



## OBTENÇÃO DE CLONES DE *Bradysia hygida* EM CROMOSSOMO ARTIFICIAL BACTERIANO (BAC)

Lívia Francischini Rodrigues (PIBIC/CNPq-UEM), Katya Jaquelline Ribeiro Passos, Sílvia Yukari Togoro, Maria Aparecida Fernandez (Orientador), e-mail: aparecidafernandez@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Biologia Celular e Genética/Maringá, PR.

### Ciências Biológicas, Genética.

**Palavras-chave:** *Bradysia hygida*, Cromossomo Artificial Bacteriano, Biblioteca genômica.

### Resumo

*Bradysia hygida* (Díptera, Sciaridae), é, entre outros insetos, utilizado como modelo experimental na análise de processos funcionais associados à amplificação gênica. O sistema BAC utilizado permite clonar fragmentos de uma variedade de genomas complexos, onde o DNA é estável, fácil para manipular e permite a clonagem de fragmentos extensos do genoma, podendo chegar a até 300 Kb. O objetivo desse trabalho foi obter clones contendo seqüências nucleotídicas de *Bradysia hygida* em vetores tipo BAC (Bacterial Artificial Chromosome) para posterior montagem de uma biblioteca genômica desse sciarídeo.

### Introdução

Os segmentos amplificados dos cromossomos politênicos de glândula salivar de sciarídeos são utilizados amplamente em biologia do desenvolvimento para estudo da ação gênica em nível cromossômico (Gerbi e Urnov, 1996). Nos cromossomos politênicos das células da glândula salivar de *Bradysia hygida* são encontradas expansões, que são os pufes de DNA, de ocorrência exclusiva nos sciarídeos (Suaia, 1971). Nos pufes de DNA há uma elevada síntese de DNA (Rudkin e Corlette, 1957), permitindo assim um incremento do número de moldes de DNA e a amplificação da atividade de sítios cromossômicos particulares (Crouse, 1968). O vetor utilizado nesse trabalho, o BAC (do inglês, *Bacterial Artificial Chromosome*), desenvolvimento por Shizuya et al. (1992) é utilizado para clonar fragmentos de uma variedade de genomas complexos, sendo que o DNA é estável, fácil para manipular e uma fonte simples de DNA exógeno. Além dessas vantagens os fragmentos de DNA ligados no vetor BAC, são muito maiores do que as tradicionalmente usadas na clonagem tradicional, podendo chegar a ter 300 Kb (Shizuya et al.; 1992).



Com esse trabalho foram obtidos alguns clones contendo DNA de *Bradysia hygida* em vetores do tipo BAC, os quais foram extraídos por lise alcalina e/ou CTAB para posterior análise dos fragmentos.

## **Materiais e métodos**

O vetor BAC foi preparado seguindo-se o protocolo do kit *Large-Construct* (QUIAGEN®) e submetida à eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão TBE 1X (Sambrook e Russel, 2001). Comprovada a eficiência da extração do BAC procedeu-se à clivagem do mesmo com a enzima *Bam*HI e em seguida foi realizada a confirmação da linearização do vetor através de eletroforese em gel de agarose 0,7%. Em seguida, o vetor foi desfosforilado utilizando-se a enzima TSAP (PROMEGA®) e em seguida armazenado a -80°C.

Para a obtenção de DNA genômico de *B. hygida* foram utilizadas indivíduos adultos desse sciarídeo. O DNA foi extraído e purificado conforme o protocolo de Sambrook e Russel (2001). O DNA purificado obtido de *B. hygida* foi clivado parcialmente com a enzima *Mbo*I e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%. A fração relacionada ao maior tamanho molecular foi recuperada do gel e purificada utilizando-se o kit de extração de gel QIAEX®II (QUIAGEN®).

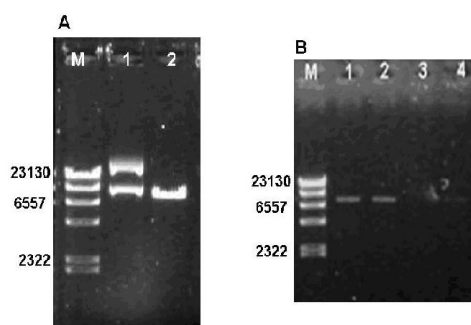
A reação de ligação entre o BAC e os fragmentos de DNA genômico de *B. hygida* foi realizada utilizando-se a enzima *T4 ligase*. A eficácia da reação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,7%. A amostra contendo o DNA recombinante foi armazenada a -80°C.

O tamanho das moléculas de DNA recombinante é de tamanho elevado e então a transformação necessita de alta eficiência (Shizuya *et al.*, 1992). Desse modo o DNA recombinante foi introduzido em bactérias *Escherichia coli* DH10B eletrocompetentes. Essas bactérias foram preparadas para o processo de eletroporação anteriormente como descrito em Sambrook e Russel (2001).

O DNA recombinante foi inserido por eletroporação (Sambrook e Russel, 2001). Os clones obtidos foram extraídos por lise alcalina e/ou CTAB e em seguida clivados com enzima *Not*I-HF, e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7%.

## **Resultados e Discussão**

O vetor pBeloBAC11 foi analisado para que pudesse ser comprovada a qualidade da extração (Figura 1A). Após a purificação do vetor foi realizada a sua linearização com a enzima *Bam*HI (Figura 1A, raia 2), sua desfosforilação (Figura 1B, raia 1), e o sucesso da desfosforilação do vetor com a enzima TSAP (Figura 1B, raia 2), ensaio de ligação com o vetor não fosforilado, raia 3 e fosforilado, raia 4.

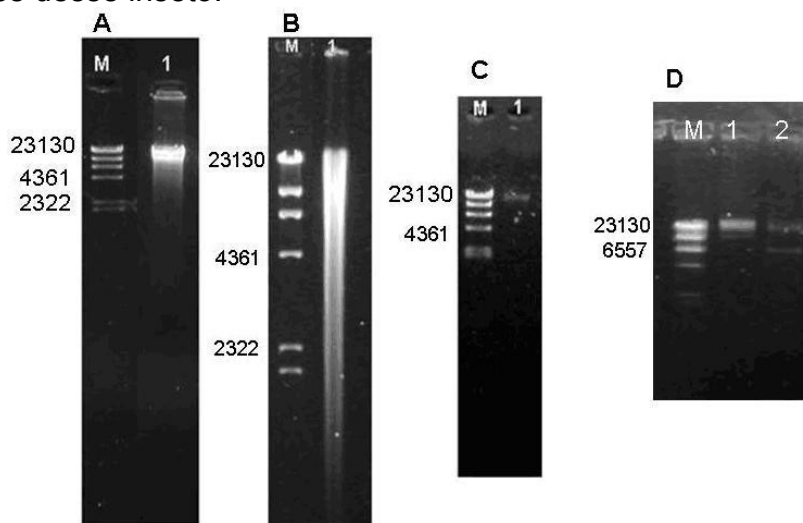


**Figura 1.** Obtenção do vetor BAC. **A**, 1, vetor pBeloBAC11; 2, vetor pBeloBAC11 clivado; **B**, 1, controle da desfosforilação; 2, desfosforilação com TSAP; 3, controle da ligação; 4, ligação com vetor desfosforilado. M) marcador molecular  $\lambda$ HindIII em pares de base. Eletroforese em gel de agarose 0,7%.

O DNA de *B. hygida* (Figura 2A) foi clivado parcialmente com a enzima de restrição *Mbol* (Figura 2B).

A amostra contendo o DNA clivado foi analisada e em seguida a fração entre 23 kb e 9kb foi recuperada e purificada (Figura 2C). O DNA resultante foi ligado ao vetor desfosforilado obtendo-se dessa forma o DNA recombinante. Com o processo de transformação por eletroporação obteve-se alguns clones que foram armazenados em cultura contendo 15% de glicerol 87% em freezer -80°C. Os clones foram extraído pelo método CTAB, posteriormente purificados utilizando-se o método fenol-clorofórmio, e em seguida clivado com enzima NotI-HF, como pode ser observado na Figura 2D.

O desenvolvimento de uma biblioteca genômica de *Bradysia hygida* poderá auxiliar nos estudos envolvendo o processo de replicação, já que poderão ser analisadas as seqüências *downstream* e *upstream* dos genes já conhecidos desse inseto.



**Figura 2.** Obtenção do DNA genômico de *Bradysia hygida*. **A**, DNA purificado de *B. hygida*. **B**, DNA de *B. hygida* clivado parcialmente com *Mbol*. **C**, eluição do DNA de tamanho molecular entre 23 e 9 kb. **D**, raia 1 vetor pBeloBAC11, raia 2, DNA recombinante. M, marcador molecular  $\lambda$  hind III em pares de base. Eletroforese em gel de agarose 0,7%.



## Conclusões

Com este trabalho foi possível a obtenção de clones genômicos de *Bradysia hygida* em vetor BAC e a sua purificação o que possibilitará posteriormente a montagem de uma biblioteca genômica.

## Agradecimentos

As autoras agradecem Valmir Péron e Marli Licero Schuete Silva pela dedicada assistência técnica e as agências financiadoras, CNPq, FINEP, Fundação Araucária, TWAS. As autoras agradecem também o suporte do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – COMCAP/UEM.

## Referências

Gerbi, S. and Urnov, F.D. Differential DNA replication in insects. In “DNA replication in eukaryotic cells”, ed. DePamphilis, M.L., Cold Spring Harbor laboratory Press. New York, 1996, 947-969.

Sauaia, H, Cromossomas politênicos de *Bradysia hygida*. Inibição do desenvolvimento dos puffs de DNA pela hidroxiluréia. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1971.

Rudkin, G. T. and Corlette, S. L. Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1957, 43, 964-968.

Crouse, H. V. The role of ecdysone in DNA-Puff formation and DNA synthesis in the polytene chromosomes of *Sciara Coprophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1968, 61, 971-978.

Shizuya, H.; Birren, B.; Kim, U. J.; Mancino, V.; Slepak, T.; Tachiiri, Y.; Simont, M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89, 8794-8797.

*Sambrook, J; Russel, D.W. (2001), Molecular Cloning: A laboratory Manual . 3ªed. New York: Cold Spring Harbor.*