

CLONAGEM DE GENES: MÉTODOS E APLICAÇÕES

GENE CLONING: METHODS AND APPLICATIONS

RONALDO ROBERTO TAIT CALEFFE¹, STEFANY RODRIGUES DE OLIVEIRA², ALYSSA CRISTINA OLIVEIRA FREITAS³, KARINA KEIKO KIDO⁴, ADRIANA GARCIA⁵, JOÃO ALENCAR PAMPHILE^{6*}

1. Acadêmico do curso de graduação em Tecnologia em Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá. 2. Acadêmica do curso de graduação em Tecnologia em Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá. 3. Acadêmica do curso de graduação em Tecnologia em Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá. 4. Acadêmica do curso de graduação em Tecnologia em Biotecnologia da Universidade Estadual de Maringá. 5. Doutora em Biologia Comparada-PGB/UEM. 6. Professor Doutor do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá.

* UEM – Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-90. japamphile@uem.br; prof.pamphile@gmail.com

Recebido em 10/11/2015. Aceito para publicação em 10/12/2015

RESUMO

A partir da descoberta da estrutura do DNA por James Dewey Watson e Francis Harry Compton Crick em 1953 e consequentemente a caracterização de uma enzima de restrição provinda de *Escherichia coli* por Matthew Stanley Meselson e Robert Yuan em 1968 é que novas tecnologias de Biologia Molecular foram desenvolvidas, culminando na primeira clonagem genética em 1972. Esta tecnologia pode ser utilizada em diversos estudos, como mecanismos de replicação e expressão gênica, na descrição da sequência de um gene e sua proteína codificada, além de culturas microbianas com a capacidade de desenvolverem substâncias de interesse como a insulina humana, enzimas industriais, vacinas entre outras variadas aplicações. Portanto, o objetivo desta revisão é fornecer informações sobre os métodos e aplicações da clonagem genética. Para a realização da revisão bibliográfica foram utilizados os bancos de dados *Google Acadêmico*, *Pubmed*, *PMC* e *Science Direct*.

PALAVRAS-CHAVE: Clonagem de genes, clonagem molecular, engenharia genética.

ABSTRACT

The Since the discovered of the DNA structure by James Dewey Watson and Francis Harry Compton Crick in 1953 and consequently characterization of a restriction enzyme from *Escherichia coli* by Matthew Stanley Meselson and Robert Yuan in 1968 is that new technologies was developed end up in the first gene cloning in 1972. This technology can be used in many researches, such as mechanism of replication and gene expression, the description of a gene sequence and its encoded protein, besides microbial cultures with the capacity of develop interest substances as human insulin, industrial enzymes, vaccine and many others applications. Thus, the objective of this review is to provide information about gene cloning methods and applications. The literature review was performed in the database as *Google Scholar*, *Pubmed*, *PMC* and *Science Direct*.

KEYWORDS: Gene cloning, molecular cloning, genetic engineer.

1. INTRODUÇÃO

A estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA) é composta por duas hélices ligadas, ao redor do mesmo eixo, segundo Watson & Crick (1953), este estudo marcou a revolução molecular, dando início a várias técnicas utilizadas hoje na genética molecular.

A engenharia genética, que permite a manipulação do material genético dos organismos, surgiu em 1972, quando cientistas da universidade de Stanford, nos Estados Unidos conseguiram combinar DNA de *Escherichia coli* ao do *Simiam papiloma vírus* (JACKSON *et al.*, 1972).

Nathans & Smith (1975) descreveram enzimas de restrição essenciais para a manipulação do DNA *in vitro*, também fundamentais para o isolamento de fragmentos específicos de DNA para clonagem *in vivo*, desenvolvida por Berg em 1972.

Também em 1975, uma nova abordagem metodológica, denominada Southern blotting (SOUTHERN, 1975), começou a ser usada para análise genética. O Southern blotting baseia-se na clivagem de DNA com enzimas de restrição, seguido por eletroforese, transferência de bandas para uma membrana, e finalmente, hibridização com sondas moleculares específicas.

Em 1977, técnicas de sequenciamento permitiram a identificação de alterações específicas na sequência de DNA e a associação destas com diferentes doenças genéticas. Depois disso, o principal marco no desenvolvimento das técnicas de diagnóstico molecular foi a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Apesar dos princípios da técnica de PCR terem sido conceitualmente descritos já em 1971 (KLEPPE, 1971), os primeiros dados experimentais só foram publicados em meados dos anos 80 (SAIKI, 1985).

Os estudos genéticos moleculares utilizam uma variedade de técnicas para analisar os ácidos nucleicos (DNA e RNA). Dentre estas técnicas as mais utilizadas são: técnica de hibridização do tipo dot ou blot, Southern e Northern, e hibridização *in situ*; técnicas de amplifica-

ção de alvos-específicos como a PCR, PCR competitiva, PCR-transcriptase reversa (RT-PCR) e a PCR em tempo-real; métodos de amplificação de sinal, como por exemplo branched DNA (bDNA); tecnologia de arrays. Os resultados destes ensaios podem ser úteis no diagnóstico, prognóstico, determinação da terapia a ser utilizada, e até mesmo na avaliação da suscetibilidade a doenças.

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica de aspectos relacionados à clonagem de genes, descrevendo sobre suas aplicações, conceitos e métodos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo possui caráter bibliográfico e foi realizado com base em artigos publicados na literatura científica. Os bancos de dados utilizados para tal finalidade foram: *Google Acadêmico*, *Pubmed*, *PMC* e *Science Direct*. A seleção dos artigos utilizados para o desenvolvimento da revisão teve como critério trabalhos publicados na língua portuguesa e inglesa disponíveis como texto completo, com importância para o tema abordado e que se enquadraram nos descritores: clonagem de genes, clonagem molecular e engenharia genética. Os dados foram analisados por meio da leitura dos artigos e conseguinte seleção das informações relevantes que se adequassem ao objetivo e ao tema da pesquisa.

3. DESENVOLVIMENTO

Clonagem de genes

Atualmente a área de biotecnologia tem pesquisado e realizado diversas técnicas de clonagem gênica, que por sua vez tem sido desenvolvida por meio de algumas tecnologias e métodos a ela aplicada. Clonagem molecular também é conhecida como engenharia genética, manipulação gênica, clonagem gênica e tecnologia do DNA recombinante. A mesma caracteriza-se por isolar e amplificar um gene específico de interesse, introduzir este gene em um vetor a fim de cloná-lo, com sua efetiva multiplicação em uma célula hospedeira onde os microrganismos são os mais utilizados, pelo fato de seu rápido desenvolvimento, fácil manutenção e manipulação (COHEN, 2013). Em geral os estudos a ela aplicados, possibilitam o melhor conhecimento da natureza dos genes e proteínas, trazendo benefícios inclusive no campo da medicina, pois possibilita a produção de proteínas recombinantes (JOHNSON, 1983) além de ser de grande interesse na área de enzimas e áreas como pecuária e a agricultura, que com a introdução desses genes em algumas espécies de animais e/ou vegetais, tem aumentado possibilidade de criação de recursos de cura e aprimoramento de algumas espécies. Desta forma, a clonagem gênica assume um importante papel nas áreas como agricultura, medicina, pecuária (MACEDO, *et al.*,

2011). O processo de construção de moléculas de DNA recombinante compreende duas etapas: Na primeira o fragmento de DNA de interesse, chamado de inserto, é amplificado e ligado à outra molécula de DNA (vetor de clonagem), gerando a molécula de DNA recombinante; na segunda o DNA recombinante é propagado em uma célula hospedeira suscetível a diversos antibióticos. Esta célula transformada pode ser identificada por meio da adição de antibióticos específicos no meio de cultura, no caso de microrganismos, já que os transformados possuem os plasmídeos com resistência ao antibiótico escolhido, como marcador de seleção. Para a realização deste processo primeiramente são necessárias algumas informações, como: a sequência de nucleotídeos (que permitirá obter os oligonucleotídeos que delimitará a sequência de interesse); o organismo de origem (se é eucarioto ou procarioto) se for procarioto o gene pode ser isolado e amplificado por PCR, a partir do DNA da fonte e se for eucarioto, quando for um gene interrompido por um ou mais introns, é necessário o tratamento para a retirada desses, já que microrganismos procariotos (bactérias) não possuem essas sequências intervenientes. Assim, se o gene contendo os introns forem inseridos em uma célula procariota, a expressão do gene não irá ocorrer corretamente, pelo fato dos procariotos não possuírem a maquinaria necessária para o processamento do mRNA que envolve o *splicing*. Desta forma é possível solucionar este problema com o método RT-PCR que possui duas partes: a primeira corresponde a reação da transcrição reversa, e a segunda a PCR, onde se sintetiza moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) como molde, assim apenas a região codificadora de um gene eucarioto é obtida, ou seja, a sequência que tem a informação final para a codificação de uma proteína. Outra forma é a obtenção destes genes por bibliotecas de cDNA (COHEN, 2013). Alternativamente, esses genes de eucariotos podem ser clonados em hospedeiros como fungos leveduriformes como *Saccharomyces cerevisiae*.

Enzimas de Restrição

As enzimas de restrição, inicialmente descobertas em bactérias como um sistema de defesa contra a infecção por bacteriófagos, atuando como sistema de guarda, assumem um importante papel na clonagem gênica. Conforme a literatura, o próprio microrganismo protege seu DNA de tal degradação, protegendo-o por meio da metilação da sequência palindrômica reconhecida pela própria enzima de restrição. Esse sistema de defesa proporcionado pela enzima é conhecido como modificação-restrição (COHEN, 2013). As enzimas de restrição são divididas nos tipos, I, II e III. As enzimas do tipo I têm a capacidade de reconhecimento de uma sequência característica assimétrica, e clivam o DNA a uma distância aleatória de pelo menos 1000pb do seu local de re-

conhecimento. As enzimas tipo II, são classificadas como enzimas monoméricas ou diméricas e realizam a partição do DNA no mesmo sítio de seu reconhecimento, de estrutura palindrômica (MACEDO, *et al.*, 2011). E as do tipo III reconhecem sequências assimétricas, realizam a clivagem de 24 a 26 pares de bases posteriores. Outro fator importante é o tipo de corte, existindo dois, um corte realizado no eixo simétrico na sequência específica, criando extremidades abruptas, e o outro corte ocorre assimetricamente situada ao redor do eixo de simetria, originando extremidades coesivas. Um fator muito significativo dessas enzimas, é que quando clivadas por uma endonuclease, tal feito será sempre no mesmo ponto, permitindo assim um padrão de restrição característico, logo proporcionando isolar partes específicas do DNA de interesse (PINGOUD, *et al.*, 2014). Outro fator importante seria que após a clivagem do DNA, o mesmo passa a ter extremidades de fita simples, o que permite outra molécula de DNA que possua extremidade de fita simples e complementar se ligar, o que forma o que conhecemos por DNA recombinante. Para que esses fragmentos permaneçam juntos é necessário recompor uma ligação fosfodiéster com a DNA ligase. Para isso, é preciso um grupamento de hidroxila livre na extremidade 3' de um dos fragmentos do DNA (NATHANS & SMITH, 1975).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Essa técnica permite a amplificação de uma sequência específica de DNA a partir de uma mix, contendo o DNA molde, dNTP's, DNA ligase e DNA polimerase. Para isso é preciso realizar a síntese de dois oligonucleotídeos (*primers*) de DNA, complementares a cada fita de DNA, demarcando a região de interesse. O ciclo de PCR tem como base a desnaturação (separação das duplas hélices), resfriamento seguido da hibridização e incubação para a atividade da DNA polimerase, que gerará novas fitas de DNA, usando quatro desoxirribonucleotídios, o que permitirá que o gene de interesse seja amplificado para a inserção no vetor. Uma forma alternativa da técnica de PCR é a RT-PCR, que possui duas partes: a primeira corresponde a reação da transcrição reversa, e a segunda a PCR. A diferença básica entre a PCR e a RT-PCR é que na última se sintetiza moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) como molde, diferente do PCR que o molde é DNA. Desta forma, apenas a região codificadora de um gene eucarioto é obtida, ou seja, a sequência que tem a informação final para a codificação de uma proteína. Em primeiro lugar, este é um dos pontos mais importante para o uso desta técnica, pois grande parte dos estudos em Biologia Molecular é realizado em bactérias, expressando-se e purificando proteínas de eucariotos neste organismo. Como já informado anteriormente, bactérias, diferente de eucariotos, não possuem íntrons em seu DNA, e desta

forma, não possuem a maquinaria necessária para, após a transcrição, retirar os íntrons do mRNA. Por isso a RT-PCR veio para resolver este problema, pois agora é possível obter apenas a sequência codificante dos genes eucariotos para, então, expressá-los em bactérias (TÓTH *et al.*, 2014; Tillet & Neilan, 1999).

Vetores

Para realizarmos a clonagem gênica, a presença de um vetor é essencial, ou seja, moléculas de DNA as quais são denominadas de vetores de clonagem, permitindo a inserção de DNA adicional ao mesmo o que possibilitará a multiplicação preferencial do inserto de interesse. Os vírus foram os primeiros vetores a serem utilizados para inserir genes em células de mamíferos: o vírus SV40, isolado de células tumorais de macacos, apresenta 5.200 pares de bases que podem ser divididas em duas regiões, região precoce e tardia. A região precoce é expressa pelo ciclo lítico e a região tardia apenas após o início da replicação viral, portanto a clonagem pode ser feita substituindo a região precoce ou tardia (WATSON, 1988). Em geral há dois importantes vetores, os plasmídeos e os fagos. O primeiro tem como características estar separado do DNA cromossômico da célula, representando uma parte do DNA total da célula hospedeira bacteriana. Eles têm a capacidade de replicação autônoma dentro da célula hospedeira, em geral células que portam o plasmídeo tendem a ter resistência a antibióticos, tem mais de um sítio de reconhecimento de enzimas de restrição, região conhecida como múltiplo sítio de clonagem (MSC), dentro dessa região o plasmídeo é clivado por endonucleases, permitindo consequentemente a adição de um fragmento de DNA. Existindo ainda o que chamamos de plasmídeo de expressão que permite a expressão de um gene de relevância para célula hospedeira (WATSON, 1988; COHEN *et al.*, 1973). Há também os fagos, ou bacteriófagos que colonizam facilmente suas células hospedeiras, ou seja, vírus que contaminam bactérias. Eles possuem em seu genoma sequências de DNA fundamental para o ciclo lítico ou lisogênico. Algumas de suas vantagens seria sua maior eficiência quando comparado ao plasmídeo, para clonagem de fragmentos maiores. Quando utilizado, o fago é empacotado *in vitro*, o que proporciona 100% de eficácia na infecção da célula hospedeira, com a possibilidade de integração do inserto de DNA em uma célula hospedeira final (que não seja para clonagem gênica) ou mesmo para multiplicação em uma célula bacteriana, via ciclo lítico, com a produção de novos fagos carregando o inserto de DNA. Os fagos tem a capacidade de inserção de 15kb, que é suficiente para clonarem genes e suas regiões flaqueadoras, contudo existem genes de 35kb a 40kb, que podem ser clonados em cosmídeos. Os cosmídeos são plasmídeos que possuem um fragmento do DNA do fago, que possui o sítio *cos*, podendo dessa

forma serem utilizados como vetores de clonagem por meio do empacotamento *in vitro*, que reconstitui a estrutura do fago permitindo a infecção da célula hospedeira (COLLINS & HOHN, 1978).

Microrganismos hospedeiros

A clonagem é uma das técnicas moleculares mais difundidas em ecologia microbiana (ALMEIDA, 2009). A expressão de proteínas recombinantes em microrganismos transformados tem se mostrado uma técnica fundamental na biologia molecular moderna e vem sendo feita desde a década de 70 (QORONFLEH, HESTERBERG, 2007).

A produção em larga escala de proteínas recombinantes para subsequente purificação é hoje uma técnica em ascensão. Essa tecnologia possui importante aplicação englobando sua utilização em imunização, estudo bioquímicos, uso biotecnológico e terapêutico (BALBÁS, 2001). Uma das utilizações da clonagem de microrganismos é a produção de vacinas que utiliza proteínas da capa viral produzindo uma vacina muito mais segura comparada com as que utilizam vírus mortos. As bactérias, por ter um cultivo rápido e produzir altas quantidades de proteína recombinante a baixo custo, são as mais utilizadas entre os microrganismos (MAKRIDES, 1996; HANNIG, MAKRIDES, 1988).

Transformação genética

Na natureza, temos vários exemplos de transferência genética de DNA para bactérias como a transformação, eletroporação e transfecção. A transformação bacteriana é realizada pela absorção de fragmentos de DNA exógenos presentes no ambiente circundante, originados de outras bactérias mortas e decompostas, e comparativamente, no caso da clonagem molecular realizada no laboratório, o fragmento de DNA que será absorvido corresponde ao gene de interesse para a clonagem. Desta forma o material genético, se compatível, será incorporado ao seu material genético, sendo duplicado.

O processo de transformação *in vitro* é utilizado em bactérias, em que a bactéria competente para a transformação é colocada em contato com o vetor de clonagem, na presença de cloreto de cálcio, leva a uma alta frequência de transformantes. Um exemplo prático seria a transformação bacteriana (*E.coli*) visando a produção de insulina humana que, após o processo de inserção do gene, passam a sintetizar o hormônio. Apenas um limitado número de espécies bacterianas possui a capacidade natural de transformação, outras são suscetíveis a tratamentos especiais que induzem esta capacidade (transformação química na presença de CaCl_2). Um método alternativo à transformação química, é o uso de corrente elétrica com o objetivo de gerar distorção na membrana da célula para então incorporar o DNA exógeno. Primeiramente a eletroporação, que consiste na formação de

poros localizados na membrana da célula causados por corrente elétrica aplicada, foi desenvolvida para o uso de células eucariotas e posteriormente este método foi adaptado para microrganismos (WIRTH *et al.*, 1989).

O processo de introduzir DNA em uma célula eucariótica sem ser de forma viral é definido como transfecção, onde se usa método químico, lipídico ou físico. Este processo é um método que neutraliza o problema de introduzir moléculas carregadas negativamente em uma membrana negativa. Substâncias químicas, como fosfato de cálcio, revestem a molécula de DNA neutralizando a carga ou criando uma carga positiva, o que torna simplificado a transfecção do DNA (Felgner *et al.*, 1987).

KITS de clonagem

Muitos kits comerciais de clonagem molecular são utilizados em diversas pesquisas. Geralmente possuem a finalidade de tornar o processo mais rápido, fácil e preciso, para melhores resultados. Alguns exemplos de kits de clonagem utilizados são: o AdvanTAge PCR cloning kit (CLONTECH) (SCHAFFNER *et al.*, 1999), que tem como principal objetivo a união de fragmentos de DNA que têm 15 pb homólogos nas suas extremidades lineares, tornando o processo rápido e preciso. Um uso típico para esta tecnologia de PCR seria para clonar produtos em vetores, sem a utilização de enzimas de restrição, ligase, ou fosfatase. É um kit compatível com qualquer inserto e qualquer vetor. Outro kit é o CloneJET PCR Cloning Kit (KLEIMAN, *et al.*, 2013) que é um sistema avançado para uma alta eficiência de clonagem de produtos de PCR gerados por polimerases de DNA termoestáveis ou qualquer outro fragmento de DNA. O kit apresenta a seleção positiva do vetor de clonagem pJET1.2 / sem corte. Este vetor contém um gene letal, que é interrompido pela ligação de um DNA clonado. Como resultado, apenas as células com o DNA recombinante são capazes de se propagar. O InsTAclone PCR Cloning Kit e o Flex-C também são bastante utilizados (DEY *et al.*, 2005; BABALOLA, 2009).

Processo baseado em cDNA

Em genética, DNA complementar (cDNA) (BATISTA, 2009) é o DNA sintetizado a partir de uma molécula de mRNA, cujos íntrons já foram removidos, ou seja, o mRNA já passou pelo processo de splicing, sendo uma reação catalisada pela enzima transcriptase reversa. Após a extração e purificação do mRNA, é inserido um primer para que a Transcriptase Reversa se ligue e sintetize a fita única de DNA a partir do molde de RNA, gerando um híbrido complementar e antiparalelo. O RNA, por ser mais instável irá se degradar permanecendo apenas a fita de DNA, que terá sua fita complementar sintetizada pela ação de uma DNA polimerase. Esse cDNA poderá ser clonado e também, por meio da PCR, ser duplicado e amplificado para estudos de expressão gênica.

4. CONCLUSÃO

A partir dos estudos de biologia molecular, que envolveram a elucidação da estrutura da molécula de DNA, da descoberta e caracterização de enzimas, como enzimas de restrição, DNA ligase, DNA polimerase entre outras, e o desenvolvimento de técnicas como PCR, muito tem se desenvolvido no que diz respeito à manipulação genética. A clonagem de genes possui variadas aplicações na área de pesquisa, por meio do conhecimento da organização de genomas, da sequência de genes e suas proteínas codificadas, da criação de bibliotecas de DNA e cDNA, além de produtos que beneficiam a sociedade, como a produção de enzimas industriais, produção de insulina humana, vacinas, hormônios de crescimento e melhoramento genético. Apesar do grande avanço da área, a manipulação genética possui um amplo campo ainda a ser explorado que pode gerar muitos benefícios resultando em novos produtos e aplicações.

REFERÊNCIAS

- [01] ALMEIDA R.N.A. Desenvolvimento, validação e aplicação de método molecular baseado na análise do rRNA para a identificação das bactérias formadoras de biofilme metabolicamente ativas na superfície de membranas de osmose reversa. [dissertação] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: 2009.
- [02] BABALOLA O.O, KIRBY B.M, ROES-HILL M.L, COOK A.E, CARY S.C, BURTON S.G, *et al.* Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antartic Dry Valley mineral soils. *Environmental Microbiology* 2009; 11(3): 566-576.
- [03] BALBÁS P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology* 2001; 19(3): 251-267.
- [04] BATISTA T.M. Clonagem do cDNA codificante para a toxina madura LTx5 da aranha *Lasiadora sp* no vetor pYES2.1/V5-His-TOPO® e expressão da proteína recombinante. [dissertação] Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto: 2009.
- [05] COHEN S.N, Chang A.C.Y, Boyer H.W, Helling R.B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1973; 70(11): 3240-3244.
- [06] COHEN S.N. DNA cloning: A personal view after 40 years. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2013; 110(39): 15521-15529
- [07] COLLINS J., HOHN B. Cosmids: A type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage λ heads. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1978; 75(9): 4242-4246
- [08] DEY D, MUKHERJEE M, BASU D, DATTA M, ROY S.S, BANDYOPADHYAY A, *et al.* Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2005; 16(4-6): 217-228.
- [09] FELGNER P.L, GADEK T.R, HOLM M, ROMAN R, CHAN H.W, WENZ M, *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1987; 84(21): 7413-7417.
- [10] HANNIG G, MAKRIDES S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tibtech* 1988; 16: 54-60.
- [11] JACKSON D.A, SYMONS R.H, BERG P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1972; 69(10): 2904-2909.
- [12] JOHNSON I.S. Human Insulin from Recombinant DNA Technology. *Science* 1983; 219: 632-637
- [13] KLEIMAN D.A, BUITRAGO D, CROWLEY M.J, BENINATO T, VEACH A.J, ZANZONICO P.B, *et al.* TSH Increases Iodine Uptake by Thyroid Cancer Cells During BRAF Silencing. *J. Surg. Res* 2013; 182(1): 85-93.
- [14] KLEPPE K. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology* 1971; 56 (2): 341-361.
- [15] MACEDO J.N.A, LOPES J.L.S, DAMALO J.C.P. Técnicas de biologia molecular e clonagem. 1ª ed. Brasília-DF: W. Educacional; 2011.
- [16] MAKRIDES S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Ver* 1996; 60(3): 512-538.
- [17] NATHANS D., SMITH H.O. Restriction endonuclease in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem* 1975; 44: 273-293.
- [18] PINGOUD A., WILSON G.G., WENDE W. Type II restriction endonucleases-a historical perspective and more. *Nucleic Acids Research* 2014; 42(12): 7489-7527
- [19] QORONFLEH M.W, HESTERBERG L.K. Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. *Protein Expression and Purification* 2007; 55(2): 209-224.
- [20] SAIKI R.K. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230 (4732): 1350-1354.
- [21] SCHAFFNER C, STILGENBAUER S, RAPPOLD G.A, DÖHNER H, LICHTER P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(2): 748-753.
- [22] SOUTHERN E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 1975; 98 (3): 503-517
- [23] TILLET D, NEILAN B.A. Enzyme-free cloning: a rapid method to clone PCR products independent of vector restriction enzymes sites. *Nucleic Acids Research* 1999; 27(19): 1-3.
- [24] TÓTH E, HUSZÁR K, BENCURA P, KULCSÁR P.I, VODICKA B, NYESTE A, *et al.* Restriction Enzyme Body Doubles and PCR Cloning: On the General Use of Type IIS Restriction Enzymes for Cloning. *Plos One* 2014; 9(3): 1-12
- [25] WATSON J.D, CRICK F.H.C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953; 171: 737-738.
- [26] WATSON N. A new revision of the sequence of plasmid pBR322. *Gene* 1988; 70: 399-403
- [27] WIRTH R, FRIESENEGGER A, FIEDLER S. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet* 1989; 216: 175-177