

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.