

Trabalho laboratorial de clonagem e transformação

A clonagem de um gene num plasmídeo é uma técnica fundamental em biologia molecular que permite a inserção de uma sequência genética específica num vetor de DNA, geralmente um plasmídeo, com o objetivo de a replicar ou expressar numa célula hospedeira, como *Escherichia coli*. Este processo é essencial para a produção de proteínas recombinantes, estudo da função génica, desenvolvimento de terapias genéticas e engenharia de microrganismos.

Após as etapas iniciais de clonagem — que incluem a amplificação do gene de interesse, digestão com enzimas de restrição¹, purificação do fragmento génico e preparação do plasmídeo por isolamento a partir de células de *E. coli*, digestão² e purificação — realiza-se a ligação do gene ao plasmídeo utilizando uma DNA ligase. O produto desta reação constitui o DNA recombinante que será utilizado na etapa seguinte.

Nos anos letivos anteriores, os estudantes da licenciatura em Biotecnologia desenvolveram estas etapas iniciais com o objetivo de clonar o gene que codifica a celulase de *Bacillus cereus* ATCC 11778 para expressão em *E. coli*. No último ano, foi obtido com sucesso um plasmídeo contendo uma versão truncada do gene, sem o sinal peptídico de secreção da proteína no N-terminal, e com fusão o N-terminal à proteína fluorescente verde (GFP) e uma cauda His-tag, utilizando o método de clonagem de Gibson com recurso ao kit da NZYTech [1-3].

Dando continuidade ao trabalho desenvolvido e com vista à expressão da proteína, segue-se agora uma fase crítica: a **transformação de células de expressão *E. coli* BL21(DE3)** com o plasmídeo recombinante, sendo necessário, para tal, **torná-las competentes** [4,5]. Esta etapa é seguida pela **seleção das colónias transformadas**. Este protocolo concentra-se especificamente nesta fase final, detalhando os procedimentos para introduzir o DNA nas células bacterianas pela técnica de choque térmico, e selecionar colónias que contenham o plasmídeo desejado.

¹ Na clonagem clássica.

² Na clonagem clássica

Aula 1

I. Reagentes, materiais e equipamentos

A. Células e plasmídeos

- *E. coli* BL21(DE3) (cultura o/n em meio LB)
- pHTP9 + Mini-Celulase *B. cereus*³

B. Meios de cultura e soluções

- Meio LB
- Meio SOC
- placas de LB-agar 1,5% (m/v) contendo 50 µg/mL de canamicina
- solução estéril de CaCl₂ 100 mM gelada
- solução estéril de CaCl₂ 100 mM e glicerol 10% (v/v) gelada
- solução stock de canamicina a 50 ou 100 mg/mL

C. Equipamentos

- Banho de água a 42°C
- Incubadora com agitação orbital
- Câmara de fluxo laminar
- Máquina de gelo picado
- Bico de bunsen

II. Procedimento laboratorial

A. Organização do trabalho das turmas:

Os procedimentos não vão ser sequenciais. Serão feitos em simultâneo, intercalando os períodos de espera.

Turma 1 – inocula a cultura. Prepara células competentes de culturas em fase estacionária. Testa células competentes antigas que “foram aquecidas”...

Turma 2 – prepara as células competentes. Testa a competência das células competentes da turma da manhã.

Turma 3 – Transforma nas células competentes preparadas pela turma 2 e compara com as suas.

³ Plasmídeo recombinante, preparado pela turma de LabVB 2024/2025, em que o *insert* clonado é uma versão truncada, sem a região do sinal peptídico, do gene que codifica a enzima celulase da bactéria *Bacillus cereus* ATCC 11778. Na clonagem foi feita a inserção da GFP seguida de uma His-Tag no N-terminal da proteína.

B. Preparação de Células Competentes de *E. coli*

1. Inocular 20 mL de meio LB num Erlenmeyer de 100 mL com *E. coli* e incubar durante a noite a 37 °C com agitação.
2. Inocular 1% da cultura da noite anterior num Erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL de meio LB.
 - o **Turma de quarta de manhã:** refrescar a cultura inoculando 5 mL em 15 mL de meio LB pré-aquecido, num Erlenmeyer de 100 mL.
3. Agitar as culturas a 37 °C até que a densidade celular atinja a fase de crescimento logarítmico médio ($OD_{600} \sim 0,5$). Isso deve levar de 2 a 4 horas.
 - o **Turma de quarta de manhã:** incuba 30 – 45 min as culturas “refrescadas”.
4. Arrefecer a cultura no gelo por 10 minutos. Na câmara de fluxo laminar, transferir 1,5 mL de cultura para microtubos de 1,5 mL.
5. Centrifugar os tubos com a suspensão celular a 5.000 rpm por 3 minutos a 4 °C (12.000 rpm por 30s a T ambiente).
6. Descartar o sobrenadante.
7. Ressuspender as células em metade do volume original (750 µL) com solução estéril de $CaCl_2$ 100 mM gelada.
8. Colocar a suspensão celular em gelo por 30 minutos.
9. Centrifugar novamente a 5.000 rpm por 3 minutos a 4 °C.
10. Descartar o sobrenadante.
11. Ressuspender suavemente as células em 50 µL da solução de $CaCl_2$ (com 10% glicerol) estéril e gelado.
 - o As células permanecerão competentes até 24 horas a 4 °C, mas a eficiência de transformação aumenta de 4 a 6 vezes durante esse período. Recomenda-se pelo menos uma incubação de 1 hora em gelo antes de iniciar a transformação.
 - o Para armazenamento prolongado, a solução final deve conter 10% glicerol, e deve armazenar a -70 °C. As células de *E. coli* permanecerão competentes até 6 meses ou mais. Evite descongelar e recongelar.
 - o Pode realizar um teste de competência (nº de transformantes para 10 ng de plasmídeo) e comparar o número mais recente de transformantes com o número obtido na preparação inicial.

C. Transformação

1. Adicione 1-5 µL do plasmídeo (~ 10 - 50 ng) diretamente em 50 µL de células competentes BL21(DE3) ou outros lisogénios de *E. coli* λDE3.
2. Coloque a mistura no gelo por 30 minutos.
3. Faça o choque térmico das células a 42 °C por 40 segundos.
4. Coloque o tubo novamente no gelo por 2 minutos.
5. Adicione 900 µL de meio SOC pré-aquecido e incubar a 200 rpm a 37 °C por 1 hora.
6. Centrifugue a 5000 rpm por 1 minuto. Remova 900 µL do sobrenadante.
7. Ressuspenda as células com pipetagem suave.
8. Plaqueie 25 e 75 µL das células em 2 placas de LB-agar contendo 50 µg/mL de canamicina.
9. Incube as placas invertidas durante a noite a 37 °C.

III. Bibliografia

- (1) NZYTech. (2024). *Instructions for use – NZYEeasy Cloning & Expression kits (MB282, MB319–MB330), Version V2401*. NZYTech. Disponível em https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/mb282_mb319_mb330_ifu_en_v2401.pdf
- (2) NZYTech. (2024). *User Guide – NZYEeasy Cloning & Expression System, Version V2501*. NZYTech. Disponível em https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/nzyeasy_cloning_expression_system_userguide_v2501.pdf
- (3) NZYTech. (2024). *pHTP9 Vector – Product Brochure, Version V1901*. NZYTech. Disponível em https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/phtp9_vector_pb_v1901.pdf
- (4) Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). "Chapter 1: Plasmids and Their Usefulness - Protocol 25: Preparation and Transformation of Competent *E. coli* using Calcium Chloride" In *Molecular cloning: A laboratory manual* (3.^a ed., Vol. 1), p. 1.111. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (5) Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). "Chapter 1: Plasmids and Their Usefulness - Protocol 23: The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*" In *Molecular cloning: A laboratory manual* (3.^a ed., Vol. 1), p. 1.105. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Trabalho laboratorial de clonagem e transformação

Aula 2

I. Contexto do processo de clonagem do gene da celulase nos vetores pHTP1 e pHTP9

No ano letivo passado, foi conseguida a clonagem de duas versões truncadas do gene que codifica a celulase de *Bacillus cereus* ATCC 11778 para expressão em *E. coli*. Foram clonadas duas construções, sem o sinal peptídico, uma contendo o codão STOP (insert II) e a outra sem o codão STOP (insert III), permitindo sempre a fusão das tags do N-terminal constantes nos dois vetores da NZYTech, o pHTP1 (só His-tag) e o pHTP9 (His-tag+GFP), e no segundo caso, a inserção de uma His-tag no C-terminal.

O método de clonagem foi o método de Gibson, recorrendo-se aos kits NZYEeasy Cloning & Expression que, conforme descrito pela empresa NZYTech, foram concebidos para facilitar a clonagem direcional de qualquer fragmento gerado por PCR ou gene sintético num vetor de expressão pHTP *Escherichia coli* linearizado.

Em termos práticos, a clonagem é realizada numa única reação independente de ligase, mediada pela mix enzimática NZYEeasy. As extremidades complementares ao vetor, contendo uma sequência específica reconhecida pela enzima NZYEeasy, são incorporadas no produto de PCR quando se usam *primers* que contém as extensões apropriadas na extremidade 5'. Assim, ao combinar o *insert* gerado com o vetor pHTP linearizado, que também contém extremidades complementares, na presença do mix enzimático NZYEeasy, as duas moléculas de DNA unem-se por complementaridade de pares de bases nas regiões de cadeia simples.

A reação de ligação ocorre num único tubo em três etapas a temperatura distintas. No final, o plasmídeo recombinante contendo o fragmento de interesse é obtido por transformação da reação da ligação em células competentes *E. coli*, à qual se deve seguir a seleção e identificação de clones positivos.

Este método tem como vantagem o *inser* não necessitar de qualquer tratamento preliminar (por exemplo, digestão com enzimas de restrição, fosforilação ou conversão das extremidades a Blunt).

Após a construção e confirmação da sequência do plasmídeo recombinante pHTP, este deve ser usado para transformar estirpes de *E. coli* com o elemento λDE3, como as BL21(DE3), para níveis elevados de expressão proteica. Esse foi o objetivo do trabalho realizado na aula 1.

II. Reagentes, materiais e equipamentos

A. Células, plasmídeos e outros materiais biológico

- *E. coli* NZYStar competentes
- DNA genómico *B. cereus* - 2020/2021 - BIOT21 G4
- NzyTaq II - Green Mastermix (2x)
- Kit de clonagem NZYEeasy Cloning & Expression do pHTP9 (ref. MB324, GFP + His-tag)
- Kit de clonagem NZYEeasy Cloning & Expression do pHTP1 (ref. MB282, só His-tag)

Componentes de um kit

<i>NZYEasy enzyme mix</i>	1 tubo (6 µL)
<i>10x Reaction Buffer</i>	1 tubo (100 µL)
<i>Vetor de expressão pHTP (*)</i>	1 tubo (10 µL)

(*) Tipo de vetor depende do kit. Será o pHTP1 ou o pHTP9.

- Primers Fw e Rev para amplificar o gene da celulase

Nome	Sequência (5'→3')	tamanho	%GC	Tm (°C)	stock (100 µM)
FwCelBac3_completa	TCAGCAAGGGCTGAGGATGAA TGGAAAAAGAAA	33 bp	42,4%	70,1	24,5 ng em 245 µL
FwCelBac4_semSinalPep	TCAGCAAGGGCTGAGGAGTGT AACGGACAATTCA	34 bp	50%	72,3	24,8 ng em 248 µL
RevCelBac3_comSTOP	TCAGCGGAAGCTGAGGTTAAT TATCGTATCCTTCAT	36 bp	41,7%	68,3	15 ng em 150 µL
RevCelBac4_semSTOP	TCAGCGGAAGCTGAGGATTAT CGTATCCTTCATAAA	36 bp	41,7%	69,1	27,5 ng em 275 µL

B. Meios de cultura, soluções e kits

- Meio SOC completo
- placas de LB-agar 1,5% (m/v) contendo 50 µg/mL de canamicina
- kit NZYGelpure (procedimento para purificação de reação de PCR)

C. Equipamentos

- Banho de água a 42°C
- Incubadora com agitação orbital
- Câmara de fluxo laminar
- Máquina de gelo picado
- Bico de bunsen
- Termociclador (aparelho de PCR)
- Centrífuga de microtubos
- Centrífuga de placas de PCR

III. Procedimento Experimental

A. Organização do trabalho das turmas:

Os procedimentos não vão ser todos realizados, mas podem mimetizar para fins da construção do vídeo. Iremos tentar clonar o insert I (gene completo)

Turma 1 – Prepara um PCR e analisa ou deixe o gel a correr.

Turma 2 – Limpa o(s) produtos e prepara a reação da clonagem.

Turma 3 – Transforma nas células competentes e cria um procedimento para os estudantes do CTESP analisarem as colónias.

Todas mimetizam a preparação da reação de ligação e o início da incubação.

É necessário alguns cálculos prévios e procurar na bibliografia o procedimento de limpeza com o kit NZYTech, trazendo-o preparado no caderno e em cadernos antigos, as instruções de quantificar DNA.

B. Preparação do insert de DNA

1. Design dos primers

Além da sequência específica do gene, inclua as seguintes extremidades de 16 bp na extremidade 5' dos primers Fw e Rev para criar as terminações complementares ao vetor:

Cauda no primer Forward: 5' - T CAG CAA GGG CTG AGG ProteaseSite...-3'

Cauda no primer Reverse: 5' - T CAG CGG AAG CTG AGG stop...-3'

Notas:

- Se desejar remover a tag do N-terminal, pode incluir um local específico de protease (por ex., para a protease *Tobacco Etch Virus* a sequência reconhecida de clivagem é ENLYFQ↓G/S).
- Se não quiser a His-tag no C-terminal, inclua um codão de STOP (TTA, TCA ou CTA).

Confirme que os primers que vai usar foram bem desenhados e se permitem ou não a inserção da His-tag no C-terminal.

2. Amplificação por PCR

1. Nas instruções do kit, é sugerido que se utilize uma DNA polimerase de alta fidelidade para reduzir erros. Confirme que a enzima é adequada.
2. O produto de PCR do insert I (que vamos tentar clonar) tem 1359bp.

3. Preparar as misturas reacionais, em gelo de acordo, em tubos de PCR com os componentes indicados na seguinte tabela (volumes para 1 reação).

Componente	Ci	Cf	Volume (para 1X)	.
Primer Fw: FwCelBac3_completa	10uM	0.25 µM ⁴	1,25 µL	
Primer Rev: RevCelBac4_semSTOP	10uM	0.5 M ⁵	2,5 µL	
Template DNA	25ng/ul	5 pg-0.5 µg	4 µL	
NZYTaq II 2x Green Master Mix			25 µL	
Nuclease-free water	perfazer para 50 µL		17,25 µL	

4. Faça um spin-down aos tubos (numa centrífuga para tubos/placas de PCR ou com adaptadores, se for para microtubos normais).
 5. Coloque os tubos no termociclador, onde já programou o seguinte programa

Etapa	Temp. (°C)	tempo	Ciclos
<i>Desnaturação inicial</i>	95	3 min	1
	94	30s	
<i>PCR</i>	58 ^{*6}	30s	35
	75	45s**	
<i>Extensão final</i>	72	5 min	1

3. Análise da reação por eletroforese em gel

1. Prepare um gel 1% em TAE (1x) e aplique 5 µL de cada reação. Aplique também um marcador de pesos moleculares.
2. Corra o gel cerca de 1h a 80V e analise no transiluminador.

4. Purificação do produto PCR com kit NZYGelpure e quantificação

1. Siga as [instruções do kit](#), e junte pelo menos 2 reações por coluna.
 - Faça a eluição final em 50 µL de tampão de eluição pré-aquecido a 55-65°C, e faça uma segunda eluição re-utilizando o eluído.
2. Use o espetrofotómetro com a placa µdrop e determine a concentração e pureza do *insert*.

⁴ Recomendado 0,1 a 0,5 µM

⁵ Deveria ser equimolar ao outro primer.

⁶ Temperatura na qual houve produtos inespecíficos ou que houve má amplificação – testar gradiente.

C. Reação de clonagem (independente da DNA ligase)

1. Misture suavemente (não use vortex) todos os componentes e faça um spin down.
2. Prepare a seguinte mistura em gelo, pipetando com cuidado para um tubo de PCR, estéril e livre de nucleases :

Componente	Volume por reação
Fragmento de DNA purificado	μL ⁷
Vetor pHTP (1 ou 9)⁸	1 μL
Tampão 10x	1 μL
Mix enzimático NZYEasy	0,5 μL
Água livre de nucleases	até 10 μL

3. Misture por pipetagem e dê um spin-down.
4. Coloque o tubo no o termociclador e corra o seguinte programa:

Etapa	Temperatura	Tempo
I	37 °C	60 min
II	80 °C	10 min
III	30 °C	10 min
(manter frio depois de acabar)	4 °C	∞

5. Armazene a -20 °C ou prossiga para transformação.

D. Transformação

- Adicionar 10 μL do produto a 100 μL de células NZYStar competentes.
- Choque térmico: 42 °C – 40 s.
- Recuperação em SOC – 37 °C – 1 h.
- Plaqueamento em LB + canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 2 placas – 10 μL e 90 μL

E. Confirmação dos clones positivos.

- PCR de colónia ou isolamento do plasmídeo e análise de restrição.

Defina uma estratégia e preveja os resultados, com base nos mapas de restrição das previsões de clonagem, apresentados de seguida.

⁷ Determine o volume a adicionar com base, na concentração a que está, no tamanho do insert (1359 bp), e aplicando a fórmula (nanogramas de insert a adicionar) = (tamanho do fragmento de DNA (bp)) $\times 0.083$. A título de exemplo, para 1000 bp é necessário 83 ng, mas se tiver 2000bp serão 166 ng.

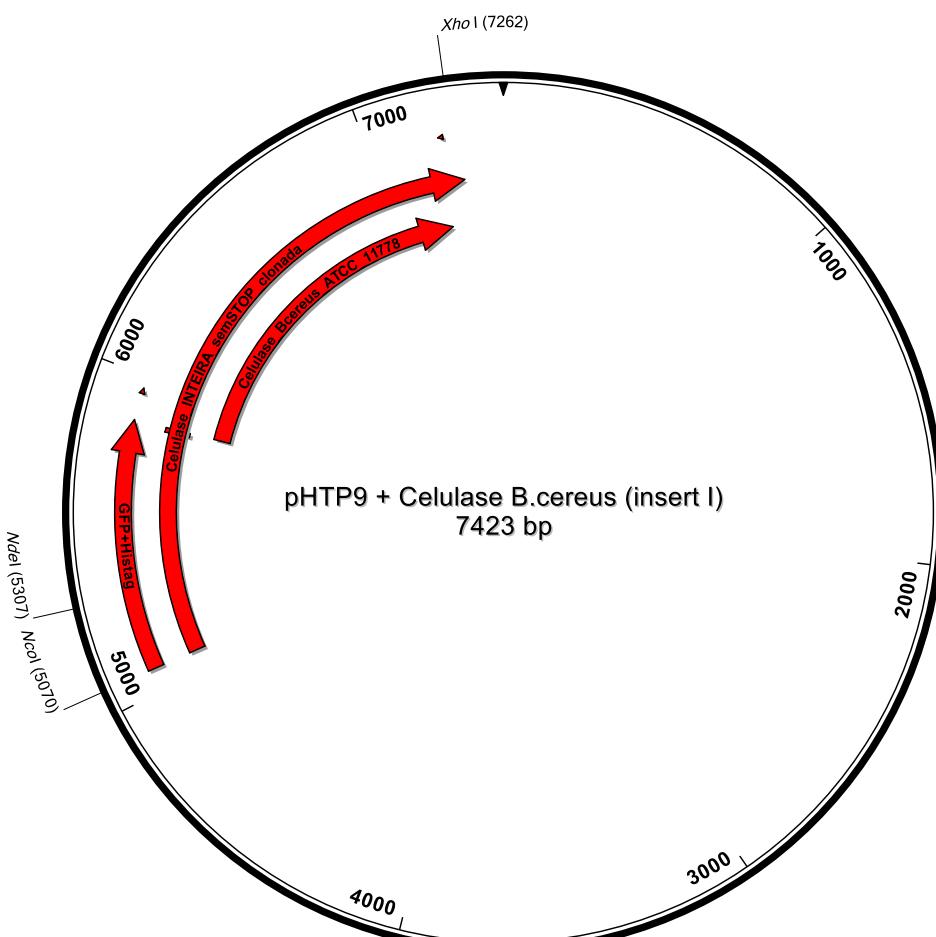
⁸ Vetores pHTP estão prontos para uso

IV. Bibliografia

- (1) NZYTech. (2024). *Instructions for use – NZYEeasy Cloning & Expression kits (MB282, MB319–MB330), Version V2401.* NZYTech. Disponível em https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/mb282_mb319-mb330_ifu_en_v2401.pdf
- (2) NZYTech. (2024). *User Guide – NZYEeasy Cloning & Expression System, Version V2501.* NZYTech. Disponível em https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/nzyeasy_cloning_expression_system_userguide_v2501.pdf
- (3) NZYTech Lda. (2024). *Instructions for use: NZYGelpure kit (MB011_IFU_EN_V2402).* Lisbon, Portugal: NZYTech Lda. Disponível em: https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/mb011_ifu_en_v2402.pdf

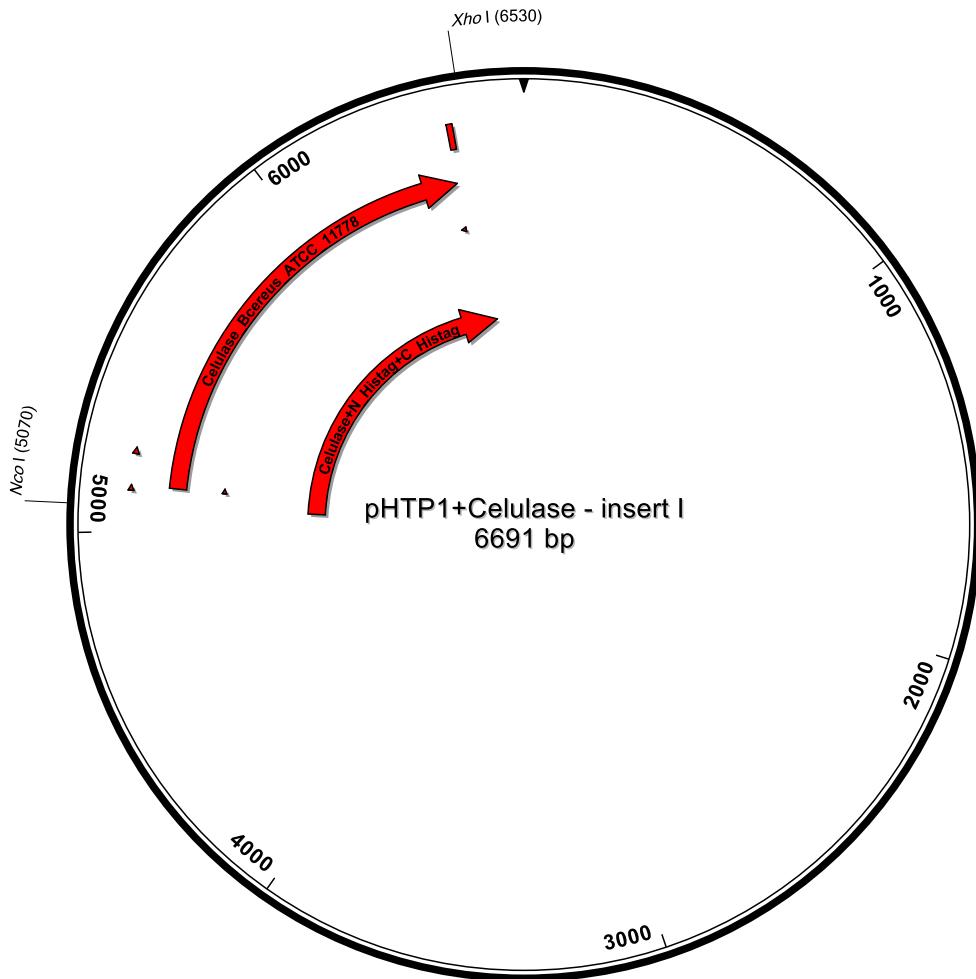
V. Previsões da clonagem – Mapas de restrição

1. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP9 + celulase de *B. cereus* (insert I – celulase completa, sem STOP)



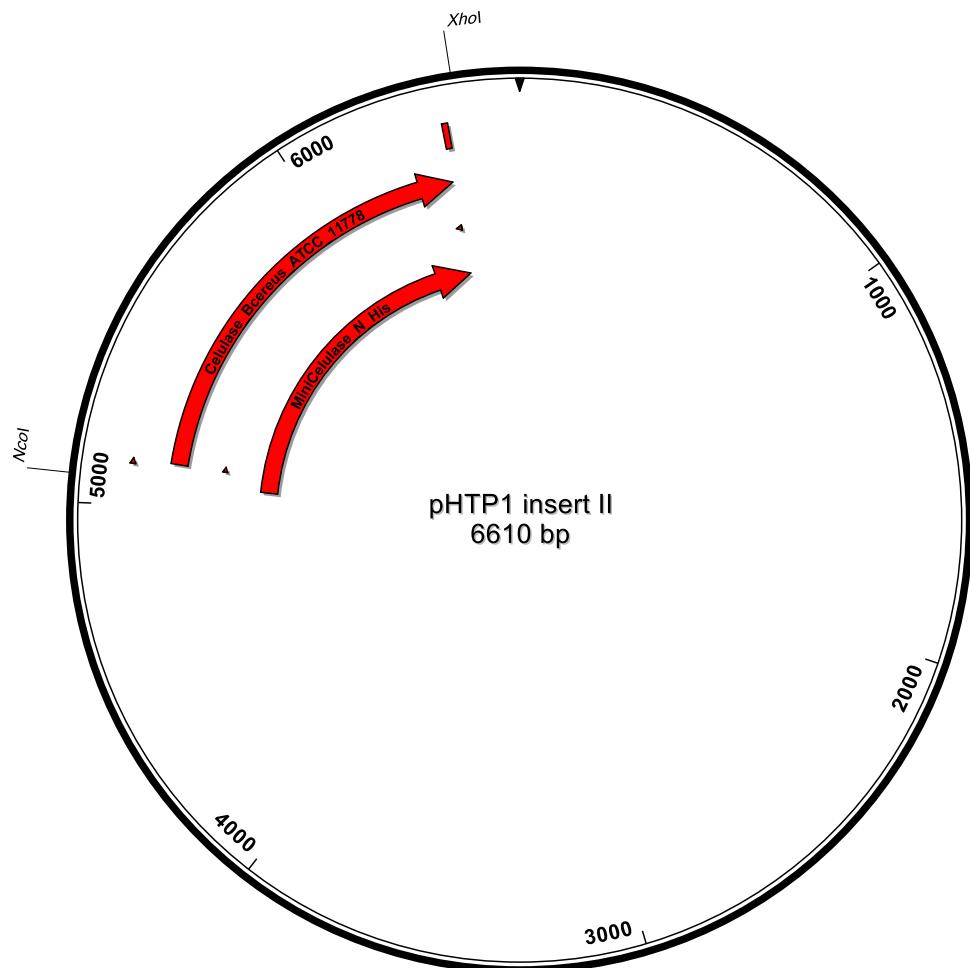
Insert I – 1359bp

2. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP1 + celulase de *B. cereus*
(insert I – celulase completa, sem STOP)



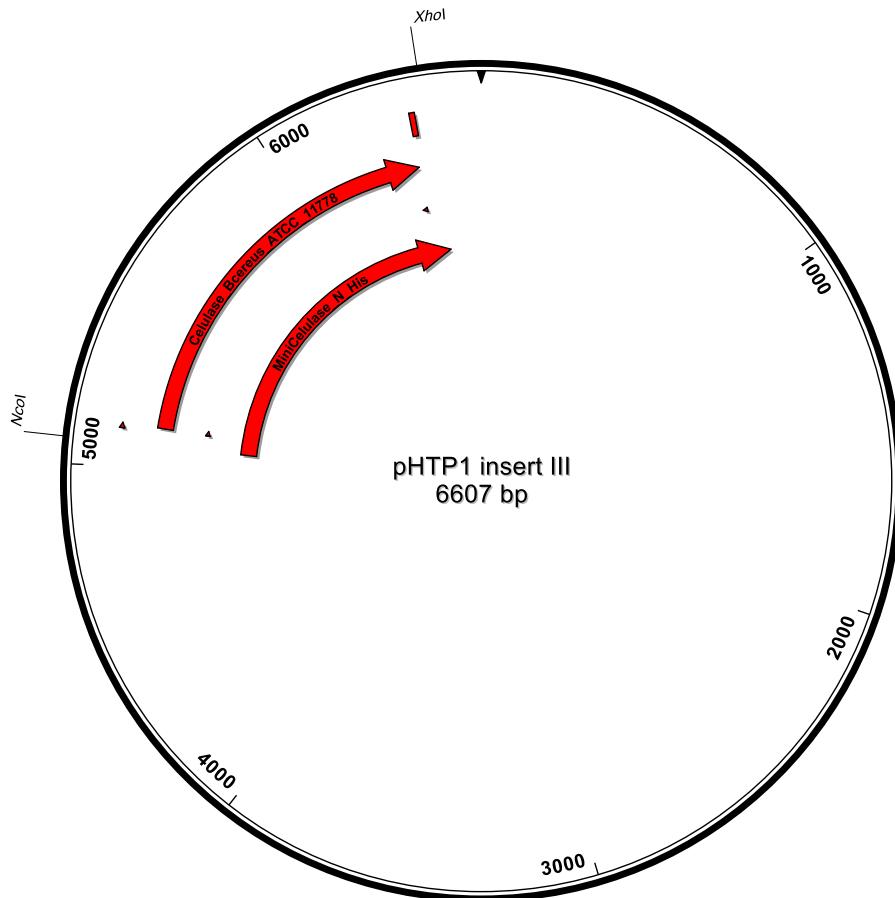
Insert I – 1359bp

3. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP1 + celulase de *B. cereus*
(insert II – celulase sem sinal peptídico, com STOP)



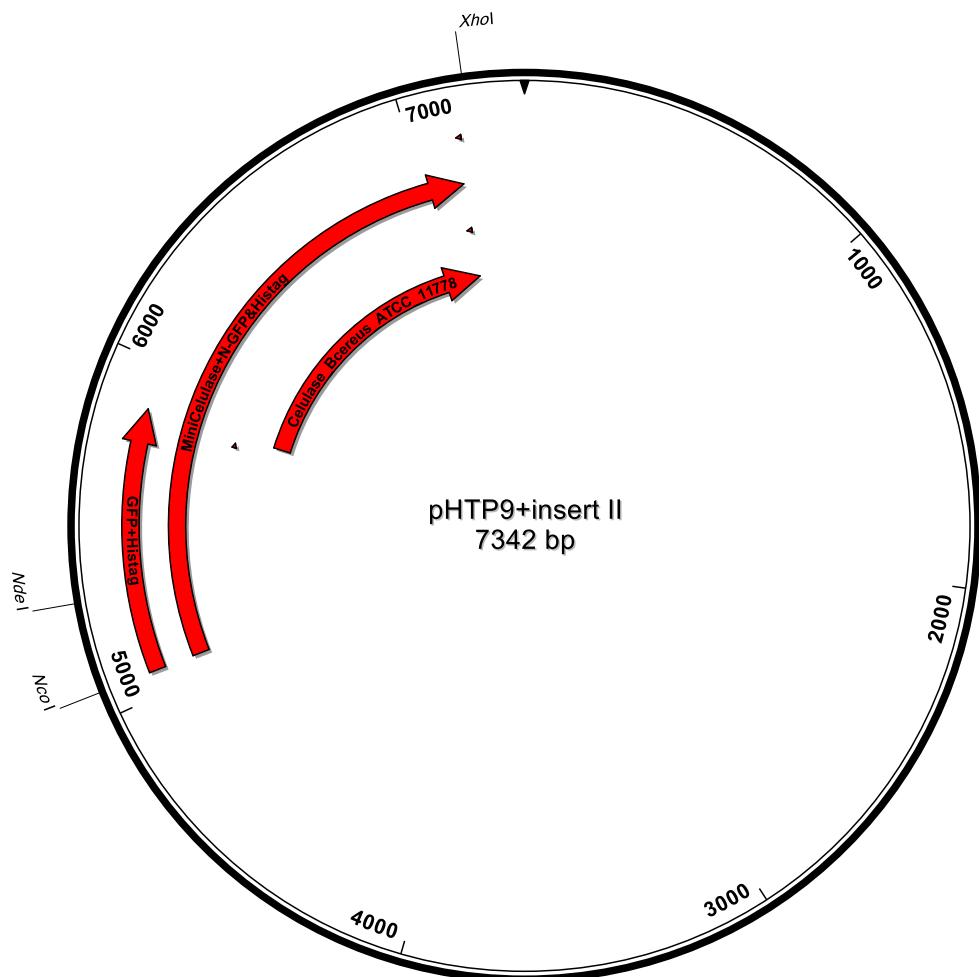
Insert II – 1278bp

4. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP1 + celulase de *B. cereus*
(insert III – celulase sem sinal peptídico, sem STOP)



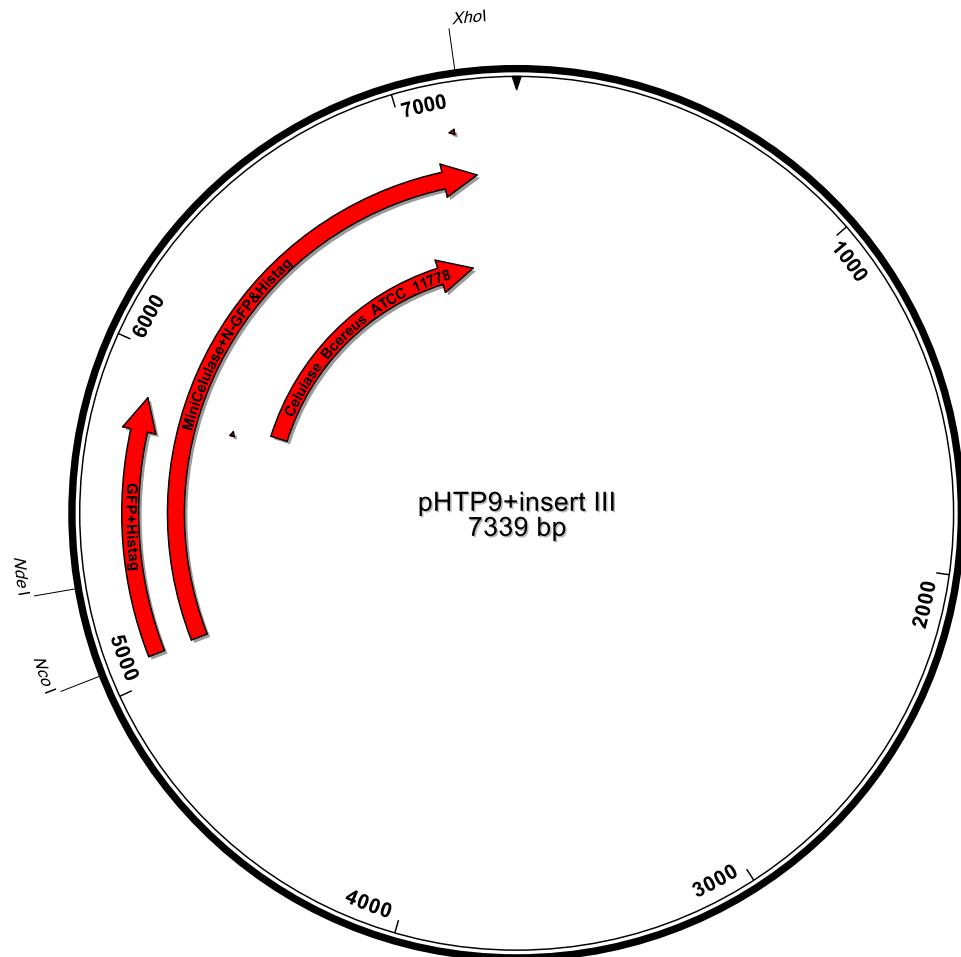
Insert III – 1275bp

5. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP9 + celulase de *B. cereus*
(insert II – celulase sem sinal peptídico, com STOP)



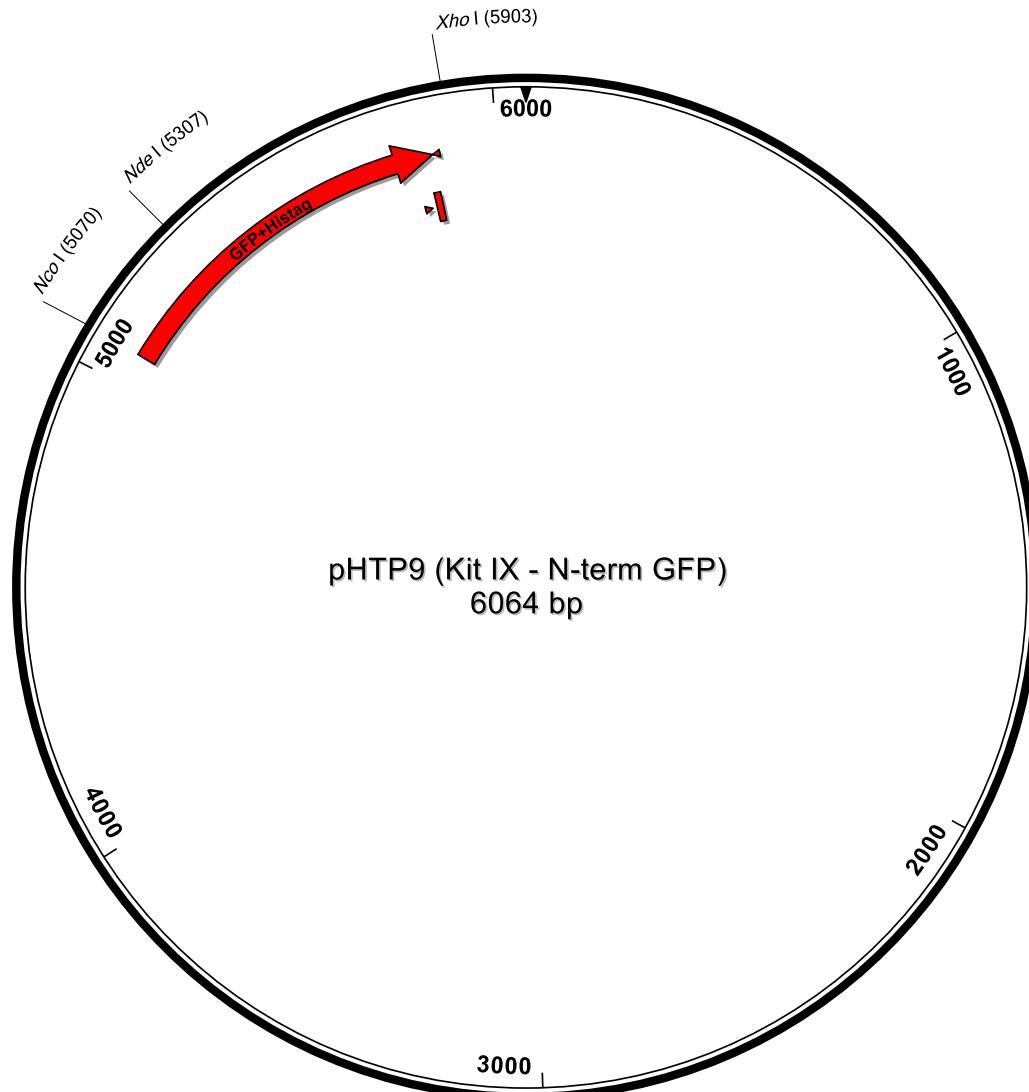
Insert II – 1278bp

6. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP9 + celulase de *B. cereus*
(insert III – celulase sem sinal peptídico, sem STOP)



Insert III – 1275bp

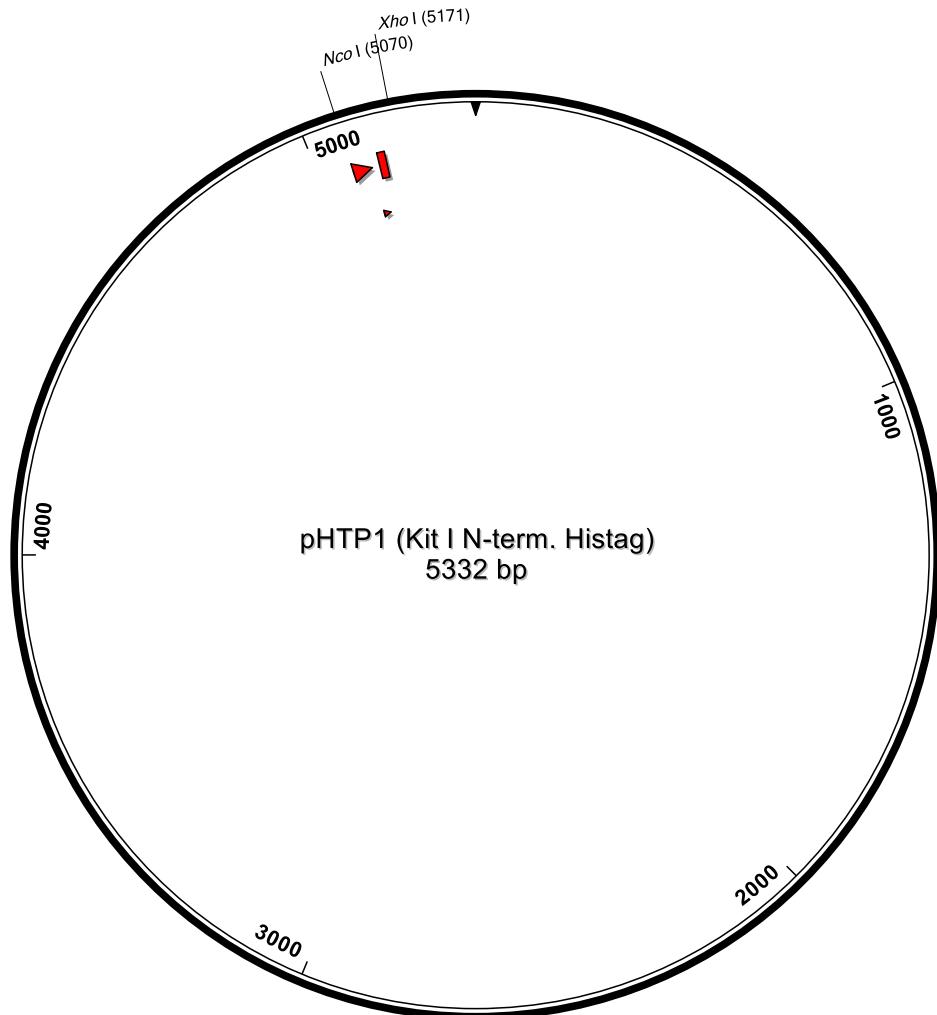
7. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP9



Tag N-terminal GFP+6xHis : 5071..5859 (789bp)

Inserção do insert: 5859 (...) 5860

8. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP1



Tag N-terminal 6xHis : 5071..5127 (57bp)

Inserção do insert: 5127 (...) 5128

