



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

**CELSO DELLE PIAGE NETO**

**CONSTRUÇÃO DE UM CIRCUITO DE REGULAÇÃO AUTÔNOMO E TEMPORAL  
DA EXPRESSÃO GÊNICA**

**Araraquara, SP**

**2022**

**CELSO DELLE PIAGE NETO**

**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 Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli

**Araraquara, SP**

**2022**

---

**P579c** Piage Neto, Celso Delle.  
Construção de um circuito de regulação autônomo e temporal da expressão gênica / Celso Delle Piage Neto. – Araraquara: [S.n.], 2022. 63 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.

1. CRISPR-Cas. 2. Expressão gênica. 3. RNA fluorescente. 4. Circuito genético. 5. Controle transcricional. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Título.

## **Dedicatória**

Este trabalho é dedicado a todos que me acompanharam e me deram forças durante toda a trajetória.

Aos meus pais, amigos e professores.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus colegas de laboratório, minha orientadora e a todos que lutam pela ciência pública de qualidade.

## RESUMO

A complexa rede de interações que permeia os processos de regulação da expressão gênica vem sendo, há muito tempo, alvo de pesquisas, uma vez que o alcance da compreensão plena acerca desses fenômenos pode levar ao desenvolvimento de circuitos genéticos sintéticos com diversas finalidades, desde aplicações em diagnósticos até o aprimoramento de sistemas de armazenamento de dados não-dependentes de silício. Tais circuitos podem ser desenvolvidos e regulados a partir do conceito de portas lógicas, onde moléculas diversas, como açúcares, são utilizadas como *inputs*, desencadeando a expressão de genes e iniciando a interação entre os módulos genéticos. Baseando-se na versatilidade de uso desses circuitos, o presente projeto desenvolveu um circuito genético para controle temporal autônomo da expressão gênica em *Escherichia coli*, através do controle transcricional dos RNAs broccoli e corn pelo sistema CRISPRa e CRISPRi. Foram realizadas simulações do circuito no software iBioSim 3.0 e os resultados mostram que o sistema tem potencial de funcionar. Ainda, foram construídas três linhagens contendo o sistema de controle transcricional dos RNAs. Os cultivos *in vivo* mostraram que não há interferência na emissão do sinal entre os fluoróforos, porém a baixa emissão de fluorescência e o crescimento lento das linhagens mostra que os parâmetros de cultivo e o circuito genético precisam de ajustes.

**Palavras-chave:** CRISPR-Cas; expressão gênica; RNA fluorescente; circuito genético; controle transcricional.

## **ABSTRACT**

The complex network of interactions that permeates the processes of gene expression regulation has been the subject of research for a long time, since reaching a full understanding of these phenomena can lead to the development of synthetic genetic circuits with different purposes, from applications in diagnostics to the improvement of non-silicon-dependent data storage systems. Such circuits can be developed and regulated based on the concept of logic gates, where different molecules, such as sugars, are used as inputs, triggering the expression of genes and initiating the interaction between the genetic modules. Based on the versatility of use of these circuits the present project developed a genetic circuit for autonomous temporal control of gene expression in *Escherichia coli* through transcriptional control of broccoli and corn RNAs by CRISPRa and CRISPRi systems. Circuit simulations were performed in the iBioSim 3.0 software and the results show that the system has operating potential. Furthermore, three strains containing the RNA transcriptional control system were constructed. The fluorescence signal and the slow growth of the strains show that the cultivation parameters and the genetic circuit need to be adapted.

**Keywords:** CRISPR-Cas; gene expression; fluorescent RNA; genetic circuit; transcriptional control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo representando os módulos de controle e resposta que compõem este projeto.....	17
Figura 2 – Simulação da produção de TetR.....	23
Figura 3 – Simulação da produção de SpdCas9_AsiA.....	24
Figura 4 – Simulação da produção de gRNA0.....	25
Figura 5 – Simulação da produção de Broccoli.....	26
Figura 6 – Resultado gerado pela simulação para produção de gRNA0.....	27
Figura 7 – Simulação da expressão de Broccoli e Corn no modelo ajustado.....	28
Figura 8 – Plasmídeo pSB1A3, com origem de replicação para <i>E. coli</i> , marca de resistência para ampicilina e as sequências P <sub>J23100_tetR</sub> (sentido reverso) e P <sub>tet_SpdCas9_asia</sub> com seus respectivos promotores.....	29
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de reação da PCR para amplificação da sequência P <sub>tet_SpdCas9</sub> .....	30
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de reação da PCR para amplificação da sequência P <sub>J23100_tetR</sub> .....	30
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas correspondentes ao corte das enzimas <i>EcoRI</i> e <i>PstI</i> .....	31
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose da PCR de correção do gBlock AsiA.....	32
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação da sequência do gene <i>asiA</i> no plasmídeo pSB1A3_tetR_SpdCas9_asia.....	32

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem das sequências P <sub>T7-lacO</sub> _gRNA-0 (9.1), P <sub>T7-lacO</sub> _RiboJ_gRNA-0 (9.2), P <sub>T7-lacO</sub> _gRNA-1(10.1) e P <sub>T7-lacO</sub> _RiboJ_gRNA-1.....	33
Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem das sequências target-1a_P <sub>J23117</sub> _target-0i_corn_P <sub>T7-lacO</sub> _gRNA-0 (9.1 + 11), target-1a_P <sub>J23117</sub> _target-0i_corn_P <sub>T7-lacO</sub> _RiboJ_gRNA-0 (9.2 + 11).....	34
Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem das sequências target-1a_P <sub>J23117</sub> _target-0i_corn_P <sub>T7-lacO</sub> _gRNA-1 (10.1 + 11), target-1a_P <sub>J23117</sub> _target-0i_corn_P <sub>T7-lacO</sub> _RiboJ_gRNA-1 (10.2 + 11).....	35
Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem da sequência target-0a_P <sub>J23117</sub> _target-1i_broccoli_target-1a_P <sub>J23117</sub> _target-0i_corn_P <sub>T7-lacO</sub> _gRNA-0 (9.1 + 8, 877 bp).....	36
Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem da sequência target-0a_P <sub>J23117</sub> _target-1i_broccoli_target-1a_P <sub>J23117</sub> _target-0i_corn_P <sub>T7-lacO</sub> _RiboJ_gRNA-0 (9.2 + 8, 951 bp).....	36
Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem da sequência target-0a_P <sub>J23117</sub> _target-1i_broccoli_target-1a_P <sub>J23117</sub> _target-0i_corn_P <sub>T7-lacO</sub> _RiboJ_gRNA-1 (10.2 + 8, 951 bp).....	37
Figura 20 – (a) e (c) Resultados de fluorescência para a linhagem contendo a sequência de ativação do RNA broccoli. (b) e (d) Resultados de fluorescência para a linhagem contendo a sequência de ativação para o RNA corn.....	39

Figura 21 – (a) e (c) Crescimento das linhagens 9.1 e 9.2 ao longo de 4 horas de cultivo. (b) e (d) Resultados de fluorescência das linhagens 9.1 e 9.2 ao longo de 4 horas de cultivo, com leitura no comprimento de onda do fluoróforo DFHO.....40

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – gBlocks utilizados nos experimentos

Tabela 2 - Reações de digestão e respectivas enzimas

## Sumário

Dedicatória .....	3
Agradecimentos .....	4
RESUMO .....	5
Palavras-chave: CRISPR-Cas; expressão gênica; RNA fluorescente; circuito genético; controle transcricional.....	5
ABSTRACT .....	6
Keywords: CRISPR-Cas; gene expression; fluorescent RNA; genetic circuit; transcriptional control. ....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	10
INTRODUÇÃO .....	13
Desenvolvimento .....	14
Revisão da Literatura.....	14
Aptâmeros de RNA como repórteres.....	14
CRISPR-Cas.....	15
CRISPRi .....	16
CRISPRa .....	16
Planejamento e descrição dos processos .....	16
Circuitos genéticos e módulos planejados.....	16
Módulo de controle.....	18
Módulo de resposta .....	18
Materiais e Métodos.....	19
Amplificação das sequências de DNA .....	19
Digestão e ligação .....	20
Transformação .....	21
Cultivos.....	21
Cultivo 0: teste de crescimento e fluorescência – indução OD 0,1.....	21
Cultivo 1: teste de crescimento e fluorescência – indução OD 0,05.....	22
Cultivo 2: teste de volumes de leitura – indução OD 0,05.....	22
Cultivo 3: teste de ligação cruzada.....	22
Simulações com o software iBioSim 3.0.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
Simulações computacionais com o software iBiosim 3.0 .....	23
Construção das sequências para montagem do circuito .....	28

Clonagens e construção dos plasmídeos .....	29
Cultivos das linhagens de BL21 .....	38
CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICE .....	44

## INTRODUÇÃO

A expressão gênica nas células é regulada de diversas formas, envolvendo processos de ativação e repressão, controlados por proteínas e RNAs reguladores. Esses processos, muitas vezes são alterados em função de variações no ambiente, tais como presença ou ausência de determinado composto químico, mudanças de temperatura e pH. A detecção do estímulo gera um produto, uma proteína ou um RNA, que irá regular a ativação ou repressão de outro gene, formando circuitos de interações complexas dentro da célula.

Os circuitos sintéticos de controle da expressão gênica comumente usados envolvem controle de processos de ativação e repressão desencadeados por substâncias indutoras, tais como IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo), anidrotetraciclina (aTc), arabinose, salicilato, homoserina lactona, entre outros (MEYER et al., 2019). Nestes casos, o processo desejado só é mantido na presença do indutor, e a reversão do processo é possível com a exaustão ou retirada completa do composto. Ou seja, os processos não são autônomos, tampouco podem ser alternados de forma rápida e fácil. Processos autônomos já foram implementados baseados em sistemas de *quórum sensing* bacteriano (CORRÊA et al., 2020; KIM et al., 2017). Estes, apesar de autônomos, permitem apenas uma transição de desligado a ligado (ou vice-versa) durante um cultivo, sendo ainda um controle pontual. O único circuito genético já desenvolvido que permite controle autônomo e facilmente reversível foi construído combinando o processo de *quórum sensing* com o processo de lise celular em cultivo com fluxo contínuo de meio em dispositivo de microfluídica. Neste sistema, a lise celular desencadeada pelo processo de *quórum sensing* leva a diminuição da população e conseqüentemente do indutor, fazendo com que o sistema seja reiniciado em ciclos (DANINO et al., 2010). Este sistema apresenta funcionamento autônomo, e reversível, mas permite apenas um padrão de respostas que alterna expressão e não-expressão do gene repórter (equivalente a 1 e 0 no sistema binário). Assim, um circuito gênico que opere de forma autônoma, rapidamente reversível e que seja capaz de alternar

respostas em diferentes ordens para criar diferentes mensagens, ainda não foi reportado na literatura. Recentes desenvolvimentos de técnicas de detecção de RNAs por fluorescência em tempo real e de controle da expressão gênica por CRISPR-Cas podem permitir o desenvolvimento deste tipo de circuito.

Com isso, o presente trabalho desenvolveu linhagens geneticamente modificadas de *E. coli* contendo um circuito sintético de regulação da expressão gênica de dois RNAs fluorescentes, broccoli e corn, para aplicações futuras no controle temporal da expressão gênica. O desenvolvimento desse trabalho abre caminho para a futura criação de dispositivos biológicos com capacidade de armazenamento e leitura de dados em tempo real, com emprego de um código binário de DNA. Além disso, por conta de sua versatilidade e modularidade, pode ter outras aplicações como a criação de kits diagnósticos para detecção de doenças de forma rápida e em tempo real.

## **Desenvolvimento**

### **Revisão da Literatura**

#### **Aptâmeros de RNA como repórteres**

A construção de circuitos biológicos sintéticos pode auxiliar na compreensão de como a maquinaria celular funciona na regulação de genes. Algumas ferramentas já conhecidas podem ser utilizadas e combinadas para criar um sistema no qual a resposta gerada possa ser mensurada e controlada temporalmente. Como exemplo de uma resposta celular mensurável, está o da expressão heteróloga do gene da proteína verde fluorescente (GFP), muito utilizada como repórter na expressão gênica (SOUTHWARD; SURETTE, 2002). Apesar da facilidade de expressar essa proteína fluorescente e da sua alta estabilidade, por demorar cerca de 30 min para maturar e por acumular-se na célula, a GFP não é a melhor opção para estudar alterações temporais na expressão gênica. Em contrapartida, os RNAs bacterianos são sintetizados e maturados rapidamente, e possuem, em sua maioria, um tempo de meia-vida de 3 a 8 min (BERNSTEIN et al., 2002). Alguns RNAs sintéticos, os aptâmeros de RNA, tem a capacidade de se ligar a moléculas-alvo com alta especificidade e afinidade, por conta das estruturas secundárias que conseguem adquirir após a transcrição (LAKHIN et al., 2013; STOLTENBURG et al., 2007). Assim, a

utilização de aptâmeros de RNA, que se ligam a fluoróforos e emitem fluorescência, como os RNAs broccoli e corn, mostra-se vantajosa em relação à GFP, uma vez que não necessita da maquinaria de tradução, são rapidamente reciclados pela célula e podem ser quantificados por fluorescência em tempo real dentro da célula (CHANDLER et al., 2018).

### **CRISPR-Cas**

O controle da expressão gênica para a síntese de proteínas ou RNAs, pode ser feito através do sistema CRISPR-Cas modificado. O CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* associado à Cas) é o sistema encontrado em bactérias e arqueias que funciona como uma imunidade adaptativa contra vírus e plasmídeos. Nesse sistema, o DNA invasor é clivado e adicionado ao DNA do hospedeiro, que passa a reconhecer o material genético em caso de reinfecções. Assim, o CRISPR-Cas é formado pela endonuclease Cas9 e seu sgRNA (*small guide RNA*). O sgRNA, ou simplesmente gRNA, é formado pelo tracrRNA (*trans-activating crRNA*) e o crRNA (CRISPR RNA). Do ponto de vista da engenharia, o gRNA pode conter duas partes: uma parte constante, chamada de *scaffold* e uma parte que pode variar em até 20 nucleotídeos na extremidade 5', a qual é complementar à sequência alvo, podendo ser reprogramada para diferentes sítios no DNA. Além disso, a Cas9 é uma proteína derivada de *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) com atividade nucleolítica (CUI et al., 2018). Existem diversas variações do sistema CRISPR-Cas, sendo que em um deles, o sistema CRISPR-Cas tipo II, a proteína Cas9 inativa fagos que infectam *S. pyogenes*, utilizando crRNAs como guias e introduzindo uma quebra dupla na fita de DNA no genoma viral (HELER et al., 2015). Para realizar a quebra, o sítio alvo no DNA deve conter um protoespaçador onde a sequência complementar do gRNA irá se ligar e uma sequência adjacente ao protoespaçador chamada PAM (*protospacer adjacent motif*), na qual a Cas9 se ligará (para Cas9-Sp, a PAM é 5'-NGG-3'). Além de promover a deleção de genes pela quebra dupla no DNA, o sistema CRISPR-Cas modificado pode ser utilizado para outras funções, como a repressão gênica (CRISPRi) e a ativação gênica (CRISPRa) (CUI et al., 2018).

### **CRISPRi**

A proteína Cas9 do sistema CRISPR-Cas tipo II abriga dois domínios nucleolíticos e a introdução de mutações pontuais em cada domínio D10A e H840A, bloqueia a atividade nucleolítica da Cas9, contudo, conserva sua capacidade de ligação ao alvo guiada pelo gRNA (BREZGIN et al., 2019). Essa capacidade de ligação pode ser usada para bloquear o progresso da RNA polimerase, durante a transcrição, a partir do design do gRNA, tendo como alvo a sequência de DNA entre as posições -10 e +1 do promotor bacteriano. Neste caso, o complexo dCas9-gRNA-DNA funciona como barreira física para o processo de transcrição (ZHAO et al., 2017; HO et al., 2020)

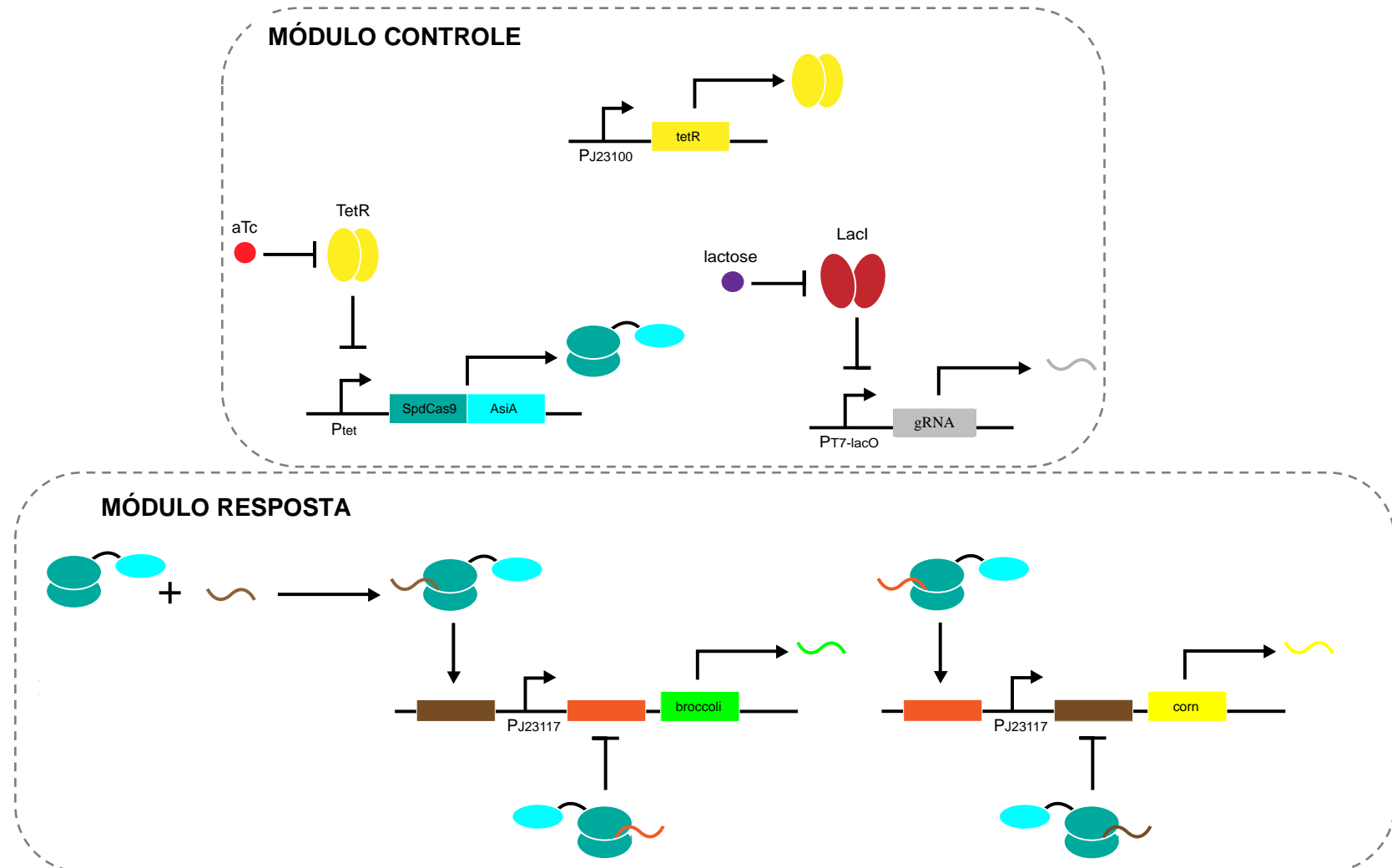
### **CRISPRa**

CRISPRa é uma ferramenta utilizada na engenharia de circuitos genéticos, capaz de atuar no controle da ativação de genes específicos. Passiva de utilização tanto em Eucariotos quanto em Procariotos e, similar ao CRISPRi, trata-se de um sistema onde a enzima Cas9 sem atividade nucleolítica (dCas9) é fusionada em sua porção C-terminal a uma ou mais proteínas ativadoras. Dessa forma, uma vez que o complexo dCas9-gRNA-DNA é formado, a ativadora é aproximada do promotor provendo assim a ativação. Ao contrário de outros modos de controle da expressão gênica mediado por proteínas ativadoras, devido a capacidade do sistema CRISPR em utilizar gRNA para reconhecimento de sequências de DNA, o sistema CRISPRa possui como vantagem uma facilidade em reprogramar as sequências alvo, promovendo assim uma maior gama de genes regulados (LIU et al., 2019; HO et al., 2020).

### **Planejamento e descrição dos processos**

#### **Circuitos genéticos e módulos planejados**

Os circuitos genéticos construídos neste projeto foram classificados em módulos, para facilitar o entendimento e a organização da construção das linhagens. Foram construídos dois módulos: controle e resposta (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo representando os módulos de controle e resposta que compõem este projeto. No módulo controle, a produção da dCas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpdCas9) fusionada à proteína ativadora AsiA será produzida por indução com aTc, e o gRNA (0 ou 1) produzido por indução com lactose. Cores iguais indicam um par gRNA e seu alvo junto ao promotor. Os gRNAs -0 e -1, ativam e desativam os RNAs broccoli e corn no módulo resposta, de forma que, a cada passo, um é ativado e o outro reprimido pelo mesmo gRNA (novamente as cores dos gRNAs combinam com seus alvos nos promotores).

### Módulo de controle

Responsável pela maquinaria de regulação do processo, sendo formado pela proteína de fusão dCas9-AsiA, proteína repressora TetR e por gRNAs. Este módulo é composto pelas seguintes unidades de transcrição:

1. P<sub>J23100\_tetR</sub>
2. P<sub>tet\_dCas9-AsiA</sub>
3. P<sub>T7-lacO\_gRNA-0</sub> ou P<sub>T7-lacO\_gRNA-1</sub>

As partes que constituem as unidades são descritas abaixo:

P<sub>J23100</sub> = promotor forte da família de promotores constitutivos Anderson para *E. coli* ([http://parts.igem.org/Part:BBa\\_J23100](http://parts.igem.org/Part:BBa_J23100))

tetR = gene que codifica a proteína repressora TetR. A repressão promovida por TetR pode ser revertida por tetraciclina ou anidrotetraciclina (aTc).

P<sub>tet</sub> = promotor regulado por TetR

dCas9 = versão cataliticamente inativa da Cas9.

AsiA = *Audrey Steven's inhibitor A*. Proteína anti-sigma70 do bacteriófago T4, que funciona como ativadora da expressão gênica quando fusionada à dCas9 (HO et al., 2020).

P<sub>T7-lacO</sub> = promotor da T7 RNA polimerase com sitio de regulação para proteína LacI (lacO).

gRNA-0 ou gRNA-1 = RNA guia de início do sistema.

### Módulo de resposta

Responsável pela resposta do sistema. Composto pelos genes dos RNAs broccoli e corn. Os RNAs formam aptâmeros capazes de se ligar a fluoróforos específicos. Os RNAs e os fluoróforos não apresentam fluorescência quando isolados, apenas quando ligados. Os RNAs broccoli e corn foram escolhidos por emitir fluorescência em comprimentos de onda diferentes após conjugação com os fluoróforos (Broccoli-DFHBI: ex-472 nm e em-507nm; Corn-DFHO: ex-500 nm e em-550 nm), por representarem uma resposta mais rápida como repórteres, já que não precisam passar pelo processo de tradução, e por apresentar rápida degradação em bactérias (comparado a proteínas fluorescentes como repórteres). Este módulo é composto pelas seguintes unidades de transcrição:

1. target-0a\_P<sub>J23117\_target-1i\_broccoli</sub>
2. target-1a\_P<sub>J23117\_target-0i\_corn</sub>

As partes que constituem as unidades são descritas abaixo:

target-0a e target-1a = alvos para ativação pelo sistema CRISPRa.

target-0i e target-1i = alvos para repressão pelo sistema CRISPRi.

P<sub>J23117</sub> = promotor fraco da família de promotores constitutivos Anderson para *E. coli* ([http://parts.igem.org/Part:BBa\\_J23100](http://parts.igem.org/Part:BBa_J23100)).

broccoli = RNA broccoli. Aptâmero capaz de emitir fluorescência quando ligado ao fluoróforo DFHBI ((Z)-3-((1H-benzo[d]imidazol-4-yl)methyl)-5-(3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene)-2-methyl-3,5-dihydro-4H-imidazol-4-one).

corn = RNA corn. Aptâmero capaz de emitir fluorescência quando ligado ao fluoróforo DFHO (3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone-2-oxime).

## Materiais e Métodos

A tabela 1 apresenta a identificação (ID) de algumas sequências, criadas para facilitar a nomenclatura durante os experimentos.

Tabela 1. gBlocks utilizados nos experimentos.

ID	gBlock	Tamanho (bp)
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

### Amplificação das sequências de DNA

A amplificação das sequências foi feita utilizando PCR com a enzima Phusion Hifi-DNA Polimerase. A reação de PCR foi realizada de acordo com o protocolo, para um volume final de 10  $\mu$ L, cuja reação contém: tampão 5X, 10  $\mu$ M de primer forward e reverse, 10mM dNTPs, a enzima Phusion Hifi-DNA Polimerase, o molde de DNA (concentração variável de acordo com o tamanho de

cada sequência; 0.1-1 ng para DNA plasmidial e 5-50 ng para DNA genômico) e água MiliQ. A reação foi submetida ao termociclador com temperatura de desnaturação de 98°C, temperatura de anelamento de acordo com a T<sub>m</sub> de cada primer e extensão a 72°C.

### Digestão e ligação

Os plasmídeos foram construídos de acordo com o protocolo das enzimas de restrição *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* e *PstI*, que consiste em montar uma reação contendo o tampão 10X da enzima, água MiliQ e o plasmídeo/inserto (0,5-1 ug/uL), sendo que cada sequência contém o sítio de restrição da enzima utilizada. As reações de digestão foram conduzidas em temperatura de 37°C de acordo com o tempo de incubação máximo de cada enzima. Nas reações contendo o vetor foi adicionada a fosfatase FastAP, para remover grupos fosfatos das extremidades do plasmídeo e prevenir a recircularização durante a ligação.

Após a reação de digestão, a ligação foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase. De acordo com o protocolo, a reação consiste na enzima, no tampão 10X, água MiliQ e as sequências digeridas e purificadas, sendo que as massas de inserto e vetor em cada reação foram calculadas pelo software Ligation Calculator, pois para cada reação há um volume específico de vetor:inserto. Os controles negativos continham apenas o vetor, sendo que o volume de inserto foi preenchido com água MiliQ. A reação de ligação foi incubada overnight a 16 °C e a enzima foi inativada com 10 minutos a 65°C.

A Tabela abaixo lista todas as reações de digestão utilizadas no trabalho

**Tabela 2.** Reações de digestão e respectivas enzimas.

Reação	Parte de DNA	Enzimas*	Sequências finais
1	pSB1A3	<i>E + P + F</i>	pSB1A3_SpdCas9_tetR
	SpdCas9	<i>X + P</i>	
	tetR	<i>E + S</i>	
2	pSB1K3	<i>X + P + F</i>	pSB1K3_PT7lacO_gRNA0 pSB1K3_PT7lacO_gRNA1
	PT7lacO_gRNA0	<i>X + P</i>	
	PT7lacO_gRNA1	<i>X + P</i>	
3	pSB1K3	<i>X + P + F</i>	pSB1K3_PT7lacO_RiboJ-gRNA0 pSB1K3_PT7lacO_RiboJ-gRNA1
	PT7lacO_RiboJ-gRNA0	<i>X + P</i>	
	PT7lacO_RiboJ-gRNA1	<i>X + P</i>	
4	pSB1K3_PT7lacO_gRNA0	<i>E + X + F</i>	pSB1K3_target-corn_gRNA0 pSB1K3_target-corn_gRNA1
	pSB1K3_PT7lacO_gRNA1	<i>E + X + F</i>	

	pSB1K3_PT7lacO_RiboJ-gRNA0	<i>E + X + F</i>	pSB1K3_target-corn_RiboJ-gRNA0 pSB1K3_target-corn_RiboJ-gRNA1
	pSB1K3_PT7lacO_RiboJ-gRNA1	<i>E + X + F</i>	
	target-1a_PJ23117_target-0i_corn	<i>E + S</i>	
5	pSB1K3_target-corn_gRNA0	<i>E + P + F</i>	pSB1K3_target-broccoli_target-corn_gRNA0 pSB1K3_target-broccoli_target-corn_gRNA1 pSB1K3_target-broccoli_target-corn_RiboJ-gRNA0 pSB1K3_target-broccoli_target-corn_RiboJ-gRNA1
	pSB1K3_target-corn_gRNA1	<i>E + P + F</i>	
	pSB1K3_target-corn_RiboJ-gRNA0	<i>E + P + F</i>	
	pSB1K3_target-corn_RiboJ-gRNA1	<i>E + P + F</i>	
	target-0a_J23117_target-1i_broccoli	<i>E + S</i>	
6	pSB1A3_SpdCas9_tetR	<i>S + P + F</i>	pSB1A3_SpdCas9_tetR_asia
	asia	<i>X + P</i>	

\**E* – *EcoRI*; *X* – *XbaI*; *S* – *SpeI*; *P* – *PstI*; *F* – *FasAP*

### Transformação

A reação de transformação foi feita utilizando choque térmico. Assim, 10µL de reação de ligação e 50µL de células de *E. coli* quimicamente competentes foram incubados em gelo por 30 minutos. Após isso, incubados em 42°C por 30 segundos e em gelo novamente por 2 minutos. Após o choque térmico, foi adicionado 250µL de meio SOC e incubado por 1h30 minutos, a 37°C, 220 rpm. Após incubação, 100µL foram plaqueados em placa de Petri com meio LB contendo o antibiótico específico para cada vetor (concentrações para *E. coli*: Cloranfenicol - 25µg/mL; Ampicilina - 100µg/mL; Canamicina - 50 µg/mL).

### Cultivos

Foram realizados cultivos iniciais apenas para testar a resposta do sistema, a velocidade de crescimento das linhagens e a quantidade de fluorescência emitida por cada fluoróforo. Assim, os cultivos de 0 a 3 descritos abaixo funcionaram como um ajuste de parâmetros para os próximos.

#### Cultivo 0: teste de crescimento e fluorescência – indução OD 0,1

Para realização do primeiro cultivo, foi preparado inóculo da linhagem contendo a sequência 9.2 (transcreve broccoli) e 10.2 (transcreve corn), incubado por 16h, 37°C. Após cultivo *overnight*, a densidade óptica (OD) do pré-inóculo foi medida em comprimento de onda 600 nm. Assim, o volume de pré-inóculo necessário para uma OD inicial de 0,1 foi calculado e inoculado em Erlenmeyer de 200 mL, para um volume final de 25 mL de meio mínimo. Foi realizado um cultivo com indução e outro sem. A indução com IPTG 1 mM e aTc 200 mg/mL foi

realizada desde o início do cultivo. Foram retiradas alíquotas de 2 mL dos tempos 0h, 3h e 6h. Em cada alíquota, foi adicionado DMSO (controle negativo, 10 mM), DFHBI (concentração 10 mM) e DFHO (concentração 10 mM). A fluorescência foi medida em leitora de placas, em triplicata para cada fluoróforo, utilizando os comprimentos de emissão e excitação de cada fluoróforo (470em e 505ex – DFHBI; 505em e 545ex – DHFO).

### **Cultivo 1: teste de crescimento e fluorescência – indução OD 0,05**

O pré-inóculo do Cultivo 1 foi realizado nas mesmas condições do Cultivo 0. O volume de pré-inóculo foi calculado para uma OD inicial de 0,05. Foram retiradas seis alíquotas de 1 mL, centrifugadas por 2 min a 13000 rpm, para que o meio não interferisse na fluorescência. O pellet foi ressuspendido em salina. Em cada alíquota dos cultivos com e sem indução, foi adicionado DMSO, DFHO e DFHBI, separadamente, nas mesmas concentrações do Cultivo 0. A leitura foi realizada nas mesmas condições do Cultivo 0.

### **Cultivo 2: teste de volumes de leitura – indução OD 0,05**

O Cultivo 2 foi realizado nas mesmas condições do Cultivo 1, porém apenas com as linhagens 9.2 e 10.2. A diferença dos outros testes foi nos pontos retirados em 0h, 2h e 4h e na leitura de fluorescência, onde foram utilizados dois volumes distintos, de 100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L para verificar se ocorria alguma mudança na leitura.

### **Cultivo 3: teste de ligação cruzada**

O terceiro cultivo foi realizado nas mesmas condições do Cultivo 2, com as linhagens 9.1 e 9.2, porém com duas concentrações diferentes do fluoróforo DFHO (10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda do fluoróforo DFHO apenas, para observar a possibilidade de ligação cruzada entre broccoli e fluoróforo, caso o broccoli estivesse sendo produzido

### **Simulações com o software iBioSim 3.0**

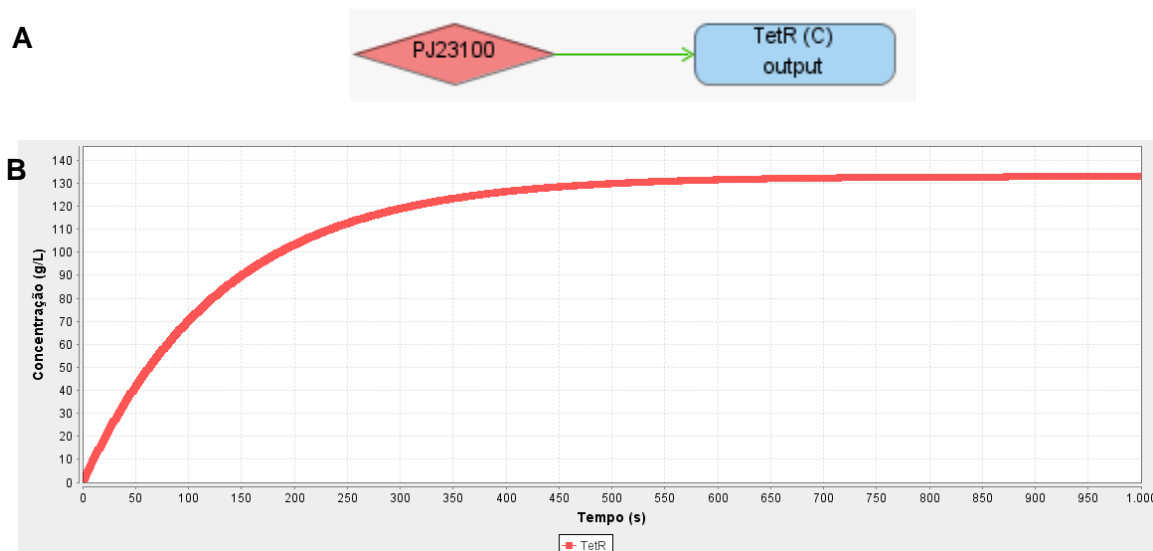
O software iBioSim 3.0 foi utilizado para construir o modelo do circuito biológico descrito no projeto. Este software permite a criação de circuitos gênicos conectados entre si e a visualização dos resultados das simulações através de gráficos de produção de um produto gênico ao longo do tempo. A simulação

descrita a seguir corresponde ao circuito que será clonado na Linhagem 1. A Linhagem 2 não foi simulada por possuir as mesmas partes biológicas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Simulações computacionais com o software iBiosim 3.0

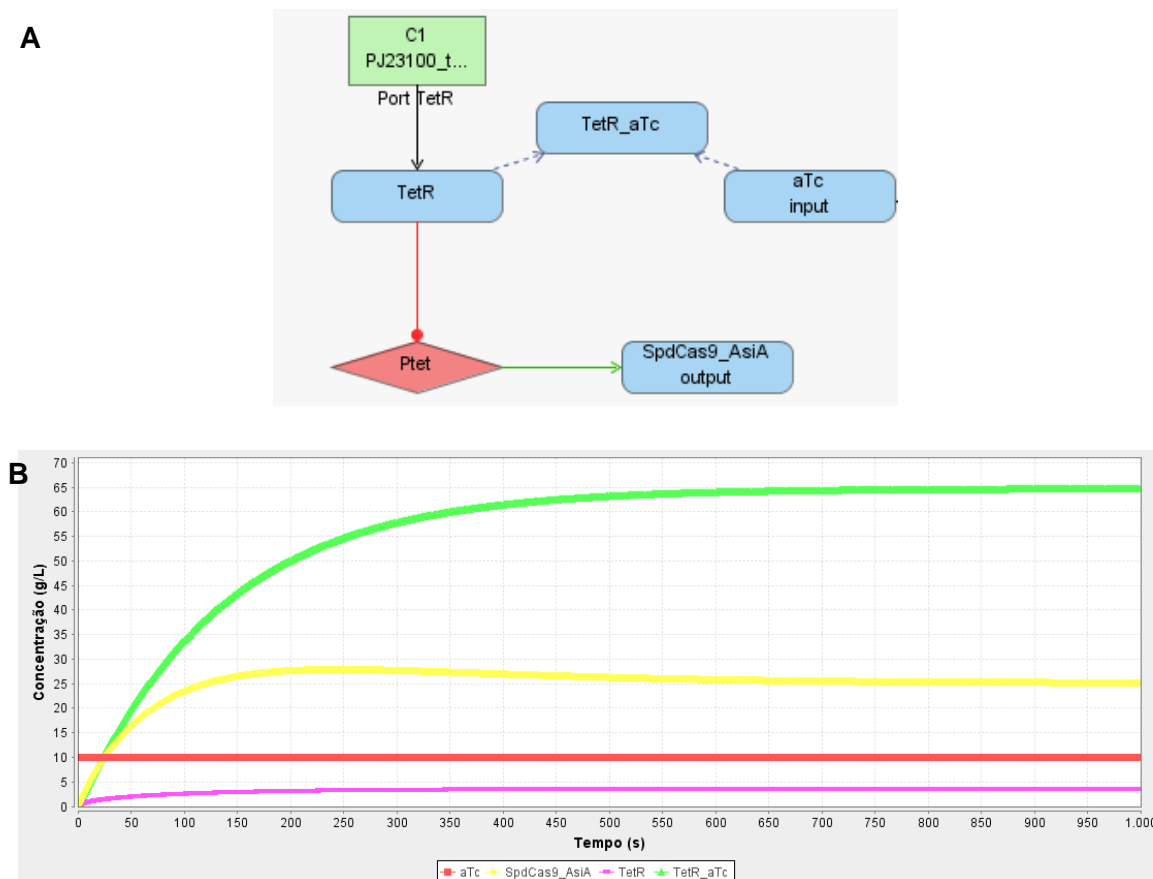
O modelo de produção de TetR foi construído de forma constitutiva, sob o controle do promotor  $P_{J23100}$  (Figura 2A). O promotor possui as condições iniciais das variáveis do próprio software e a proteína foi considerada como um *output* constitutivo e com degradação. O resultado da simulação mostra a produção constitutiva de TetR ao longo do tempo (Figura 2B). O gráfico mostra a produção da proteína, em vermelho, mostrando aumento exponencial da concentração da proteína até a estabilização com a taxa de síntese se igualando a taxa de degradação



**Figura 2.** Simulação da produção de TetR. **A)** Produção de TetR sob o comando do promotor  $P_{J23100}$ . **B)** Resultado da simulação da produção da proteína TetR.

O modelo da produção da proteína SpdCas9, fusionada à proteína de ativação AsiA, foi construído sob controle do promotor induzível  $P_{tet}$  (Figura 3A). A presença constante de aTc impede a ação repressora da TetR no promotor  $P_{tet}$  devido à formação do complexo TetR\_aTc. A TetR está sendo importada do modelo apresentado anteriormente (Figura 1A). O resultado da simulação mostra a produção de SpdCas9\_AsiA ao mesmo tempo da formação do complexo TetR\_aTc (Figura 3B). O gráfico mostra a produção da proteína, em amarelo,

mostrando estabilização da mesma após atingir a concentração de 25g/L. Em verde observa-se a formação do complexo TetR\_aTc, o qual se mantém estável após atingir 65 g/L.

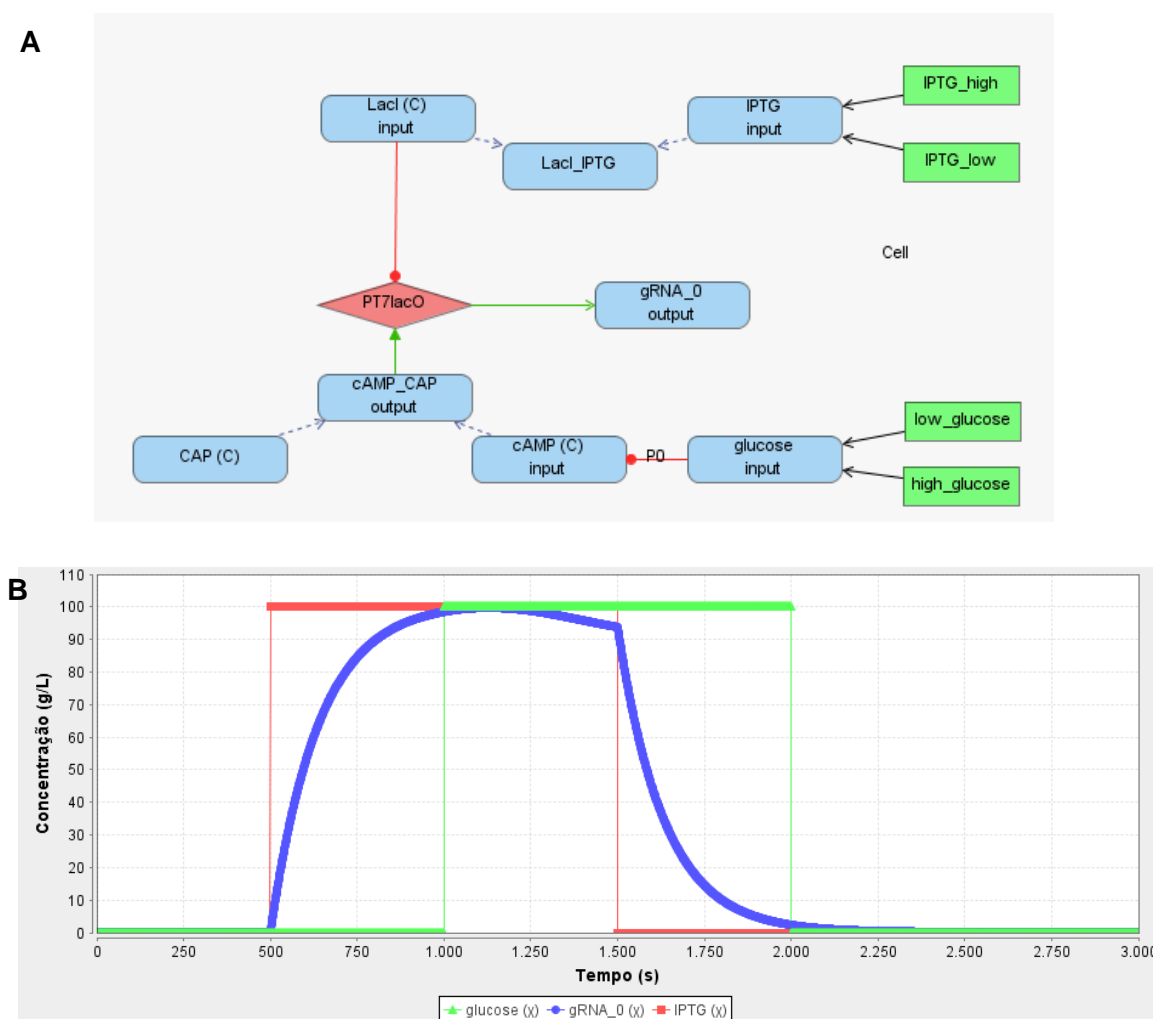


**Figura 3.** Simulação da produção de SpdCas9\_AsiA. **A)** Modelo de produção da proteína SpdCas9 fusionada com AsiA, através da ativação do promotor  $P_{tet}$  pela adição de aTc. **B)** Resultado da simulação da produção da proteína SpdCas9\_AsiA.

O modelo de produção do gRNA0 foi construído sob controle do promotor  $P_{T7\_lacO}$ , que é reprimido pela proteína LacI quando não há IPTG no meio. Já com a adição de IPTG, há formação do complexo LacI\_IPTG, retirando a repressão do sítio operador *lacO*. Assim, com IPTG no meio e na ausência de glicose, a expressão aumenta devido a ausência de repressão e também pela ação do complexo cAMP\_CAP, presente apenas quando a concentração de glicose é baixa, aumentando a força de expressão (Figura 4A). Nos quadrados verdes estão representados os eventos *IPTG\_high* (adição de IPTG em 500 s), *IPTG\_low*

(remoção de IPTG em 1500 s), *high\_glucose* (adição de glicose em 1000 s) e *low\_glucose* (remoção de glicose em 2000 s). A glicose está reprimindo a formação de cAMP através de um promotor indireto, como forma de representar simplificadaamente o processo de repressão catabólica.

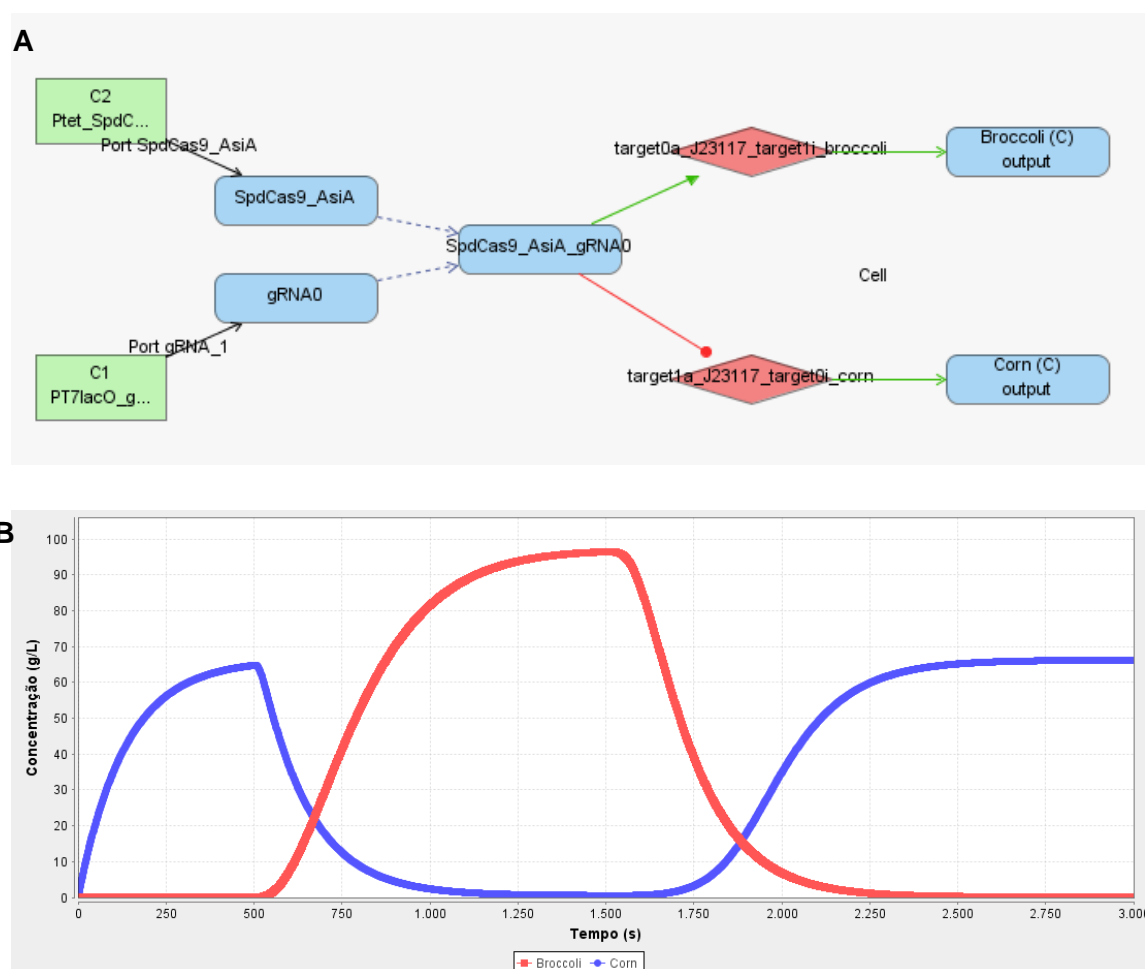
O resultado da simulação mostra a produção de gRNA0 após a adição de IPTG, em 500 s. Há uma pequena queda de produção após a adição de glicose. Em 1500 s há uma queda completa por conta da remoção de IPTG (Figura 4B).



**Figura 4.** Simulação da produção de gRNA0. **A)** Modelo da produção do gRNA0, através do promotor  $P_{T7\_lacO}$ , mediado por IPTG e glicose. **B)** Resultado da simulação da produção de gRNA0 (linha azul) com a adição e remoção de IPTG (linha vermelha) e glicose (linha verde).

O modelo para produção do Broccoli e repressão do Corn mostra a ativação do Broccoli pelo complexo SpdCas9\_AsiA\_gRNA0, enquanto o Corn é reprimido pelo mesmo complexo (Figura 5A). A proteína SpdCas9\_AsiA e o gRNA0 estão sendo produzidos nos modelos anteriores e importados. (Figura 3A e 4A).

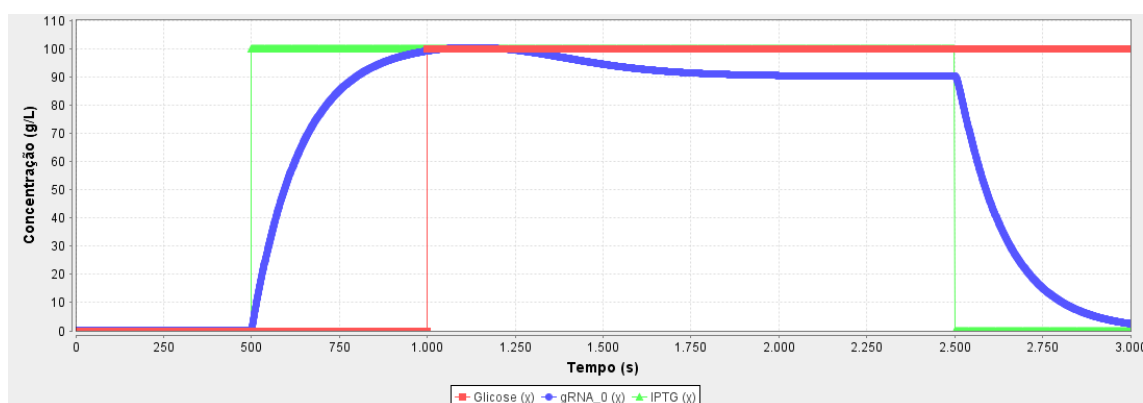
No resultado da simulação do modelo anterior é possível observar que o Corn está sendo produzido desde o começo, já o Broccoli só começa a ser produzido em 500 s, que é o momento exato da adição de IPTG e, assim, inicia-se a produção do gRNA0 (Figura 4B). A produção de Corn mesmo com a repressão pelo complexo SpdCas9\_AsiA mostra que este modelo ainda não se comporta como o esperado.



**Figura 5.** Simulação da produção de Broccoli. **A)** Modelo de produção de Broccoli, através da ativação do promotor P<sub>J23117</sub> pelo complexo SpdCas9\_AsiA\_gRNA0 e consequente repressão pelo mesmo complexo para impedir a produção de Corn. **B)** Resultado da simulação da produção de RNA

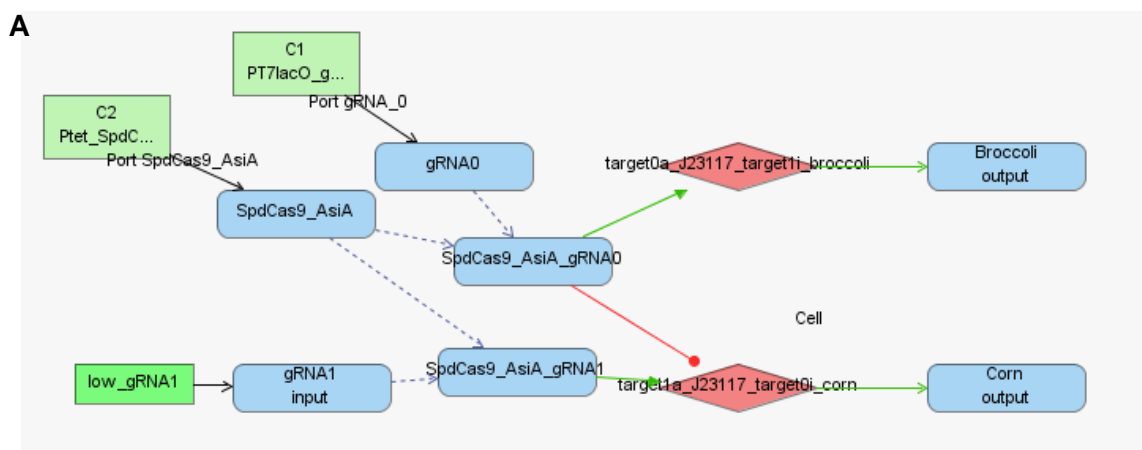
fluorescente Broccoli, em vermelho, e repressão do RNA fluorescente Corn, em azul, após a adição de IPTG.

Para observar melhor o efeito da adição e remoção de IPTG e também da adição de glicose no meio, os eventos do modelo anterior (Figura 5A) foram alterados, sendo que IPTG foi adicionado em 500 s e retirado em 2500 s e a glicose foi mantida constante a partir de 1000 s (Figura 6). O resultado gerado pela simulação, com as devidas alterações, mostrou uma leve queda na produção de gRNA0 após a adição de glicose e queda total após remoção de IPTG.

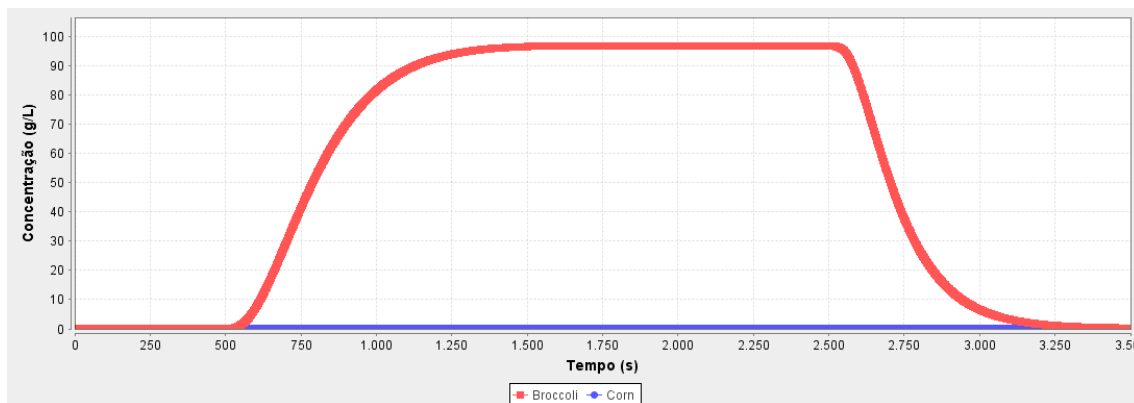


**Figura 6.** Resultado gerado pela simulação para produção de gRNA0 (linha azul), com adição de IPTG (linha verde) em 500 s, remoção em 2500 s e adição de glicose (linha vermelha) em 1000 s.

Para corrigir a produção de Corn no início do processo, que ocorre mesmo na ausência do gRNA1, foi adicionada ao modelo uma indução com o complexo SpdCas9\_AsiA\_gRNA1 (Figura 7A), porém com o evento *low\_gRNA1* que indica que não há concentração de gRNA1 desde o início.



**B**



**Figura 7.** Simulação da expressão de Broccoli e Corn no modelo ajustado. **A)** Representação do modelo alterado para produção de Broccoli e Corn, com a adição do gRNA1, formando o complexo com SpdCas9\_AsiA. **B)** Resultado da simulação para produção de Broccoli (linha vermelha) e repressão de Corn (linha azul).

O resultado gerado pelo modelo (Figura 7B) mostra aumento exponencial de Broccoli em 500 s, momento de adição de IPTG, e queda em 2500 s após remoção de IPTG. O RNA Corn não foi produzido desde o início.

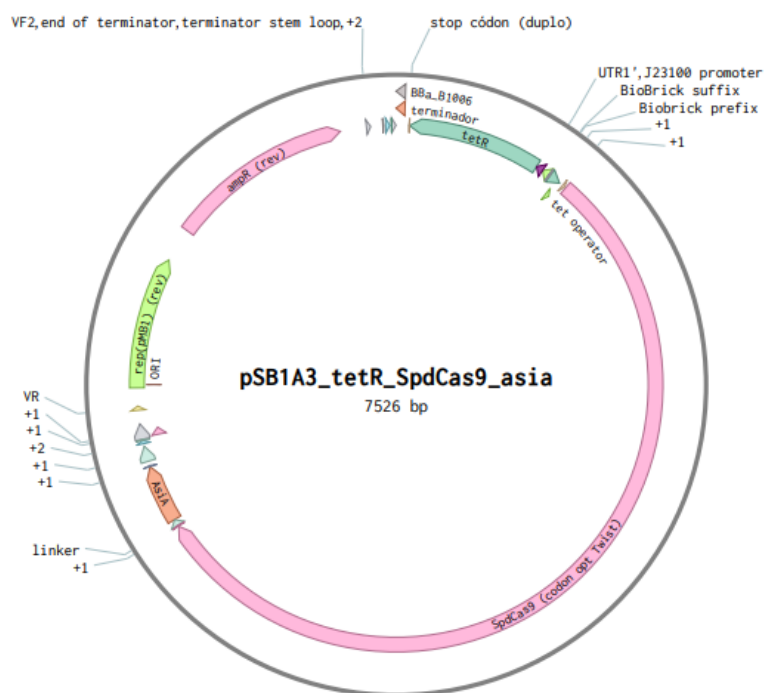
### Construção das sequências para montagem do circuito

As sequências de DNA descritas no projeto foram desenhadas utilizando a plataforma Benchling. Em todas as sequências foram adicionados sítios de clonagem seguindo o padrão BioBrick (sítios de restrição das enzimas *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* e *PstI*), e na sequência target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_broccoli, do Módulo Resposta, o padrão Golden Gate com sítio de restrição para a enzima *BsaI*.

O gene da SpdCas9 recebeu o terminador rrnB T1 (BBa\_B0010), e o gene da TetR um terminador bidirecional (BBa\_B1006). Os genes dos RNAs Broccoli, Corn e dos gRNA-0 e 1 receberam o terminador T0 (BBa\_K864600).

As sequências do Módulo Controle foram construídas para clonagem no plasmídeo pSB1A3 (Figura 8). A sequência P<sub>J23100</sub>\_tetR foi construída no sentido reverso com o padrão de clonagem BioBrick. A sequência P<sub>tet</sub>\_SpdCas9 foi construída com sítios das enzimas *SpeI* e *PstI* para permitir a clonagem da proteína AsiA na extremidade C-terminal. Os plasmídeos construídos no trabalho estão no Apêndice 4.

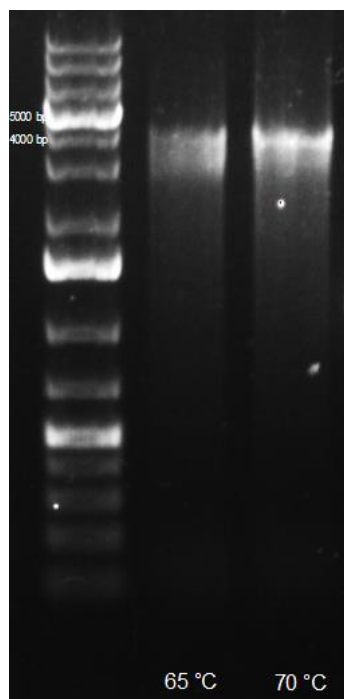
Todas as sequências anteriores foram solicitadas para síntese na empresa IDT (Integrated DNA Technologies) na forma de gBlocks.



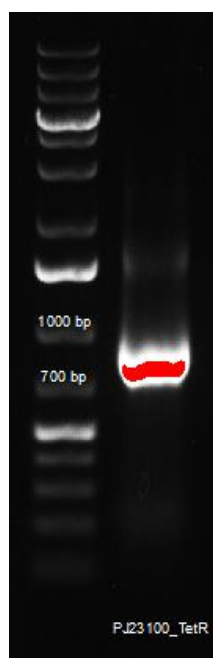
**Figura 8.** Plasmídeo pSB1A3, com origem de replicação para *E. coli* (verde claro), marca de resistência para ampicilina (rosa claro; “ampR (rev)”) e as sequências P<sub>J23100</sub>\_tetR (verde; sentido reverso) e P<sub>tet</sub>\_SpdCas9\_asia (rosa claro; “SpdCas9 (codon opt Twist)”) com seus respectivos promotores.

### Clonagens e construção dos plasmídeos

O primeiro plasmídeo construído foi do módulo controle. Para isso, foi realizada a amplificação da sequência P<sub>tet</sub>\_SpdCas9 (4327 pb) e P<sub>J23100</sub>\_tetR (797 pb) através dos pares de oligonucleotídeos específicos 601/602 e 626/627 (Apêndice 1), por reação de PCR com a enzima Time Hifi DNA Polimerase (Figuras 9 e 10).

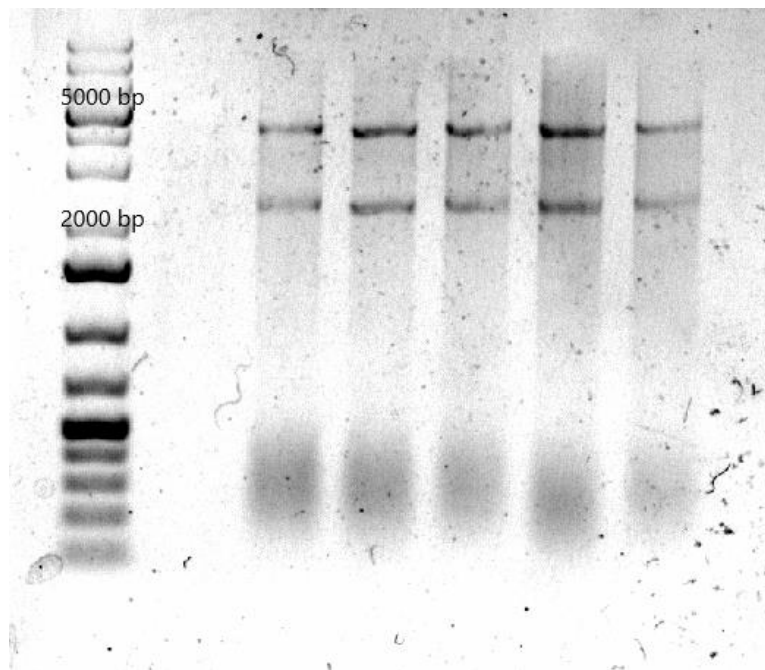


**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de reação da PCR para amplificação da sequência  $P_{tet\_SpdCas9}$ , utilizando as temperaturas de anelamento de 65°C e 70°C (poços 2 e 3 da esquerda para a direita). O marcador de tamanho é exibido no primeiro poço à esquerda.



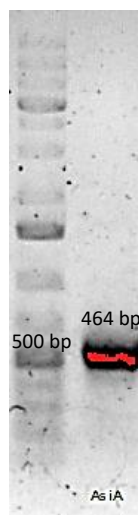
**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos de reação da PCR para amplificação da sequência  $P_{J23100\_tetR}$ .

A ligação das sequências  $P_{tet\_SpdCas9}$  +  $P_{J23100\_tetR}$  (5100 bp) no plasmídeo pSB1A3 (2100 bp) foi confirmada através da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* (Figura 11).



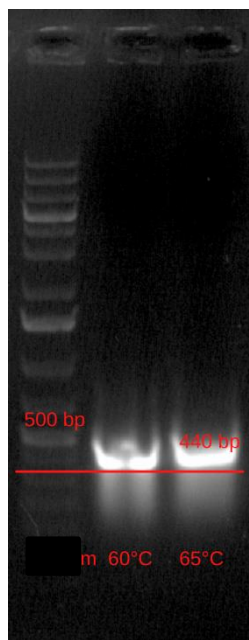
**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas correspondentes ao corte das enzimas *EcoRI* e *PstI*.

Em seguida, o gene da proteína ativadora AsiA (464 bp) precisava ser inserido ao final da sequência da SpdCas9. Porém, foi cometido um erro no pedido do gBlock da AsiA, o qual possuía um nucleotídeo a mais, fazendo com que a fase de leitura ficasse incorreta e formasse um stop códon prematuro. Assim, foi solicitado o oligonucleotídeo 635 (Apêndice 1) para correção da sequência através de PCR. A PCR foi realizada utilizando-se 2 ng de molde, a fim de maximizar a proporção produto PCR/ molde, já que não seria possível separar o molde do produto após a reação. A reação de PCR para correção foi bem-sucedida (Figura 12).



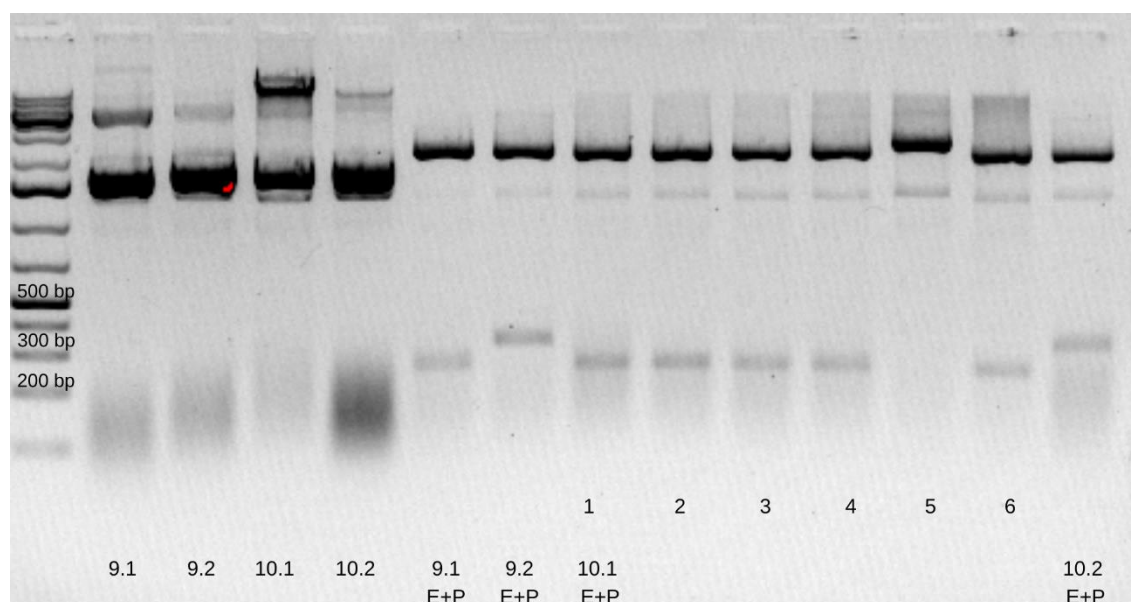
**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose da PCR de correção do gBlock AsiA.

A ligação do gene *asiA* com o vetor pSB1A3\_ *tetR\_SpdCas9* foi feita nas proporções de 1:3, 1:10 e 1:50 (vetor:inserto). Após clonagem e miniprep, foi realizada PCR com os oligos 635 e 124 (Apêndice 1), e posterior verificação dos produtos por eletroforese. Apenas uma colônia apresentou banda próxima do tamanho esperado como positivo (Figura 13).



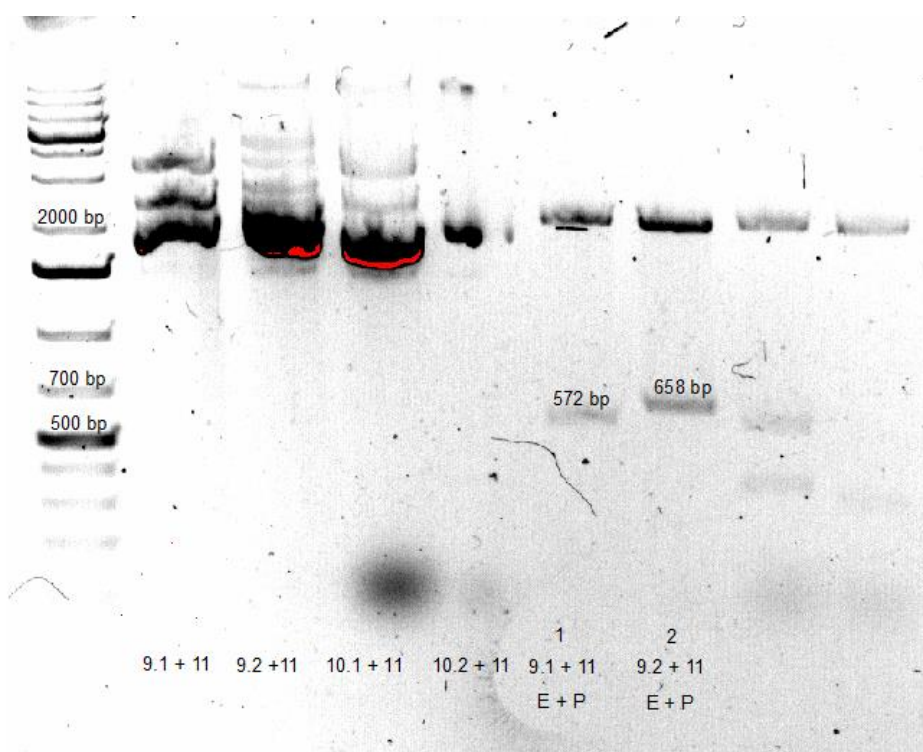
**Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação da sequência do gene *asiA* no plasmídeo pSB1A3\_ *tetR\_SpdCas9\_asiA*. As colunas 2 e 3 (da esquerda para a direita) mostram os produtos de duas reações idênticas desenvolvidas com temperaturas de anelamento distintas (60 e 65°C).

Em seguida, foi realizada a construção do módulo resposta. Assim, foram realizadas as clonagens das partes 9.1 P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-0 (248 bp), 9.2 P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 (334 bp), 10.1 P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-1 (248 bp) e 10.2 P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-1 (334 bp) no plasmídeo pSB1K3. A confirmação dos clones positivos foi feita através de digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e visualização dos produtos após eletroforese (Figura 14). Todas as bandas que aparecem na figura, exceto a identificada como “5”, corresponderam ao tamanho esperado, portanto são positivas.



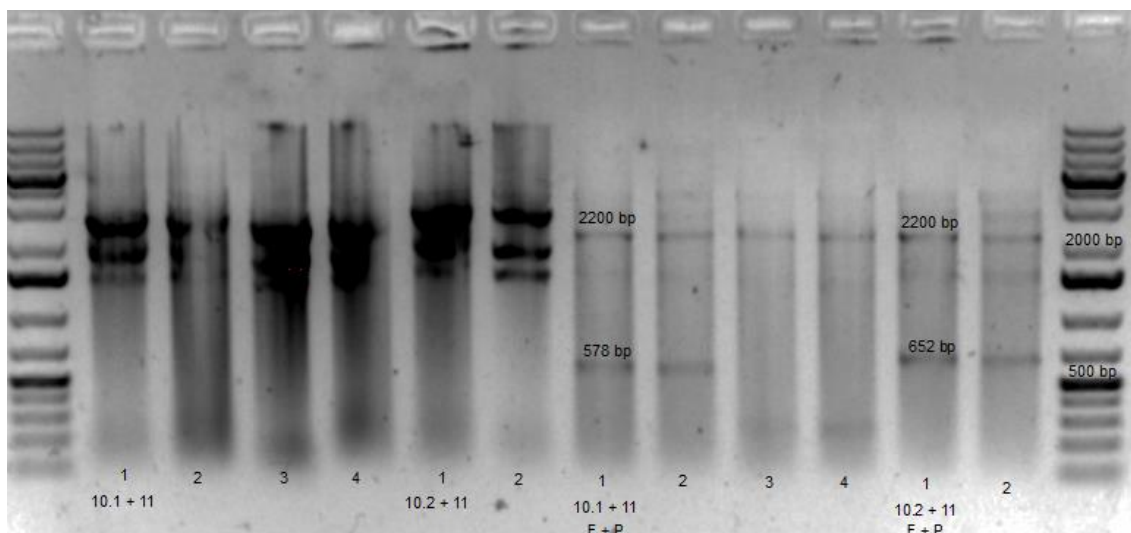
**Figura 14.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem das seqüências P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-0 (9.1), P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 (9.2), P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-1(10.1) e P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-1. A primeira coluna corresponde ao ladder e as quatro colunas seguintes correspondem aos controles negativos (plasmídeos não digeridos).

Continuando as construções, os plasmídeos obtidos nas clonagens anteriores com as partes 9.1 e 9.2 foram usados para inserção da parte 11 a fim de construir as partes target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-0 (572 bp) e target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 (658 bp). A confirmação dos plasmídeos positivos foi realizada através de digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e visualização dos produtos após eletroforese (Figura 15). As duas bandas com tamanhos destacados na Figura 14 foram positivas.



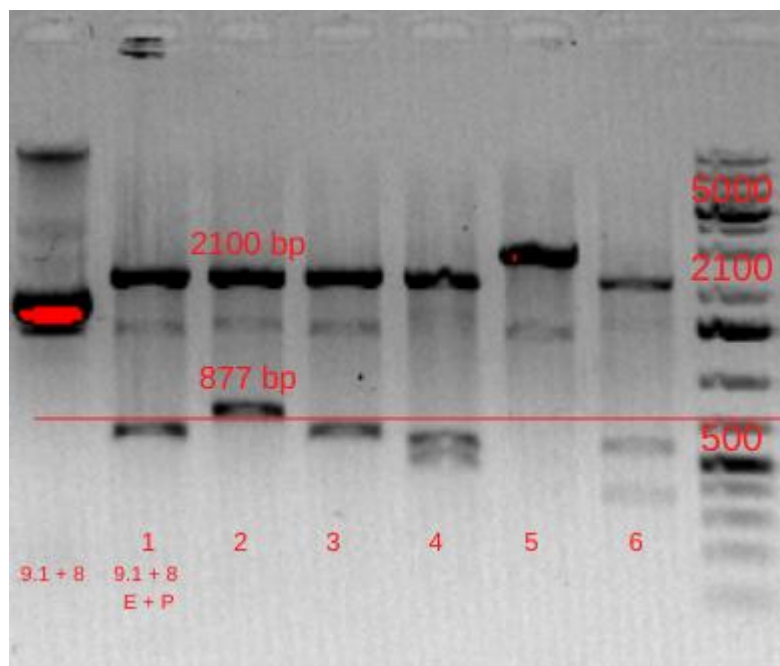
**Figura 15.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem das sequências target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-0 (9.1 + 11), target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 (9.2 + 11). A primeira coluna corresponde ao ladder e as quatro colunas seguintes correspondem aos controles negativos (plasmídeos não digeridos).

Os plasmídeos obtidos na clonagem das partes 10.1 e 10.2 foram usados para inserção da parte 11, para gerar as sequências target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-1 (578 bp), target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 (652 bp). A confirmação dos plasmídeos positivos foi realizada através da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e visualização dos produtos após eletroforese (Figura 16). As bandas com tamanhos identificados são as positivas.

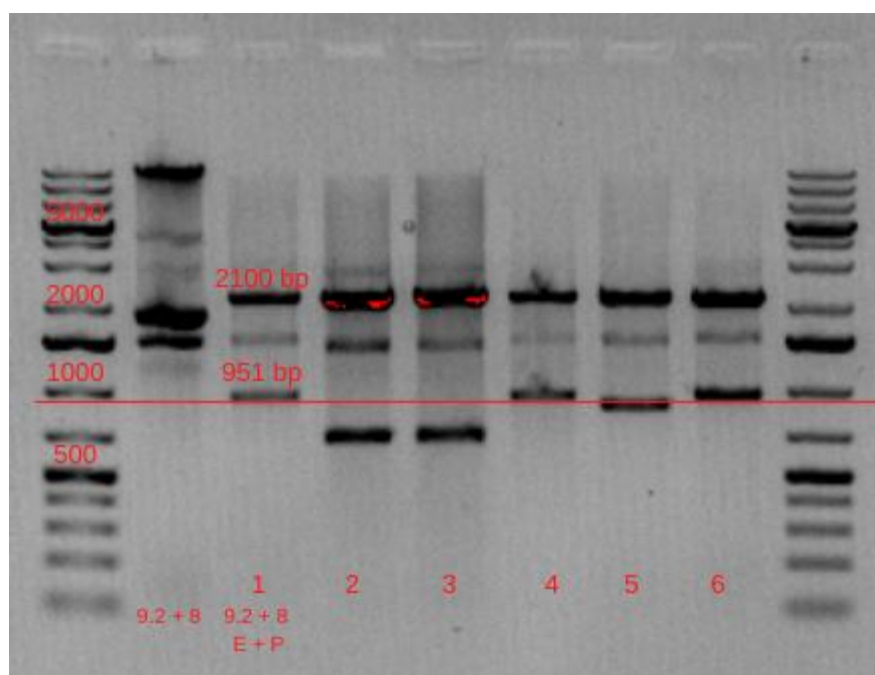


**Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem das sequências target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-1 (10.1 + 11), target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-1 (10.2 + 11). A primeira coluna corresponde ao ladder e as seis colunas seguintes correspondem aos controles negativos (plasmídeos não digeridos).

Os plasmídeos 9.1 e 9.2 também foram usados para inserir a parte 8, gerando as sequências target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-0 (877 bp), target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 (951 bp). A confirmação dos plasmídeos positivos foi realizada através da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e visualização dos produtos após eletroforese (Figura 17 e 18). As bandas logo acima da linha vermelha, identificada como 877pb e 951pb, identificam as amostras positivas.

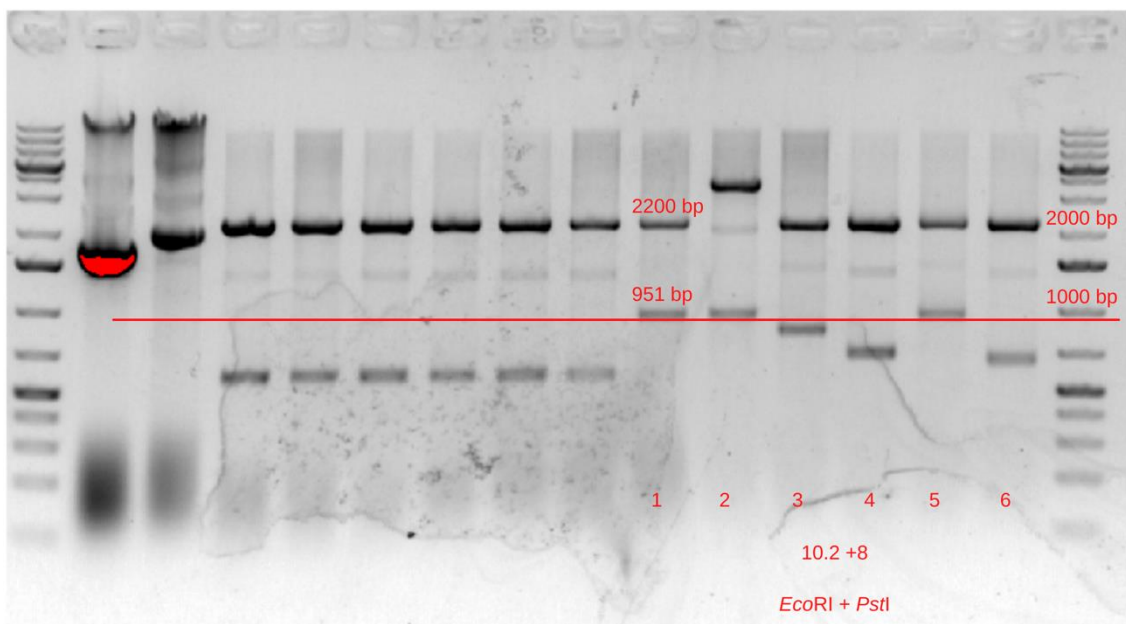


**Figura 17.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem da sequência `target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_gRNA-0` (9.1 + 8, 877 bp). A primeira coluna corresponde ao controle negativo (plasmídeo não digerido).



**Figura 18.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem da sequência `target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_RiboJ_gRNA-0` (9.2 + 8, 951 bp). A segunda coluna, da esquerda para a direita, corresponde ao controle negativo (plasmídeo não digerido).

Por fim, o plasmídeo 10.2 foi usado para a inserção da parte 8, para gerar a sequência `target-1a_PJ23117_target-0i_broccoli_target-0a_PJ23117_target-1i_corn_PT7-lacO_RiboJ_gRNA-1` (951 bp). A confirmação dos plasmídeos positivos foi realizada através da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* e visualização dos produtos após eletroforese (Figura 19). As bandas localizadas logo acima da linha vermelha (951 pb) são indicativas das amostras positivas.



**Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem da sequência `target-0a_PJ23117_target-1i_broccoli_target-1a_PJ23117_target-0i_corn_PT7-lacO_RiboJ_gRNA-1` (10.2 + 8, 951 bp). A segunda e terceira coluna, da esquerda para a direita, correspondem ao controle negativo (plasmídeos não digeridos).

Como apresentado acima, todas as sequências clonadas foram confirmadas por digestão e visualização dos produtos após eletroforese em gel de agarose. Além disso, as clonagens 9.1+8, 9.2+11 e 9.2+8 e 10.2+8 e PJ23100\_tetR+Ptet\_SpdCas9-AsiA foram confirmadas por sequenciamento de Sanger, cujos resultados são apresentados no Apêndice 2.

Assim, os plasmídeos com as sequências completas (Apêndice 3) foram usados para transformar *E. coli* BL21, que possui o sistema de expressão com a T7 RNA polimerase. As transformantes foram selecionadas em meio Lúria Bertani contendo dois antibióticos, sendo a canamicina referente ao plasmídeo pSB1K3 e a ampicilina referente ao plasmídeo pSB1A3.

As linhagens construídas possuem, além do plasmídeo pSB1A3\_tetR\_SpdCas9\_asia, o plasmídeo pSB1K3 contendo as seguintes sequências:

9.1: target-0a\_PJ23117\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_PJ23117\_target-0i\_corn\_PT7-lacO\_gRNA-0

9.2: 0a\_PJ23117\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_PJ23117\_target-0i\_corn\_PT7-lacO\_RiboJ\_gRNA-0

10.2: target-1a\_PJ23117\_target-0i\_broccoli\_target-0a\_PJ23117\_target-1i\_corn\_PT7-lacO\_RiboJ\_gRNA-1

### **Cultivos das linhagens de BL21**

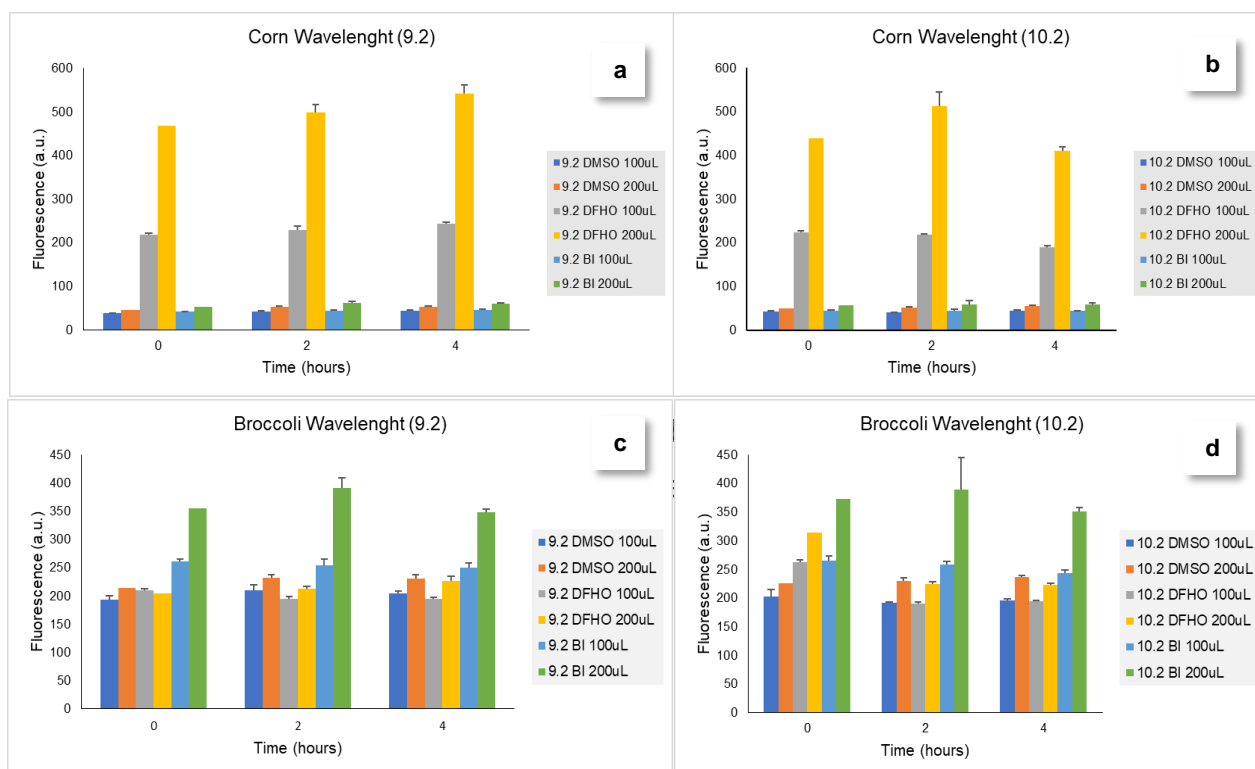
O Cultivo 0 apresentou baixa emissão de fluorescência, sendo que as linhagens 9.1 e 9.2 apresentaram um máximo de aproximadamente 500 U.A. após 6h nos cultivos contendo os fluoróforos e a linhagem 10.2 um máximo de 1000 U.A. após 6h para os cultivos contendo tanto os fluoróforos, como DMSO, o que mostra que o sinal emitido não foi confiável, pois o controle negativo apresentou o mesmo nível de fluorescência. Isso pode ser explicado pela interferência do meio LB na leitura de fluorescência.

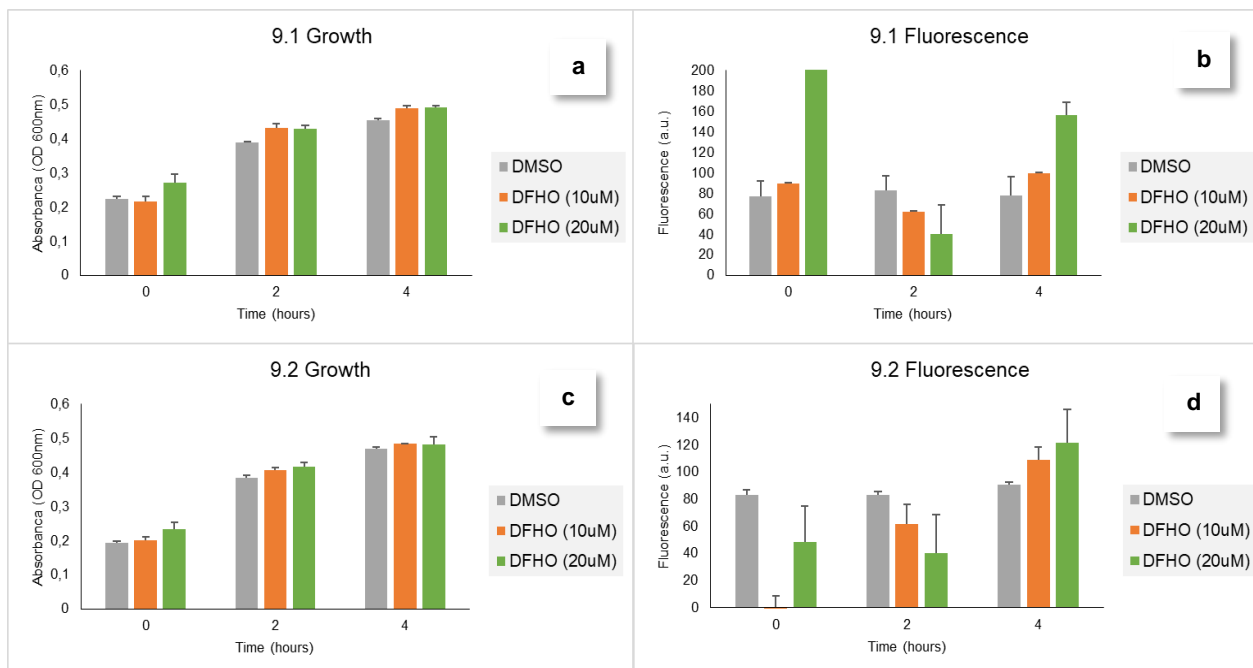
Assim, para o Cultivo 1, o meio foi centrifugado para impedir que interferisse na leitura de fluorescência. Porém, os resultados desse cultivo se tornaram inconclusivos, pois o nível de fluorescência diminuiu após 3h de cultivo. Também vale ressaltar que as células cresceram pouco, sendo que a densidade óptica máxima foi de 0,131 para os cultivos com indução. Os cultivos sem indução cresceram o dobro, aproximadamente 0,3 de densidade óptica, o que pode ter relação com o início da transcrição do complexo de ativação dCas9-Asia, pois a proteína dCas9 é tóxica para as células da bactéria em altas concentrações, provavelmente por conta de ligações não específicas no DNA (Zhang, 2018).

A Figura 19a e 19b mostra os resultados obtidos no Cultivo 2, em que no comprimento de onda do RNA corn, a detecção de fluorescência foi maior para um volume de leitura de 200µL, mas não houve aumento de fluorescência ao longo das 4 horas de cultivo para ambas as linhagens, o que pode ser explicado pelo baixo crescimento das células, que alcançou OD máxima de 0,1. Com um crescimento insuficiente e fluorescência baixa, ainda não é possível confirmar a presença do RNA corn. Por outro lado, como as leituras realizadas com o fluorófo

DFHBI não apresentaram resultados significativos de fluorescência, podemos inferir que, apesar dos comprimentos de onda dos fluoróforos serem próximos, não há interferência na leitura, sendo assim, apenas DFHO foi detectado.

Ainda, nas Figuras 19c e 19d, podemos ver que também não houve mudanças significativas de fluorescência ao longo do cultivo. Durante a realização dos cultivos, foi descoberto que as sequências contendo o módulo de ativação do broccoli não possuíam o espaçador entre o sítio de ligação da dCas e o promotor, necessário para a ativação da expressão. A ativação só ocorre com distâncias superiores à 50 bp entre o sitio de ligação e o promotor, sendo que a máxima ativação ocorre com 200 bp upstream (HO HI, et al; 2020). Assim, sem a presença desse espaçador, a transcrição do RNA broccoli deve ocorrer em níveis basais apenas, impossibilitando a leitura de fluorescência, pois não há concentração de RNA suficiente para complexar com o fluoróforo DFBHI.





**Figura 21. (a) e (c)** Crescimento das linhagens 9.1 e 9.2 ao longo de 4 horas de cultivo. **(b) e (d)** Resultados de fluorescência das linhagens 9.1 e 9.2 ao longo de 4 horas de cultivo, com leitura no comprimento de onda do fluoróforo DFHO.

## CONCLUSÃO

O armazenamento de dados em DNA já vem sendo estudado há algum tempo, pois os meios atuais de armazenamento não serão suficientes para suprir toda a demanda gerada atualmente. Assim, o armazenamento de dados em plasmídeos bacterianos, como proposto no presente trabalho, mostra-se promissor. Tavella et al (2019), por exemplo, criou uma abordagem de armazenamento baseada em nanoredes bacterianas, as quais permitem que o DNA codificado digitalmente seja armazenado em células bacterianas com mobilidade restrita, compondo uma arquitetura de arquivamento de dados em clusters e, posterior ao armazenamento, haja a recuperação dos mesmos dados em bactérias móveis, sempre que a leitura for necessária. Neste trabalho, as redes bacterianas conseguiram recuperar a mensagem “Hello World”. Após isso, Tavella et al (2022) analisou o mesmo sistema de armazenamento de dados para encontrar possíveis ameaças que o sistema poderia sofrer, propondo técnicas de detecção através de *machine learning* para identificar quais ameaças ao sistema poderiam ocorrer, pois uma vez que as bactérias vivem em um ambiente com constantes mudanças, outros organismos podem impedir que a mensagem seja

enviada. Por isso, o monitoramento dessas relações intra- e interespecies precisa ser monitorado a fim de garantir a confiabilidade das conexões estabelecidas para gerar a mensagem.

No presente trabalho, as simulações realizadas mostraram que o sistema tem potencial para funcionar corretamente após indução por IPTG, produzindo o RNA Broccoli após formação do complexo SpdCas9\_Asia\_gRNA0. Mas a repressão catabólica por glicose precisará ser avaliada experimentalmente. Foi criada uma linhagem em *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pSB1A3 com o Módulo Controle. Além disso, foram criadas três outras linhagens em BL21 contendo o plasmídeo pSB1K3 com as sequências dos guias e dos RNAs fluorescentes, sendo que a primeira linhagem possui a sequência target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-0, a segunda target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 e a terceira target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_broccoli\_target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-1, que formam os Módulos de Resposta. Contudo, as linhagens contendo o gene que expressa o RNA broccoli não possuem o espaçamento necessário para a ativação do promotor, impossibilitando a ativação da expressão gênica. Assim, apenas as linhagens 10.1 e 10.2 têm potencial de funcionarem. Por outro lado, não houve emissão de fluorescência do fluoróforo DFHO no comprimento de onda do broccoli, o que mostra que não há interferência na leitura.

Ademais, o armazenamento de dados em DNA mostra-se muito promissor, uma vez que sua incrível capacidade de armazenamento poderia suprir toda a demanda atual de dados gerados pela humanidade sem necessitar de muito espaço físico. Porém, investimentos nessa área para alcançar novas tecnologias e dispositivos biológicos robustos, com capacidade de leitura e armazenamento de dados de forma rápida e confiável, ainda são necessários.

## REFERÊNCIAS

BERNSTEIN, Jonathan A. *et al.* Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 99, n. 15, p. 9697-9702, 23 jul. 2002.

BREZGIN, Sergey *et al.* Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 6041, 2019. doi: 10.3390/ijms20236041.

CHANDLER, Morgan *et al.* Broccoli Fluorets: Split Aptamers as a User-Friendly Fluorescent Toolkit for Dynamic RNA Nanotechnology. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3178, Dec. 2, 2018.

CORRÊA, Graciely Gomes *et al.* A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 326–334, Sept. 1, 2020.

CUI, Yingbo *et al.* Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 10, p. 455–465, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12539-018-0298-zp>.

DANINO, Tal *et al.* A synchronized quorum of genetic clocks. **Nature**, v. 463, n. 7279, p. 326–330, 21 Jan 2010.

ESSINGER, James. **Ada's Algorithm: How Lord Byron's Daughter Ada Lovelace Launched the Digital Age**. Hoboken, N.J: Melville House Publishing, 2012. ISBN: 978-1612194578.

HELER, Robert *et al.* Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. **Nature**, v. 519, n. 7542, p. 199–202, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14245>.

HO, Hsing-I *et al.* Programmable CRISPR-Cas transcriptional activation in bacteria. **Molecular Systems Biology**, v. 16, n. 7, p. 1–12, 16 Jul 2020.

KIM, Eun Mi *et al.* Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*.

**Metabolic Engineering**, v. 44, p. 325–336, 1 Nov 2017.

LAKHIN, A. V.; TARANTUL, V. Z.; GENING, L. V. Aptamers : Problems, Solutions and Prospects. **Acta Naturae**, v. 5, n. 4, p. 34–43, Oct. 5, 2013.

LIU, Yang; WAN, Xinyi; WANG, Baojun. Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–16, Dec. 1, 2019.

MEYER, Adam J. *et al.* Escherichia coli “Marionette” strains with 12 highly optimized small-molecule sensors. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 2, p. 196–204, Febr. 1, 2019.

PEDROLLI, Danielle B. *et al.* Engineering Microbial Living Therapeutics: The Synthetic Biology Toolbox. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 100-115, Oct. 11, 2018.

SCHWARTZ, Juliana *et al.* Mulheres na informática: quais foram as pioneiras? **Cadernos Pagu**, n. 27, p. 255–278, Dez 2006.

SOUTHWARD, Carolyn M.; SURETTE, Michael G. The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1191–1196, Sept. 2, 2002.

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C.; STREHILTZ, B. SELEX—a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. **Biomol. Eng.** v. 24, n. 4, p. 381–403 , Jun. 16, 2007.

TAVELLA, Federico *et al.* DNA molecular storage system: Transferring digitally encoded information through bacterial nanonetworks. **IEEE Transactions on Emerging Topics in Computing**, v. 9, n. 3, p. 1566-1580, 2019.

TAVELLA, Federico *et al.* A machine learning-based approach to detect threats in bio-cyber DNA storage systems. **Computer Communications**, v. 187, p. 59-70, April, 1, 2022.

UW NEWS STAFF. With a ‘hello,’ Microsoft and UW demonstrate first fully automated DNA data storage. *In*: UNIVERSITY OF WASHINGTON. **With a ‘hello,’ Microsoft and UW demonstrate first fully automated DNA data storage.**

Washington, DC: Microsoft and UW, March 21, 2019.

WATANABE, Leandro *et al.* BIOSIM 3: A Tool for Model-Based Genetic Circuit Design. **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 7, p. 1560–1563, July, 19, 2019.

ZHAO, Changlong; SHU, Xueqin; SUN, Baolin. Construction of a gene knockdown system based on catalytically inactive (“dead”) Cas9 (dCas9) in *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 12, p. e00291-17, June 1, 2017.

ZHANG, S.; VOIGT, C. A. Engineered dCas9 with reduced toxicity in bacteria: implications for genetic circuit design. **Nucleic acids research**, v. 46, n. 20, p. 11115-11125, Nov 16, 2018.

## APÊNDICE

### APÊNDICE 1

Oligonucleotídeos utilizados na construção das sequências PtetR/tetA\_SpdCas9, PJ23100\_tetR, P<sub>T7-lacO\_corn</sub> e P<sub>T7-lacO\_broccoli</sub>. Os promotores, terminadores e sítios de restrição foram adicionados nas *overhangs*.

ID	Descrição	Sequência
123	BBprefix_fw	ATGAGAATTCGCGGCCGCTTCTAG
124	BBsuffix_rv	CGGACTGCAGCGGCCGCTACTAG
601	PtetR/tetA_SpdCas9(BBp)_fw	TACGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGT TGACACTCTATCGTTGATAGAGTTATTTT ACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAG AACTCAAAGATCTAAAGAGGAGAAAAGG ATCTATGGATAAAAAGTATAGTATTGGCC TTGCAATTGGTAC
602	PtetR/tetA_SpdCas9(PstI)_rv	AAACCTGCAGGAGAGCGTTCACCGACAA ACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCT

		TTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATG CCTGGAGATCCTCGAGCTTATTAAGTAG TATCGCCGCCAGCTGAGACAG
627	PJ23100_tetR_fw	GATTTCTGCAGAGCGGCCGACTAGTTTG ACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGC TAGCAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAG GAGATAAAATGTCCAGATTAGATAAAAGT AAAGTGATTAACAGCGC
628	PJ23100_tetR_rv	ATAACGAATTCAGCGGCCGCTCTAGAAA AAAAAACCCCGCCCTGTCAGGGGCGGG GTTTTTTTTTTTGGATGCCTGGAGTGCCTG GTTATTAGGACCCACTTTCACATTTAAGT TGTTTTTCTAATCCG
629	PT7-lacO_corn_fw	AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAG GAATTTAATACGACTCACTATAGGGGAA TTGTGAGCGGATAACAATTCCCCGGCGC GAGGAAGGAGGTCTGAGGAGGTCCTG CGCC
630	PT7-lacO_corn_rv	TCGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTAT GGACTCACAAAGAAAAACGCCCGGTGT GCAAGACCGAGCGTTCTGAACAACCTCG GCGCAGTGACCTCCTCAGACCTCCTTCC TCGCGCC
631	PT7- lacO_broccoli(1)_fw	AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAG GAATTTAATACGACTCACTATAGGGGAA TTGTGAGCGGATAACAATTCCCCGGACC CACATACTCTGATGATCCGAGACGGTTCG GGTCCAGATATTCGTATCTGTGAGTAG AGTGTGGGCTCGGATCATTGCAAG AGAC
632	PT7- lacO_broccoli(1)_rv	CCCACTCTACTCGACAGATACGAATAT CTGGACCCGACCGTCTCGGATCATCAGA GTATGTGGGTCCGGGAATTGTTATCCG CTCACAATTCCCCTATAGTGAGTCGTATT

		AAATTCCTCTAGAAGCGGCCGCGAATTC TGATCT
633	PT7- lacO_broccoli(2)_fw	GGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTCTG AGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTA TGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTC TTGCACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGA GTCCATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTC CGA
634	PT7- lacO_broccoli(2)_rv	TCGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTAT GGACTCACAAAGAAAAACGCCCGGTGT GCAAGACCGAGCGTTCTGAACAACCTCCC CACATACACATGGCAAGAGCCCACACTC TACTCGACAGATACGAATATCTGGACCC GACCGTCTCTTGCCATGAATGATCCGAG C
635	Bbprefix_linker_AsiA	GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGCGGC GGGGGTAGCG

## APÊNDICE 2

Sequências completas utilizadas no projeto.

Descrição	Sequência
PT7-lacO_broccoli	AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAATTT AATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGAT AACAAATCCCCGGACCCACATACTCTGATGATCC GAGACGGTCTGGGTCCAGATATTCGTATCTGTCTGA GTAGAGTGTGGGCTCGGATCATTGATGGCAAGA GACGGTCTGGGTCCAGATATTCGTATCTGTCTGAGT AGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTATGTGGGGA GTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGC GTTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCC GCTGCAGTCCGA
PT7-lacO_corn	AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAATTT AATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGAT AACAAATCCCCGGCGCGAGGAAGGAGGTCTGAG GAGGTCCTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCG GTCTTGACACCCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTC CATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGA
PJ23100_tetR	TCTGCAGAGCGGCCGACTAGTTTGACGGCTAGC TCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGCAATAATTTTGT TAACTTTAAGAAGGAGATAAAATGTCCAGATTAGA TAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTG CTTAATGAGGTCGGAATCGAAGGTTTAAACAACC GTAAACTCGCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCAGC CTACATTGTATTGGCATGTAAAAAATAAGCGGGC TTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTAGAT AGGCACCATACTCACTTTTGCCCTTTAGAAGGGG AAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAA AGTTTTAGATGTGCTTTACTAAGTCATCGCGATGG AGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAA AAACAGTATGAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTT TTTATGCCAACAAGGTTTTTCACTAGAGAATGCAT TATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTACTTTA

	<p>GGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCG  CTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATAG  TATGCCGCCATTATTACGACAAGCTATCGAATTAT  TTGATCACCAAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATT  CGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAA  CAACTTAAATGTGAAAGTGGGTCTAATAACCAG  GCACTCCAGGCATCAAAAAAAAAAACCCCGCCCC  TGACAGGGCGGGGTTTTTTTTTCTAGAGCGGCCG  CTGAATTC</p>
<p>PtetR/tetA_SpdCa  s9_AsiA</p>	<p>GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGTTGACACTCTA  TCGTTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCTATCAGT  GATAGAGAAAAGAACTCAAAGATCTAAAGAGGA  GAAAGGATCTATGGATAAAAAGTATAGTATTGGC  CTTGCAATTGGTACTAATAGCGTTGGCTGGGCCG  TCATTACAGACGAATATAAGGTGCCGTCTAAAAA  TTCAAAGTTCTGGGGAATACCGATCGGCATTCCA  TAAAAAAAAATCTTATTGGTGCTCTTTTATTTCGATT  CGGGTGAGACGGCGGAAGCGACGCGTTTGAAC  GCACTGCGCGGGCGGCGGTATACGCGTCGTAAAA  ATCGCATTTGCTATCTTCAGGAGATTTTCTCAAAT  GAAATGGCAAAGGTAGATGATAGCTTTTTTCATC  GCCTTGAAGAATCTTTTTTAGTTGAAGAAGATAAA  AAGCACGAACGCCATCCAATCTTTGGGAACATTG  TGGATGAAGTTGCGTATCATGAGAAATATCCGAC  GATATATCATCTGAGAAAGAACTGGTAGATAGC  ACAGACAAAGCAGATTTGAGATTGATCTATCTTGC  GCTGGCGCATATGATTAAGTTCCGCGGCCATTTT  CTTATAGAAGGTGATCTGAATCCGGACAATTCTG  ACGTAGATAAATTGTTTATCCAGCTGGTTCAGACC  TATAATCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATTAACGC  TAGCGGCGTTGACGCAAAGCGATATTATCAGCT  CGTCTGTCTAAATCACGGCGCCTTGAAAACCTTAA  TCGCTCAACTGCCCGGAGAGAAAAAAAAATGGCCT</p>

TTTCGGCAACTTGATTGCTCTGAGCCTGGGTTTG  
ACCCCTAATTTCAAAGCAACTTTGATTTGGCAGA  
AGATGCAAACTGCAATTGAGCAAGGACACGTAT  
GATGATGACCTTGATAACCTTCTTGCGCAGATAG  
GAGATCAATACGCGGACTTGTTTTTGGCAGCCAA  
AACTTGTCAGACGCCATCCTTCTTAGCGACATC  
TTACGCGTTAATACAGAGATAACCAAAGCACCGT  
TATCTGCCTCCATGATCAAGCGGTATGATGAGCA  
TCACCAAGATCTGACACTGCTGAAAGCACTTGTC  
CGTCAACAACCTCCGGAAAAATATAAAGAAATTTT  
TTTTGATCAGTCGAAAAATGGATACGCTGGATAC  
ATTGACGGGGGAGCCAGCCAGGAGGAGTTTTAC  
AAATTTATCAAACCAATCCTTGAGAAAATGGATGG  
TACGGAAGAGTTGTTAGTTAAGCTTAATCGTGAG  
GACTTATTACGCAAGCAGCGTACCTTCGATAACG  
GAAGCATCCCCACCAGATCCACCTTGGGGAGC  
TGCATGCCATTTTGCGCCGCCAGGAAGATTTCTA  
CCCATTTTTGAAAGATAATCGCGAAAAATCGAAA  
AGATTTTAACCTTTCGTATCCCGTATTATGTGGGT  
CCGCTGGCAAGAGGCAATTCACGTTTCGCATGGA  
TGACCCGGAAATCCGAAGAGACTATAACACCGTG  
GAATTCGAAGAAGTCGTTGACAAGGGAGCGAG  
CGCCCAGAGTTTCATTGAACGTATGACTAACTTC  
GACAAGAATCTGCCTAACGAAAAGGTTCTTCCA  
AGCACTCCCTGCTGTATGAATATTTACAGTCTAT  
AACGAATTGACAAAAGTGAAATATGTAACGGAAG  
GAATGCGTAAACCAGCTTTCCTGTCAGGCGAGCA  
GAAGAAAGCAATCGTGGACTTACTGTTCAAACC  
AACCGGAAAGTTACGGTTAAACAATTAAGGAGG  
ATTACTTTAAGAAAATTGAATGCTTTGACTCCGTA  
GAGATTAGCGGAGTAGAAGATCGTTTCAATGCCT  
CATTGGGAACATATCATGACCTGTTAAAAATTATT  
AAAGATAAGGATTTTTTAGATAATGAAGAGAACGA  
AGACATACTGGAGGATATAGTCTTAACACTTACTT

TATTCGAAGATCGCGAAATGATTGAGGAGCGTTT  
GAAAACCTACGCGCATCTGTTTGATGATAAAGTG  
ATGAAACAACTGAAACGCCGGCGGTATACCGGAT  
GGGGTCGTTTGAGTCGGAAACTTATTAATGGCAT  
TAGAGACAAGCAGTCAGGTAAAACCATTCTTGAC  
TTTTTAAAATCTGATGGATTTCGCAAACAGAACTT  
CATGCAACTGATCCATGACGATTCCTTGACCTTTA  
AGGAAGATATTCAGAAGGCACAGGTTTCCGGCCA  
AGGCGATAGTTTGCATGAACACATTGCAAATCTT  
GCAGGTTCCCCGGCGATTAAAAAGGGCATCCTTC  
AGACGGTTAAAGTAGTTGATGAACTGGTCAAGGT  
GATGGGGCGTCATAAACCCAGAGAATATAGTGATT  
GAAATGGCTCGCGAAAACCAGACCACCCAAAAAG  
GCCAGAAAAATTCTCGTGAACGTATGAAGCGGAT  
CGAAGAAGGCATCAAAGAACTGGGTTCCCAAATC  
TTGAAGGAGCATCCAGTTGAGAATACGCAGCTGC  
AAAATGAAAAATTATATCTGTATTATCTGCAAAT  
GGCCGGGATATGTACGTTGACCAGGAATTGGATA  
TTAATCGTCTGAGCGACTATGATGTAGATGCCAT  
AGTTCCCCAGTCTTTTTTAAAAGATGATTCTATCG  
ACAATAAAGTTCTTACGCGGTCAGACAAAAATCG  
TGGAAAATCAGATAACGTGCCGAGCGAAGAAGTC  
GTTAAGAAAATGAAAAATTATTGGCGTCAGCTGCT  
TAATGCGAAGCTGATTACACAGCGCAAATTTGAT  
AATCTGACTAAAGCTGAAAGAGGAGGACTTAGTG  
AGTTAGACAAGGCCGGGTTTATTAAACGGCAACT  
GGTGGAAACCAGACAAATAACTAAGCATGTTGCG  
CAGATACTGGATAGCCGTATGAATACAAAATACG  
ATGAGAACGATAAATTGATTCGTGAAGTAAAAGTT  
ATCACGCTTAAATCTAAACTGGTCTCCGATTTCCG  
CAAGGATTTTCAGTTTTTACAAAGTCCGCGAAATCA  
ATAACTACCACCACGCCACGATGCCTATCTGAA  
CGCAGTCGTGGCACAGCACTTATAAAAAAATAT  
CCAAAACCTGGAGTCTGAGTTTGTATACGGGGATT

ACAAGGTATATGACGTGCGGAAGATGATAGCCAA  
ATCGGAGCAAGAGATCGGGAAAGCTACCGCCAA  
GTACTTCTTCTATTCTAATATAATGAATTTTTTCAA  
AACGGAGATCACTCTTGCAAATGGAGAAATTCGT  
AAACGCCCGTTGATTGAAACGAATGGTGAAACGG  
GGGAAATTGTTTGGGATAAAGGACGTGACTTTGC  
GACTGTGAGAAAAGTGCTGAGCATGCCCCAGGT  
CAATATTGTGAAGAAGACGGAAGTTCAGACGGGC  
GGCTTCAGTAAAGAAAGCATTCTGCCGAAACGCA  
ATTCTGACAAATTAATAGCTCGGAAAAAAGATTGG  
GATCCTAAAAAATACGGTGGCTTCGACTCTCCCA  
CTGTTGCCTATTCAGTCCTGGTTGTAGCAAAAGT  
CGAAAAAGGAAAGAGTAAAAAGCTGAAAAGCGTT  
AAGGAGCTGCTTGGTATTACAATTATGGAACGCT  
CTTCCTTCGAAAAAATCCGATTGATTTTCTGGAA  
GCCAAGGGCTATAAAGAAGTAAAAAAGACTTGA  
TTATCAAACCTCCGAAGTATAGTCTGTTTCGAGCTG  
GAGAACGGCAGAAAAAGAATGCTGGCCTCGGCC  
GGCGAACTGCAAAAGGGGAACGAACTGGCGTTG  
CCTTCAAATATGTGAACTTTTTGTATTTAGCCTC  
CCATTACGAAAAACTGAAGGGTTCGCCTGAAGAT  
AATGAACAGAAACAGTTGTTTCGTTGAGCAACATA  
AACACTACCTGGATGAAATCATAGAGCAAATTTCC  
GAATTTAGTAAACGTGTTATTCTGGCTGACGCAAA  
TTAGATAAAGTCCTTAGCGCTTATAATAAACATC  
GTGATAAACCCATTCGCGAGCAGGCTGAAAATAT  
AATCCATCTTTTTACGCTTACTAATCTGGGTGCTC  
CAGCTGCCTTCAAATATTTTGATACCACAATTGAT  
CGTAAGCGCTACACCAGTACTAAAGAGGTGTTGG  
ATGCTACTCTGATTCACCAAAGTATTACCGGCCT  
GTACGAAACGCGTATTGACCTGTCTCAGCTGGGC  
GGCGATACTAGAGGCGGCGGGGGTAGCGGCGG  
TGGTGGCTCTATGAACAAGAACATTGACACAGTA  
CGCGAAATCATTACTGTTGCAAGCATCCTGATTAA

	<p>GTTTTCCCGTGAAGACATCGTGGAGAACCGTGCC  AATTTTCATCGCTTTTCTGAACGAGATCGGAGTAAC  TCACGAGGGCCGTAAGTTAAACCGTAACTCATT  CGCAAGATCATTAGTAAATTGACACAGGAAGACA  AAAAAACATTGATTGATGAGTTCAACGAAGGCTTT  GAGGGTGTCTATCGCTATCTTGAAATGTATACCA  ACAAGTAATAAGCTCGAGGATCTCCAGGCATCAA  ATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCT  TTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCCGGTGAACGCTCTC  CTGCAG</p>
PT7-lacO_gRNA0	<p>GATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAATTTA  ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATA  ACAATTCCCCCATCTAATTCAACAAGAATGTTTT  AGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT  CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGG  TGCTTTTTGAGTTGTTTCCAGAACGCTCCGGTCTTG  ACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTA  GTAGCGGCCGCTGCAGAATCA</p>
PT7-lacO_gRNA1	<p>GATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGAATTTA  ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATA  ACAATTCCCCGCCAAGGTGATAATCCATAGGTTT  TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAG  TCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG  GTGCTTTTTGAGTTGTTTCCAGAACGCTCCGGTCTTG  CACACCGGGCGTTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTA  GTAGCGGCCGCTGCAGAATCA</p>
target- 0a_PJ23117_targe t-1i_broccoli	<p>AGATCAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCCTATT  CTTGTTGAATTAGATGGTTGACAGCTAGCTCAGT  CCTAGGGATTGTGCTAGCAGGGCCAAGGTGATA  ATCCATAGGGACCCACATACTCTGATGATCCGAG  ACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTGCGAGTA  GAGTGTGGGCTCGGATCATTGCAAGAGAC  GGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTGCGAGTAGA  GTGTGGGCTCTTGCCATGTGTATGTGGGGAGTTG</p>

	<p>TTCAGAACGCTCGGTCTTGCACACCGGGCGTTTT  TTCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGCTGC  AGTCCGA</p>
<p>target-  1a_PJ23117_targe  t-0i_corn</p>	<p>GAACAGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCCTCTAT  GGATTATCACCTTGGCGGATAAACTTGTGCTTAT  TTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCC  AGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAA  CTGACTGAAATGCCTCAAATGTTCTTTACGATGC  CATTGGGATATATCAACGGTGGTATATTTGACAG  CTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCA  TCTAATTCAACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGGT  CTGAGGAGGTCACTGCGCCGAGTTGTTCAGAAC  GCTCGGTCTTGCACACCGGGCGTTTTTTCTTTGT  GAGTCCATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGATCAT</p>

### 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... GTGTGGGCTCGGATCATTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCAT
broccoli-... -----TCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCAT
.....

                2133                                     2214
pSB1K3_ta... GTGTATGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagCCTCTATG
broccoli-... GTGTATGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGCCTCTATG
.....

                2215                                     2296
pSB1K3_ta... GATTATCACCTTGGCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGTGAACGGTCT
broccoli-... GATTATCACCTTGGCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGTGAACGGTCT
.....

                2297                                     2378
pSB1K3_ta... GGTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATA
broccoli-... GGTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATA
.....

                2379                                     2460
pSB1K3_ta... TTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATTCACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGGTCTGAGG
broccoli-... TTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATTCACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGGTCTGAGG
.....

                2461                                     2542
pSB1K3_ta... AGGTCACTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagGAATTT
broccoli-... AGGTCACTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGGAATTT
.....

                2543                                     2624
pSB1K3_ta... AATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCCATCTAATTCACAAGAATGTTTTAGAGTAGAAAT
broccoli-... AATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCCATCTAATTCACAAGAATGTTTTAGAGTAGAAAT
.....

                2625                                     2706
pSB1K3_ta... AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC-TTTTGTGAGTTGTTTCAGAACGCT
broccoli-... AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC-TTTTGTGAGTTGTTTCAGAACGCT
.....

```

**Figura 20.** Resultado do alinhamento da sequência target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_gRNA-0 (9.1 + 8) com o sequenciamento.

```

985 1066
pSB1K3 ta... GGTGATAATCCATAGGGACCCACATACTCTGATGATCCGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTG
broccoli-... ---CAAAAGGGGGGGCGCGGAGGCTCATGTCCGAGAGGTCGCGGTCCTATAAAAPAAAAAAGAGACGAGTCCGAGTAGAGTGTG
.....

1067 1148
pSB1K3 ta... GGTCCGGATCATTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTA
broccoli-... GGCTCCGATCATTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGATATTCGTATCTGTCGAGTAAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTA
.....

1149 1230
pSB1K3 ta... TGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagCCTCTATGGATTA
broccoli-... TGTGGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGCCTCTATGGATTA
.....

1231 1312
pSB1K3 ta... TCACCTTGGCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTGA
broccoli-... TCACCTTGGCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTGA
.....

1313 1394
pSB1K3 ta... TAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATTTGA
broccoli-... TAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTTCTTTACATGCCCTTGGGATATATCAACGGTGGTATATTTGA
.....

1395 1476
pSB1K3 ta... CAGCTAGCTCAGTCCAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATTCAACAAGAATGGCCGAGGAAGGAGGTCTGAGGAGGTC
broccoli-... CAGCTAGCTATTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGCCATCTAATTCAACAAGAATGGCCGAGGAAGGAGGTCTGAGGAGGTC
.....

1477 1558
pSB1K3 ta... ACTGCG-CCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagGAA-TTTAAT
broccoli-... ACTGCGCCAGTTGTTTCAGAACGCTCGGCTTGACACCCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGGAA-TTTAAT
.....

1559 1640
pSB1K3 ta... ACGAC-TCACTATAGGGAAATGTGAGCGGATAACAATCCCCAGCTGTACCAGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGT
broccoli-... ACGACTCACTATAGGGGAATGTG-----

```

**Figura 21.** Resultado do alinhamento da sequência target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 (9.2 + 8) com o sequenciamento.

```

247 328
K3_target... -----GAA
IG01_c05_... AGGAGTCACTGCGCCGAGTGTTCAGAACGCTCGGTCTTGACACCCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGGAA
.....

329 410
K3_target... TTTAATACGACTCACTATAGGGAAATGTGAGCGGATAACAATCCCCAGCTGTACCAGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAG
IG01_c05_... TTTAATACGACTCACTATAGGGAAATGTGAGCGGATAACAATCCCCAGCTGTACCAGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAG
.....

411 492
K3_target... TCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAATAAATTTGTTTACCATCTAATTCAACAAGAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
IG01_c05_... TCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAATAAATTTGTTTACCATCTAATTCAACAAGAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
.....

493 574
K3_target... GTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCCGGTGTCTTTTGTGAGTGTTCAGAACGCTCGGTCT
IG01_c05_... GTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCCGGTGTCTTTTGTGAGTGTTCAGAACGCTCGGTCT
.....

575 656
K3_target... TGCACACCCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGctgcagtcggcaaaaaagggcaaggtgtcaccac
IG01_c05_... TGCACACCCGGGCGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAAAAGGGCAAGGTGTACCAC
.....

657 738
K3_target... cctgcctttttcttttaaaaccgaaaagattactcgcggttatgcaggctt-cctcgtcactgactcgtcgcgctcggctcg
IG01_c05_... CCTGCCTTTTCTTTAAACCGAAAAGATTACTTCGCGTTATGCAGGCTTCCCTCGTCACTGACTCGCTCGGCTCGGCTCG
.....

739 820
K3_target... ttcggctgcggcgagcgttatcagctcactcaaaaggggtaatacggttatccacagaaatcaggggataacgcaggaagaa
IG01_c05_... TTCGGCTGCGGCAGCGATATCAGCTCACTCATAAGCGCGTAATAACGGTATATCCAGAG-----

```

**Figura 22.** Resultado do alinhamento da sequência target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-0 (9.2 + 11) com o sequenciamento.

```

1313                                     1394
pSB1K3 ta... aaaaaaaccttagctttcgctaaggatgatttctggaattcgcggcgcttctagagCCTATTCTTGTGAATAGATGGT
broccoli-... -----ACCGTATTGTTGAATTGATGGT
.....

1395                                     1476
pSB1K3 ta... TGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGGCCAAGGTGATAATCCATAGGGACCCACATACTCTGATGATCCGA
broccoli-... TGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGATTGTGCTAGCAGGGCCAAGGTGATAATCCATAGGGACCCACATACTCTGATGATCCGA
.....

1477                                     1558
pSB1K3 ta... GACGGTCGGGTCCAGATATTCTGATCTGTGCTAGTAGAGTGTGGGCTCGGATCATTTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGAT
broccoli-... GACGGTCGGGTCCAGATATTCTGATCTGTGCTAGTAGAGTGTGGGCTCGGATCATTTCATGGCAAGAGACGGTCCGGTCCAGAT
.....

1559                                     1640
pSB1K3 ta... ATTTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTATGTGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGCTTTCACACCCGGG
broccoli-... ATTTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTGGGCTCTTGCCATGTGTATGTGGGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGCTTTCACACCCGGG
.....

1641                                     1722
pSB1K3 ta... CGTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagCCTCTATGGATTATCACCTTGCGGATAAAAACCTTGTGCTATTTTTCTTTACG
broccoli-... CGTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGCCTCTATGGATTATCACCTTGCGGATAAAAACCTTGTGCTATTTTTCTTTACG
.....

1723                                     1804
pSB1K3 ta... GTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTT
broccoli-... GTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTT
.....

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

1887                                     1968
pSB1K3 ta... AATTCAACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGTCTGAGGAGTCACTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGCTTTCACACCCG
broccoli-... AATTCAACAAGAATGGCGCGAGGAAGGAGTCTGAGGAGTCACTGCGCCGAGTTGTTTCAGAACGCTCGGCTTTCACACCCG
.....

1969                                     2050
pSB1K3 ta... GCGCTTTTTCTTTGTGAGTCCATAActagagGAATTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCGCC
broccoli-... GCGCTTTTTCTTTGTGAGTCCATACTAGAGGAATTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA-----

```

**Figura 23.** Resultado do alinhamento da sequência target-0a\_ target-0a\_P<sub>J23117</sub>\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_P<sub>J23117</sub>\_target-0i\_corn\_P<sub>T7</sub>-lacO\_RiboJ\_gRNA-1 (10.2 + 8) com o sequenciamento.

```

4019                                     4100
pSB1A3 te... AATTCGTAAACGCCCGTTGATTGAAACGAATGGTGAACGGGGAAATTTGGGATAAAGGACGTGACTTTGCGACTGTG
AsiA (Asi... -----BAACGACATCTCTAGCGAAGCTAGCTAACAACAGCTGCCAGAGTCA
.....

4101                                     4182
pSB1A3 te... AGAAAAGTGTGAGCATGCCCCAGGTCAATATTTGTGAAGAAGACGGAAGTTCAGACGGGCGGCTTCAGTAAAGAAAGCATT
AsiA (Asi... TCGCCCCACGCTACATCAGTCTATGAAGAGTACTGCATGTCATGCACTGCGTCGGCTTCAGTACAGAAAGCAATGCTG
.....

4183                                     4264
pSB1A3 te... TGCCGAAACGCAATTTGACAAATTAATAGCTCGGAAAAAAGATTGGGATCCTAAAAATACGGTGGCTTCGACTCTCCAC
AsiA (Asi... TGCATACCTCAATCTGTCAAAAGTAAAGCTCGTCAAAAGACATCGGGATCAGCAAAATAATGTATGCAATTCGACTCTCCAA
.....

4265                                     4346
pSB1A3 te... TGTTCCTTACCTAGTCAGTGTGATGTAGCAAAAAGTAAAGGAAAGTAAAGCTGAAAAGCGTTAAGGAGCTGCTTGGT
AsiA (Asi... CTGTTTCCTAGTCAGTGTGATGTAGCAAAAAGTAAAGGAAAGTAAAGCTGAAAAGCGTTAAGGAGCTGCTTGGT
.....

4347                                     4428
pSB1A3 te... ATTACAATTTGGAACGCTCTTCCTTCGAAAAAATCCGATTTGATTTTCTGGAAGCCAAGGGCTATAAAGAAGTAAAAAAG
AsiA (Asi... TGTTCATTTAAAGACGGCTTTCTTCGAAAATAAATCGATTGATTTTGTGAAGCCAAGGGCTATAAAGAAGTAAAAAAG
.....

4429                                     4510
pSB1A3 te... ACTTGATTATCAAACCTCCGAAGTATAGTCTGTTCGAGCTGGGAAACGGCAGAAAAAAGTGTGGCCCTCGGCCGGCGAACT
AsiA (Asi... ACTTGATTATCAAACCTCCGAAGTATAGTCTGTTCGAGCTGGGAAACGGCAGAAAAAAGTGTGGCCCTCGGCCGGCGAACT

```

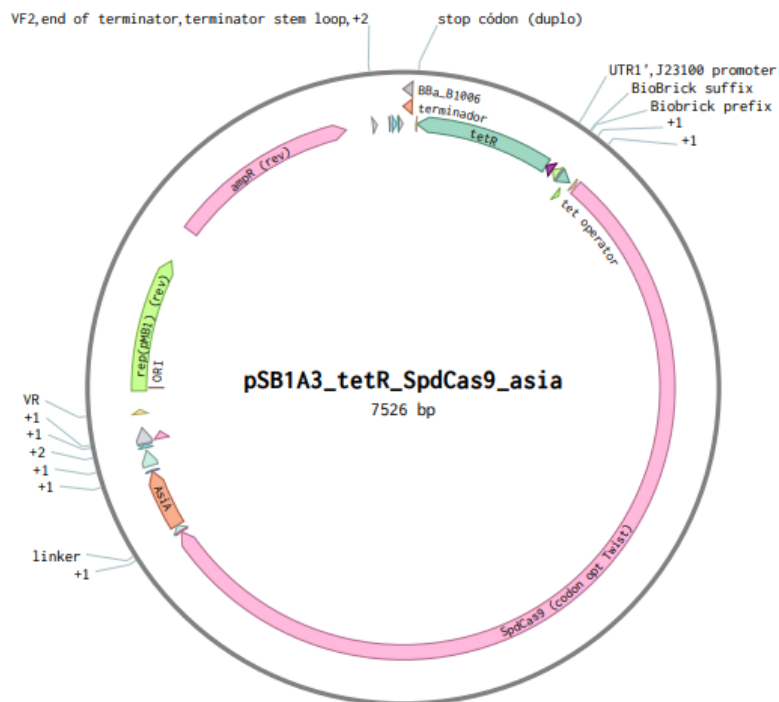
```

4511                                     4592
pSB1A3_te... GCAAAAGGGGAACGAACTGGCGTTGCCTTCCAAATATGTGAACCTTTTGTATTTAGCCTCCCATFACGAAAACTGAAGGTT
Asia (Āsi... GCAAAAGGGGAACGAACTGGCGTTGCCTTCCAAATATGTGAACCTTTTGTATTTAGCCTCCCATFACGAAAACTGAAGGTT
.....
4593                                     4674
pSB1A3_te... TCGCCTGAAGATAATGAACAGAACAGTTGTTTCGTTGAGCAACATAAACACTACCTGGATGAAATCATAGAGCAAATTTCCG
Asia (Āsi... TCGCCTGAAGATAATGAACAGAACAGTTGTTTCGTTGAGCAACATAAACACTACCTGGATGAAATCATAGAGCAAATTTCCG
.....
4675                                     4756
pSB1A3_te... AATTTAGTAAACGTGTTATTCTGGCTGACGCAAATTTAGATAAAGTCCTTAGCGCTTATAATAAACATCGTGATAAACCCAT
Asia (Āsi... AATTTAGTAAACGTGTTATTCTGGCTGACGCAAATTTAGATAAAGTCCTTAGCGCTTATAATAAACATCGTGATAAACCCAT
.....
4757                                     4838
pSB1A3_te... TCGCGAGCAGGCTGAAAATATAATCCATCTTTTACGCTTACTAATCTGGGTGCTCCAGCTGCCTCAAATATTTTGATACC
Asia (Āsi... TCGCGAGCAGGCTGAAAATATAATCCATCTTTTACGCTTACTAATCTGGGTGCTCCAGCTGCCTCAAATATTTTGATACC
.....
4839                                     4920
pSB1A3_te... ACAATTGATCGTAAGCGCTACACCAGTACTAAAGAGGTGTTGGATGCTACTCTGATTCACCAAAGTATTACCGGCTGTACG
Asia (Āsi... ACAATTGATCGTAAGCGCTACACCAGTACTAAAGAGGTGTTGGATGCTACTCTGATTCACCAAAGTATTACCGGCTGTACG
.....
4921                                     5002
pSB1A3_te... AAACGCGTATTGACCTGTCTCAGCTGGCGGCGGATActagaGGCGGCGGGGTAGCGGCGGTGGTGGCTCTATGAACAAGAA
Asia (Āsi... AAACGCGTATTGACCTGTCTCAGCTGGCGGCGGATActagaGGCGGCGGGGTAGCGGCGGTGGTGGCTCTATGAACAAGAA
-----

```

**Figura 24.** Resultado do alinhamento da sequência PJ23100\_tetR\_Ptet\_SpdCas9-AsiA com o sequenciamento.

## APÊNDICE 4

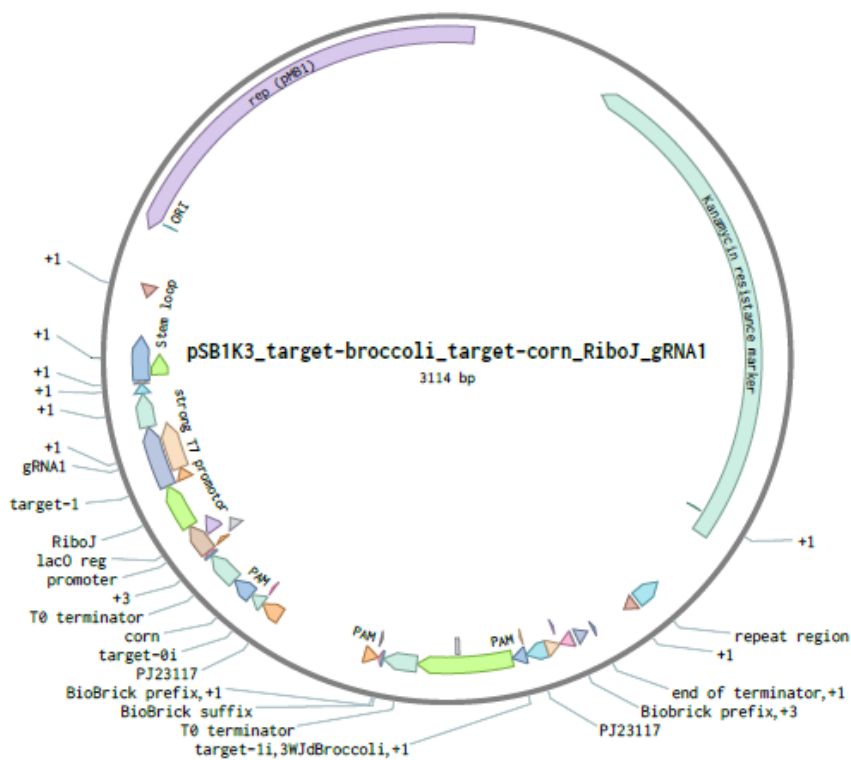


**Figura 7.** Plasmídeo pSB1A3, com origem de replicação para *E. coli*, marca de resistência para ampicilina e as sequências P<sub>J23100\_tetR</sub> (sentido reverso) e P<sub>tet\_SpdCas9\_asia</sub>.









**Figura 28.** Plasmídeo pSB1K3, com origem de replicação para *E. coli*, marca de resistência para canamicina e as sequências target-0a\_PJ23117\_target-1i\_broccoli\_target-1a\_PJ23117\_target-0i\_corn\_P<sub>T7-lacO</sub>\_RiboJ\_gRNA-1.