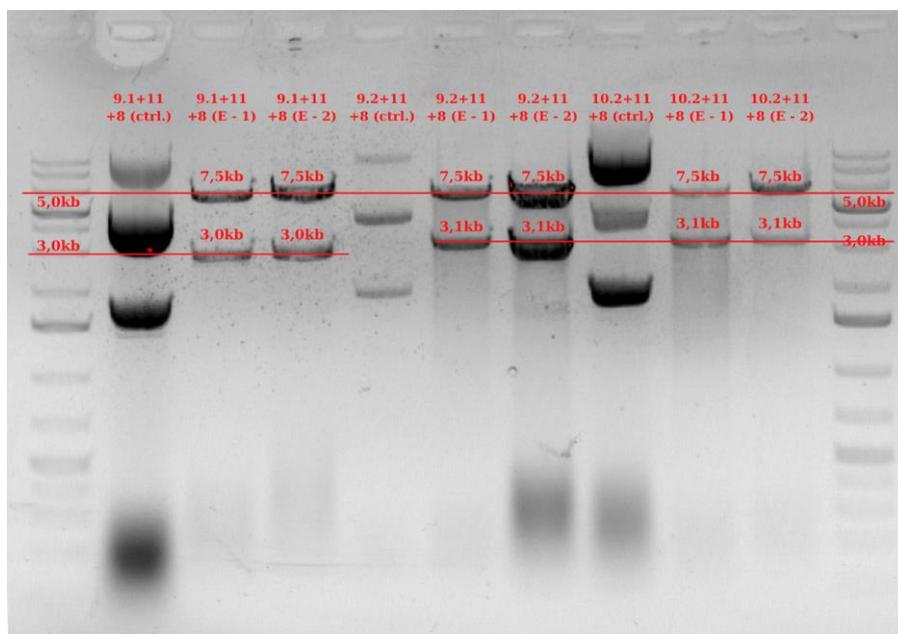
Figura 17. Placas de petri para teste da resistência fornecida pelos plasmídeos pSB1A3 (ampicilina) e pSB1K3 (canamicina) presentes nas construções clonadas.



Placas de petri contendo LB-ágar e antibióticos canamicina, ampicilina e ambos, de cima para baixo, indicando o resultado positivo para clonagem. Todas as seis placas apresentaram crescimento bacteriano, o que confirma a resistência fornecida pelos plasmídeos pSB1A3 (ampicilina) e pSB1K3 (canamicina) presentes nas construções clonadas.

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 18. Produtos da digestão dos plasmídeos pSB1K3+9.1+8+11 (3000bp), pSB1K3+9.2+11+8 (3100bp), pSB1K3+10.2+11+8 (3100bp) e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA (7500bp) analisados em eletroforese em gel de agarose.



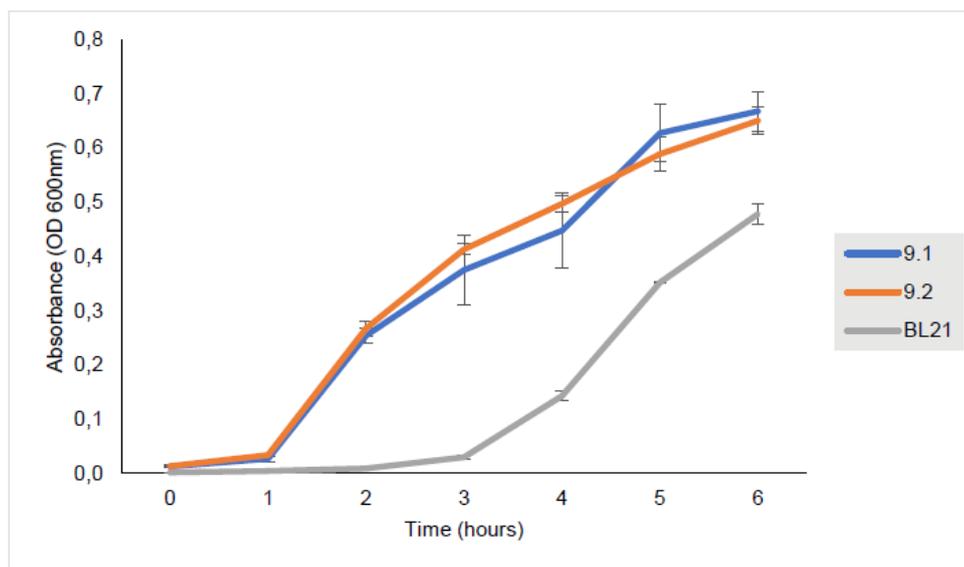
Eletroforese em gel de agarose mostrando a linearização de plasmídeos após a digestão pela enzima *EcoRI*. Os produtos da digestão dos plasmídeos pSB1K3+9.1+11+8 (3000bp) são observados nos poços 3 e 4, pSB1K3+9.2+11+8 (3100bp) nos poços 6 e 7, pSB1K3+9.2+11+8 (3100bp) nos poços 9 e 10, e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA (7500bp) nos poços 3, 4, 6, 7, 9 e 10. O marcador de massa molecular (GeneRuler™ 1kb DNA ladder) se encontra no primeiro poço à esquerda, e o controle negativo (plasmídeo não digerido) referente às clonagens com os gRNAs 9.1, 9.2 e 10.2 encontram-se nos poços 2, 5 e 8, respectivamente.

Fonte: próprio autor, 2023.

Após a clonagem dos sistemas em *Escherichia coli* BL21, realizou-se um cultivo adicionando ampicilina e canamicina com as bactérias contendo os plasmídeos pSB1K3+9.1+11+8 ou pSB1K3+9.2+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA, com o objetivo de mapear o crescimento das bactérias com a construção e os indutores.

De maneira a investigar se a construção seria um fardo metabólico para a bactéria, realizou-se uma curva de crescimento comparativa entre a *E. coli* BL21 sem a construção e as *E. coli* BL21 que continham os plasmídeos referentes às construções 9.1 e 9.2. A curva pode ser verificada na Figura 19.

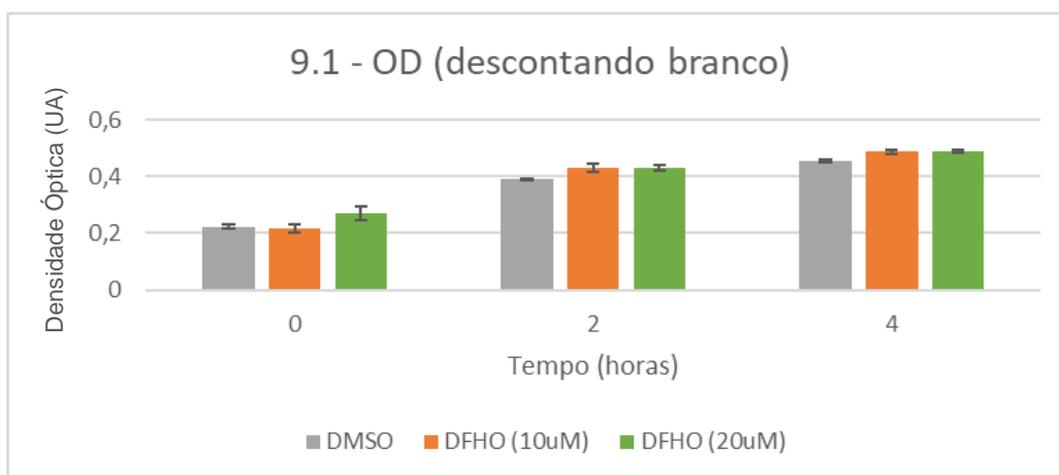
Figura 19. Curva de crescimento das bactérias *E. coli* BL21 sem construção e com as construções referentes a 9.1 e 9.2.



Fonte: próprio autor, 2023.

Da mesma maneira que o cultivo relatado anteriormente, realizou-se outro para identificar fluorescência basal do sistema referente ao gRNA0 – sistema 9.1 e 9.2, que direciona ao alvo 0 e se liga ao fluoróforo BI (excitação: 470 nm e emissão: 505 nm) (LUCERNA TECHNOLOGIES, 2022a), em solução com DFHO (excitação: 505 nm e emissão: 545 nm) (LUCERNA TECHNOLOGIES, 2021b). Os resultados podem ser visualizados nos gráficos apresentados nas Figuras 20, 21, 22 e 23.

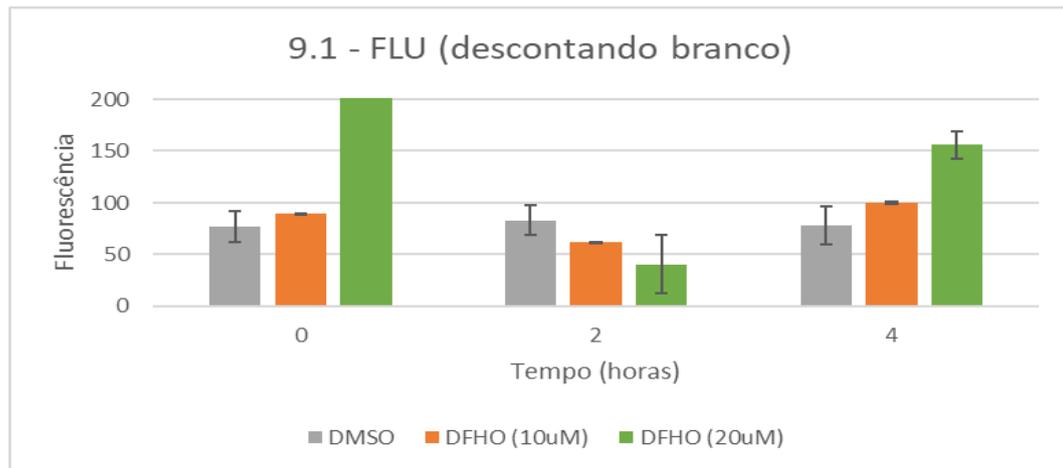
Figura 20. Gráfico do desenvolvimento da densidade óptica (OD600) do cultivo de *Escherichia coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.1+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA.



O gráfico apresenta o desenvolvimento da densidade óptica (OD600) do cultivo de *Escherichia coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+gRNA0+corn+broccoli (9.1) e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA, utilizado para controle de fluorescência basal.

Fonte: próprio autor, 2023.

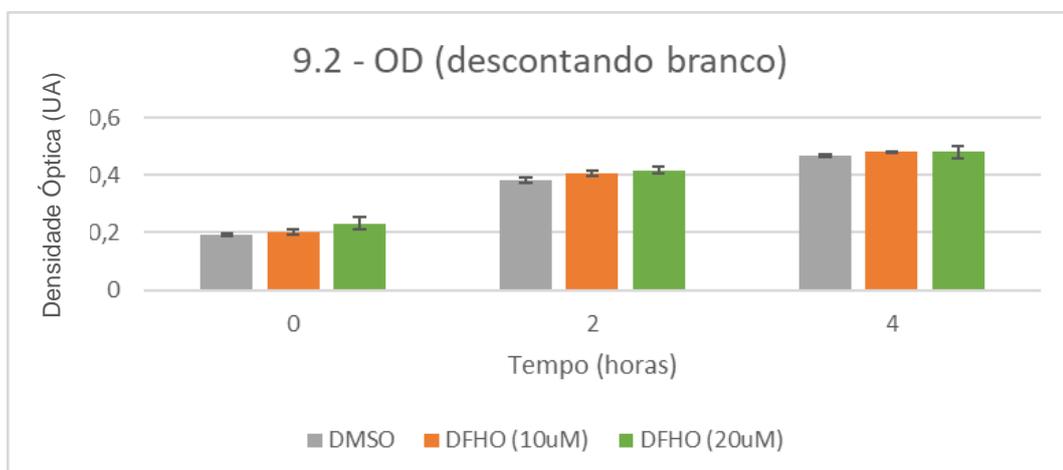
Figura 21. Gráfico do desenvolvimento da fluorescência (FLU) basal do cultivo de *Escherichia coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.1+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA.



O gráfico apresenta o desenvolvimento da fluorescência (FLU) basal do cultivo de *Escherichia coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.1+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA, utilizado para controle de fluorescência basal.

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 22. Gráfico do desenvolvimento da densidade óptica (OD) do cultivo de *Escherichia coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.2+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA.



O gráfico apresenta o desenvolvimento da densidade óptica (OD) do cultivo de *Escherichia coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.2+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA, utilizado para controle de fluorescência basal.

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 23. Gráfico da evolução de fluorescência (FLU) basal em cultura de *E. coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+ 9.2+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA.

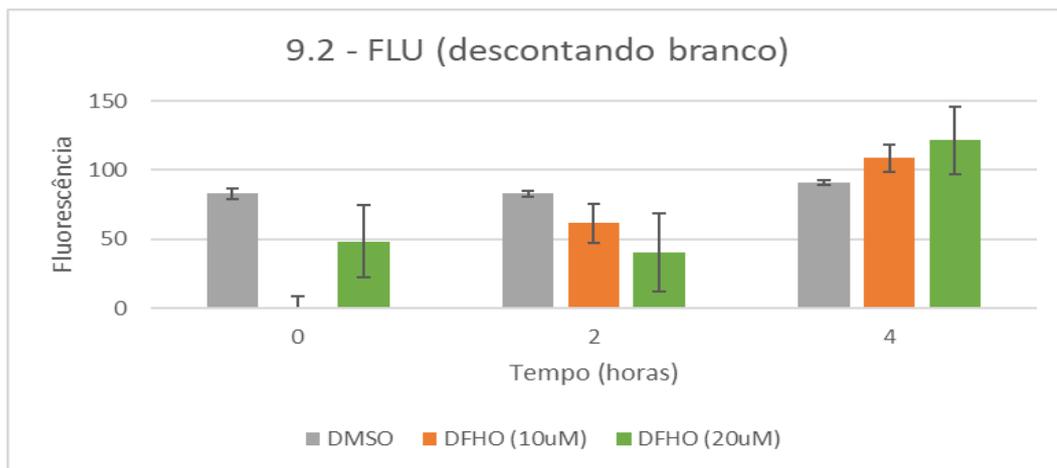


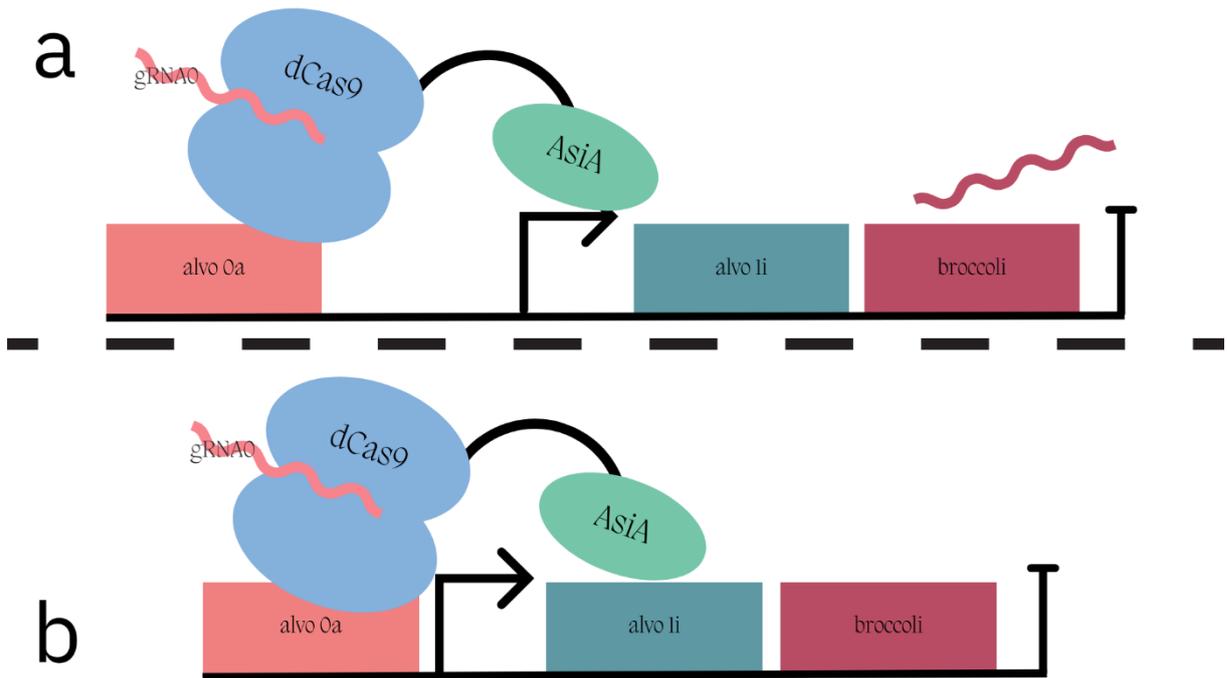
Gráfico que mostra a evolução de fluorescência (FLU) basal em cultura de *E. coli* BL21 contendo os plasmídeos pSB1K3+9.2+11+8 e pSB1A3+Ptet_SpdCas9-AsiA, ao longo do tempo, para controle de fluorescência basal.

Fonte: próprio autor, 2023.

Através dos gráficos pode-se notar que o crescimento das bactérias ocorreu dentro do previsto e de maneira razoavelmente linear para ambas as construções, permitindo que se afirme que a presença de dCas9 não está sendo tóxica para a célula e que o controle de sua produção está sendo efetivo. Contudo, ao observar os gráficos de fluorescência, percebe-se há algum problema, uma vez que os resultados foram extremamente baixos e inconsistentes. Assim sendo, foi notada uma falha na construção dos sistemas: a falta de um espaçamento entre o target0a e seu promotor (PJ23117), para que haja espaço suficiente para o posicionamento da dCas9 no DNA e a asiA possa ativar o promotor, o funcionamento pode ser melhor compreendido no esquema contido nas Figuras 24a e b. Para corrigir essa falha, foi realizada

uma PCR com primers contendo o espaçamento e o sítio de corte da enzima de restrição *BsaI*, que permitiu a realização de uma reação de Golden Gate, logo após a digestão do molde (material genético metilado) do produto de PCR através da enzima de restrição *DpnI* durante 4 horas a 37°C.

Figura 24. a) Ilustração do funcionamento do sistema na construção correta (transcrição do RNA). b) Ilustração do funcionamento do sistema na construção incorreta (ausência da transcrição do RNA).



Fonte: próprio autor, 2023.

Após a correção das construções, os plasmídeos serão clonados em *E. coli* Top10 e, em seguida, em BL21, para então serem realizados testes de emissão de fluorescência por meio de cultivos em frascos do tipo Erlenmeyer, semelhantes aos realizados para o controle de fluorescência basal emitida. Dessa forma, será possível observar o funcionamento dos sistemas e, conseqüentemente, dos sinais, que serão gerados ao longo do cultivo como principal produto do sistema.

3.3. Discussão

A crescente quantidade de dados gerados no mundo digital tem desafiado as capacidades de armazenamento dos dispositivos eletrônicos convencionais. Diante desse cenário, o armazenamento de dados em DNA surge como uma solução promissora e inovadora. O DNA possui uma densidade de armazenamento extremamente alta e uma durabilidade surpreendente, permitindo, inclusive, que o material genético de fósseis de milhares de anos seja decodificado (CEZE *et al.*, 2019), tornando-o uma alternativa viável aos dispositivos de armazenamento atuais. Nesse contexto, este trabalho de conclusão de curso teve como objetivo explorar as possibilidades do armazenamento de dados em DNA e apresentar uma proposta para sua implementação prática.

Ao longo do estudo de Ceze *et al.* (2019), é destacado que para ser viável, o armazenamento de dados em material genético deve ser recuperável através de acesso aleatório, ou seja, que a informação solicitada seja acessada sem que os dados sejam lidos em sua totalidade. O que pode ser facilmente aplicado à construção proposta pelo presente estudo através da colocação dos genes codificadores da informação sob controle de promotores induzíveis por diferentes moléculas ou da inserção de gRNAs para o direcionamento da dCas9 para o sítio de ativação do respectivo dado.

O trabalho de Yim *et al.* (2021) relata a construção de um sistema responsivo à eletricidade, o qual funciona com base no mesmo princípio que as máquinas, nas quais a presença de energia (0,5 V) codifica 1 e a ausência (0,0 V) codifica 0. Diferentemente, neste trabalho, para que a alternância e o funcionamento de ambos os sinais possam ser plenamente verificados, o código 0 é representado pela emissão da fluorescência do RNA broccoli, enquanto o código 1, ao RNA corn; impedindo, portanto, dúvidas entre o não funcionamento do sistema ou a ausência de sinal – referente ao 0.

Ademais, Ceze *et al.* (2019) e Yim *et al.* (2021) propõem que o sequenciamento seja o modelo de leitura dos dados armazenados em DNA, enquanto Sheth *et al.* (2018), além disso, propõe que esta observação pode ser feita *in situ* através de mapeamento de fluorescência de RNA por hibridização, modelo que se aproxima mais do proposto no presente trabalho e que torna mais simples e rápido o acesso.

Apesar de as adições dos espaçamentos ainda precisarem ser realizadas, através de consulta à literatura e confirmação de que as construções foram devidamente clonadas nas bactérias, pode-se notar que o presente sistema tem grande potencial para funcionamento como “hardware” para armazenamento de dados em material genético e que, além disso, através do uso de aptâmeros de RNA como repórteres, pode vir a ser implementado com a finalidade de mapear processos metabólicos das células. E apesar de a dCas9 ter apresentado toxicidade quando sintetizada em altas taxas em outros trabalhos (ZHANG *et al.*, 2018), neste trabalho as linhagens construídas não demonstraram diminuição da taxa de crescimento ou prolongamento da fase lag de crescimento. Desta forma, pode-se inferir que não houve sobrecarga metabólica para as bactérias *E. coli* BL21.

Por outro lado, o funcionamento das construções apenas poderá ser plenamente compreendido quando os sistemas forem corrigidos e clonados nas bactérias responsáveis pela expressão do sistema. Para que isso seja concluído, ainda será realizada uma reação PCR para correção com primers contendo o espaçador e sítio da enzima de restrição *BsaI*, uma digestão dos moldes por *DpnI*, uma reação de Golden Gate e, finalmente, as transformações em *E. coli*.

4. Conclusão

A partir da seção de resultados, pode-se notar que as construções foram devidamente feitas, portanto, os plasmídeos foram devidamente ligados aos insertos responsáveis pelos sistemas de ativação, repressão e de sinal.

Neste trabalho, o escopo foi de compreender parte da complexidade e os mecanismos dos sistemas biológicos através do direcionamento da proteína dCas9 para locais específicos atuando como um ativador ou repressor gênico. Compreensão essa que pode ser aplicada a uma grande gama de outros estudos, uma vez que a capacidade de controle gênico temporal pode ser de grande valia para a biologia sintética.

Em suma, este trabalho destaca o poder da tecnologia baseada na proteína dCas9 para o controle preciso da expressão gênica em sistemas biológicos complexos e como esta ferramenta pode vir a ser utilizada para os mais diversos fins, como o armazenamento de dados em DNA, como citado anteriormente.

Referências

- AUSTIN CHE (org.). Part:pSB1K3. Disponível em: <http://parts.igem.org/Part:pSB1K3>. Acesso em: 06 jan. 2020.
- BAI, Jiuyuan *et al.* A protein-independent fluorescent RNA aptamer reporter system for plant genetic engineering. **Nature Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, 31 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17497-7>.
- BIO-RAD LABORATORIES. (s.d.). MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide. Bio-Rad. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006174B.pdf> (Acessado em: 10 de junho de 2022).
- CEZE, Luis *et al.* Molecular digital data storage using DNA. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 456-466, 8 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-019-0125-3>.
- CHURCH, George M. *et al.* Next-Generation Digital Information Storage in DNA. **Science**, [S.L.], v. 337, n. 6102, p. 1628-1628, 28 set. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1226355>.
- CUI, Yingbo *et al.* Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 455-465, 11 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12539-018-0298-z>.
- DONG, Huina *et al.* CRISPR/Cas Technologies and Their Applications in *Escherichia coli*. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 9, 11 nov. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.762676>.
- DOUDNA, J. A.; Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014. DOI: 10.1126/science.1258096.
- DOUDNA, Jennifer A. *et al.* The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, [S.L.], v. 346, n. 6213, 28 nov. 2014. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1258096>.
- EYDELER, Katja *et al.* Fluorophore Binding Aptamers as a Tool for RNA Visualization. **Biophysical Journal**, [S.L.], v. 96, n. 9, p. 3703-3707, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.01.041>.
- ELLINGTON, Andrew D. *et al.* In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature**, [S.L.], v. 346, n. 6287, p. 818-822, ago. 1990. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/346818a0>.
- FILONOV, Grigory S. *et al.* Broccoli: rapid selection of an rna mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 136, n. 46, p. 16299-16308, 5 nov. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja508478x>.
- GILBERT, L. A. *et al.* CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. **Cell**, v. 154, n. 2, p. 442-451, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.044.

HILLEN, W.; BERENS, C. Mechanisms underlying expression of Tetracycline-regulated genes: a review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 1-6, 1996. DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00376-5.

HO, Hsing-I *et al.* Programmable CRISPR-Cas transcriptional activation in bacteria. **Molecular Systems Biology**, [S.L.], v. 16, n. 7, jul. 2020. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/msb.20199427>.

JINEK, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012. DOI: 10.1126/science.1225829.

KANG, Kyung-Nam *et al.* RNA Aptamers: a review of recent trends and applications. **Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology**, [S.L.], p. 153-169, 2012. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/10_2012_136.

KIM, Seong Keun *et al.* CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases terpenoid production. **Metabolic Engineering**, [S.L.], v. 38, p. 228-240, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2016.08.006>.

KIM, Hyaeyeong *et al.* A Fluorogenic RNA-Based Sensor Activated by Metabolite-Induced RNA Dimerization. **Cell Chemical Biology**, [S.L.], v. 26, n. 12, p. 1725-1731, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.09.013>.

LUCERNA TECHNOLOGIES. **BI**: (z)-3-((1h-benzo[d]imidazol-4-yl)methyl)- 5-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene)-2-methyl-3,5-dihydro-4h-imidazol-4-one. Ithaca: Lucerna Technologies, 2021a. Disponível em: <https://lucernatechnologies.com/wp-content/uploads/2021/01/BI-Datasheet-600-all.pdf>. Acesso em: 13 maio 2022.

LUCERNA TECHNOLOGIES. **DFHO**: 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene-imidazolione-2-oxime. Ithaca: Lucerna Technologies, 2021b. Disponível em: <https://lucernatechnologies.com/wp-content/uploads/2021/01/DFHO-Datasheet-500-all.pdf>. Acesso em: 13 maio 2022.

MALI, Prashant *et al.* Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nature Methods**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 957-963, 27 set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2649>.

ORSINI, G., *et al.* The *asiA* gene of bacteriophage T4 codes for the anti-sigma 70 protein. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 1, p. 85-93, 1993. DOI: 10.1128/jb.175.1.85-93.1993.

PLUMMER, J. D.; GRIFFIN, P. B. Material and process limits in silicon VLSI technology. **Proceedings of the IEEE**, v. 89, n. 3, p. 240-258, mar. 2001.

RESHMA SHETTY (org.). **Part:pSB1A3**. Disponível em: <http://parts.igem.org/Part:pSB1A3>. Acesso em: 06 fev. 2020.

SGORBATI, B. *et al.* Plasmids in the Genus *Bifidobacterium*. **Microbiology**, [S.L.], v. 128, n. 9, p. 2121-2131, 1 set. 1982. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-128-9-2121>.

SHETH, Ravi U. *et al.* DNA-based memory devices for recording cellular events. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 718-732, 20 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-018-0052-8>.

SONG, Kyung-Mi et al. Aptamers and Their Biological Applications. **Sensors**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 612-631, 9 jan. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/s120100612>.

TOSELAND, Christopher P.. Fluorescent labeling and modification of proteins. **Journal Of Chemical Biology**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 85-95, 13 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12154-013-0094-5>.

UNIVERSIDADE DE DUSSELDORF. **LIGATION CALCULATOR**. Disponível em: http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html. Acesso em: 05 out. 2021.

WEBER, E. *et al.* A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0016755.

YIM, Sung Sun *et al.* Robust direct digital-to-biological data storage in living cells. **Nature Chemical Biology**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 246-253, 11 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41589-020-00711-4>.

ZHANG, Shuyi *et al.* Engineered dCas9 with reduced toxicity in bacteria: implications for genetic circuit design. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], 5 out. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky884>.

APÊNDICE 1

Quadro 2: Relação de oligonucleotídeos utilizados na construção das sequências PtetR/tetA_SpdCas9, PJ23100_tetR, PT7-lacO_corn e PT7-lacO_broccoli.

ID	Descrição	Sequência
123	BBprefix_fw	ATGAGAATTCGCGGCCGCTTCTAG
124	BBsuffix_rv	CGGACTGCAGCGGCCGCTACTAG
601	PtetR/tetA_SpdCas9(BBp)_fw	TACGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGTTG ACACTCTATCGTTGATAGAGTTATTTACCA CTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGAACTCA AAAGATCTAAAGAGGAGAAAGGATCTATG GATAAAAAGTATAGTATTGGCCTTGCAATT GGTAC
602	PtetR/tetA_SpdCas9(PstI)_rv	AAACCTGCAGGAGAGCGTTCACCGACAAAC AACAGATAAACGAAAGGCCAGTCTTTTCG ACTGAGCCTTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGA GATCCTCGAGCTTATTAAGTAGTATCGCCG CCCAGCTGAGACAG
627	PJ23100_tetR_fw	GATTTCTGCAGAGCGGCCGACTAGTTTGAC GGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGC AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAT

		AAAATGTCCAGATTAGATAAAAAGTAAAGTG ATTAACAGCGC
628	PJ23100_tetR_rv	ATAACGAATTCAGCGGCCGCTCTAGAAAAA AAAACCCCGCCCTGTCAGGGGCGGGGTTTT TTTTTTTGATGCCTGGAGTGCCTGGTTATTA GGACCCACTTTTACATTTAAGTTGTTTTTCT AATCCG
629	PT7-lacO_corn_fw	AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGA ATTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGT GAGCGGATAACAATTCCCCGGCGCGAGGA AGGAGGTCTGAGGAGGTCACTGCGCC
630	PT7-lacO_corn_rv	TCGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTATGGA CTCACAAGAAAAACGCCCGGTGTGCAA GACCGAGCGTTCTGAACAACCTCGGCGCAGT GACCTCCTCAGACCTCCTTCCTCGCGCC
631	PT7-lacO_broccoli(1)_fw	AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGA ATTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGT GAGCGGATAACAATTCCCCGGACCCACATA CTCTGATGATCCGAGACGGTCCGGTCCAGA TATTCGTATCTGTGCGAGTAGAGTGTGGGCT CGGATCATTGCAAGAGAC
632	PT7-lacO_broccoli(1)_rv	CCCACTCTACTCGACAGATACGAATATCT GGACCCGACCGTCTCGGATCATCAGAGTAT GTGGGTCCGGGGAATTGTTATCCGCTCACA ATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTCT CTAGAAGCGGCCGCGAATTCTGATCT

633	PT7-lacO_broccoli(2)_fw	GGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAG TAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTATGTG GGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGAC ACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATACT AGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGA
634	PT7-lacO_broccoli(2)_rv	TCGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTATGGA CTCACAAGAAAAACGCCCGGTGTGCAA GACCGAGCGTTCTGAACAACCTCCCCACATA CACATGGCAAGAGCCCACACTCTACTCGAC AGATACGAATATCTGGACCCGACCGTCTCT TGCCATGAATGATCCGAGC
635	Bbprefix_linker_AsiA	GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGCGGCGGG GGTAGCG

APÊNDICE 2

Quadro 3: Sequências completas utilizadas no projeto.

Descrição	Sequência
PT7-lacO_broccoli	AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAA TTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA GCGGATAACAATTCCCCGGACCCACATACTC TGATGATCCGAGACGGTCGGGTCCAGATATT CGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCGGAT CATTGATGGCAAGAGACGGTCGGGTCCAGAT ATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTT GCCATGTGTATGTGGGGAGTTGTTTCAGAACG

	<p>CTCGGTCTTGCACACCGGGCGTTTTTTCTTTG TGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTC CGA</p>
PT7-lacO_corn	<p>AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAA TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA GCGGATAACAATTCCCCGGCGCGAGGAAGGA GGTCTGAGGAGGTCCTGCGCCGAGTTGTTC AGAACGCTCGGTCTTGCACACCGGGCGTTTTT TCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGCTG CAGTCCGA</p>
PJ23100_tetR	<p>TCTGCAGAGCGGCCGACTAGTTTGACGGCTA GCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGCAATAATT TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAAAATGTCC AGATTAGATAAAAGTAAAGTGATTAACAGCG CATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCGGAATCGA AGGTTTAAACAACCCGTAAACTCGCCCAGAAG CTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGC ATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGC CTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCAT ACTCACTTTTGCCCTTTAGAAGGGGAAAGCTG GCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTT TTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGGA GCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAG AAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATT AGCCTTTTTATGCCAACAAGGTTTTTCACTAG AGAATGCATTATATGCACTCAGCGCTGTGGG GCATTTTACTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATC AAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGG AAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCCATTA</p>

	<p>TTACGACAAGCTATCGAATTATTTGATCACCA AGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTG AATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAAC TAAATGTGAAAGTGGGTCCTAATAACCAGGC ACTCCAGGCATCAAAAAAAAAAACCCCGCCC CTGACAGGGCGGGGTTTTTTTTTCTAGAGCGG CCGCTGAATTC</p>
<p>PtetR/tetA_SpdCas9_AsiA</p>	<p>GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGTTGACACTC TATCGTTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCTA TCAGTGATAGAGAAAAGAAGTCAAAAGATCT AAAGAGGAGAAAGGATCTATGGATAAAAAG TATAGTATTGGCCTTGCAATTGGTACTAATAG CGTTGGCTGGGCCGTCATTACAGACGAATAT AAGGTGCCGTCTAAAAAATTCAAAGTTCTGG GGAATACCGATCGGCATTCCATAAAAAAAAAA TCTTATTGGTGCTCTTTTATTCGATTCCGGGTG AGACGGCGGAAGCGACGCGTTTGAAACGCAC TGCGCGGCGGCGGTATACGCGTCGTAAAAAT CGCATTGCTATCTTCAGGAGATTTTCTCAA TGAAATGGCAAAGGTAGATGATAGCTTTTTTC ATCGCCTTGAAGAATCTTTTTTAGTTGAAGAA GATAAAAAGCACGAACGCCATCCAATCTTTG GGAACATTGTGGATGAAGTTGCGTATCATGA GAAATATCCGACGATATATCATCTGAGAAAG AACTGGTAGATAGCACAGACAAAGCAGATT TGAGATTGATCTATCTTGCGCTGGCGCATATG ATTAAGTTCCGCGGCCATTTTCTTATAGAAGG</p>

TGATCTGAATCCGGACAATTCTGACGTAGAT
AAATTGTTTATCCAGCTGGTTCAGACCTATAA
TCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATTAACGCT
AGCGGCGTTGACGCAAAAGCGATATTATCAG
CTCGTCTGTCTAAATCACGGCGCCTTGAAAAC
TTAATCGCTCAACTGCCC GGAGAGAAAAAAA
ATGGCCTTTTCGGCAACTTGATTGCTCTGAGC
CTGGGTTTGACCCCTAATTTCAAAGCAACTT
TGATTTGGCAGAAGATGCAAACTGCAATTG
AGCAAGGACACGTATGATGATGACCTTGATA
ACCTTCTTGCGCAGATAGGAGATCAATACGC
GGACTTGTTTTTGGCAGCCAAAACTTGTCAG
ACGCCATCCTTCTTAGCGACATCTTACGCGTT
AATACAGAGATAACCAAAGCACCGTTATCTG
CCTCCATGATCAAGCGGTATGATGAGCATCA
CCAAGATCTGACACTGCTGAAAGCACTTGTC
CGTCAACA ACTTCCGGAAAAATATAAAGAAA
TTTTTTTTGATCAGTCGAAAAATGGATACGCT
GGATACATTGACGGGGGAGCCAGCCAGGAGG
AGTTTTACAAATTTATCAAACCAATCCTTGAG
AAAATGGATGGTACGGAAGAGTTGTTAGTTA
AGCTTAATCGTGAGGACTTATTACGCAAGCA
GCGTACCTTCGATAACGGAAGCATCCCCAC
CAGATCCACCTTGGGGAGCTGCATGCCATTTT
GCGCCGCCAGGAAGATTTCTACCCATTTTTGA
AAGATAATCGCGAAAAAATCGAAAAGATTTT
AACCTTTCGTATCCCGTATTATGTGGGTCCGC
TGGCAAGAGGCAATTCACGTTTCGCATGGAT
GACCCGGAAATCCGAAGAGACTATAACACCG
TGGAATTT CGAAGAAGTCGTTGACAAGGGAG
CGAGCGCCCAGAGTTTCATTGAACGTATGAC

TAACTTCGACAAGAATCTGCCTAACGAAAAG
GTTCTTCCCAAGCACTCCCTGCTGTATGAATA
TTTCACAGTCTATAACGAATTGACAAAAGTG
AAATATGTAACGGAAGGAATGCGTAAACCAG
CTTTCCTGTCAGGCGAGCAGAAGAAAGCAAT
CGTGGACTTACTGTTCAAACCAACCGGAAA
GTTACGGTTAAACAATTAAGGAGGATTACT
TTAAGAAAATTGAATGCTTTGACTCCGTAGA
GATTAGCGGAGTAGAAGATCGTTTCAATGCC
TCATTGGGAACATATCATGACCTGTAAAAAT
TATTAAGATAAGGATTTTTTAGATAATGAA
GAGAACGAAGACATACTGGAGGATATAGTCT
TAACACTTACTTTATTTCGAAGATCGCGAAATG
ATTGAGGAGCGTTTGAAAACCTACGCGCATC
TGTTTGATGATAAAGTGATGAAACAACCTGAA
ACGCCGGCGGTATACCGGATGGGGTCGTTTG
AGTCGGAAACTTATTAATGGCATTAGAGACA
AGCAGTCAGGTAAAACCATTCTTGACTTTTTA
AAATCTGATGGATTCGCAAACAGAACTTCA
TGCAACTGATCCATGACGATTCCTTGACCTTT
AAGGAAGATATTCAGAAGGCACAGGTTCCG
GCCAAGGCGATAGTTTGCATGAACACATTGC
AAATCTTGCAGGTTCCCCGGCGATTAAAAAG
GGCATCCTTCAGACGGTTAAAGTAGTTGATG
AACTGGTCAAGGTGATGGGGCGTCATAAACC
AGAGAATATAGTGATTGAAATGGCTCGCGAA
AACCAGACCACCCAAAAGGCCAGAAAAATT
CTCGTGAACGTATGAAGCGGATCGAAGAAGG
CATCAAAGAACTGGGTTCCTCAAATCTTGAAG
GAGCATCCAGTTGAGAATACGCAGCTGCAAA
ATGAAAAATTATATCTGTATTATCTGCAAAAT

GGCCGGGATATGTACGTTGACCAGGAATTGG
ATATTAATCGTCTGAGCGACTATGATGTAGAT
GCCATAGTTCCCCAGTCTTTTTTAAAAGATGA
TTCTATCGACAATAAAGTTCTTACGCGGTCAG
ACAAAAATCGTGGAAAATCAGATAACGTGCC
GAGCGAAGAAGTCGTTAAGAAAATGAAAAAT
TATTGGCGTCAGCTGCTTAATGCGAAGCTGAT
TACACAGCGCAAATTTGATAATCTGACTAAA
GCTGAAAGAGGAGGACTTAGTGAGTTAGACA
AGGCCGGGTTTCATTAAACGGCAACTGGTGGA
AACCAGACAAATAACTAAGCATGTTGCGCAG
ATACTGGATAGCCGTATGAATACAAAATACG
ATGAGAACGATAAATTGATTCGTGAAGTAAA
AGTTATCACGCTTAAATCTAAACTGGTCTCCG
ATTTCCGCAAGGATTTTCAGTTTTACAAAGTC
CGCGAAATCAATAACTACCACCACGCCACG
ATGCCTATCTGAACGCAGTCGTCGGCACAGC
ACTTATAAAAAAATATCCAAAACCTGGAGTCT
GAGTTTGTATACGGGGATTACAAGGTATATG
ACGTGCGGAAGATGATAGCCAAATCGGAGCA
AGAGATCGGGAAAGCTACCGCCAAGTACTTC
TTCTATTCTAATATAATGAATTTTTTCAAAC
GGAGATCACTCTTGCAAATGGAGAAATTCGT
AAACGCCCGTTGATTGAAACGAATGGTGAAA
CGGGGGAAATTGTTTGGGATAAAGGACGTGA
CTTTGCGACTGTGAGAAAAGTGCTGAGCATG
CCCAGGTCAATATTGTGAAGAAGACGGAAG
TTCAGACGGGCGGCTTCAGTAAAGAAAGCAT
TCTGCCGAAACGCAATTCTGACAAATTAATA
GCTCGGAAAAAAGATTGGGATCCTAAAAAAT
ACGGTGGCTTCGACTCTCCCACTGTTGCCTAT

TCAGTCCTGGTTGTAGCAAAAAGTCGAAAAAG
GAAAGAGTAAAAAGCTGAAAAGCGTTAAGG
AGCTGCTTGGTATTACAATTATGGAACGCTCT
TCCTTCGAAAAAATCCGATTGATTTTCTGGA
AGCCAAGGGCTATAAAGAAGTAAAAAAGA
CTTGATTATCAAACCTCCGAAGTATAGTCTGT
TCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAAAGAATGCT
GGCCTCGGCCGGCGAACTGCAAAAGGGGAAC
GAACTGGCGTTGCCTTCCAAATATGTGAACTT
TTTGTATTTAGCCTCCCATTACGAAAACTGA
AGGGTTCGCCTGAAGATAATGAACAGAAACA
GTTGTTTCGTTGAGCAACATAAACACTACCTGG
ATGAAATCATAGAGCAAATTTCCGAATTTAG
TAAACGTGTTATTCTGGCTGACGCAAATTTAG
ATAAAGTCCTTAGCGCTTATAATAAACATCGT
GATAAACCCATTTCGCGAGCAGGCTGAAAATA
TAATCCATCTTTTTACGCTTACTAATCTGGGT
GCTCCAGCTGCCTTCAAATATTTTGATACCAC
AATTGATCGTAAGCGCTACACCAGTACTAAA
GAGGTGTTGGATGCTACTCTGATTCACCAA
GTATTACCGCCTGTACGAAACGCGTATTGA
CCTGTCTCAGCTGGGCGGGGATACTAGAGGC
GGCGGGGGTAGCGGCGGTGGTGGCTCTATGA
ACAAGAACATTGACACAGTACGCGAAATCAT
TACTGTTGCAAGCATCCTGATTAAGTTTTCCC
GTGAAGACATCGTGGAGAACCGTGCCAATTT
CATCGCTTTTCTGAACGAGATCGGAGTAACTC
ACGAGGGCCGTAAGTTAAACCGTAACTCATT
CCGCAAGATCATTAGTAAATTGACACAGGAA
GACAAAAAACATTGATTGATGAGTTCAACG
AAGGCTTTGAGGGTGTCTATCGCTATCTTGAA

	<p>ATGTATACCAACAAGTAATAAGCTCGAGGAT CTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAG TCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTG TTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGCAG</p>
<p>PT7-lacO_gRNA0</p>	<p>GATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAAT TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAG CGGATAACAATTCCCCCATCTAATTCAACAA GAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAGTTGTT AGAACGCTCGGTCTTGACACCGGGCGTTTTT TCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGCTG CAGAATCA</p>
<p>PT7-lacO_gRNA1</p>	<p>GATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAAT TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAG CGGATAACAATTCCCCGCAAGGTGATAATC CATAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGAGTTGTT CAGAACGCTCGGTCTTGACACCGGGCGTTTT TTCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGCT GCAGAATCA</p>

target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli	AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCCT ATTCTTGTTGAATTAGATGGTTGACAGCTAGC TCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGGCCAA GGTGATAATCCATAGGGACCCACATACTCTG ATGATCCGAGACGGTCGGGTCCAGATATTCG TATCTGTGAGTAGAGTGTGGGCTCGGATCAT TCATGGCAAGAGACGGTCGGGTCCAGATATT CGTATCTGTGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCC ATGTGTATGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTC GGTCTTGACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGA GTCCATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGA
target-1a_PJ23117_target-0i_corn	GAACAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCCTC TATGGATTATCACCTTGGCGGATAAAACTTGT GCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCC GTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGT ACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAA TGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAAC GGTGGTATATTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAG GGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATTCAACA AGAATGGCGCGAGGAAGGAGGTCTGAGGAG GTCACTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGT CTTGACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTC CATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGATCAT

APÊNDICE 3

As figuras abaixo mostram os resultados de alinhamento das sequências com o sequenciamento. Todos os sequenciamentos mostraram que as clonagens dos RNAs broccoli e corn foram bem-sucedidas, assim como o gene da *SpdCas9*.

```

                2051                                                    2132
pSB1k3 ta... GTGTGGGCTCGGATCATTTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCAT
broccoli-... GTGTGGGCTCGGATCATTTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCAT
.....

                2133                                                    2214
pSB1k3 ta... GTGTATGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagCCTCTATG
broccoli-... GTGTATGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGCCTCTATG
.....

                2215                                                    2296
pSB1k3 ta... GATTATCACCTTGGCGGATAAAAACCTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCT
broccoli-... GATTATCACCTTGGCGGATAAAAACCTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCT
.....

                2297                                                    2378
pSB1k3 ta... GGTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATA
broccoli-... GGTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATA
.....

                2379                                                    2460
pSB1k3 ta... TTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATTCACAAGAATGGCGGAGGAAGGAGGTCTGAGG
broccoli-... TTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATTCACAAGAATGGCGGAGGAAGGAGGTCTGAGG
.....

                2461                                                    2542
pSB1k3 ta... AGGTCACTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagGAATTT
broccoli-... AGGTCACTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGGAATTT
.....

                2543                                                    2624
pSB1k3 ta... AATACGACTACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACCCCATCTAATTCACAAGAATGTTTTAGAGCTAGAAAT
broccoli-... AATACGACTACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACCCCATCTAATTCACAAGAATGTTTTAGAGCTAGAAAT
.....

                2625                                                    2706
pSB1k3 ta... AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGC-TTTTTGAGTTGTTTCAGAACGCT
broccoli-... AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGC■TTTTTTGAGTTGTTTCAGAACGC-
.....

```

Figura 25. Resultado do alinhamento da sequência target-0a_P_{J23117}-target-li_broccoli_ target-1a_P_{J23117}-target-0i_corn_P_{T7-lacO}-gRNA-0 (9.1 + 8) com o sequenciamento.

```

985                                     1066
pSB1K3 ta... GGTGATAATCCATAGGGACCCACATACTCTGATGATCCGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTCCGAGTAGAGTGTG
broccoli-li-... ---CAAAGGGGGGGGCGCGGAGCTCTGATGTCGGAGACGGTCGGTCCCTATAAAAGAGACACGAGTAGAGTGTG
.....

1067                                     1148
pSB1K3 ta... GGCTCGGATCATTTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTCCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTA
broccoli-li-... GGCTCGGATCATTTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTCCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTA
.....

1149                                     1230
pSB1K3 ta... TGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagCCTCTATGGATTA
broccoli-li-... TGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGCCTCTATGGATTA
.....

1231                                     1312
pSB1K3 ta... TCACCTTGCGGATAAAAACCTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTGA
broccoli-li-... TCACCTTGCGGATAAAAACCTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTGA
.....

1313                                     1394
pSB1K3 ta... TAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATTTGA
broccoli-li-... TAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTTCTTTACATGCCATTGGGATATCAACGGTGGTATATTTGA
.....

1395                                     1476
pSB1K3 ta... CAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATCAACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGGTCTGAGGAGGTC
broccoli-li-... CAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATCAACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGGTCTGAGGAGGTC
.....

1477                                     1558
pSB1K3 ta... ACTGCG-CCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagGAA-TTTAAT
broccoli-li-... ACTGCGCCAGTTGTTTCAGAACGCTCGGCTTGACACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGGAA-TTTAAT
.....

1559                                     1640
pSB1K3 ta... ACGAC-TCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCAGCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGT
broccoli-li-... ACAC-TCACTATAGGGGAATTGCT-----

```

Figura 26. Resultado do alinhamento da sequência target-0a_Pj23117_target-li_broccoli_target-1a_Pj23117_target-0i_corn_PT7-lacO_RiboJ_gRNA-0 (9.2 + 8) com o sequenciamento.

```

247 328
K3_target... -----GAA
IG01_C05_... AGGAGGTCACTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGGAA
.....

329 410
K3_target... TTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCAGCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAG
IG01_C05_... TTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCAGCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAG
.....

411 492
K3_target... TCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTGTTTACCATCTAATTCAACAAGAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
IG01_C05_... TCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTGTTTACCATCTAATTCAACAAGAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
.....

493 574
K3_target... GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCT
IG01_C05_... GTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCT
.....

575 656
K3_target... TGCACACCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGctgcagtcggcaaaaaagggcaaggtgtcaccac
IG01_C05_... TGCACACCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGGCAAGGTGTCACCAC
.....

657 738
K3_target... cctgccctttttcttttaaaaccgaaaagattacttcgcggttatgcaggctt-cctcgctcactgactcgctgcgctcggtcg
IG01_C05_... CCTGCCCTTTTTCTTTAAACCgAAAAGATTACTTCGCGTTATGCAGGCTTcCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTcG
.....

739 820
K3_target... ttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaagcggttaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaa
IG01_C05_... TTCGGCTGCGGCGAGCGATATCAGCTCACTCAATAGGGGTAAATACGTTATCCACAG-----

```

Figura 27. Resultado do alinhamento da sequência target-1a_P_{J23117}_target-0i_corn_P_{T7-lacO_RiboJ_gRNA-0} (9.2 + 11) com o sequenciamento.

```

1313                                     1394
pSB1K3 ta... aaaaaaaccttagctttcgctaaggatgatttctggaattcgcgcccgttctagagCCTATTCTTGTGAATTAGATGGT
broccoli-... -----ACCGTTTTGGTGAATTGAATGGT
.....

1395                                     1476
pSB1K3 ta... TGACAGCTAGCTCAGTCTAGGGATTGTGCTAGCAGGGCCAAGGTGATAATCCATAGGGACCCACATACTCTGATGATCCGA
broccoli-... TGACAGCTAGCTCAGTCTAGGGATTGTGCTAGCAGGGCCAAGGTGATAATCCATAGGGACCCACATACTCTGATGATCCGA
.....

1477                                     1558
pSB1K3 ta... GACGGTCGGGTCCAGATATTTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCGGATCATTTCATGGCAAGAGACGGTCGGGTCCAGAT
broccoli-... GACGGTCGGGTCCAGATATTTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCGGATCATTTCATGGCAAGAGACGGTCGGGTCCAGAT
.....

1559                                     1640
pSB1K3 ta... ATTTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTATGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGCACACCGGG
broccoli-... ATTTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTATGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGCACACCGGG
.....

1641                                     1722
pSB1K3 ta... CGTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagCCTCTATGGATTATCACCTTGGCGGATAAACTTGTGCTTATTTTCTTTACG
broccoli-... CGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGCCTCTATGGATTATCACCTTGGCGGATAAACTTGTGCTTATTTTCTTTACG
.....

1723                                     1804
pSB1K3 ta... GTCTTTAAAAAGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTT
broccoli-... GTCTTTAAAAAGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTT
.....

1805                                     1886
pSB1K3 ta... CTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCT
broccoli-... CTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCT
.....

1887                                     1968
pSB1K3 ta... AATTCAACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGGTCTGAGGAGGTCACCTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGCACACCG
broccoli-... AATTCAACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGGTCTGAGGAGGTCACCTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGCACACCG
.....

1969                                     2050
pSB1K3 ta... GGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagGAATTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCC
broccoli-... GGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGGAATTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA-----

```

Figura 28. Resultado do alinhamento da sequência target-0a_target-0a_P_{J23117}_target-1i_broccoli_target-1a_P_{J23117}_target-0i_corn_P_{T7-lacO}_RiboJ_gRNA-1 (10.2 + 8) com o sequenciamento.

```

4019
pSB1A3_te... AATTCGTA AACGCCCGTTGATTGAAACGAATGGTGA AACCGGGGAAATGTTTGGGATAAAGGACGTGACTTTGCGACTGTG
AsiA (Äsi... -----GAAGGAGATCTCTAGCGAACTACGTAACAAAAGTGCAGAGTCA
.....

4101
pSB1A3_te... AGAAAAGTGCTGAGCATGCCCCAGGTCAATATTGTGAAGAAGACGGAAGTTCAGACGGGCGGCTTCAGTAAAGAAAGCATTTC
AsiA (Äsi... ■GCCCCCAACGTAACATCAGTCTATGAAAGACTACTGCATGTCATGCACTGCGTGGCTTCAGTACAGAA■GCAATGGTGC
.....

4183
pSB1A3_te... TGCCGAAACGCAATTCTGACAAATTAATAGCTCGGAAAAAGATTGGGATCCTAAAAATACGGTGGCTTCGACTCTCCAC
AsiA (Äsi... TGCACTCTCAATCTGTCA■AGTAATAGCTCGGTCAAA■GATCGG■ATCAGCAA■TAAATGTAGTGG■AATTCGACTCTCCCA
.....

4265
pSB1A3_te... TGTTGCCATTCAGTCTGGTTGTAGCAAAAAGTCGAAAAAGGAAAGAGTAAAAAGCTGAAAAGCGTTAAGGAGCTGCTTGGT
AsiA (Äsi... CTCTTCTCTAGTCTAGTCTGGATCTAGCAAAA■CGTGGAAA■CATGAAAAGAGTCAA■AGCTCAGATGGCT■AAGGAGCTGGT■TGC
.....

4347
pSB1A3_te... ATTACAATTATGGAACGCTCTTCCCTTCGAAAAAATCCGATTGATTTTCTGGAAGCCAAGGGCTATAAAGAAGTAAAAAAG
AsiA (Äsi... ■TGTTCAT■TATGGA■AGCG■TTCCTTCGAA■AAAAAT■CGATTGATTT■TGGAAAGCCAAGGGCTATA■AGA■GTAA■AAAA
.....

4429
pSB1A3_te... ACTTGATTATCAAACCTCCGAAGTATAGTCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAAAGAAATGCTGGCCTCGGCCGGCGAAT
AsiA (Äsi... ACTTGATTATCAAACCTCCGAAGTATAGTCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAAAGAAATGCT■GCCTCGGCCGGCGA■GCT
.....

4511
pSB1A3_te... GCAAAAGGGGAACGAACTGGCGTTGCCTTCCAAATATGTGAACCTTTTGTATTTAGCCTCCCATTACGAAAAACTGAAGGGT
AsiA (Äsi... GCAAAAGGGGAACGAACTGGCGTTGCCTTCCAA■CTATGTGAACCTTT■GTATTTAGCCT■CCATTACG■AAAACTGAAGGGT
.....

4593
pSB1A3_te... TCGCCTGAAGATAATGAACAGAAACAGTTGTTGTTGAGCAACATAAACACTACCTGGATGAAATCATAGAGCAAATTTCCG
AsiA (Äsi... TCGCCTGA■GATAATGAACAGAAACAG■GTGTT■GG■TGAGCAACATAAACACTACCTGGATGAAATCATAGAGCAAATTTCCG
.....

4675
pSB1A3_te... AATTTAGTAAACGTGTTATTCTGGCTGACGCAAATTTAGATAAAGTCCTTAGCGCTTATAATAAACATCGTGATAAACCCAT
AsiA (Äsi... AATTT■GTAAACGTGTTATT■TGGC■GACGCAAATTT■GG■TAAAGTCCTTAGCGCTTATAATAAACATCGTGATAAACCCAT
.....

4757
pSB1A3_te... TCGCGAGCAGGCTGAAAATATAATCCATCTTTTACGCTTACTAATCTGGGTGCTCCAGCTGCCTTCAAATATTTTGATACC
AsiA (Äsi... TC■CGAGCAGGC■GAAAATATA■TCCATCTTTTACGCTTA■TAATCTGGGTGCTCCAG■TGCCTTCA■ATATTTTGATACC
.....

4839
pSB1A3_te... ACAATTGATCGTAAGCGCTACACCAGTACTAAAGAGGTGTGGATGCTACTCTGATTACCAAAGTATTACCGCCTGTACG
AsiA (Äsi... ■CAATTGAT■GTAAGC■CTAC■CCA■CCACTAAAGAG■AGGT■GGAG■CTGCT■TC■GAT■CA■CAA■AGT■TA■AC■G■CG■GCC■GC■ACG
.....

4921
pSB1A3_te... AAACGCGTATTGACCTGTCTCAGCTGGGCGGCATActagaGGCGGGGGGTAGCGCGGTGGTGGCTCTATGAACAAGAA
AsiA (Äsi... AAACGC■TATGAGCTGT■CAG■CC■G■AG■GG■TACC■TCC-----

```

Figura 29. Resultado do alinhamento da sequência P_{J23100}_TetR_P_{ter}_SpdCas9-AsiA com o sequenciamento.

APÊNDICE 4

O meio de lisogenia pode ser encontrado em dois formatos, ágar e caldo, suas formulações para 1 litro podem ser encontradas na Tabela 9.

Componente	Quantidade	
	Líquido	Sólido
Peptona 140	10g	10g
Extrato de Levedura	5g	5g
Cloreto de Sódio	10g	5g
Ágar	-	12g

Tabela 9. Receita dos meios caldo LB e LB ágar.

Fonte: (BERTANI, 1951).

O meio SOC é basicamente o caldo super ideal (SOB) com adição de glicose. A receita de meio SOC está na Tabela 10.

Componente	Quantidade
Triptona	2%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	10mM
KCl	2,5mM
MgCl ₂	10mM
MgSO ₄	10mM
Glicose	20mM

Tabela 10. Receita meio SOC.

Fonte: (HANAHAN *et al.*, 1983).