

XU Congresso
Fluminense
de Iniciação
Científica e Tecnológica

28^o

Encontro de
Iniciação
Científica
da UENF

20^o

Circuito de
Iniciação
Científica do
IFFluminense

16^a

Jornada de
Iniciação
Científica
da UFF



U III Congresso
Fluminense de
Pós-Graduação

23^a

Mostra de
Pós-Graduação
da UENF

8^a

Mostra de
Pós-Graduação
do IFFluminense

8^a

Mostra de
Pós-Graduação
da UFF

Transfecção celular da construção pCAG-GFP-ROSA26 via CRISPR-Cas9 em células epiteliais da glândula mamária bovina

Letícia dos Santos Nascimento, Paula Magnelli Mangiavacchi, Paulo Vitor Maravilha Braga, Ana Eliza Zeraik, Jéssica Macedo Rafael de Arruda, Mariana da Silva Mendonça, Carla Sobrinho Paes de Carvalho, Maria Clara Caldas Bussiere, Angelo José Burla Dias, Álvaro Fabricio Lopes Rios

A utilização de linhagens celulares como biorreatores pode ser usada como importante fonte para produção de biofármacos. Por sua vez, o cultivo de linhagens celulares transgênicas permite o uso das mesmas como doadoras de núcleo para protocolos de transferência nuclear para a produção de animais geneticamente modificados. A produção de proteínas recombinantes pelo cultivo de células epiteliais da glândula mamária bovina (bMECs) tem importantes vantagens devido a sua produção em larga escala, além de possuir a maquinaria de modificações pós-traducionais necessárias para algumas proteínas, o que pode ser utilizado como modelo para a produção de proteínas recombinantes a partir da glândula mamária de animais transgênicos. O atual projeto visa inserir a construção pCAG-GFP-ROSA26, via sistema de edição gênica CRISPR-Cas, em bMECs cultivadas, como forma de avaliar a taxa de incorporação do transgene, além de utilizá-lo como modelo de estudo para incorporação e expressão gênica. Ademais, as bMECs transfectadas poderão ser utilizadas como doadoras de núcleo para produção de embriões transgênicos. A construção do plasmídeo pCAG-GFP-ROSA26 será realizado através da amplificação dos fragmentos pCAG-GFP (*green fluorescent protein*) e das sequências do 3'ARM e 5'ARM do gene ROSA26 bovino, e a posterior fusão dos fragmentos purificados. Posteriormente, o plasmídeo construído será inserido em bMECs cultivadas, via sistema CRISPR-Cas, por meio dos protocolos de lipofecção e eletroporação. As bMECs transfectadas terão sua viabilidade celular avaliadas antes e após a transfecção celular, pela marcação com Hoechst e iodeto de propídeo. A incorporação da construção pCAG-GFP-ROSA26 nas células após a transfecção será identificada por genotipagem utilizando o protocolo de PCR e a quantificação dos transcritos GFP por Real Time - qPCR. No momento, o projeto encontra-se na fase de purificação dos fragmentos e a posterior fusão para a construção plasmidial pCAG-GFP-ROSA26. Espera-se com este projeto estabelecer a técnica de cultivo de bMECs que resulte no estabelecimento de linhagens celulares doadoras de núcleo, e padronizar o protocolo de transfecção celular da maquinaria de CRISPR-Cas contendo a construção de pCAG-GFP-ROSA26. Adicionalmente, é previsto que seja possível identificar a incorporação do gene GFP nas bMECs transfectadas.

*Instituição do Programa de IC, IT ou PG: UENF
Eixo temático: Biotecnologia Animal/Biociências
Fomento da bolsa (quando aplicável): CNPq*

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:



XU Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica

28º

Encontro de Iniciação Científica da UENF

20º

Circuito de Iniciação Científica do IFFluminense

16ª

Jornada de Iniciação Científica da UFF



U III Congresso Fluminense de Pós-Graduação

23ª

Mostra de Pós-Graduação da UENF

8ª

Mostra de Pós-Graduação do IFFluminense

8ª

Mostra de Pós-Graduação da UFF

Cellular transfection of pCAG-GFP-ROSA26 construct via CRISPR-Cas9 in bovine mammary epithelial cells

Letícia dos Santos Nascimento, Paula Magnelli Mangiavacchi, Paulo Vitor Maravilha Braga, Ana Eliza Zeraik, Jéssica Macedo Rafael de Arruda, Mariana da Silva Mendonça, Carla Sobrinho Paes de Carvalho, Maria Clara Caldas Bussiere, Angelo José Burla Dias, Álvaro Fabricio Lopes Rios

The use of cell lines as bioreactors can be employed as an important source for the production of biopharmaceuticals. Furthermore, the cultivation of transgenic cell lines allows for their use as nucleus donors in nuclear transfer protocols for the production of genetically modified animals. The production of recombinant proteins through the cultivation of bovine mammary epithelial cells (bMECs) offers significant advantages due to their large-scale production capabilities, as well as possessing the necessary machinery for post-translational modifications of certain proteins. This can serve as a model for the production of recombinant proteins from the mammary gland of transgenic animals. The current project aims to introduce the pCAG-GFP-ROSA26 construct into cultured bMECs using the CRISPR-Cas gene editing system to evaluate the transgene incorporation rate and utilize it as a study model for gene incorporation and expression. Additionally, the transfected bMECs can be used as nucleus donors for the production of transgenic embryos. The construction of the pCAG-GFP-ROSA26 plasmid will be carried out by amplifying the pCAG-GFP (green fluorescent protein) fragments and the 3' ARM and 5' ARM sequences of the bovine ROSA26 gene, followed by the fusion of the purified fragments. Subsequently, the constructed plasmid will be inserted into cultured bMECs using the CRISPR-Cas system through lipofection and electroporation protocols. The viability of transfected bMECs will be evaluated before and after cell transfection using Hoechst and propidium iodide staining. The incorporation of the pCAG-GFP-ROSA26 construct into the cells after transfection will be identified through genotyping using PCR protocols, and the quantification of GFP transcripts will be performed using Real-Time qPCR. Currently, the project is in the phase of fragment purification and subsequent fusion for the construction of the pCAG-GFP-ROSA26 plasmid. The aim of this project is to establish a bMEC cultivation technique that results in the establishment of nucleus donor cell lines and standardize the cell transfection protocol of the CRISPR-Cas machinery containing the pCAG-GFP-ROSA26 construct. Additionally, it is expected to identify the incorporation of the GFP gene in the transfected bMECs.

Research Program of IC, IT or PG: UENF

Thematic axis: Animal Biotechnology/ Biosciences

Scholarship funding (when applicable): CNPq

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:

