

## 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 restrição<sup>1</sup>, purificação do fragmento génico e preparação do plasmídeo por isolamento a partir de células de *E. coli*, digestão<sup>2</sup> 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.

---

<sup>1</sup> Na clonagem clássica.

<sup>2</sup> 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*<sup>3</sup>

#### 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 CaCl<sub>2</sub> 100 mM gelada
- solução estéril de CaCl<sub>2</sub> 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.

---

<sup>3</sup> 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.
  - **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.
  - **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.
  - 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.
  - 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.
  - Pode realizar um teste de competência ( $n^o$  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 – NZYEasy 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](https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/mb282_mb319-mb330_ifu_en_v2401.pdf)
- (2) NZYTech. (2024). *User Guide – NZYEasy Cloning & Expression System, Version V2501*. NZYTech. Disponível em [https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/nzyeasy\\_cloning\\_expression\\_system\\_userguide\\_v2501.pdf](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](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.<sup>a</sup> 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.<sup>a</sup> 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 NZYEasy 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 NZYEasy. As extremidades complementares ao vetor, contendo uma sequência específica reconhecida pela enzima NZYEasy, 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 NZYEasy, 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 NZYEasy Cloning & Expression do pHTP9 (ref. MB324, GFP + His-tag)
- Kit de clonagem NZYEasy Cloning & Expression do pHTP1 (ref. MB282, só His-tag)

#### Componentes de um kit

NZYEasy enzyme mix	1 tubo (6 µL)
10x Reaction Buffer	1 tubo (100 µL)
Vetor de expressão pHTP (*)	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)
<b>FwCelBac3_completa</b>	TCAGCAAGGGCTGAGGATGAA TGGAAAAAGAAA	33 bp	42,4%	70,1	24,5 ng em 245 µL
FwCelBac4_s emSinalPep	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
<b>RevCelBac4_semSTOP</b>	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 deixa 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)	.
<b>Primer Fw: FwCelBac3_completa</b>	10uM	0.25 $\mu\text{M}^4$	1,25 $\mu\text{L}$	
<b>Primer Rev: RevCelBac4_semSTOP</b>	10uM	0.5 $\text{M}^5$	2,5 $\mu\text{L}$	
<b>Template DNA</b>	25ng/ul	5 pg-0.5 $\mu\text{g}$	4 $\mu\text{L}$	
<b>NZYTaq II 2× Green Master Mix</b>			25 $\mu\text{L}$	
<b>Nuclease-free water</b>	perfazer para 50 $\mu\text{L}$		17,25 $\mu\text{L}$	

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

<i>Etapa</i>	<i>Temp. (°C)</i>	<i>tempo</i>	<i>Ciclos</i>
<i>Desnaturação inicial</i>	95	3 min	1
<i>PCR</i>	94	30s	
	58* <sup>6</sup>	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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição pré-aquecido a 55-65°C, e faça uma segunda eluição re-utilizando o eluído.
2. Use o espectrofotómetro com a placa  $\mu\text{drop}$  e determine a concentração e pureza do *insert*.

<sup>4</sup> Recomendado 0,1 a 0,5  $\mu\text{M}$

<sup>5</sup> Deveria ser equimolar ao outro primer.

<sup>6</sup> 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
<b>Fragmento de DNA purificado</b>	_____ $\mu\text{L}$ <sup>7</sup>
<b>Vetor pHTP (1 ou 9)<sup>8</sup></b>	1 $\mu\text{L}$
<b>Tampão 10x</b>	1 $\mu\text{L}$
<b>Mix enzimático NZYEasy</b>	0,5 $\mu\text{L}$
<b>Água livre de nucleases</b>	até 10 $\mu\text{L}$

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

Etapa	Temperatura	Tempo
<b>I</b>	37 °C	60 min
<b>II</b>	80 °C	10 min
<b>III</b>	30 °C	10 min
<b>(manter frio depois de acabar)</b>	4 °C	$\infty$

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

### D. Transformação

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

### 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.

---

<sup>7</sup> 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.

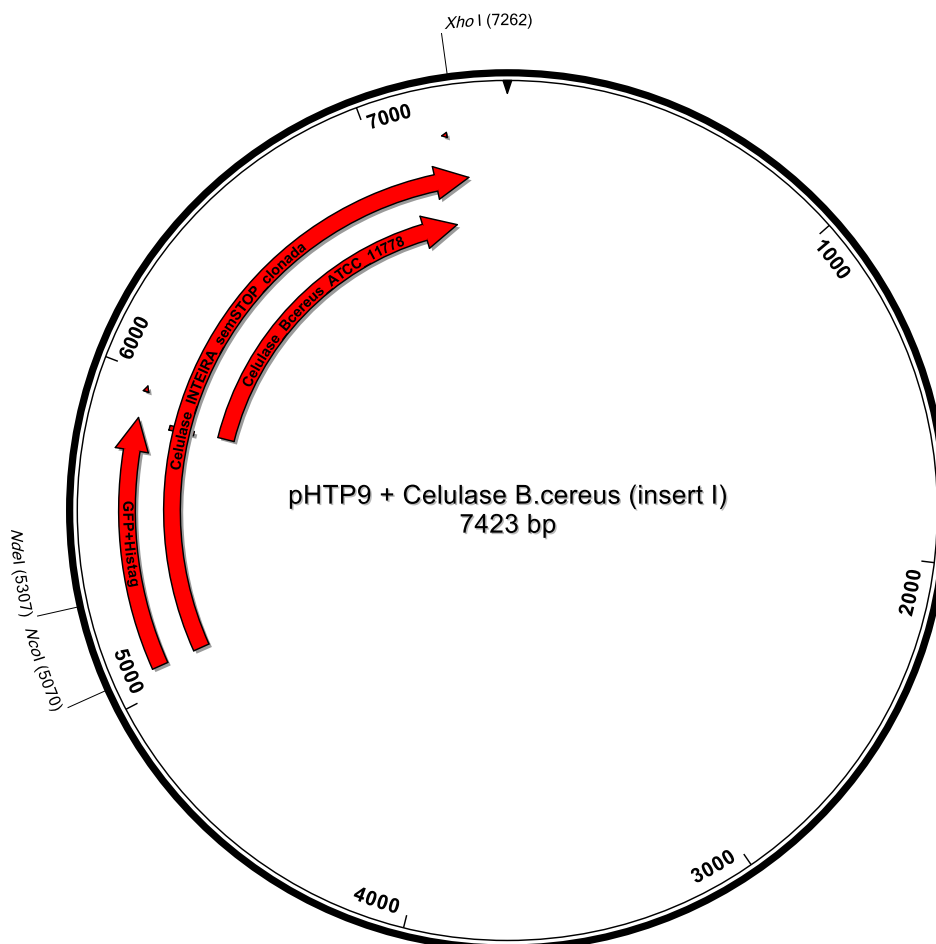
<sup>8</sup> Vetores pHTP estão prontos para uso

## IV. Bibliografia

- (1) NZYTech. (2024). *Instructions for use – NZYEasy 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](https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/mb282_mb319-mb330_ifu_en_v2401.pdf)
- (2) NZYTech. (2024). *User Guide – NZYEasy Cloning & Expression System, Version V2501*. NZYTech. Disponível em [https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/nzyeasy\\_cloning\\_expression\\_system\\_userguide\\_v2501.pdf](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](https://www.nzytech.com/media/dds/brochurescertificates/mb011_ifu_en_v2402.pdf)

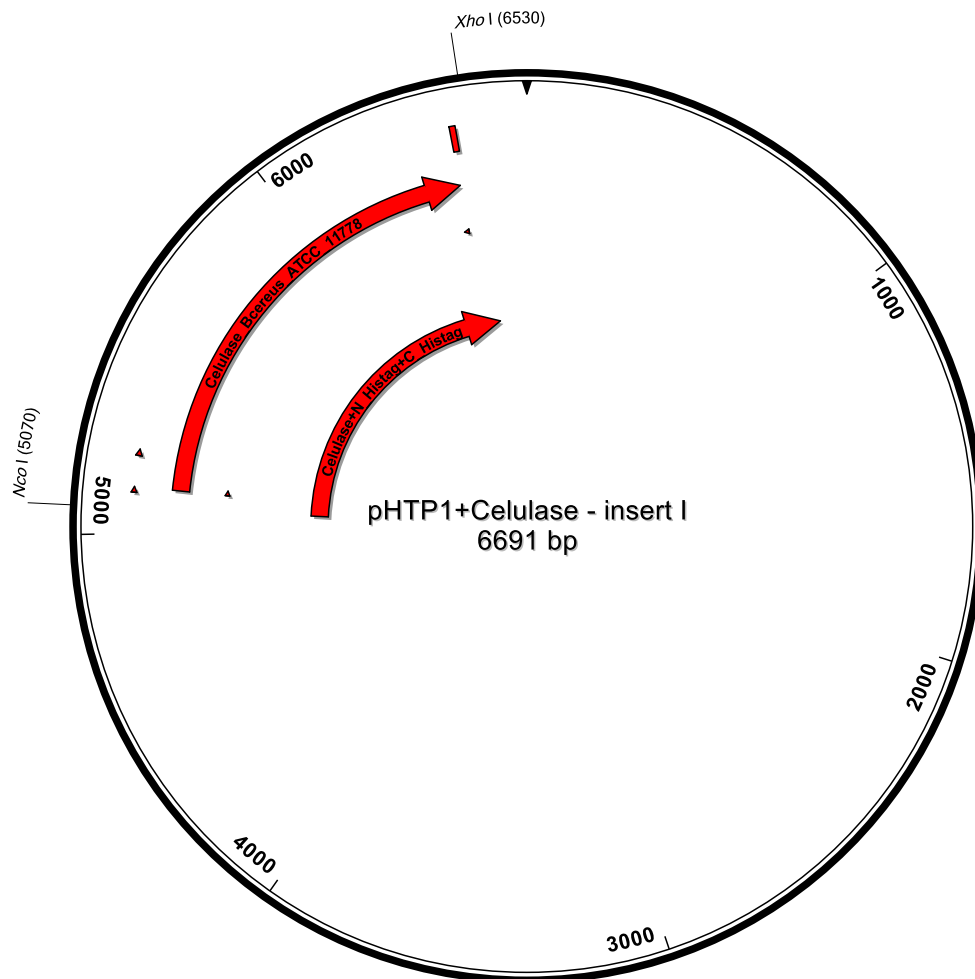
## V. Previsões da clonagem – Mapas de restrição

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



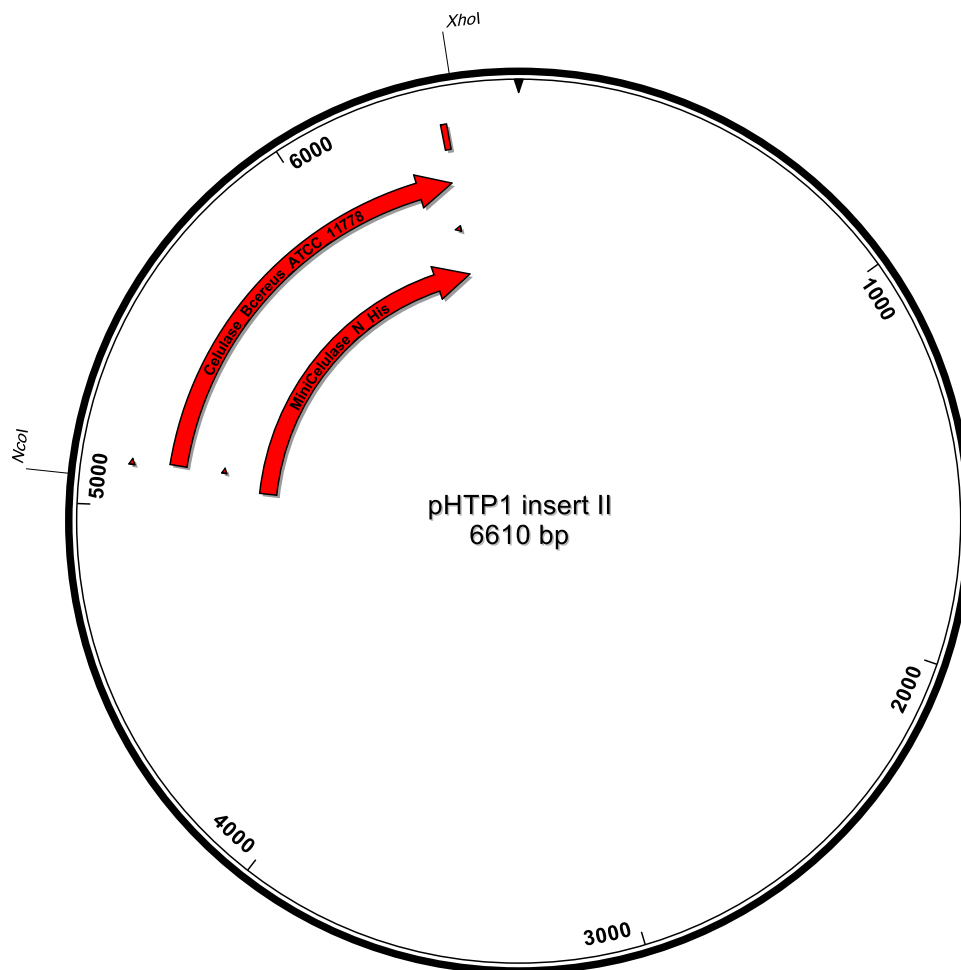
Insert I – 1359bp

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



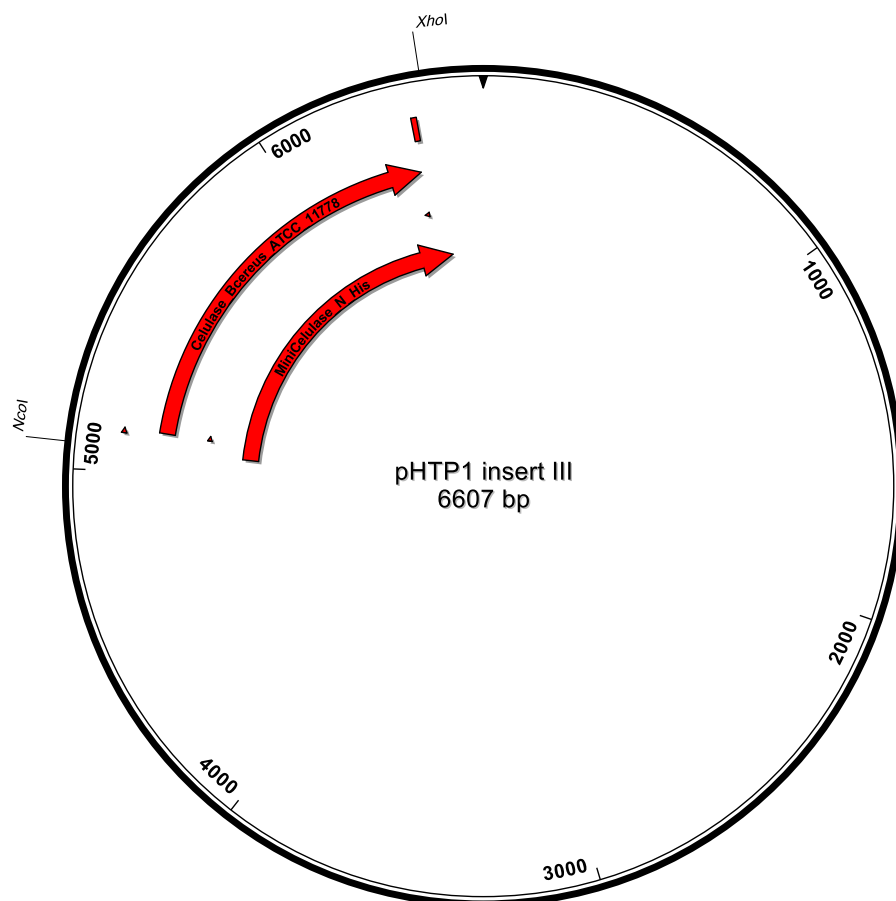
Insert I – 1359bp

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



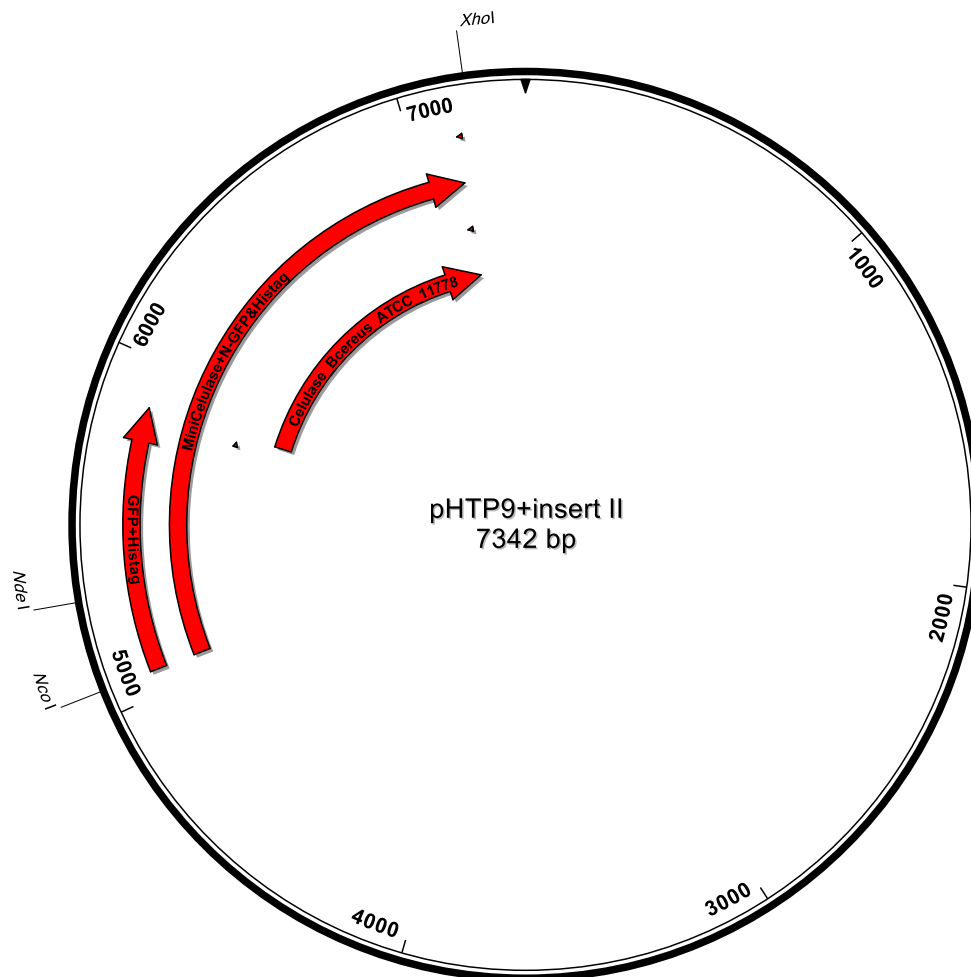
Insert II – 1278bp

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



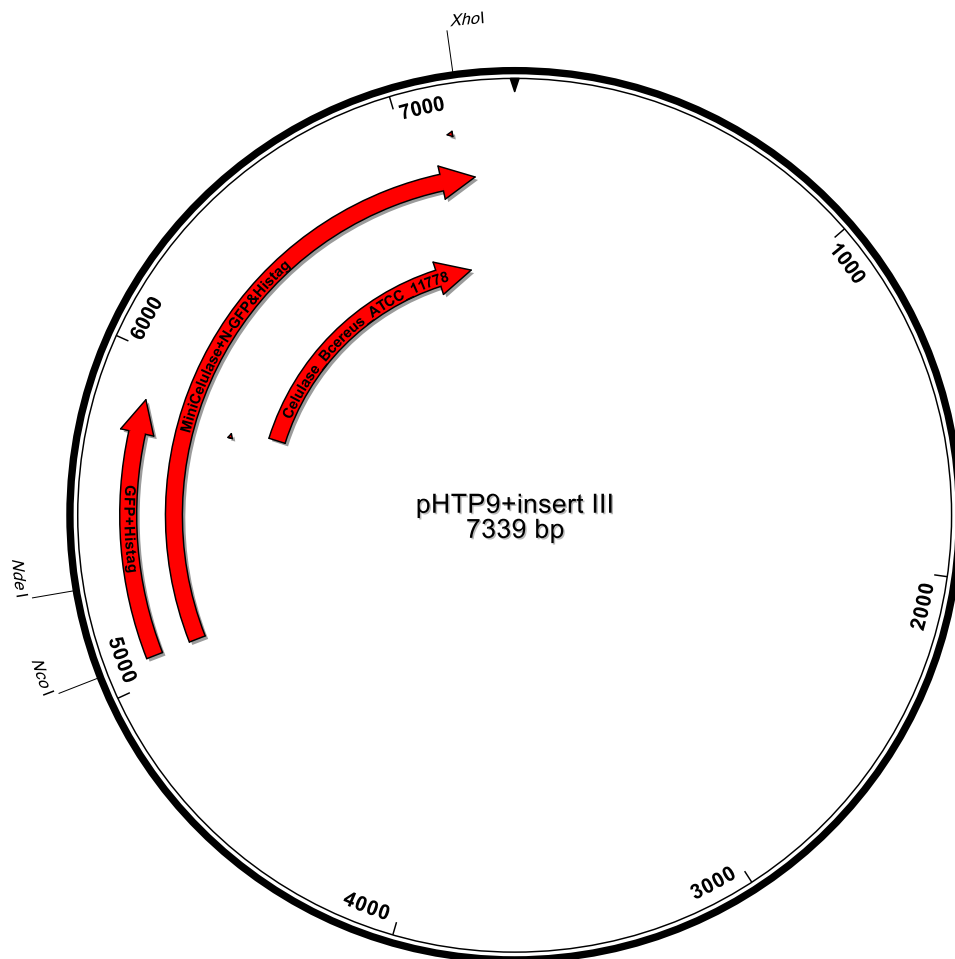
Insert III – 1275bp

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



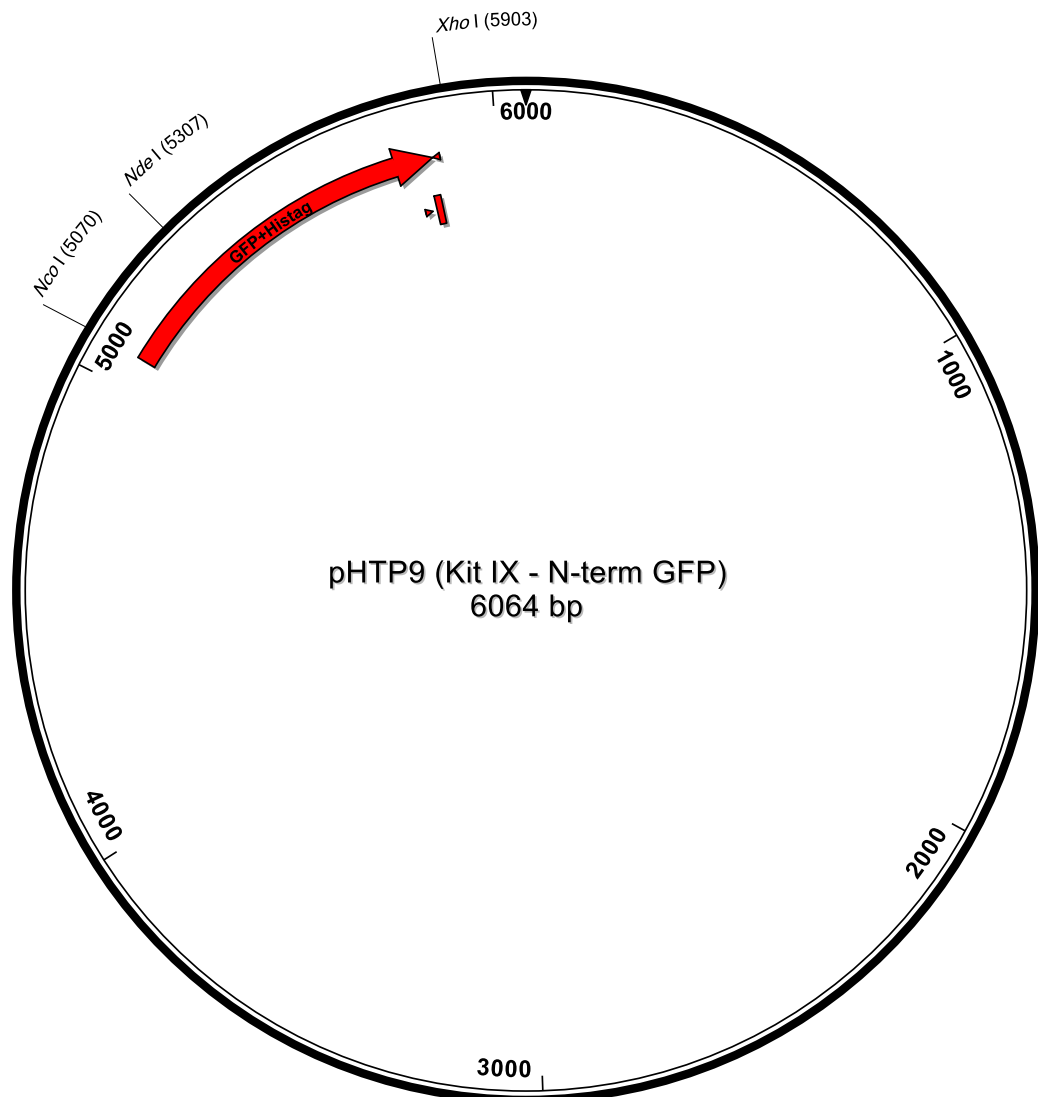
Insert II – 1278bp

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

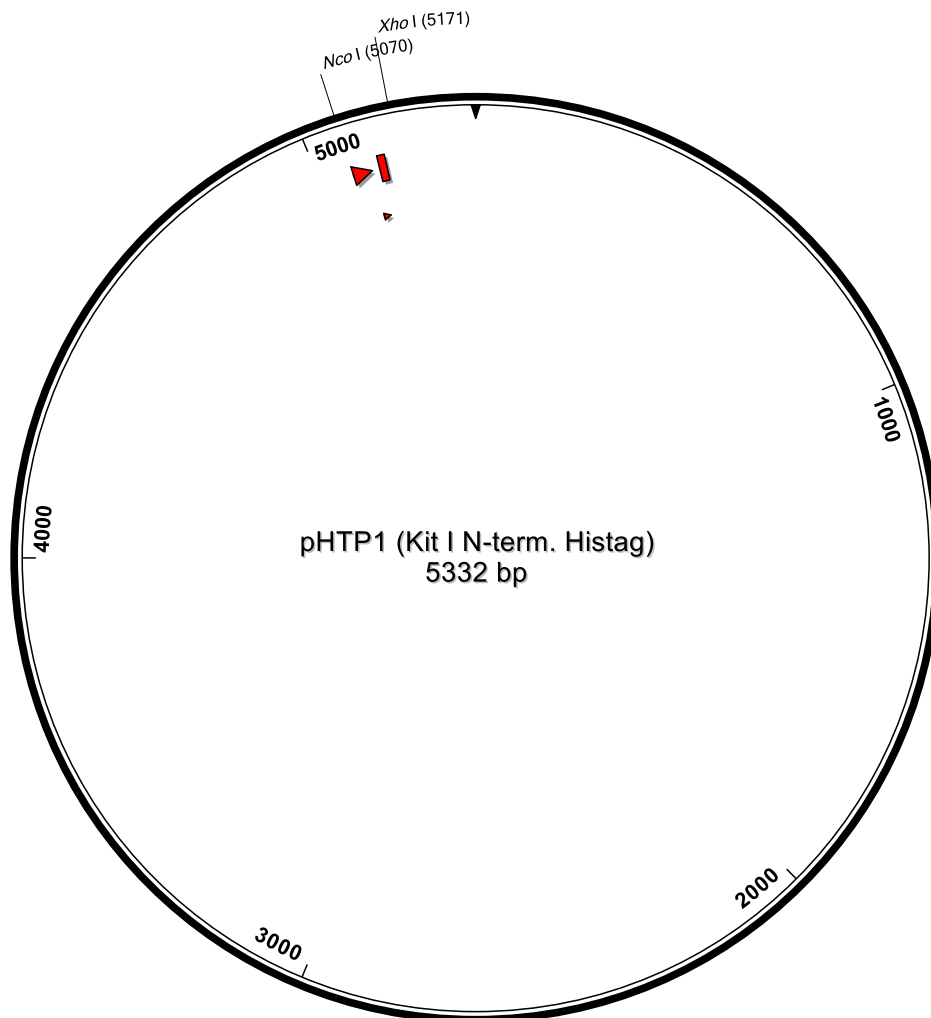


Tag N-terminal GFP+6xHis : 5071..5859 (789bp)

Inserção do insert: 5859 (...) 5860



## 8. Mapa de restrição do plasmídeo pHTP1



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

Inserção do insert: 5127 (...) 5128

