



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**AVANÇOS EM MÉTODOS DE CLONAGEM MOLECULAR PARA A ENGENHARIA
GENÉTICA E BIOLOGIA SINTÉTICA**

JULIA BEATRIZ DOS SANTOS

Foz do Iguaçu
2024

**AVANÇOS EM MÉTODOS DE CLONAGEM MOLECULAR PARA A ENGENHARIA
GENÉTICA E BIOLOGIA SINTÉTICA**

JULIA BEATRIZ DOS SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas.

Foz do Iguaçu
2024

JULIA BEATRIZ DOS SANTOS

**AVANÇOS EM MÉTODOS DE CLONAGEM MOLECULAR PARA A ENGENHARIA
GENÉTICA E BIOLOGIA SINTÉTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA

Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa
UNILA

Foz do Iguaçu, 15 de abril de 2024.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Marcia Cristiane da Silva e Jair dos Santos, pelo apoio incondicional durante todos esses anos, por sempre terem acreditado em mim e por terem me proporcionado sempre o seu melhor, seja um conselho, uma refeição feita na hora, e até mesmo um ombro para chorar. Sem vocês nada disso teria sido possível. À minha irmã Ana Clara dos Santos, que apesar de estar longe é uma presença constante na minha vida, e acredita em mim mais do que eu mesma. Agradeço também às minhas irmãs Maria Luiza e Estela, que trazem à tona o melhor de mim, sempre. Ao meu irmão Jair dos Santos Junior e à minha cunhada Natalli Pilatti, pelo apoio, conversas profundas e abraços reconfortantes.

Agradeço aos meus amigos biotecnologistas da turma de 2017, principalmente à Ana Caroline de Lima e Matheus Araújo, por estarem comigo desde o início do curso, por todas as experiências compartilhadas, pelas incontáveis risadas e por terem se tornado minha família escolhida. A caminhada até aqui não foi fácil, mas valeu a pena só por estar com vocês. Agradeço também à Santiago Marsiglia, Alexander Colmenarez, André Lopes, Gabriel Neumann, Patricia Alderete, Any Pantaleão, Sara Torres e Kauê Cardoso por todos os momentos de amizade e leveza proporcionados.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Cristian Rojas, por todo o apoio na elaboração deste trabalho, pelos ensinamentos durante os anos de graduação, e por não ter desistido de mim devido à minha procrastinação.

Agradeço à Universidade Federal da Integração Latino-Americana pelo acolhimento e pelo conhecimento oferecido a mim durante essa jornada, e por expandir meus horizontes à uma América Latina multicultural e integrada.

RESUMO

Este Trabalho de Conclusão de Curso apresenta um estudo introdutório sobre a engenharia genética e a biologia sintética, explorando as técnicas revolucionárias e suas aplicações transformadoras na medicina, agricultura e biotecnologia. Com a introdução das enzimas de restrição e a capacidade de manipular o DNA, a engenharia genética propiciou avanços significativos, como a produção de insulina humana recombinante e o desenvolvimento de culturas agrícolas transgênicas com resistência a pragas e tolerância a herbicidas, demonstrando o potencial destas tecnologias para resolver desafios globais em saúde e alimentação. A análise detalha o processo de clonagem molecular, fundamentando-se em técnicas experimentais que permitem a transferência e combinação de genes entre organismos, resultando em microrganismos, plantas e animais geneticamente modificados para fins específicos. Diversos métodos de clonagem são examinados, incluindo o Golden Gate, que permite a montagem eficiente de sequências de DNA, e BioBricks, que padroniza partes biológicas para facilitar a construção de sistemas biológicos complexos. Além disso, discute-se o método TEDA, que utiliza a exonuclease T5 para a montagem simplificada de DNA, e a importância das enzimas de restrição na clonagem precisa de DNA. O método de Gibson é destacado por sua capacidade de unir múltiplos fragmentos de DNA em um processo isotérmico, simplificando a construção de moléculas grandes de DNA. Aborda-se também a clonagem por PCR, um método versátil para a amplificação e clonagem de DNA, e a clonagem TA, que se aproveita da propriedade da Taq polimerase para facilitar a ligação de produtos de PCR a vetores de clonagem. O estudo avança com a técnica Gateway Cloning, enfatizando sua eficiência na transferência de fragmentos de DNA entre vetores, e o método SLICE, que se destaca por sua capacidade de montar DNA sem sítios de restrição. Adicionalmente, o *recombineering* é apresentado como uma técnica poderosa para a modificação direta do DNA genômico, abrindo caminhos para a edição genômica e o desenvolvimento de novas terapias genéticas. Este TCC sublinha a importância dessas técnicas revolucionárias para o avanço científico e aplicações práticas em várias áreas da biotecnologia, sinalizando o futuro promissor destas tecnologias na engenharia genética e na biologia sintética. Com uma visão abrangente das metodologias atuais e potenciais futuras aplicações, este trabalho destaca a engenharia genética e a biologia sintética como campos fundamentais para o progresso contínuo na ciência e tecnologia, evidenciando seu papel crítico na solução de problemas complexos de saúde, alimentação e sustentabilidade ambiental.

Palavras-chave: engenharia genética; biologia sintética; métodos de clonagem.

ABSTRACT

This Course Completion Paper presents an introductory study of genetic engineering and synthetic biology, exploring revolutionary techniques and their transformative applications in medicine, agriculture and biotechnology. With the introduction of restriction enzymes and the ability to manipulate DNA, genetic engineering has led to significant advances, such as the production of recombinant human insulin and the development of transgenic agricultural crops with pest resistance and herbicide tolerance, demonstrating the potential of these technologies to solve global health and food challenges. This analysis details the process of molecular cloning, based on experimental techniques that allow the transfer and combination of genes between organisms, resulting in microorganisms, animals and plants genetically modified for specific purposes. Several cloning methods are examined, including Golden Gate, which allows the efficient assembly of DNA sequences, and BioBricks, which standardizes biological parts to facilitate the construction of complex biological systems. Furthermore, the TEDA method uses the T5 exonuclease for simplified DNA assembly, and the importance of restriction enzymes in accurate DNA cloning are discussed. Gibson's method is highlighted by its ability to join multiple DNA fragments in an unique isothermal process, simplifying the construction of large DNA molecules. PCR cloning, a versatile method for DNA amplification and cloning is also discussed, and TA cloning, which takes advantage of the property of Taq polymerase to facilitate the ligation of PCR products to cloning vectors. The study advances with the Gateway Cloning technique, emphasizing its efficiency in transferring DNA fragments between vectors, and the SLICE method, which stands out by its ability to assemble DNA without the need for restriction sites. Additionally, *recombineering* is presented as a powerful technique for the direct modification of genomic DNA, opening avenues for genomic editing and the development of new gene therapies. This TCC highlights the importance of these revolutionary techniques for scientific advancement and practical applications in several areas of biotechnology, signaling the promising future of these technologies in genetic engineering and synthetic biology. With a comprehensive view of current methodologies and potential future applications, this work highlights genetic engineering and synthetic biology as fundamental fields for continued progress in science and technology, highlighting their critical role in solving complex health, food and environmental problems.

Key words: genetic engineering; synthetic biology; cloning methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Clonagem Molecular	13
Figura 2 – Funcionamento da Enzima EcoRI	19
Figura 3 – Clonagem Golden Gate	21
Figura 4 – Montagem por BioBricks	22
Figura 5 – Método TEDA	24
Figura 6 – Método de Gibson	26
Figura 7 – Clonagem TA	27
Figura 8 – Método Gateway	29
Figura 9 – Método SLICE	31
Figura 10 – Técnica Recombineering	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OGM - Organismo Geneticamente Modificado

Crispr-Cas9 - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas Regularmente Interespaçadas

TALEN - Nucleases Efetoras Semelhantes A Ativador De Transcrição

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

TEDA - Montagem Dependente De Exonuclease T5

SLICE - Extrato de Clonagem de Ligação Contínua

ORFs - Fases de Leitura Aberta

ssDNA - Dna De Fita Simples

dsDNA - Dna De Fita Dupla

iGEM - International Genetically Engineered Machine

SLIC - Clonagem Independente de Sequência e Ligação

BACs - Cromossomos Artificiais Bacterianos

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1 ENGENHARIA GENÉTICA	10
1.2 BIOLOGIA SINTÉTICA	11
1.3 CLONAGEM	12
1.4 MÉTODOS DE CLONAGEM	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 METODOLOGIA	17
4 RESULTADOS	18
4.1 MÉTODOS BASEADOS EM ENZIMAS	18
4.1.1 Enzimas de Restrição	18
4.1.2 Método Golden Gate	19
4.1.3 BioBricks	22
4.1.4 TEDA	23
4.1.5 Método de Gibson	25
4.2 MÉTODOS BASEADOS EM PCR	26
4.2.1 Clonagem TA	26
4.3 MÉTODOS BASEADOS EM RECOMBINAÇÃO	28
5.3.1 Método Gateway	28
5.3.2 Método SLICE	30
5.3.3 Recombineering cloning	32
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS	35

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ENGENHARIA GENÉTICA

A engenharia genética é uma área da biologia que se baseia na manipulação e recombinação dos genes de organismos vivos para alcançar objetivos específicos. Constitui um conjunto de técnicas de análises moleculares que permitem estudos de caracterização, expressão e modificações do material genético em organismos a fim de alterar suas características (LANIGAN, 2020).

Um organismo criado através da engenharia genética é chamado de organismo geneticamente modificado (OGM). Quando ocorre a inserção de genes intraespécies, um organismo transgênico é produzido, e quando material genético é introduzido em um hospedeiro da mesma espécie, o organismo gerado é cisgênico.

O conceito de engenharia genética foi primeiramente estabelecido em bactérias por Boyer e Cohen em 1973, como resultado da união entre estudos em plasmídeos e enzimas de restrição. O primeiro produto geneticamente modificado a ser comercializado, em 1982, foi a insulina humana, produzida através da síntese e inserção da sequência genética dessa proteína em plasmídeos e células de *Escherichia coli*, bactéria que atuou como fábrica biológica para a insulina, que conseqüentemente pôde ser purificada e utilizada no tratamento da diabetes (GLICK *et al.*, 2010).

A engenharia genética desempenha um papel fundamental em vários campos como biotecnologia industrial, medicina e agricultura, além de permitir o avanço científico. Na agricultura é usada para a criação de novas variedades comerciais de safras com características rentáveis, como tolerância a herbicidas e resistência a pragas, através da introdução de genes benéficos ou supressão de genes endógenos em cultivares, gerando plantas transgênicas (KUMAR, 2020). Na medicina, a engenharia genética é utilizada para o tratamento de doenças hereditárias, doenças monogênicas e cânceres por meio da terapia gênica (LINDEN, 2010). Na indústria, a produção de proteínas recombinantes através de fábricas biológicas para a geração de biofarmacêuticos como vacinas e medicamentos tem se tornado um campo muito proeminente nos últimos anos (NIELSEN, 2012).

Existem vários tipos de modificações genéticas que podem ser realizadas para alterar o genoma, através da capacidade de marcar e transformar genes

específicos. Podem envolver a deleção de regiões de Ácido Desoxirribonucleico (DNA), inserções de segmentos novos ao DNA, e a substituição de pares de bases

Na deleção de sequências específicas de DNA a sequência de interesse é substituída por uma sequência inativa, alterada ou irrelevante (MAJZOUN, 1996). Essa técnica é desempenhada através da recombinação homóloga e uso de marcadores moleculares, também pode ser feita por nucleases modificadas, como o sistema de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas, em conjunto com a enzima Cas9 (CRISPR-CAS9) e nucleases efetoras semelhantes a ativador de transcrição (TALENs), (CAMPENHOUT *et al.*, 2019). Deleções curtas no genoma são usadas para remover elementos regulatórios que impedem a expressão gênica, ativam a expressão de certos genes, ou modificam a estrutura e função de proteínas (LANIGAN, 2020). De forma similar, pode ser realizada a inserção direcionada de sequências de DNA para modificar a função gênica através da recombinação homóloga e inserção de genes repórteres de proteínas fluorescentes, para estudar modificações gênicas e os fenótipos resultantes da substituição direcionada. A substituição de sequências de DNA no genoma pode ser usada para bloquear a função de genes específicos e simultaneamente ativar a função de outro gene, e nucleotídeos únicos podem ser substituídos para estudar mutações (LANIGAN, 2020).

1.2 BIOLOGIA SINTÉTICA

A biologia sintética é um campo interdisciplinar que une conceitos de engenharia, biotecnologia, química e ciência da computação para o desenho e construção de sistemas biológicos, organismos e partes, através de circuitos regulatórios de gene que funcionam de forma análoga a circuitos elétricos (CAMERON, 2014). A adaptação e montagem de partes funcionalmente independentes, como promotores, locais de ligação de ribossomo, sequências codificantes, terminadores e domínios proteicos são uma forma promissora de reconstruir organismos existentes ou de produzir novas entidades biológicas (HEINEMANN, PANKE, 2006).

Para a aplicação dos sistemas biológicos produzidos, é necessário o estabelecimento de regras sistemáticas baseadas na padronização, dissociação e abstração (ENDY, 2005) em vários níveis celulares, seguindo uma visão e abordagem da engenharia aplicada à biologia. A padronização inclui a definição, descrição e caracterização de partes biológicas básicas, além das condições mínimas necessárias

para o funcionamento da operação. Essa padronização é feita através da construção de repositórios de peças que facilitam o compartilhamento de informações entre pesquisadores, como o *Registro de Partes Biológicas Padrão iGEM* e o *SynBioHub* (MCLAUGHLIN, 2018). Com a disponibilização das informações que codificam a parte desejada, fragmentos de DNA podem ser sintetizados diretamente por empresas especializadas, sendo limitados apenas pelo seu tamanho. A dissociação consiste na ideia de separar um projeto complicado em pequenas etapas, que eventualmente podem ser combinadas funcionalmente, como é o caso da síntese de fragmentos de DNA citada acima. Moléculas longas podem ser construídas a partir da montagem automática de oligonucleotídeos e fragmentos curtos de DNA, permitindo a pesquisadores uma melhor divisão laboral dos projetos (ENDY, 2005). A abstração permite com que indivíduos trabalhem de forma independente em qualquer etapa do processo, sendo uma forma de manejar níveis de complexidade em hierarquias.

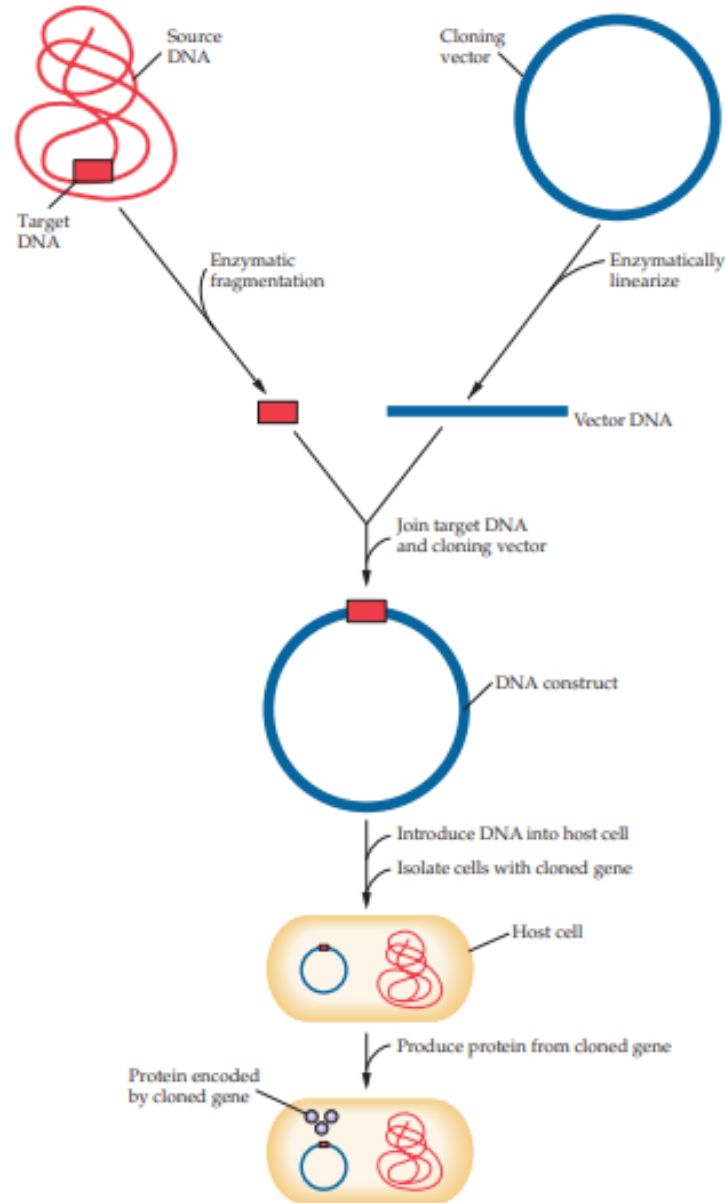
1.3 CLONAGEM

A clonagem molecular ou a tecnologia do DNA recombinante é uma área da biotecnologia que fundamenta-se num conjunto de técnicas experimentais que consistem no isolamento de genes e a sua combinação em um único organismo ou a sua transferência de um organismo para outro, permitindo a criação de microrganismos, plantas e animais com atributos genéticos específicos (GLICK *et al.*, 2010).

No geral, uma sequência específica de passos são necessários para a realização da clonagem (Figura 1) (REECE *et al.*, 2011); (GLICK *et al.*, 2010):

1. A extração do DNA de um organismo doador deve ser feita, seguida de clivagem enzimática e ligação a um vetor para formar uma nova molécula de DNA recombinado;
2. O construto de DNA contendo o vetor de clonagem com o inserto é então transferido para uma célula hospedeira bacteriana em um processo de transformação;
3. As células transformadas devem ser identificadas e separadas das outras células bacterianas, e em alguns casos pode haver a produção de proteínas codificadas pela sequência de DNA clonada na própria célula hospedeira.

Figura 1: Clonagem Molecular



Fonte: Glick *et al.* (2010)

No entanto, apenas as enzimas de restrição não são suficientes para a clonagem molecular, após a clivagem as ligações de hidrogênio das quatro bases pareadas não são fortes o suficiente para manter a molécula alinhada, sendo necessária uma forma de religação internucleotídica entre o grupo hidroxila 3' e o grupo fosfato 5' no esqueleto nos dois locais de ligação cortados. Utiliza-se então a enzima DNA ligase, proveniente do bacteriófago T4 (BOYER; CHANG, 1973) que catalisa a formação de ligações fosfodiéster nas extremidades das fitas de DNA. As condições para a reação

dependem se as moléculas possuem extensões salientes ou cegas, e também da clivagem de um plasmídeo com a mesma enzima utilizada, garantindo a complementaridade no construto (ROBERTS, 2005) e sua inserção em uma célula hospedeira, geralmente *Escherichia coli*.

Para a introdução e propagação do DNA nas células hospedeiras, são utilizados vetores de clonagem. Existem vários tipos de vetores diferentes, sendo derivados de transportadores naturais de genes, por exemplo um genoma de vírus que infecta células eucarióticas ou procarióticas e se integra no genoma hospedeiro, ou plasmídeos comumente encontrados em células fúngicas ou bacterianas. Os vetores plasmidiais mais utilizados atualmente são o vetor pBR322 e o grupo de vetores pUC.

1.4 MÉTODOS DE CLONAGEM

A rápida evolução da indústria biotecnológica está intrinsecamente ligada aos avanços nas metodologias de DNA recombinante, uma revolução científica que permitiu manipulações genéticas precisas e inovadoras. Desde a descoberta das enzimas de restrição e a introdução dos primeiros métodos de clonagem molecular na década de 1970, a capacidade de isolar, modificar e reintroduzir DNA em células hospedeiras transformou radicalmente campos como medicina, agricultura e bioprodução.

Na medicina, esses avanços metodológicos tornaram possível a produção de proteínas recombinantes, como insulina e fatores de coagulação, antes obtidos apenas de fontes limitadas e muitas vezes problemáticas. A técnica de DNA recombinante, portanto, abriu caminho para terapias biológicas mais seguras e eficazes, marcando uma nova era no tratamento de doenças crônicas e genéticas. No setor agrícola, a introdução de genes em plantas através de tecnologias de DNA recombinante revolucionou o cultivo de alimentos, permitindo o desenvolvimento de variedades transgênicas com resistência a pragas, tolerância a herbicidas e melhoria nutricional (CALEFFE *et al.*, 2016). Essas modificações genéticas têm o potencial de aumentar a produtividade agrícola, reduzir a dependência de químicos e contribuir para a segurança alimentar global. Na pecuária, a recombinação gênica possibilitou a criação de animais transgênicos com características desejáveis, como crescimento acelerado e resistência a doenças. Essas inovações não só melhoram a eficiência da produção animal, mas também podem impactar positivamente o bem-estar animal e reduzir o impacto ambiental da pecuária.

A biotecnologia, portanto, evolui através de uma variedade de técnicas, classificadas conforme suas aplicações e metodologias subjacentes. Métodos baseados em enzimas, como a síntese de DNA in vitro, facilitaram a clonagem e manipulação de genes. A reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionou a biologia molecular ao permitir a amplificação específica de sequências de DNA, tornando a genotipagem, diagnósticos e pesquisas em biologia molecular mais rápidos e acessíveis. Por fim, a recombinação gênica continua a ser uma ferramenta poderosa para a engenharia genética, permitindo a inserção direcionada de genes em organismos hospedeiros para produzir proteínas recombinantes ou alterar traços fenotípicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma revisão sobre os diferentes métodos de clonagem utilizados no âmbito das disciplinas de Engenharia Genética e Biologia Sintética.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as principais metodologias de DNA recombinante utilizadas por pesquisadores na indústria biotecnológica.
- Caracterizar os tipos de clonagem de acordo com as suas especificidades e aplicações.

3 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado a partir da revisão bibliográfica guiada de artigos científicos disponíveis nos bancos de dados do Google Acadêmico e Pubmed, que disponibilizam uma ampla abordagem multidisciplinar para o objetivo proposto.

A seleção das publicações foi realizada em tópicos para cada tipo de clonagem. Primeiramente foi feita uma seleção inicial de artigos mais abrangentes utilizando as palavras-chave: *“cloning methods”*. Em seguida, utilizando o mesmo termo junto com o operador booleano AND as seguintes palavras-chave foram pesquisadas: *“restriction enzymes”*, *“PCR”*, *“recombineering DNA”*, e para filtrar ainda mais a pesquisa os termos específicos para cada método escolhido foram explorados: *“golden gate cloning”*, *“biobricks”*, *“TEDA”*, *“gibson assembly”*, *“TA cloning”*, *“gateway cloning”*, *“SLICE”* e *“recombineering cloning”*.

Todos os artigos foram revisados lendo o título e o resumo, e o critério de inclusão consistiu na relevância, datas de publicação mais recentes, e na escolha de artigos mais sintéticos e didáticos. O critério de exclusão foi a falta de clareza e simplicidade técnica. Foram selecionados 25 artigos para a elaboração do trabalho.

4 RESULTADOS

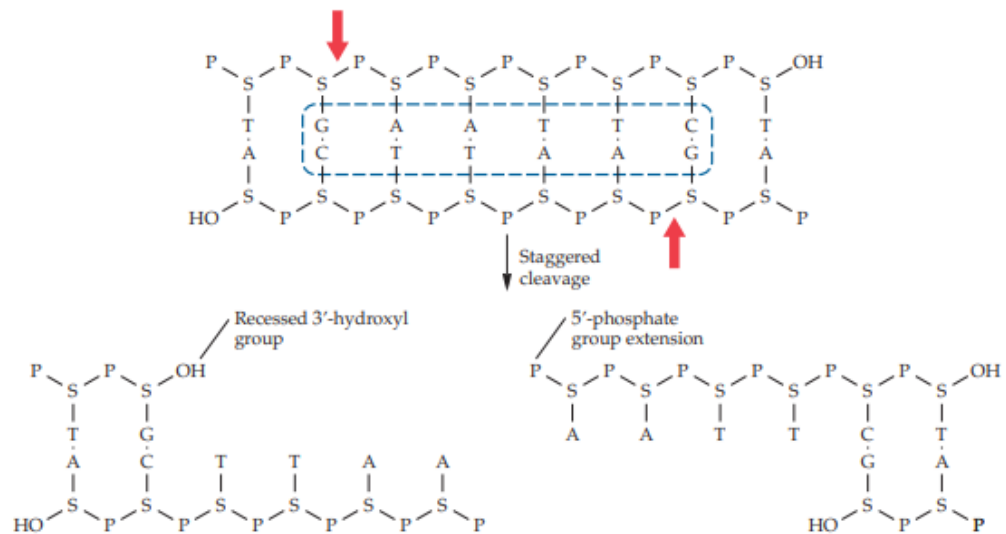
4.1 MÉTODOS BASEADOS EM ENZIMAS

4.1.1 Enzimas De Restrição

A descoberta e o desenvolvimento das enzimas de restrição representaram um marco fundamental na biotecnologia e na biologia molecular, pavimentando o caminho para técnicas avançadas de manipulação de DNA. As enzimas de restrição, particularmente as endonucleases do tipo II, como destacado por Nathans e Smith em 1975, revolucionaram a clonagem de DNA ao permitir a clivagem precisa de sequências de DNA de fita dupla em locais específicos. Essas enzimas reconhecem sequências específicas de nucleotídeos, muitas vezes sequências palindrômicas, e realizam cortes que podem resultar em extremidades salientes ou cegas, dependendo da enzima específica.

EcoRI, uma das primeiras endonucleases de restrição descobertas, exemplifica a especificidade e a funcionalidade destas enzimas. Originária da bactéria *Escherichia coli*, como elucidado por Meselson e Yuan em 1968, a EcoRI é capaz de se ligar e clivar sequências de DNA específicas, gerando extremidades salientes que facilitam a ligação subsequente de fragmentos de DNA (Figura 2). Esta característica tem sido instrumental na engenharia de vetores de clonagem e na facilitação da recombinação genética.

Figura 2: Funcionamento da Enzima EcoRI



Fonte: Glick *et al.* (2010)

A importância das enzimas de restrição vai além da mera clivagem do DNA. Como Glick *et al.* (2010) detalham, a capacidade de gerar extremidades compatíveis permite a ligação de fragmentos de DNA de diferentes origens, uma técnica fundamental na construção de bibliotecas genômicas, na inserção de genes em vetores plasmidiais e na formação de novas combinações genéticas através do pareamento de bases. Esse processo é essencial para experimentos de recombinação genética, permitindo a exploração de funções gênicas e o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados para pesquisa, medicina e aplicações industriais.

Além disso, a evolução das enzimas de restrição contribuiu para o desenvolvimento de tecnologias de edição genômica, como CRISPR-Cas9, que utilizam princípios semelhantes de reconhecimento e clivagem de sequências específicas de DNA para modificar o genoma de maneira direcionada. Este avanço ilustra a contínua influência das enzimas de restrição no campo da genética e destaca o potencial para futuras inovações na engenharia genética e na terapia genética.

4.1.2 Método Golden Gate

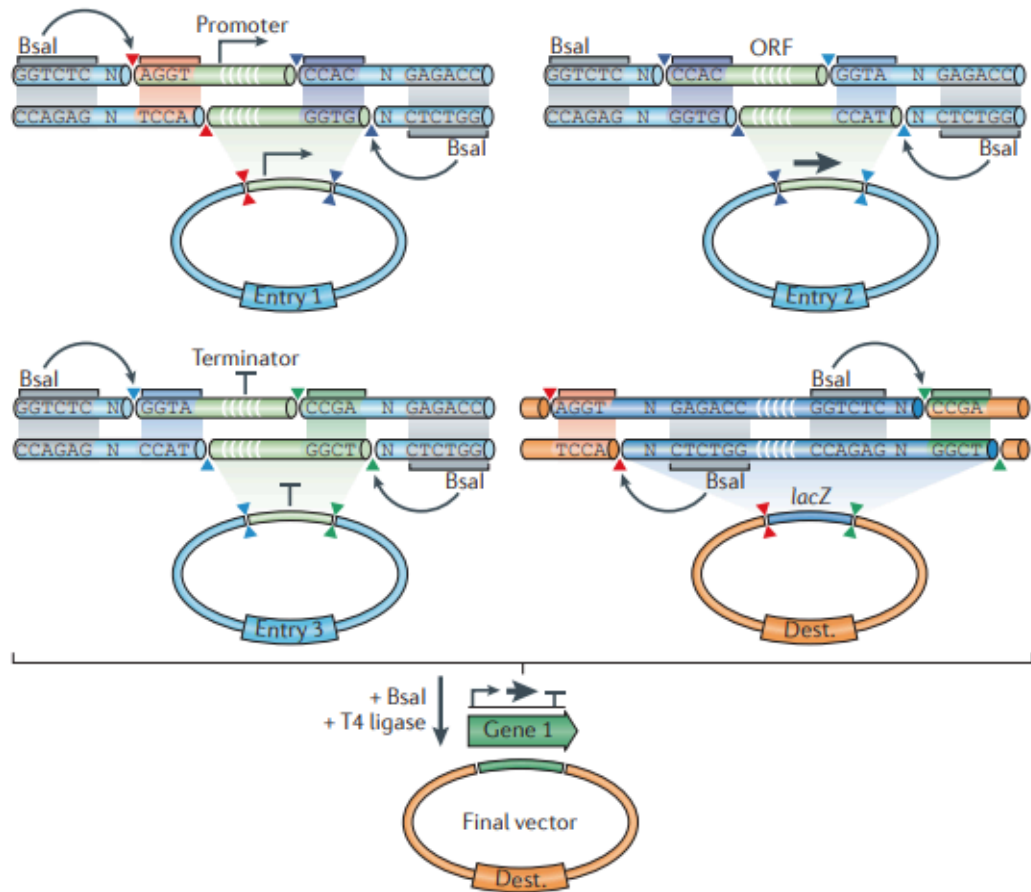
A técnica de montagem Golden Gate revolucionou a clonagem de DNA recombinante, proporcionando uma ferramenta eficaz e precisa para a construção de estruturas de DNA complexas. Esta metodologia, idealizada por Engler *et al.* (2008),

destaca-se pela sua capacidade de combinar múltiplos fragmentos de DNA de maneira sequencial e orientada em um único vetor. A chave para este método reside no uso estratégico de endonucleases do tipo IIS, que cortam o DNA fora de seus sítios de reconhecimento, gerando extremidades coesivas que podem ser ligadas de forma direcional por ligases de DNA T4. Tal abordagem não apenas simplifica a construção de moléculas de DNA complexas, mas também a torna altamente eficiente, reduzindo significativamente o tempo e o esforço comparado a métodos tradicionais de clonagem.

A otimização das condições de reação, como detalhado por Engler *et al.* (2009), é crucial para a eficácia desta técnica. A precisão na seleção da temperatura durante os ciclos de termociclador é vital para minimizar reações indesejadas, como a ligação de sequências não complementares, que poderiam introduzir erros ou "cicatrices" no DNA recombinante. Esta otimização assegura a fidelidade e a precisão da montagem, elementos essenciais quando se visa construir estruturas de DNA de alta complexidade.

Além dos aspectos técnicos, o método Golden Gate é notável pela sua modularidade e versatilidade. Como Casini *et al.* (2015) elucidam, a estratégia de montagem em camadas é um componente crítico deste método. Na primeira camada, componentes genéticos fundamentais como promotores, fases de leitura aberta (ORFs), e terminadores são meticulosamente combinados para formar uma unidade funcional, ou gene (Figura 3). Posteriormente, na segunda camada, estes genes são reunidos para criar sistemas multigênicos. Este processo permite uma abordagem escalável e flexível para a engenharia genética, facilitando a construção de circuitos genéticos complexos e redes de expressão gênica personalizadas para aplicações específicas.

Figura 3 - Clonagem Golden Gate



Fonte: Casini *et al.* (2015)

Este método tem ampliado seu impacto além do laboratório, influenciando significativamente áreas como a biologia sintética, onde a capacidade de projetar e construir sistemas biológicos complexos a partir do zero é um objetivo fundamental. Além disso, tem aplicações práticas na biotecnologia, medicina e agricultura, onde a necessidade de estruturas de DNA personalizadas e precisas é urgente. Seja na produção de proteínas recombinantes, no desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas com traços desejáveis, ou na criação de modelos animais para pesquisa, a montagem Golden Gate oferece uma plataforma robusta e confiável.

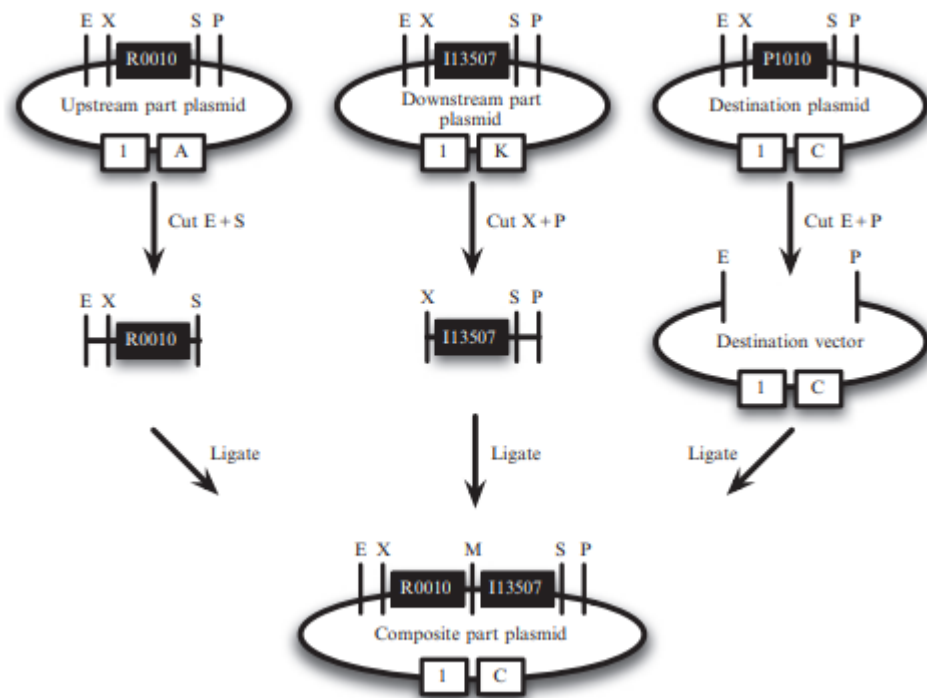
Portanto, a técnica de montagem Golden Gate representa um avanço notável na clonagem de DNA recombinante, destacando-se como uma ferramenta essencial no arsenal de cientistas e engenheiros genéticos. À medida que a ciência avança, espera-se que novas inovações e aperfeiçoamentos nesta metodologia continuem a expandir suas capacidades e aplicações, reforçando seu papel central na

engenharia genética e na biotecnologia moderna.

4.1.3 BioBricks

O conceito de Biobricks representa uma inovação fundamental na biologia sintética, visando a simplificação e a padronização do design de sistemas biológicos complexos. Conforme estabelecido por Knight em 2003, Biobricks são sequências de DNA que seguem um padrão modular, permitindo que cientistas montem componentes biológicos como se estivessem utilizando blocos de construção (Figura 4). Esta abordagem modular se baseia no uso de enzimas de restrição específicas, facilitando a combinação de partes de DNA com funções distintas, como promotores, genes codificadores de proteínas, e sequências terminadoras, de maneira precisa e previsível.

Figura 4 - Montagem por Biobricks



Fonte: Shetty (2011)

A utilização de Biobricks tem desbloqueado possibilidades extraordinárias para o design e a implementação de circuitos biológicos sintéticos. Estes circuitos, quando integrados em vetores e incorporados em células hospedeiras, podem conferir novas funções biológicas, abrindo caminho para aplicações revolucionárias em medicina,

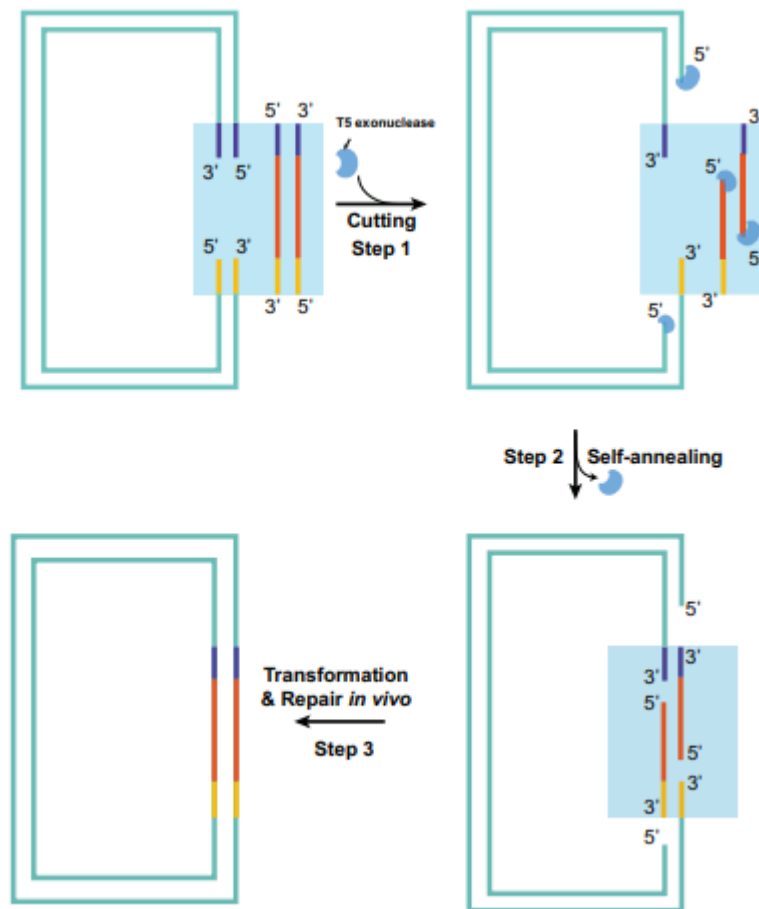
agricultura, e biotecnologia. Por exemplo, circuitos sintéticos podem ser projetados para responder a condições ambientais específicas, produzir compostos terapêuticos, ou até mesmo para a biorremediação. A padronização proposta por Biobricks não é apenas uma questão de conveniência; é uma necessidade para a expansão eficaz da biologia sintética. A construção de uma biblioteca extensa de partes biológicas padronizadas, que podem ser facilmente acessadas e combinadas, permite aos pesquisadores projetar sistemas biológicos com uma eficiência sem precedentes. Essa abordagem reduz significativamente o tempo e os recursos necessários para o desenvolvimento de novas construções genéticas, democratizando o acesso à engenharia genética e estimulando a inovação.

Além de suas implicações práticas, a estratégia de Biobricks também destaca a importância da colaboração e do compartilhamento de conhecimento na ciência. Através da criação de repositórios acessíveis de partes biológicas padronizadas, pesquisadores de todo o mundo podem contribuir para e se beneficiar de um acervo coletivo de conhecimento biológico. Isso estimula uma cultura de transparência e cooperação que é vital para o avanço rápido e ético da biologia sintética. A visão apresentada por Knight em 2003 lançou as bases para o desenvolvimento contínuo da biologia sintética como um campo de pesquisa interdisciplinar, destacando a interseção entre biologia, engenharia e tecnologia da informação. À medida que a ciência avança, novas metodologias e tecnologias, como a edição de genes CRISPR-Cas9, estão expandindo ainda mais o potencial dos Biobricks, permitindo manipulações genéticas mais complexas e precisas. O futuro da biologia sintética promete inovações que podem transformar a maneira como entendemos e interagimos com o mundo biológico.

4.1.4 TEDA

A montagem dependente de exonuclease T5 (TEDA) representa um avanço significativo nas técnicas de montagem de DNA, aproveitando a capacidade única da exonuclease T5 de digerir seletivamente as extremidades homólogas dos fragmentos de DNA. Esta abordagem, descrita por Yongzhen *et al.*, (2018), oferece uma alternativa simplificada, porém poderosa, aos métodos tradicionais de clonagem, como os métodos Gibson, Hot Fusion e SLIC, destacando-se pela sua eficácia e potencial de otimização. Ao contrário das técnicas convencionais, que muitas vezes requerem múltiplas etapas e diferentes enzimas para a preparação de fragmentos de DNA e sua posterior ligação, o método TEDA consolida o processo em uma única etapa *in vivo* (Figura 5).

Figura 5 - Método TEDA



Fonte: Yongzhen *et al.* (2018)

Depois de digerir as extremidades homólogas com a exonuclease T5, os fragmentos de DNA são ligados às células bacterianas de *E. coli*, aproveitando os mecanismos naturais de reparo do DNA da célula hospedeira. Esta estratégia não só simplifica o fluxo de trabalho de montagem do DNA, mas também reduz a incidência de erros, uma vez que as sequências são reparadas utilizando máquinas de reparação celular de alta fidelidade.

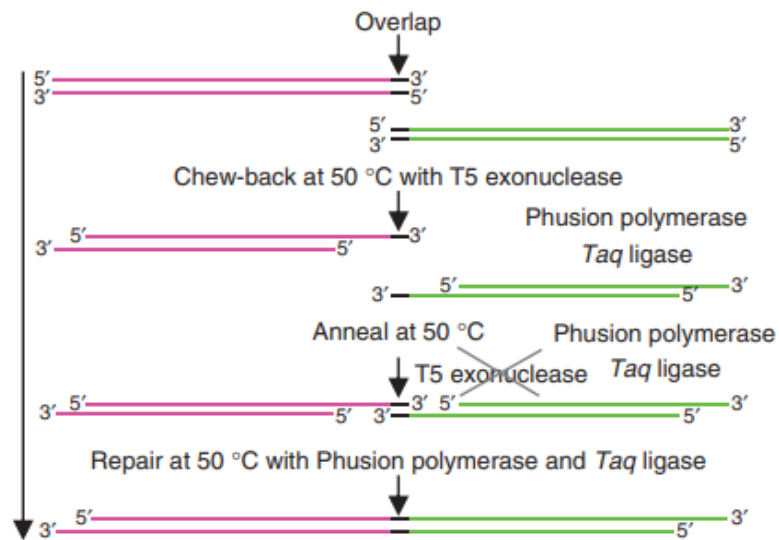
A implementação do método TEDA para clonagem apresenta diversas vantagens. Em primeiro lugar, a necessidade de apenas uma enzima para processar as extremidades do DNA representa uma redução significativa nos custos dos reagentes e simplifica o protocolo experimental. Além disso, a capacidade de realizar montagem e reparo de sequências diretamente nas células de *Escherichia coli* elimina a necessidade de etapas *in vitro* de purificação e preparação de DNA, acelerando significativamente o processo de

clonagem. Para otimizar ainda mais o método TEDA, pesquisas futuras poderiam explorar variações nas condições de incubação, concentrações de enzimas e estratégias de design de primers, com o objetivo de aumentar a eficiência da montagem e expandir a gama de possíveis aplicações. Além disso, a aplicabilidade do método em outros sistemas hospedeiros, além da *E. coli*, poderia ser investigada, abrindo potencialmente novos caminhos para a engenharia genética numa variedade de organismos. O método TEDA é um exemplo notável de como as inovações na biotecnologia e na engenharia genética estão continuamente a expandir as fronteiras das possibilidades. À medida que as técnicas de montagem de DNA se tornam mais eficientes e acessíveis, espera-se um impacto significativo em campos que vão da medicina sintética à bioenergia, onde a necessidade de montagens genéticas complexas e de alta fidelidade é cada vez mais crítica.

4.1.5 Método De Gibson

O método de montagem de Gibson “Gibson assembly” é um sistema de recombinação *in vitro* capaz de montar e reparar múltiplas moléculas de DNA sobrepostas em um único passo isotermal, através da utilização de uma exonuclease 5', uma DNA polimerase e uma DNA ligase, como descrito por Gibson em 2009 (Figura 6). As enzimas e os reagentes necessários para a reação são encontradas comercialmente, podendo ser usadas simultaneamente sem interferir no funcionamento da reação, permitindo a recombinação e a construção de plasmídeos de forma simplificada, e podem ser pré-misturados e congelados até ser necessário. A montagem do DNA requer somente a adição de DNA de fita simples (ssDNA) ou DNA de fita dupla (dsDNA) e breve incubação a 50° C, conforme estabelecido por Gibson em 2011.

Figura 6: Método de Gibson



Fonte: Gibson (2009)

Esse método simplificou a construção de moléculas grandes de DNA - podendo ser usado para unir moléculas de DNA de até 583 kb e para clonar produtos em *Escherichia coli* de até 300 kb. O método de Gibson também é eficaz para realizar a clonagem de múltiplos insertos em um vetor sem depender da disponibilidade de sítios de restrição, através da divisão em vários amplicons de PCR sobrepostos em regiões de DNA que não podem ser amplificadas por PCR por serem muito longas.

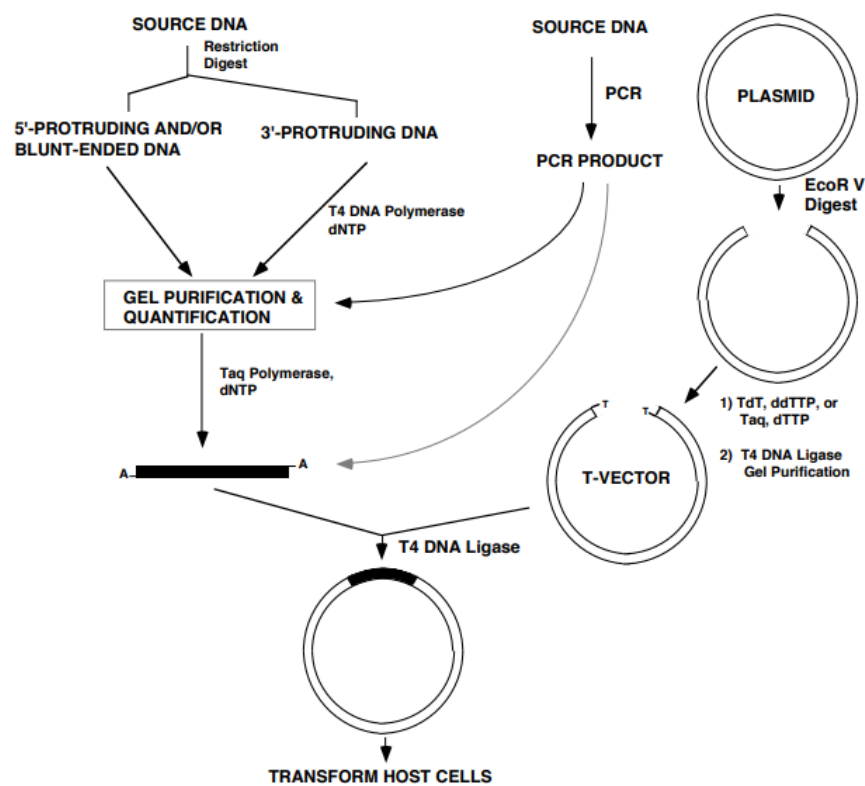
4.2 MÉTODOS BASEADOS EM PCR

4.2.1 Clonagem TA

O método de clonagem TA é uma técnica amplamente utilizada e eficiente para a clonagem de produtos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em plasmídeos. Esta técnica se destaca por sua simplicidade e alta eficiência, tornando-a uma ferramenta de escolha para muitos pesquisadores no campo da biologia molecular e genética. O princípio do método TA baseia-se na propriedade da Taq polimerase, uma

enzima frequentemente usada em reações de PCR, de adicionar uma adenina (A) extra nas extremidades 3' dos produtos de PCR. Aproveitando essa característica, os vetores de clonagem utilizados no método TA são projetados para ter extremidades 5' com timina (T) única, compatíveis com as adeninas extras dos produtos de PCR. Quando esses produtos são misturados com o vetor TA, as extremidades complementares T e A facilitam a ligação dos insertos de DNA ao vetor, permitindo uma ligação direta e eficiente sem a necessidade de enzimas de restrição ou ligases adicionais (Figura 7).

Figura 7: Clonagem TA



Fonte: Zhou (2000)

A facilidade de uso do método TA e a eliminação da necessidade de adaptadores ou procedimentos de blunting tornam este método particularmente atraente para a clonagem rápida de sequências de DNA. Isso permite que pesquisadores avancem rapidamente de sequências de PCR para a criação de clones recombinantes para expressão gênica, análise de sequência ou outras aplicações genéticas e biológicas.

No entanto, apesar das suas vantagens, o método TA também apresenta limitações. Por exemplo, a especificidade da clonagem pode ser um desafio, uma vez que

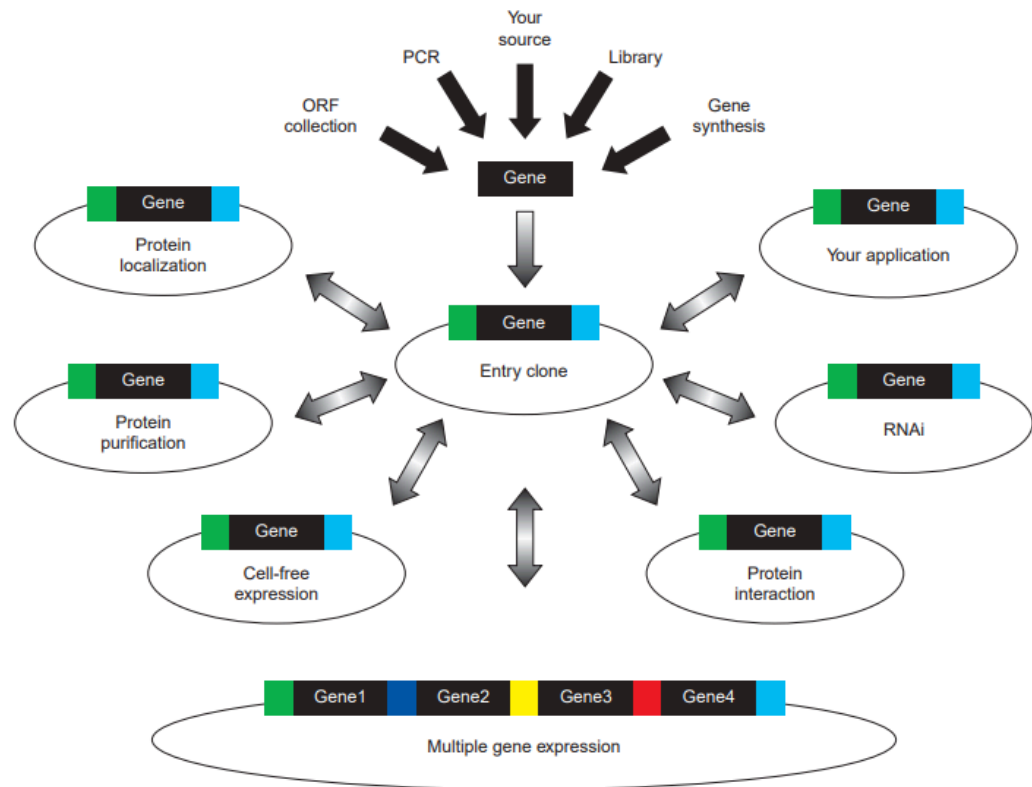
a adição não específica de adeninas pode levar à inserção de múltiplos clones ou a clonagem indesejada de produtos de PCR não específicos. Além disso, a eficiência da clonagem pode variar dependendo da qualidade do vetor e dos produtos de PCR. Apesar desses desafios, o desenvolvimento de kits de clonagem TA comerciais e a otimização de protocolos têm aumentado significativamente a eficiência e a confiabilidade dessa técnica. Isso tem permitido sua aplicação em uma ampla gama de áreas da pesquisa, incluindo a genética, a engenharia genética, a biologia do desenvolvimento e a biomedicina.

4.3 MÉTODOS BASEADOS EM RECOMBINAÇÃO

4.3.1 Método Gateway

A técnica Gateway Cloning revoluciona a clonagem de DNA recombinante ao oferecer uma abordagem altamente eficiente para a manipulação de fragmentos de DNA entre diferentes vetores. Esta técnica se apoia nas reações de recombinação sítio-específicas, um mecanismo empregado pelo bacteriófago lambda durante a infecção bacteriana, para facilitar a clonagem, combinação, e transferência de segmentos de DNA (Figura 8). Uma das principais vantagens deste método, conforme descrito por Katzen em 2007, é sua capacidade de preservar a orientação e a fase de leitura aberta dos fragmentos de interesse, um aspecto crítico para a expressão gênica correta e funcionalidade do DNA clonado.

Figura 8: Método Gateway



Fonte: Katzen (2007)

O processo Gateway se distingue pelo uso de "Cassetes Gateway", sequências de ligação específicas derivadas do DNA do bacteriófago (attP) e do cromossomo bacteriano (attB). Essas sequências atuam como âncoras para a integração do DNA de interesse em plasmídeos Gateway, através da ação coordenada de duas enzimas específicas, a clonase BP e a clonase LR. A clonase BP facilita a recombinação entre os sítios attB do DNA de interesse e os sítios attP do vetor de entrada Gateway, gerando um produto intermediário que é posteriormente reestruturado pela clonase LR. Esta última etapa resulta na inserção precisa do segmento de DNA dentro do vetor de expressão Gateway, flanqueado pelos sítios attP e attB, preparando o plasmídeo recombinante para a transformação bacteriana. Este vetor recombinante é então introduzido nas bactérias, onde o DNA de interesse pode ser expresso ou submetido a análises adicionais. A transformação bacteriana utilizada neste contexto é um método bem estabelecido que permite a introdução de DNA exógeno em células bacterianas, um passo fundamental para a propagação e expressão do DNA clonado. Além da eficiência e precisão, a tecnologia Gateway oferece versatilidade sem precedentes. Os pesquisadores

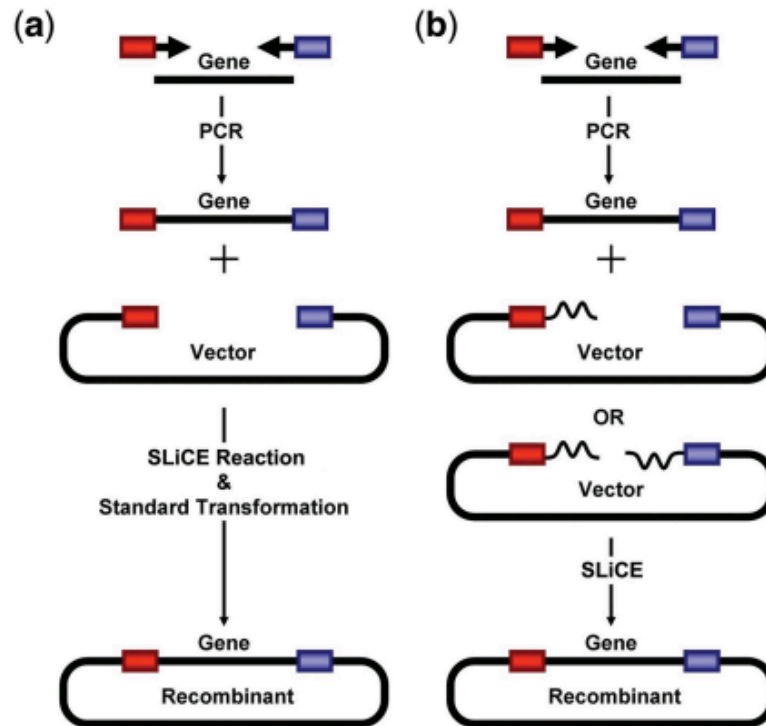
podem facilmente transferir sequências de DNA entre diferentes vetores de expressão sem a necessidade de realizar clonagem de DNA convencional, economizando tempo e reduzindo a possibilidade de erros. Esta característica torna o Gateway Cloning particularmente atraente para projetos que requerem a expressão de genes em múltiplos sistemas hospedeiros ou a análise funcional de variantes gênicas.

4.3.2 Método SLICE

O método baseado no Extrato de Clonagem de Ligação Contínua (SLICE) representa um avanço notável na clonagem de DNA, oferecendo uma abordagem inovadora e eficiente para a montagem de múltiplos fragmentos de DNA em moléculas de DNA recombinantes. Essa técnica, detalhada por Zhang em 2015, destaca-se por sua capacidade de realizar a montagem de DNA sem a necessidade de sítios de restrição ou a inclusão de sequências indesejadas durante a ligação. Baseando-se na recombinação *in vitro* entre regiões curtas de homologia, o SLICE utiliza extratos de células bacterianas derivadas de cepas de *E. coli*, como DH10B e JM109, que são recombinadas de maneira independente da via RecA, conforme elucidado por Zhang em 2012.

Este método inovador consiste em três etapas principais. A primeira etapa envolve a preparação do vetor linear e dos fragmentos homólogos a serem inseridos, geralmente alcançada através de reações de PCR que introduzem regiões de homologia nas extremidades dos fragmentos de DNA. A segunda etapa, a reação SLICE *in vitro*, permite a recombinação desses fragmentos homólogos em um único processo, graças à atividade dos extratos celulares bacterianos que facilitam a ligação dos fragmentos de DNA. Finalmente, a terceira etapa é a transformação dos constructos recombinados em bactérias hospedeiras, onde podem ser propagados e analisados posteriormente (Figura 9).

Figura 9 - Método SLICE



Fonte: Zhang (2012)

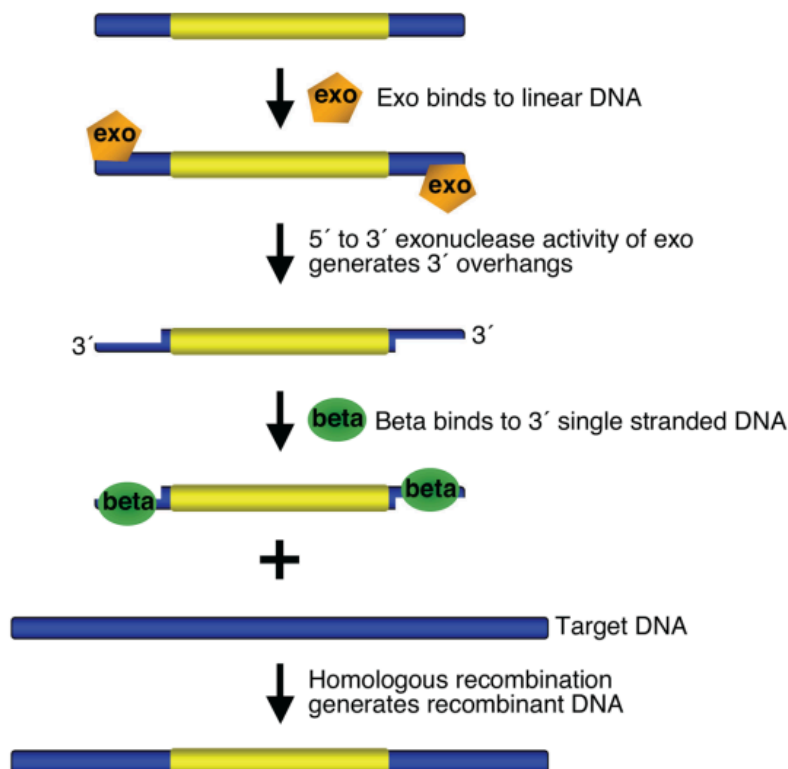
A abordagem SLICE elimina várias limitações associadas aos métodos tradicionais de clonagem, como a necessidade de sítios de restrição compatíveis e a potencial introdução de sequências indesejadas, oferecendo uma flexibilidade sem precedentes para projetos de engenharia genética. Essa técnica não apenas simplifica significativamente o processo de clonagem, como também aumenta a eficiência da montagem de fragmentos de DNA, abrindo novas possibilidades para a construção de vetores complexos de DNA recombinante.

Além de suas aplicações práticas na pesquisa biológica e biotecnológica, o método SLICE serve como uma poderosa ferramenta para a biologia sintética, permitindo a rápida prototipagem e testagem de circuitos genéticos e redes regulatórias. A capacidade de combinar múltiplos fragmentos de DNA de maneira precisa e eficiente é essencial para a exploração de sistemas biológicos complexos e para o desenvolvimento de terapias genéticas inovadoras.

4.3.3 Recombineering cloning

O "Recombineering cloning", ou engenharia homóloga de recombinação, representa uma das mais versáteis e poderosas ferramentas no campo da biologia sintética e engenharia genética (Copeland et al, 2001). Diferente dos métodos de clonagem tradicionais, que dependem do uso de enzimas de restrição e ligases para inserir fragmentos de DNA em vetores plasmídicos, o recombineering permite a modificação direta do DNA genômico ou de plasmídeos por meio da recombinação homóloga. Esta técnica tira proveito de curtas sequências de DNA homólogas às regiões de interesse no genoma para introduzir deleções, inserções ou substituições sem a necessidade de enzimas de restrição (Figura 10). Desenvolvida e refinada ao longo de décadas, a técnica de recombineering foi inicialmente baseada no sistema de recombinação do bacteriófago λ (Lambda Red) em *Escherichia coli*, que mostrou ser capaz de mediar a recombinação de sequências de DNA com uma eficiência notavelmente alta. Desde então, várias adaptações e melhorias foram introduzidas, expandindo as capacidades e a facilidade de uso desta metodologia para uma variedade de sistemas biológicos.

Figura 10: Técnica Recombineering



Fonte: Sharan *et al.* (2009)

A principal vantagem do recombineering sobre métodos de clonagem convencionais reside na sua flexibilidade e precisão. Cientistas podem agora projetar construções genéticas complexas, como cassetes de expressão gênica customizadas, com uma precisão nucleotídica, sem se preocupar com a disponibilidade de sítios de restrição ou com a direcionalidade da inserção. Além disso, essa técnica tem se mostrado inestimável na geração de modelos animais transgênicos, na construção de bibliotecas de mutantes genômicos e na manipulação de grandes segmentos de DNA, como cromossomos artificiais bacterianos (BACs). Outro desenvolvimento importante no recombineering é a aplicação de sistemas CRISPR-Cas para direcionar ainda mais especificamente a recombinação homóloga, aumentando significativamente a eficiência e a especificidade das edições genômicas. A combinação do CRISPR-Cas com técnicas de recombineering tem aberto novas possibilidades para a engenharia genética, desde a correção de mutações genéticas até a introdução de propriedades novas e benéficas em organismos.

Apesar de suas muitas vantagens, o recombineering também apresenta desafios, como a necessidade de sequências homólogas adequadas e a dependência de sistemas de recombinação eficientes. Além disso, a técnica requer uma compreensão detalhada dos mecanismos moleculares subjacentes e dos sistemas de expressão para maximizar sua eficácia. À medida que a biologia sintética e a engenharia genética continuam a evoluir, é provável que o recombineering e suas variantes desempenhem papéis ainda mais centrais, possibilitando a criação de sistemas biológicos com complexidade e funcionalidades sem precedentes. O futuro do recombineering promete não apenas avanços na pesquisa básica, mas também aplicações práticas em biotecnologia, medicina regenerativa e terapia genética, destacando seu papel fundamental na ciência moderna.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da análise e compreensão meticulosa de cada um dos métodos de clonagem abordados neste trabalho, é possível elucidar os avanços metodológicos na área da biologia sintética como a construção de circuitos genéticos complexos utilizando montagem por camadas disponibilizada pelo método Golden Gate, e a padronização e previsibilidade oferecidas pela utilização de BioBricks, além da grande vantagem ofertada pela sua disponibilidade em repositórios coletivos de partes.

Na clonagem, o uso amplamente difundido das enzimas de restrição é fundamental para a edição genômica, sendo base para o surgimento de novas técnicas. O uso das exonucleases é destacado pela implementação do método TEDA, que simplifica os protocolos convencionais em apenas uma etapa *in vivo* e uma enzima, assim possibilitando inúmeras modificações no processo, e também pelo método de Gibson, que permite a construção de moléculas grandes de DNA.

A inserção direcionada de nucleotídeos em produtos de PCR é ressaltada pelo método de clonagem TA, que permite uma maior rapidez, facilidade e alta especificidade na clonagem através da Taq polimerase, e pela técnica Gateway, que emprega o mecanismo sítio-específico do bacteriófago lambda em plasmídeos Gateway, permitindo a transferência de sequências de DNA entre diferentes vetores. O método SLICE inova pela utilização de extratos de células bacterianas para a montagem de múltiplos fragmentos de DNA de forma eficaz, podendo ser utilizado como alternativa a métodos tradicionais de clonagem e também na biologia sintética. A técnica recombineering se mostra muito importante tanto na engenharia genética quanto na biologia sintética, o uso dos mecanismos do bacteriófago Lambda Red de recombinação homóloga concede uma flexibilidade inédita, permitindo uma ampla gama de aplicações.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, John.; DUEBER, John.; LEGUIA, Mariana.; WU, Gabriel.; GOLER, Jonathan.; ARKIN, Adam.; KEASLING, Jay. BglBricks: A flexible standard for biological part assembly. **Journal of biological engineering**, v. 4, n. 1, 2010. DOI: 10.1186/1754-1611-4-1.
- CALEFFE, R. R. T.; DE OLIVEIRA, S. R.; FREITAS, A. C. O.; KIDO, K. K.; GARCIA, A.; PAMPHILE, J. A. Clonagem De Genes: Métodos E Aplicações. **Revista Uningá**, [s. l.], v. 47, n. 1, 2016. DOI: 10.46311/2318-0579.47.eUJ1252.
- CAMERON, D. Ewen; BASHOR, Caleb J.; COLLINS, James J. A brief history of synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 381–390, maio 2014. ISSN 1740-1526, 1740-1534. DOI: 10.1038/nrmicro3239.
- CAMPENHOUT, Claude Van et al. Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. **BioTechniques**, [s. l.], v. 66, ed. 6, p. 295-302, 2019. DOI: 10.2144/btn-2018-0187.
- CASINI, A.; STORCH, M.; BALDWIN, G. S.; & ELLIS, T. Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 568–576, 2015. DOI:10.1038/nrm4014.
- CHEE, Marcus & FOAN, Chin. Gateway Cloning Technology: Advantages and Drawbacks. **Journal of Cloning & Transgenesis**, v. 4, p. 1-3, 2015. DOI: 10.4172/2168-9849.1000138.
- COHEN S. N.; CHANG A. C.; BOYER H. W.; & HELLING R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 70, n. 11, p. 3240-4, 1984. DOI: 10.1073/pnas.70.11.3240. PMID: 4594039; PMCID: PMC427208.
- CONSTANTE, Marco.; GRÜNBERG, Raik.; & ISALAN, Mark. A Biobrick Library for Cloning Custom Eukaryotic Plasmids. **PLoS ONE**, v. 6, e23685, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0023685.
- COPELAND, Neal G.; JENKINS, Nancy A.; COURT, Donald L. Mouse Genomic Technologies: Recombineering: A Powerful New Tool For Mouse Functional Genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 10, p. 769–779, 2001. DOI: 10.1038/35093556.
- ENDY, Drew. Foundations for engineering biology. **Nature**. v. 438, n. 7067, p. 449–453, 2005. DOI:10.1038/nature04342.
- ENGLER, C.; GRUETZNER, R.; KANDZIA, R.; & MARILLONNET, S. Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, e5553, 2009. DOI:10.1371/journal.pone.0005553.
- ENGLER, C.; KANDZIA, R.; & MARILLONNET, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, e3647, 2008. DOI:10.1371/journal.pone.0003647.
- GIBSON, Daniel G.; YOUNG, Lei; CHUANG, Ray-Yuan; VENTER, J. Craig; HUTCHISON, Clyde A.; SMITH, Hamilton O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several

hundred kilobases. **Nature Methods**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 343–345, 2009. ISSN 1548-7105. DOI: 10.1038/nmeth.1318.

GIBSON, Daniel G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. **Methods Enzymol**, v. 498, p. 349-61, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2. PMID: 21601685; PMCID: PMC7149801.

GLICK, Bernard R. et al. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. 4. ed. Washington, DC : ASM Press, c2010. ISBN 978-1-55581-498-4.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Cloning Polymerase Chain Reaction (PCR) Products: TA Cloning. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 6, 2021. DOI: 10.1101/pdb.prot101303. PMID: 34074739.

GUO, Baotai & BI, Yuping. Cloning PCR products. An overview. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 192, p. 111-9, 2002. DOI: 10.1385/1-59259-177-9:111.

HEINEMANN, M.; PANKE, S. Synthetic biology--putting engineering into biology. **Bioinformatics**, v. 22, p. 2790–2799, 2006. DOI:10.1093/bioinformatics/btl469.

KATZEN, Federico. Gateway® recombinational cloning: A biological operating system. **Expert opinion on drug discovery**, v. 2, p. 571-89. 2007. DOI: 10.1517/17460441.2.4.571.

KNIGHT, Thomas. Idempotent Vector Design for Standard Assembly of BioBricks. **MIT Synthetic Biology Working Group**, 2005. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1721.1/21168>.

KUMAR, Krishan.; GAMBHIR, Geetika.; DASS, Abhishek.; TRIPATHI, Amit Kumar.; SINGH, Alla.; JHA, Abhishek Kumar.; YADAVA, Pranjal.; CHOUDHARY, Mukesh.; RAKSHIT, Sujay. Genetically modified crops: current status and future prospects. **Planta**, v. 251, p. 1-27, abr. 2020. DOI: 10.1007/s00425-020-03372-8.

LANIGAN, Thomas M.; KOPERA, Huiru C.; SAUNDERS, Thomas L. Principles of Genetic Engineering. **Genes**, v. 1, p. 291–, 2020. DOI: 10.3390/genes11030291.

LIANG, Xiquan.; PENG, Lansha.; BAEK, Chang-Ho.; KATZEN, Federico. Single step BP/LR combined Gateway reactions. **BioTechniques**, v. 55, p. 265-8, 2013. DOI: 10.2144/000114101.

LINDEN, Rafael. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 31–69, 2010. DOI: 10.1590/S0103-40142010000300004.

MAJZOUB, Joseph A.; MUGLIA, Louis J. Knockout Mice. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 14, p. 904–906, 1996. DOI:10.1056/NEJM199604043341407.

MARILLONNET, Sylvestre.; GRÜTZNER, Ramona. Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 130, mar. 2020. DOI: 10.1002/cpmb.115.

MCLAUGHLIN, James Alastair et al. SynBioHub: A Standards-Enabled Design Repository for Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 682–688, 16 fev. 2018. ISSN 2161-5063, 2161-5063. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00403.

MESELSON, M.; & YUAN, R. DNA Restriction Enzyme from E. coli. **Nature**, v. 217,

(5134), p. 1110–1114, 1968. DOI:10.1038/2171110a0.

MOTOHASHI, K. A novel series of high-efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products. **Scientific Reports**, v. 9, 6417, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-42868-6

NATHANS, Daniel.; SMITH, Hamilton O. Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 44, p. 273-293, 1975. DOI: 10.1146/annurev.bi.44.070175.001421.

NIELSEN, Jens. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. **Bioengineered**, v. 4, 2012. DOI:10.4161/bioe.22856.

REECE, J. B. et al. DNA tools and biotechnology. **Campbell biology**, 10. ed., pp. 408-435. San Francisco, CA: Pearson 2019. ISBN 978-0321775658.

REECE-HOYES, John S.; WALHOUT, Albertha J.M. Gateway Recombinational Cloning. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 1, 2018. DOI:10.1101/pdb.top094912.

ROBERTS, R. J. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102(17), p. 5905–5908, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0500923102.

SHARAN, S.; THOMASON, L.; KUZNETSOV, S. et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. **Nature Protocols**, v. 4, p. 206–223, 2009. DOI: 10.1038/nprot.2008.227.

SHETTY, Reshma.; ENDY, Drew.; KNIGHT, Tom. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. **Journal of biological engineering**, v. 2, p. 5, fev. 2008. DOI: 10.1186/1754-1611-2-5.

SHETTY, Reshma.; LIZARAZO, Meagan.; RETTBERG, Randy.; KNIGHT, Tom. Assembly of BioBrick Standard Biological Parts Using Three Antibiotic Assembly. **Methods in enzymology**, v. 498, p. 311-26, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00013-9.

VICK, Jacob.; JOHNSON, Ethan.; CHOUDHARY, Swati.; BLOCH, Sarah.; LÓPEZ-GALLEGO, Fernando.; SRIVASTAVA, Poonam.; TIKH, Ilya.; WAWRZYN, Grayson.; SCHMIDT-DANNERT, Claudia. Optimized compatible set of BioBrick (TM) vectors for metabolic pathway engineering. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, p. 1275-86, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3633-4.

YAO, S.; HART, D. J.; AN, Y. Recent advances in universal TA cloning methods for use in function studies. **Protein engineering, design & selection : PEDS**, v. 29, p. 551–556, 2016. DOI: 10.1093/protein/gzw047.

YONGZHEN, Xia et al, T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis, **Nucleic Acids Research**, v, 47, n. 3, fev. 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1169.

ZHANG, Y.; WERLING, U.; & EDELMANN, W. Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) Cloning Method. **Methods in Molecular Biology**, v. 1116, p. 235–244, 2013. DOI: 10.1007/978-1-62703-764-8_16.