



UNIVERSIDADE  
E COMUNIDADE  
EM CONEXÃO



**XIII FINOVA**

6 a 10 de novembro

<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2023: FEIRA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UFRGS - FINOVA
<b>Ano</b>	2023
<b>Local</b>	Campus Centro - UFRGS
<b>Título</b>	Criação de uma plataforma molecular para a clonagem de genes de interesse em leveduras usando a sequência 35S e CRISPR-Cas9
<b>Autor</b>	ANA PAULA DA SILVA WIVES
<b>Orientador</b>	DIEGO BONATTO

**TÍTULO DO PROJETO:** Criação de uma plataforma molecular para a clonagem de genes de interesse em leveduras usando a sequência 35S e CRISPR-Cas9

**Aluno:** Ana Paula da Silva Wives

**Orientador:** Diego Bonatto

### RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS PELO BOLSISTA

Uma das leveduras mais utilizadas em aplicações biotecnológicas é a *Saccharomyces cerevisiae*. Ela está presente na fermentação de alimentos, assim como na síntese de produtos químicos ou farmacêuticos, bem como na expressão de genes heterólogos. Uma forma de aumentar a eficiência de expressão de genes heterólogos em leveduras industriais é utilizar a sequência codificante para o rRNA 35S, presente em centenas de cópias no genoma de *S. cerevisiae*. Dessa forma, esse projeto visa gerar ferramentas moleculares capazes de promover a expressão de genes heterólogos em leveduras industriais usando a sequência 35S modificada por meio da técnica CRISPR-Cas9 para múltiplas inserções do gene de interesse. Para tanto será feito o uso de vetores bi-funcionais de leveduras e *E. coli* denominados de pLEV7 e pLEV8. Esses vetores possuem uma marca de seleção de transformantes para leveduras (genes *KanMX* e *KILEU2*, respectivamente) e um dispositivo para expressão de sequências codificantes sob controle de um promotor forte constitutivo e um terminador (dispositivo MCS). Estes dispositivos serão amplificados por PCR de alta fidelidade para a inserção de regiões de homologia à sequência 35S de leveduras. Paralelamente, foi feita a clonagem do RNA guia (gRNA) para a sequência 35S no vetor episomal pCas9U2micra, que codifica para a enzima Cas9 e que possibilitará gerar pontos de quebra onde o dispositivo MCS será inserido. Por fim, espera-se conseguir inserir o dispositivo MCS em múltiplas cópias na sequência 35S de *S. cerevisiae* para aumentar a eficiência de produção das proteínas de interesse.