

# Clonagem em bactérias



Filipa Monteiro | [fmonteiro@isa.ulisboa.pt](mailto:fmonteiro@isa.ulisboa.pt)

Lisboa, 20 Abril 2026

## Resumo da aula

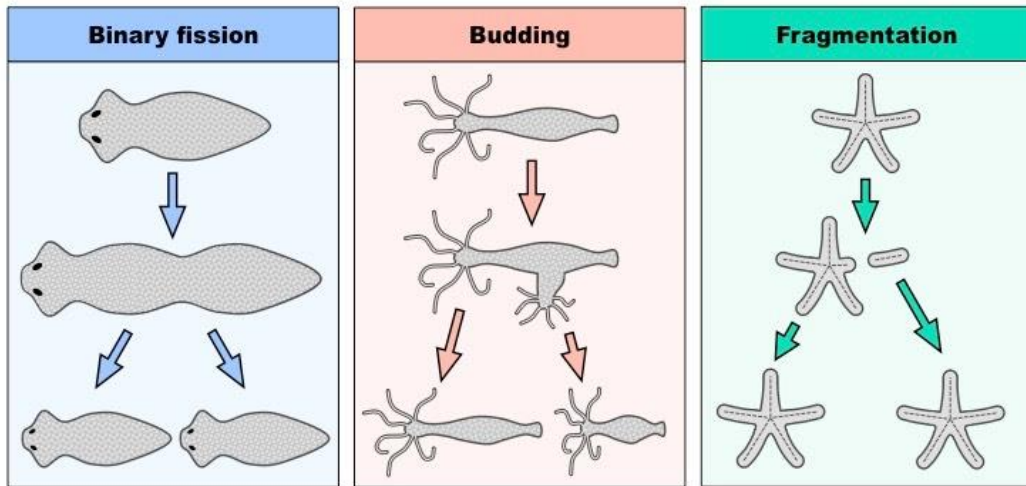
- O que é a clonagem? Tipos de clonagem
- Clonagem molecular: conceitos e procedimento
- Vetores, hospedeiros de clonagem, enzimas de restrição, ligase
- Clonagem passo a passo: ligação, transformação e seleção
- Outras tecnologias de clonagem e edição genética.

# O que é a clonagem?

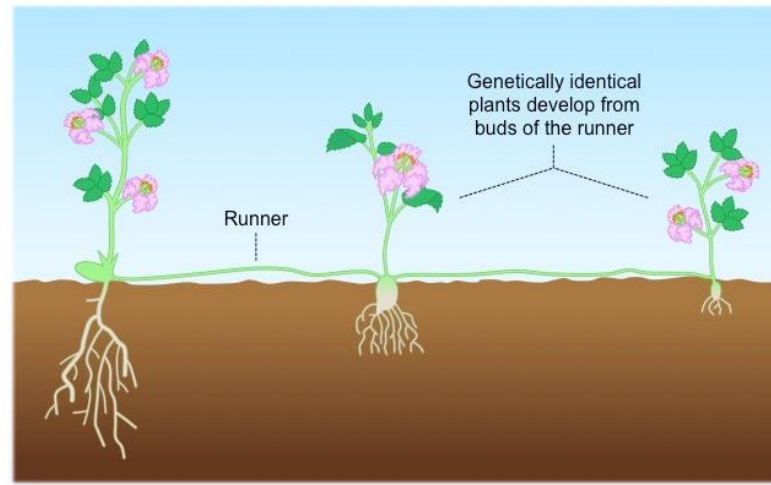
o processo de gerar uma cópia geneticamente idêntica de uma célula ou de um organismo.

A clonagem acontece frequentemente na natureza — por exemplo, quando uma célula se replica assexuadamente sem qualquer alteração genética ou recombinação.

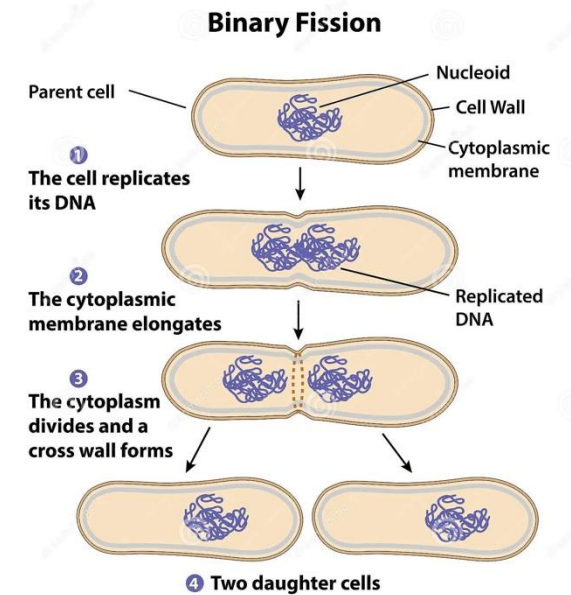
ocorre naturalmente através da reprodução assexuada, produzindo descendência geneticamente idêntica (clones) sem recombinação genética



Animais



Plantas



Bactérias

# Tipos de clonagem

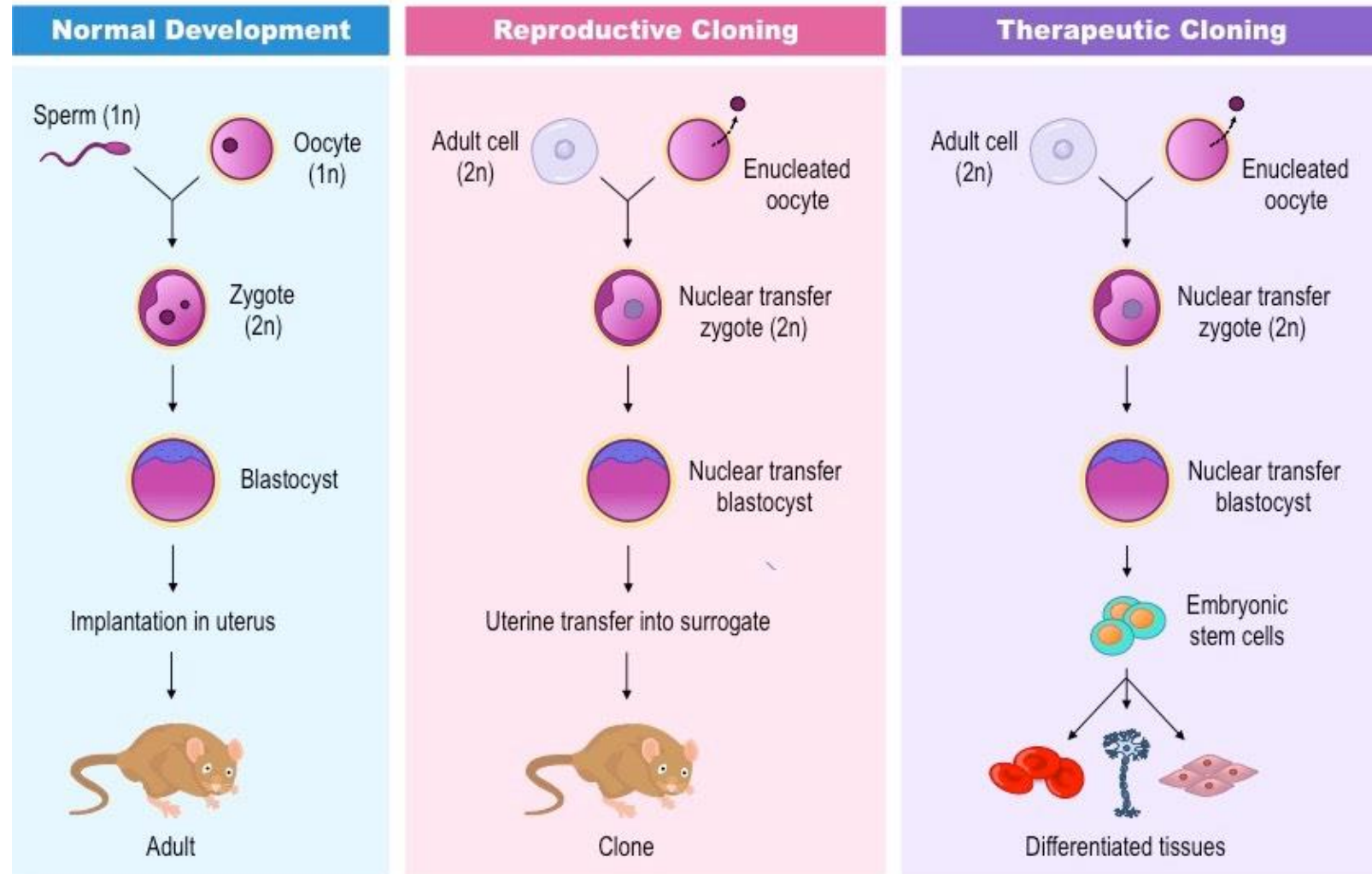
## 1. Clonagem reprodutiva

Este tipo de clonagem tem o objetivo de produzir organismos idênticos ao progenitor.

## 2. Clonagem terapêutica

Clonagem de embriões para produzir células estaminais embrionárias.

Ex. Desenvolvimento de tratamentos para doenças ou para cultivar tecido saudável que substitua células doentes.



# Tipos de clonagem

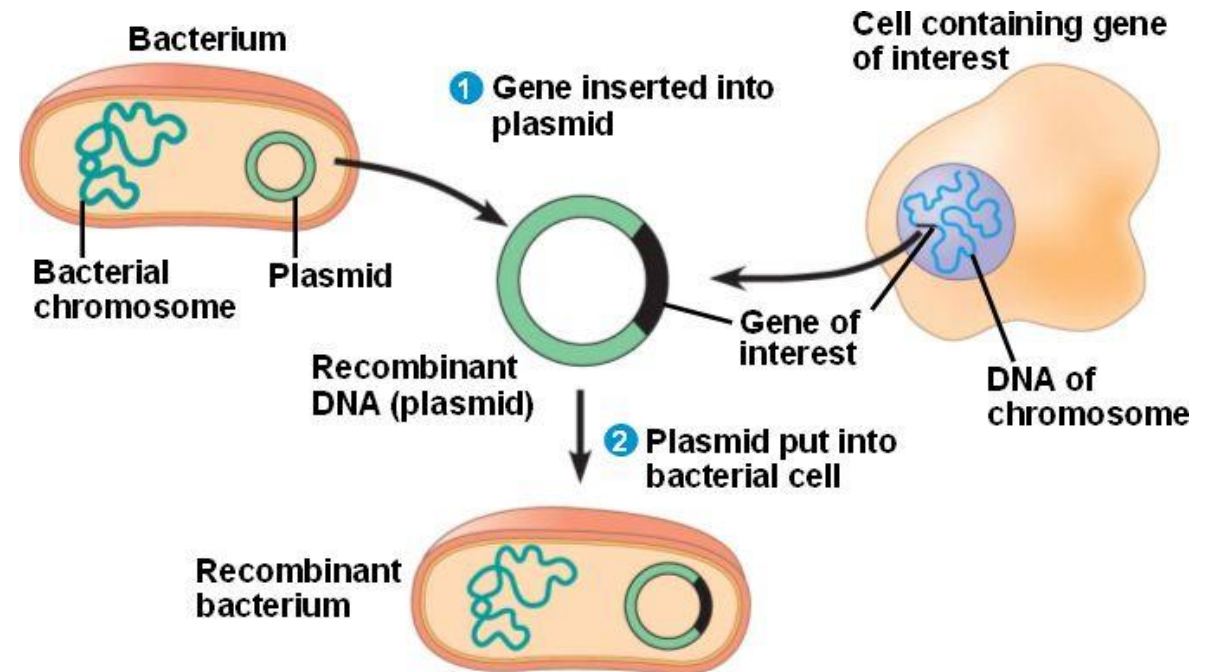
## 3. Clonagem molecular (clonagem de genes)

Cria cópias de genes ou segmentos de DNA, geneticamente idênticas.



### Para que serve?

- ✓ Produção de grandes quantidades de DNA recombinante
- ✓ Expressão de proteínas de interesse
- ✓ Engenharia genética



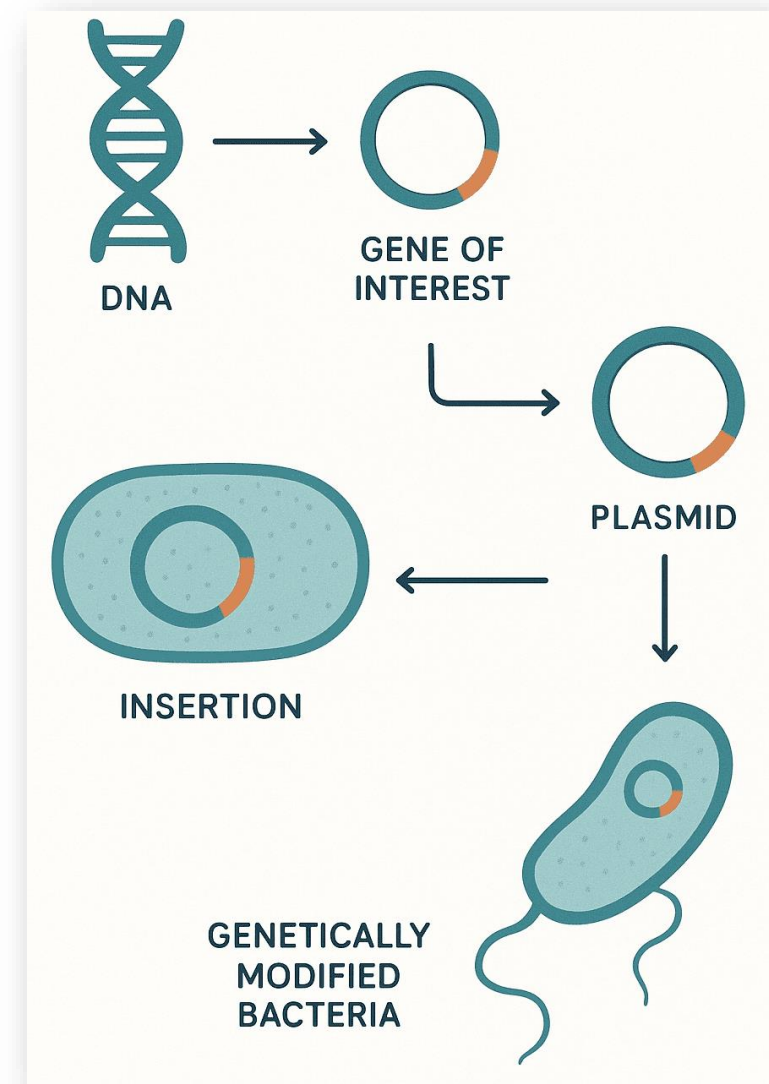
## Clonagem Molecular: GLOSSÁRIO EM CLONAGEM

**Clone** - grupo de organismos, ou células, geneticamente idênticos descendentes de um único ancestral.

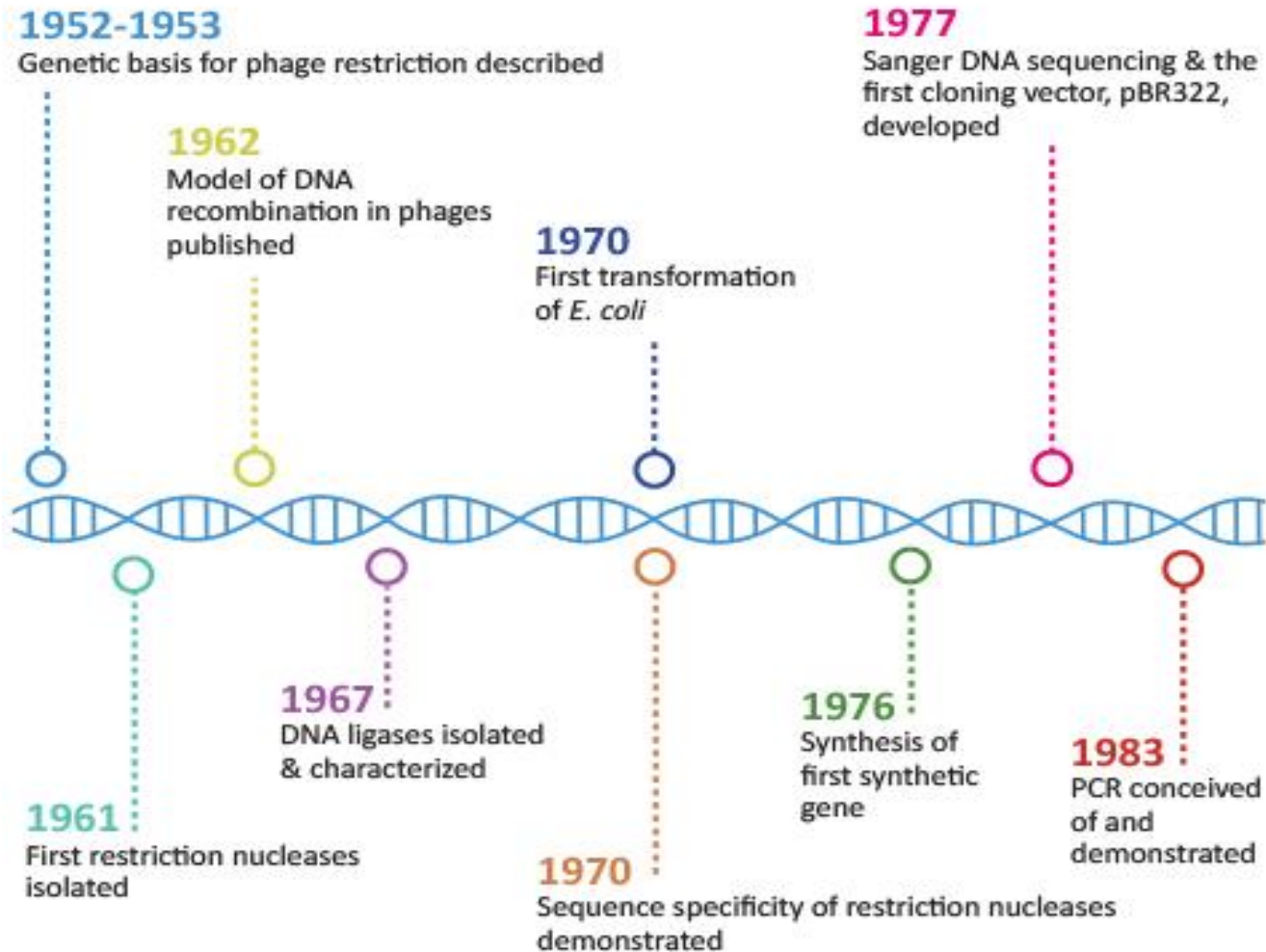
**Clonagem** (“cloning”) - produção de clones.

**Clonagem de genes** (“gene cloning”) - criação de uma linha de organismos geneticamente idênticos, que contêm moléculas de DNA recombinante, e que podem ser propagados de forma a amplificar as moléculas recombinantes.

**DNA recombinante** - uma molécula de DNA híbrida, produzida *in vitro*, pela ligação de um DNA estranho a um vector.



# História da clonagem



## EVOLUÇÃO DA CLONAGEM MOLECULAR

**1967** - isolamento da enzima DNA ligase.

**1970** - isolamento da primeira enzima de restrição.

**1973** - ligação de fragmentos de DNA num plasmídeo.

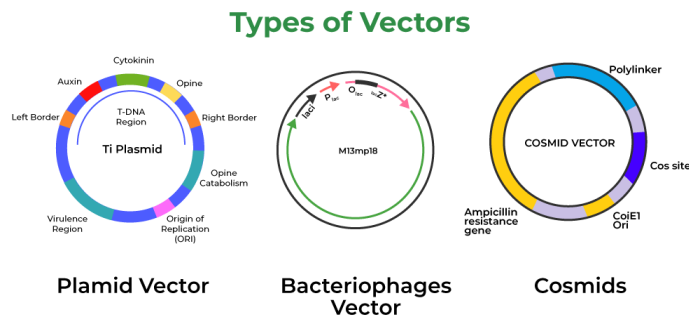
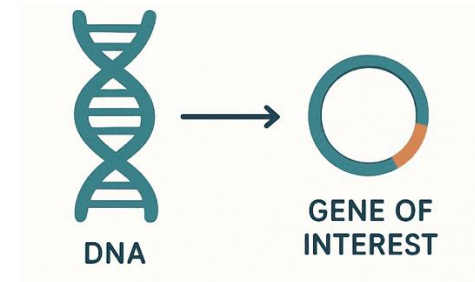
**1980s** - Desenvolvimento de vetores de expressão, PCR e bibliotecas de cDNA → revolucionando a biotecnologia vegetal e molecular.

**2000s** - New cloning methodologies have emerged such as the Gateway.

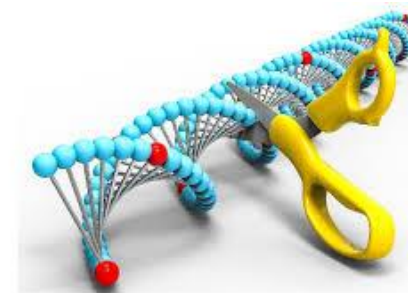
**2011**- CRISP/Cas9 (edição genética)

# Componentes essenciais na clonagem

DNA de Interesse: Gene ou fragmento a ser clonado.



Vetor de Clonagem: "Veículo" que transporta o DNA.

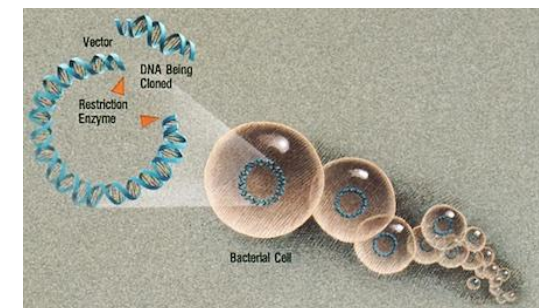


Enzimas de Restrição: "Tesouras moleculares" que cortam o DNA.



DNA ligase (ligation)

DNA Ligase: "Cola"/une fragmentos.



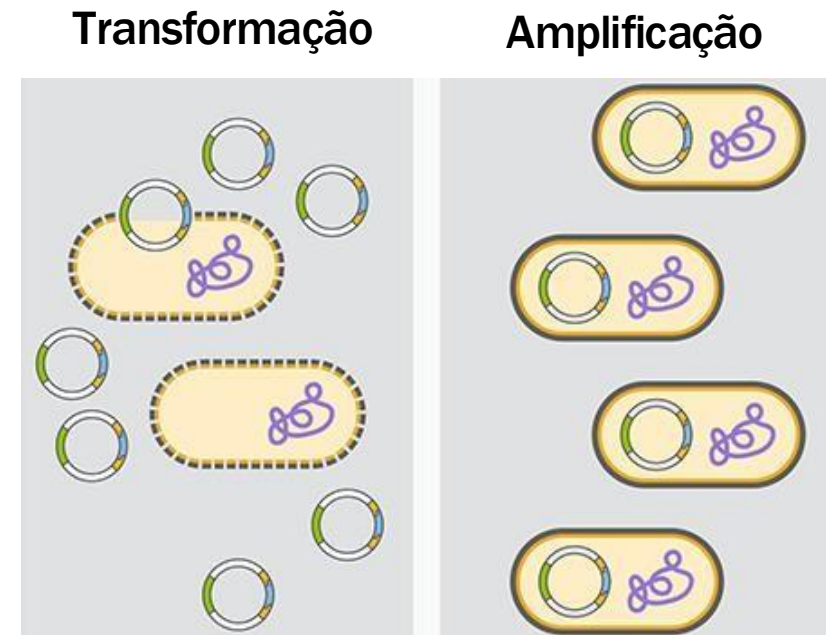
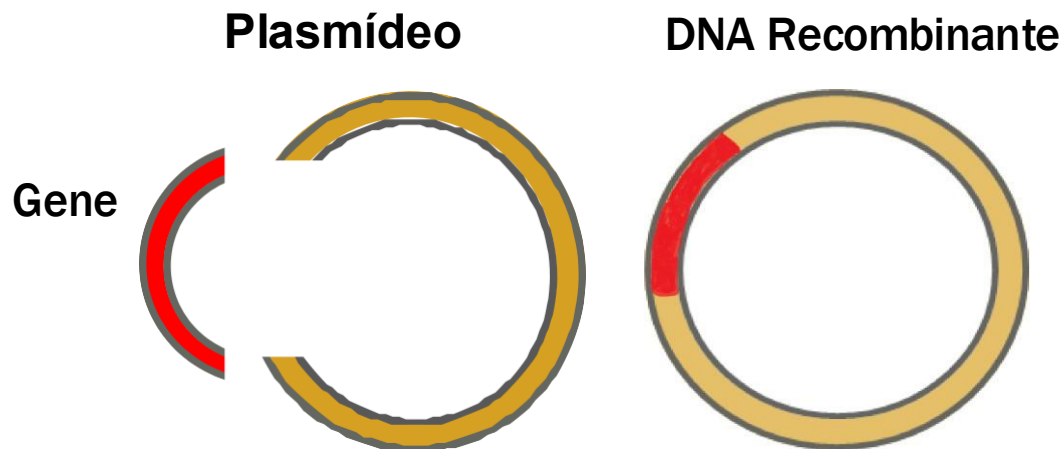
Organismo Hospedeiro: Onde o DNA recombinante será replicado.

# Clonagem de genes



A clonagem é a criação de uma cópia geneticamente idêntica.

A **clonagem molecular** envolve o isolamento de um gene de interesse e a sua inserção num vetor adequado (**vetor de clonagem**), que é então introduzido num organismo hospedeiro (**células bacterianas**), permitindo que o gene se replique e se expresse dentro do sistema hospedeiro.

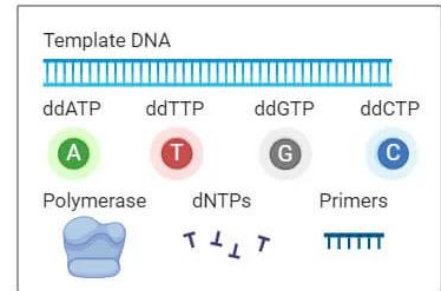


DNA recombinante: Molécula híbrida de DNA, produzida *in vitro* pela inserção de um DNA exógeno num vetor.

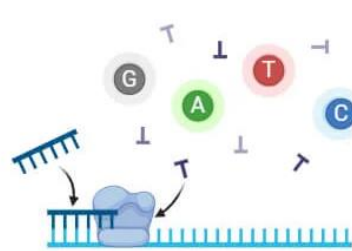
# Desenvolvimentos importantes da biologia molecular

## Frederic Sanger in 1975 - DNA sequencing

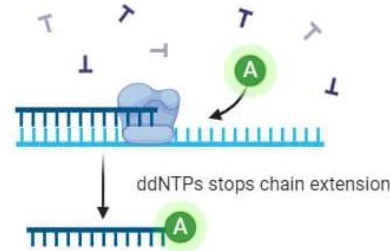
### Reagents



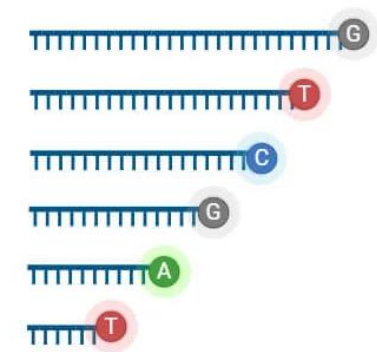
### ① Primer annealing and chain extension



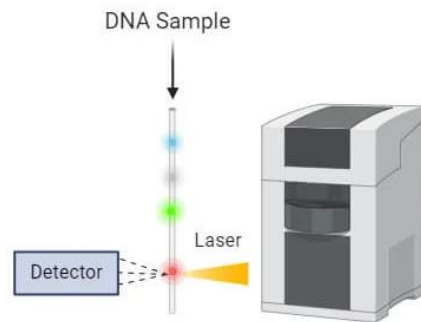
### ② ddNTP binding and chain termination



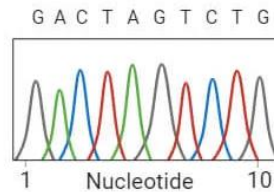
### ③ Fluorescently labelled DNA sample



### ④ Capillary gel electrophoresis and fluorescence detection

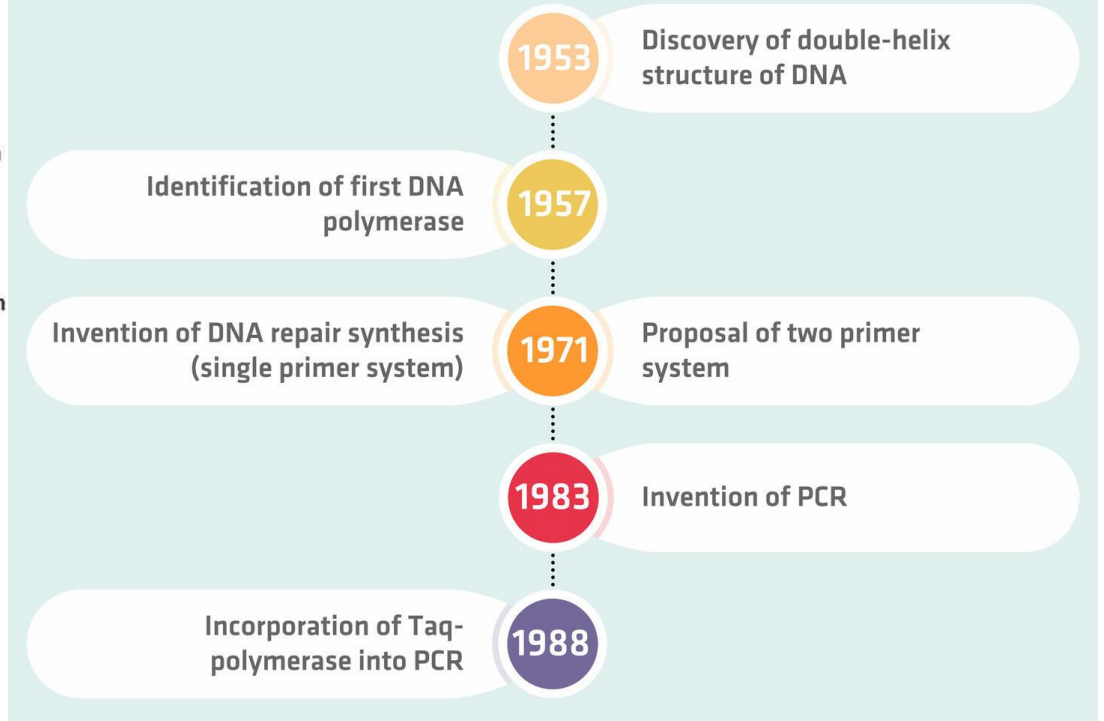


### ⑤ Sequence analysis and reconstruction



## Kary B. Mullis in 1983 developed the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

### The history of PCR



# Aplicações da clonagem em biotecnologia

## 01 **Terapia genética**

Substituição de um gene defeituoso ou adiciona um novo gene numa tentativa de curar doenças ou melhorar a capacidade do organismo de combater doenças.

## 02 **Conservação de germoplasma**

Clonagem permite preservar recursos genéticos: espécies ameaçadas, variedades tradicionais, bancos de germoplasma in vitro, criopreservação de tecidos- Crucial para biodiversidade e melhoramento genético futuro.

## 03 **Estudos de expressão**

superexpressão de genes, silenciamento (RNAi, CRISPRi), edição genética (CRISPR/Cas), engenharia metabólica, tolerância a stresses, biofortificação

## 04 **Produção de enzimas**

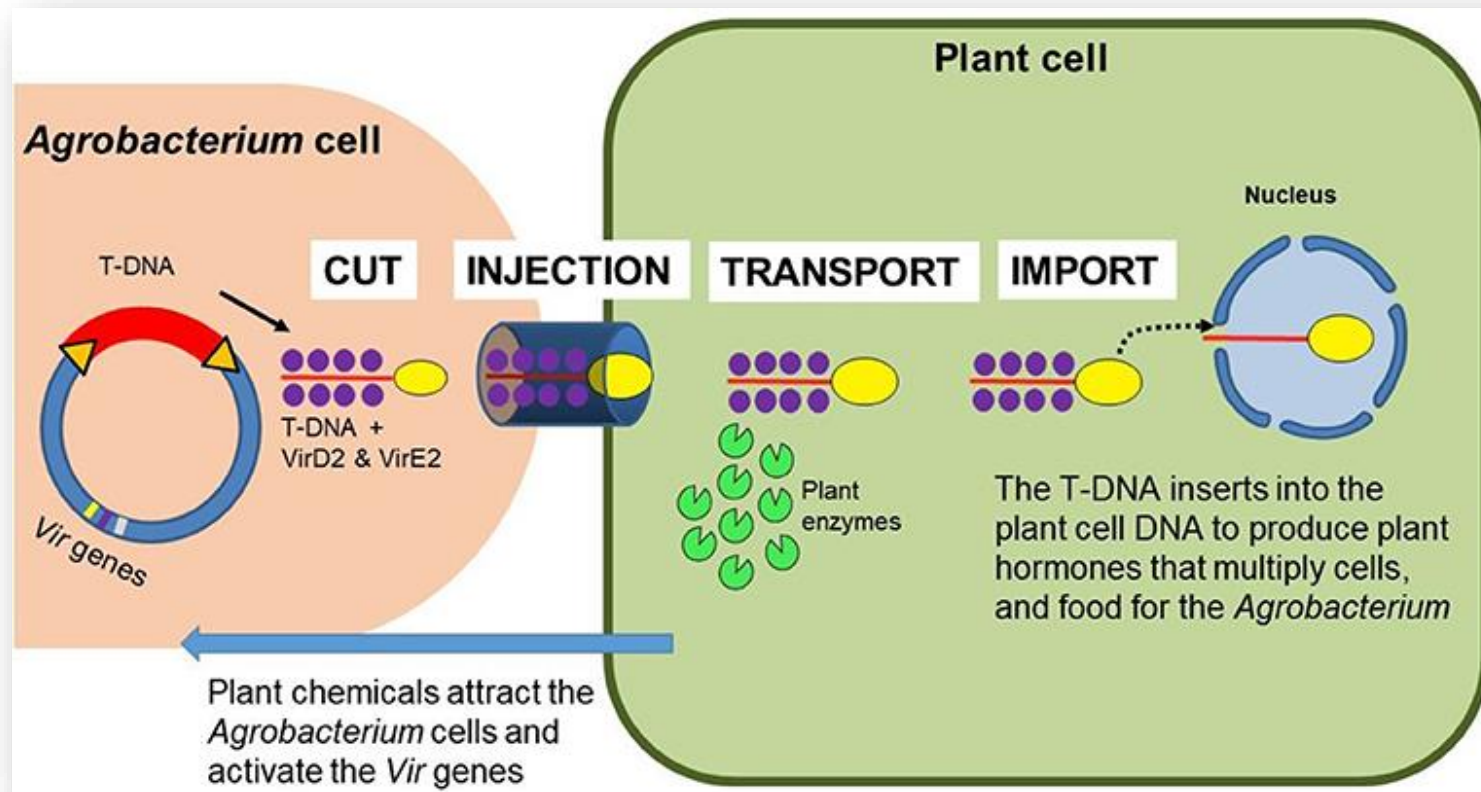
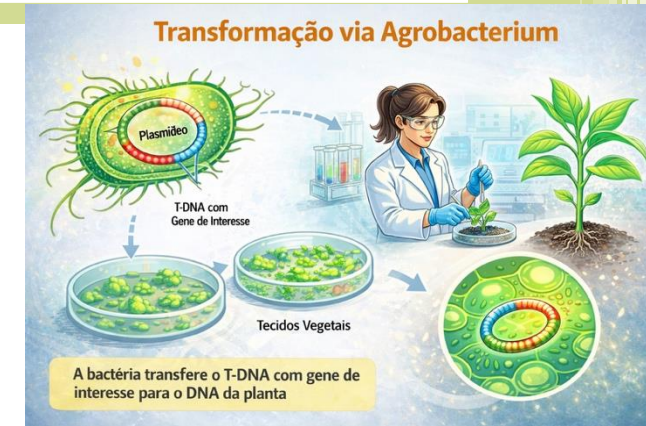
Produção industrial em larga escala de enzimas (por exemplo, coalho para produção de queijo) através de tecnologia de DNA recombinante em hospedeiros bacterianos ou de levedura.

## 05 **Proteínas Alternativas**

Desenvolvimento de alternativas à carne de origem vegetal ou cultivada através da clonagem e expressão de proteínas em microrganismos.

# Técnicas de introdução de genes em plantas

- Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (biológico)



O processo envolve a inserção do gene de interesse (vetor de expressão), no T-DNA da bactéria, infecção do explante, cultura, seleção de tecidos transformados e regeneração da planta transgênica.

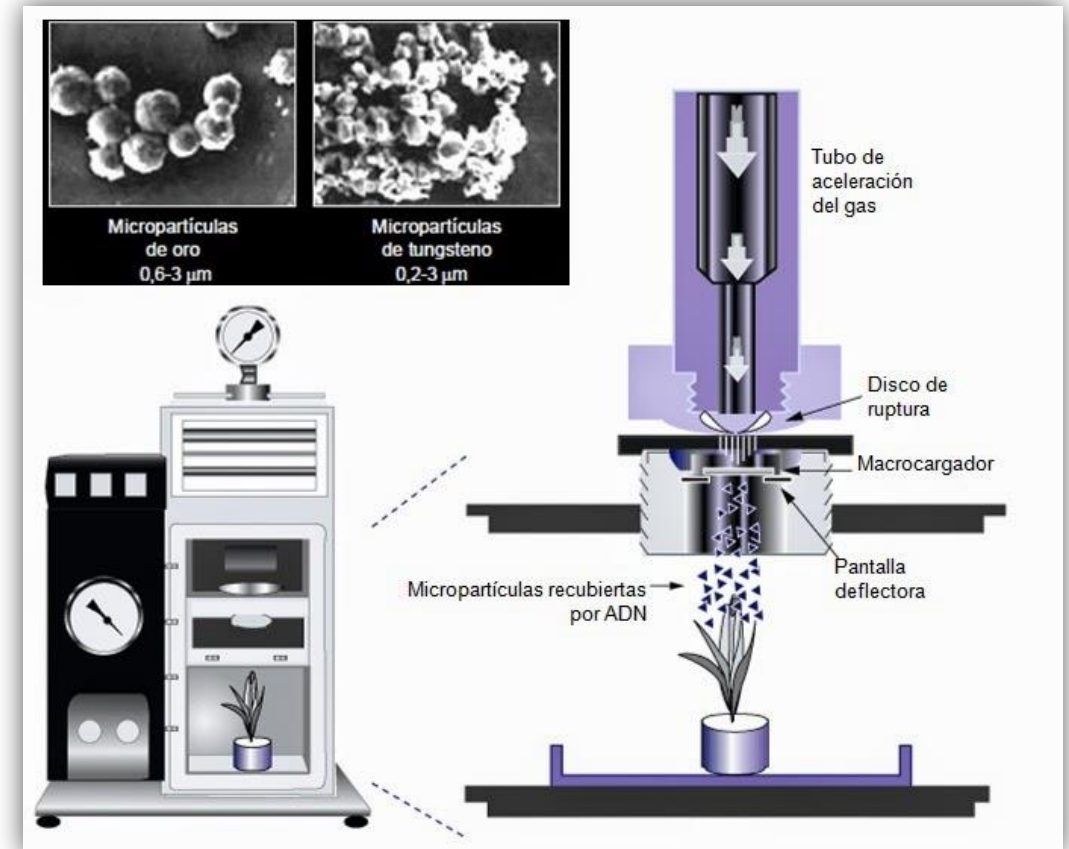
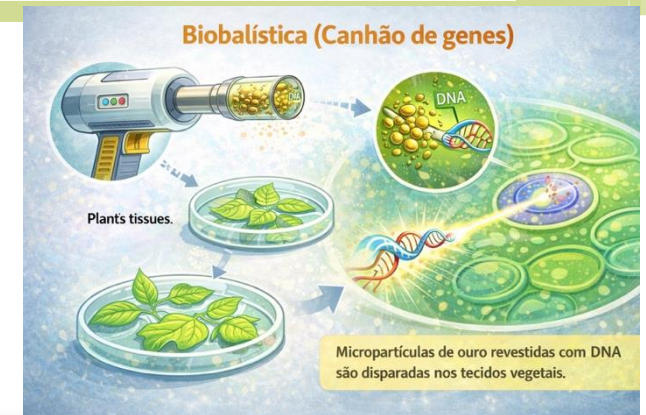
# Técnicas de introdução de genes em plantas

- Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (biológico)
- Biobalística (físico)

Bombardeamento de micropartículas de tungstênio ou ouro cobertas com o DNA de interesse.

As micropartículas são projetadas sobre o tecido da espécie que se pretende modificar

Eventualmente, as micropartículas atravessam a célula e penetram o núcleo, e o DNA exógeno integra-se no genoma do organismo hospedeiro (dissociando-se das micropartículas)



Usa um equipamento específico (Gene gun)

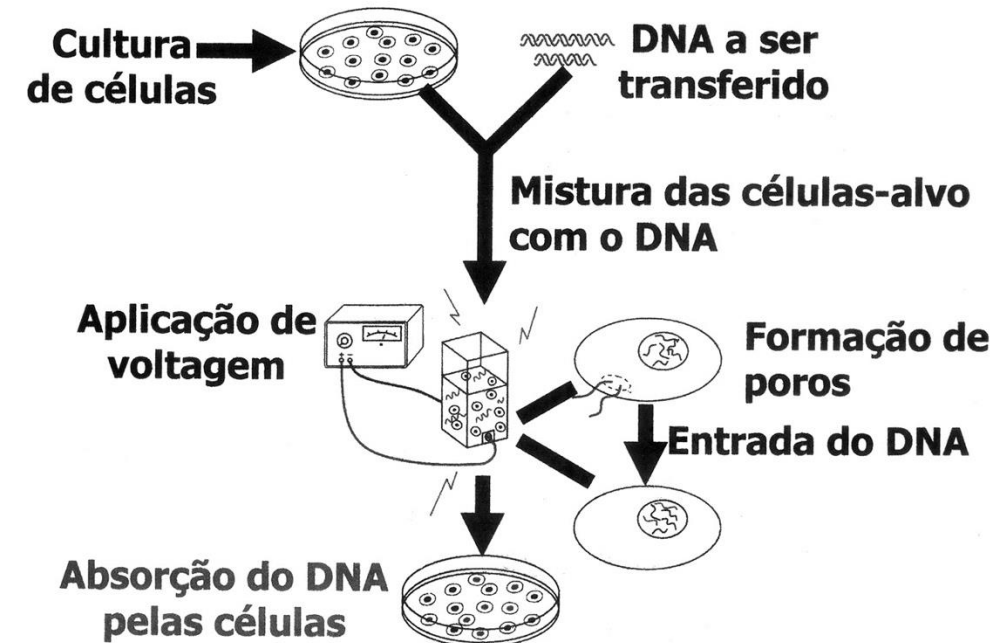
# Técnicas de introdução de genes em plantas

- Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (biológico)
- Biobalística (físico)
- Eletroporação e métodos alternativos

Aplica pulsos elétricos para abrir poros na membrana celular.  
Permite a entrada do DNA.  
Mais comum em células isoladas (protoplastos)

## Novas Técnicas de Edição Genômica

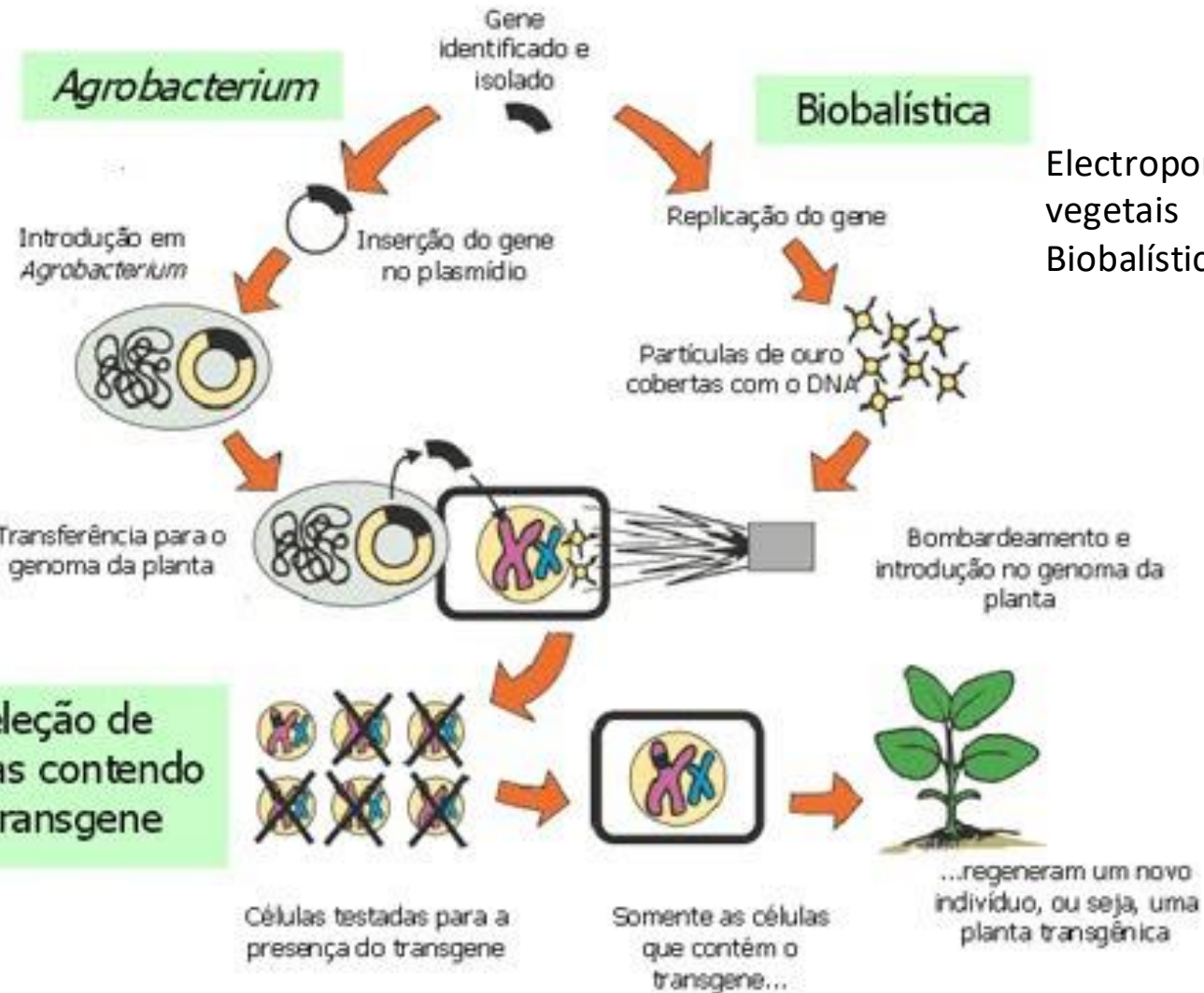
- **CRISPR-Cas9**: Funciona como uma "tesoura molecular" para edições precisas e pontuais no DNA, permitindo silenciar ou modificar genes específicos sem introduzir DNA exógeno na planta final.
- **TALEN e Nucleases "Zinc Finger"**: Outras ferramentas de edição de genoma que permitem a mutagenese direcionada.



# Métodos de transformação de plantas

## Indirectos

*Agrobacterium tumefaciens*



## Directos

Electroporação de protoplastos e de células vegetais  
Biolística (bombardeamento de partículas)

# Etapas da clonagem molecular

**Corte ou cópia de um gene/fragmento.**

Este processo depende de enzimas de restrição (que cortam o DNA) e/ou da utilização de PCR.

**Inserção no vetor (plasmídeo)- Ligação.**

Este processo depende da **DNA ligase** (que liga o DNA: vetor + inserto).

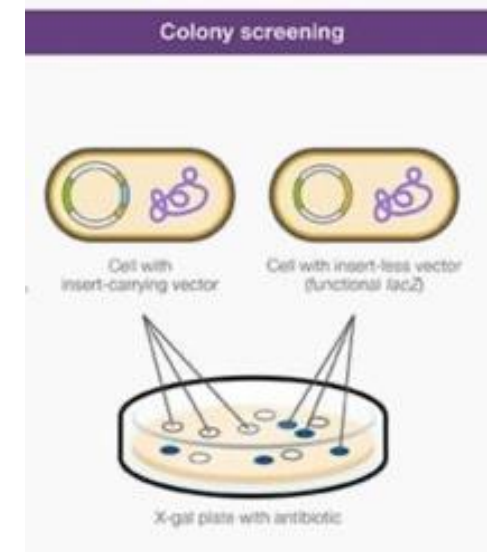
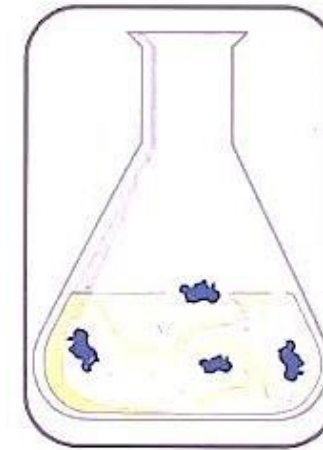
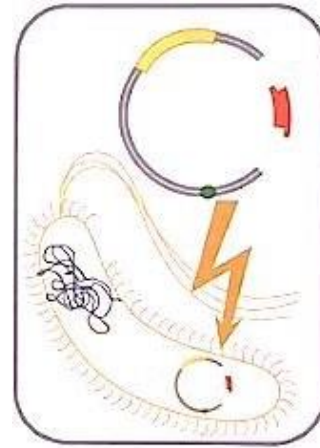
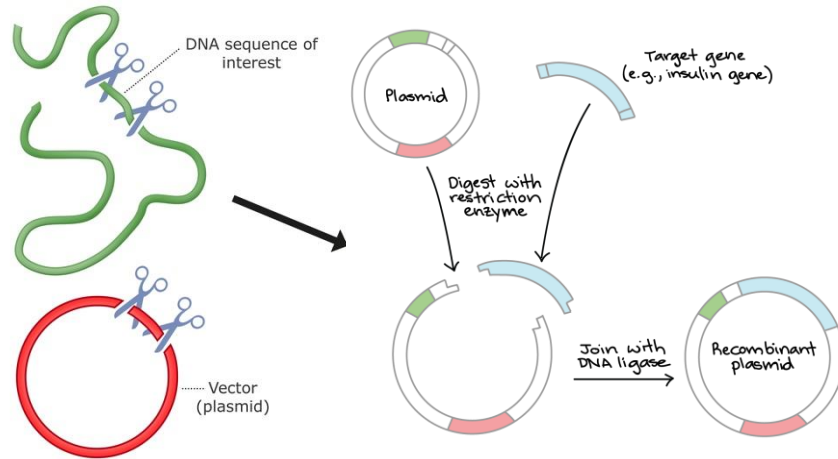
**Inserção do plasmídeo em bactérias (Transformação).**

**Multiplicação de bactérias portadoras de plasmídeo.**

**Seleção de bactérias transformadas.**

Esta seleção é feita através da utilização de antibióticos específicos, de acordo com as características do plasmídeo (vetor).

# Etapas da clonagem molecular



Gene de interesse

Ligação

Transformação

Cultura de bactérias

Seleção de transformantes

Digestão do gene para clonar com enzima de restrição adequada ou amplificação por PCR do gene/fragmento a clonar

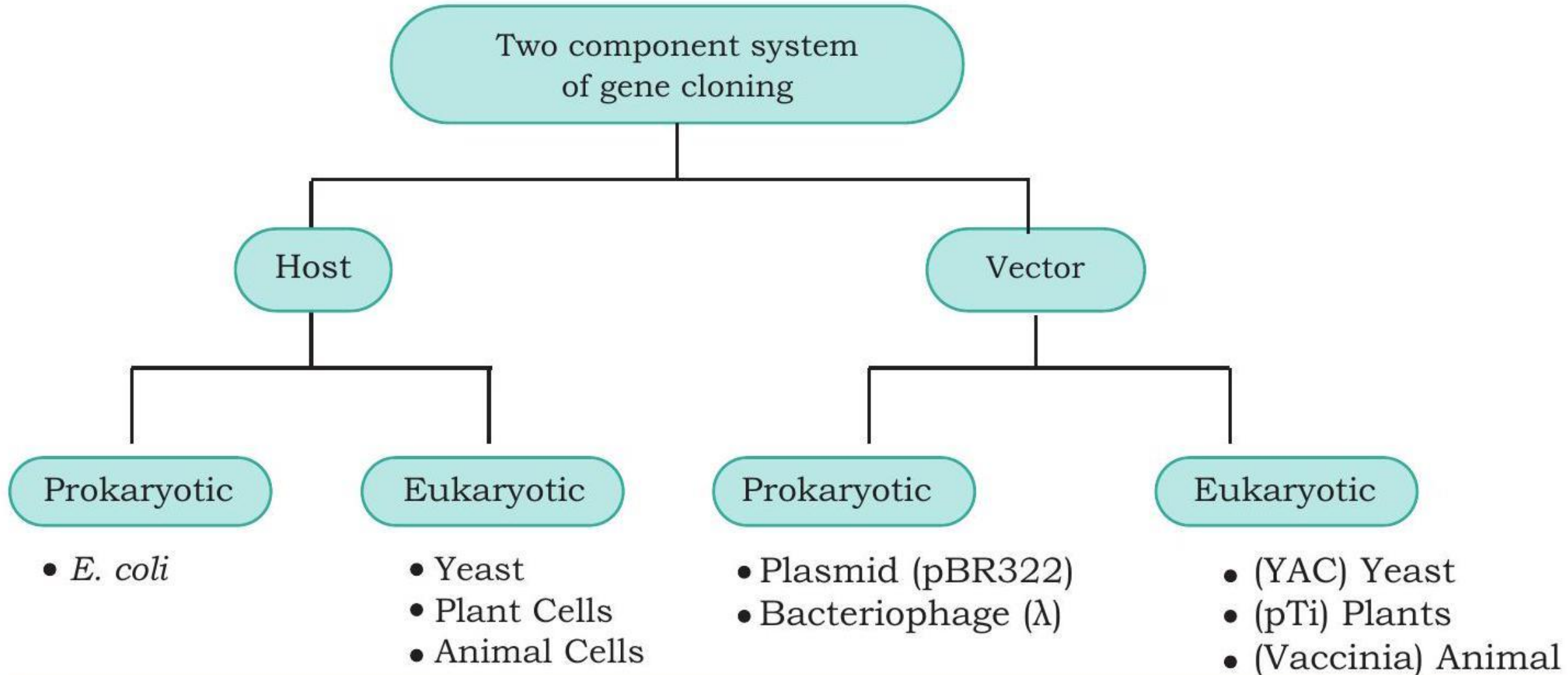
Ligação com DNA ligase  
A ligação depende da razão vetor: inserto  
Tempo de incubação  
Temperatura de incubação

Transformação do vetor recombinante em bactérias competentes

Crescimento bacteriano em meio de cultura para amplificar o gene/fragmento clonado

Crescimento bacteriano em meio seletivo  
Recombinantes selecionados por presença de colónias (seleção positiva) ou por seleção azul/branco.

## Hospedeiro e vetor de clonagem



# Hospedeiros de clonagem

- ✓ O tipo de células hospedeiras usadas depende do objetivo a atingir
- ✓ Se o objetivo é expressar a informação genética em grandes eucariontes como as plantas, um sistema mais específico deve ser recomendado. (modificações pós-traducionais).
- ✓ Frequentemente é usado um hospedeiro primário para isolar a sequência e em seguida faz-se a introdução dentro de um sistema mais complexo para expressão.

## Devem:

- ser fáceis de manipular e multiplicar,
- apresentar uma vasta gama de estirpes geneticamente definidas,
- aceitar vários tipos de vetores.



## 1. PROCARIOTAS

- *Escherichia coli* ( $4 \times 10^6$  pb)
- *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Streptomyces sp.*

## 2. EUCARIOTAS

- *Saccharomyces cerevisiae* ( $1,35 \times 10^7$  pb)
- *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Chlamydomonas reinhardtii*.

**Curiosidade:** Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, e *Pichia pastoris* estão entre os organismos eucarióticos mais simples. Têm um crescimento rápido e são altamente adaptáveis à produção em larga escala.

# Hospedeiros de clonagem

Os sistemas procarióticos (bactérias) ou eucarióticos (leveduras, cultura de células de plantas ou animais) são geralmente utilizados como hospedeiros para a produção de quantidades utilizáveis do produto de DNA recombinante pretendido.

A maioria dos produtos de rDNA aprovados pela FDA é produzida usando estes sistemas.

As bactérias como *E. coli* são amplamente utilizadas para a expressão de produtos de DNA recombinante. A *E. coli* oferece várias vantagens devido ao alto nível de expressão de proteínas recombinantes, rápido crescimento de células e necessidade simples de meios.

No entanto, existem algumas limitações, como a acumulação intracelular de proteínas heterólogas, o potencial de degradação do produto devido à presença de proteases, e produção de endotoxina.

Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, e *Pichia pastoris* estão entre os organismos eucarióticos mais simples. Têm um crescimento rápido e são altamente adaptáveis à produção em larga escala. Esses organismos não produzem endotoxina. Além disso são capazes de glicosilar proteínas, de modo relativamente semelhante às células de mamíferos.

# Vetores de clonagem

É uma molécula de DNA que serve de veículo para transportar artificialmente um fragmento de DNA estranho para outra célula, onde pode ser replicado e/ou expresso.

Um vetor com DNA exógeno é denominado de **DNA recombinante**.

Os quatro principais tipos de vetores são: **plasmídeos, vetores virais, cosmídeos e cromossomas artificiais**.

Destes, os vetores mais utilizados são os **plasmídeos**.

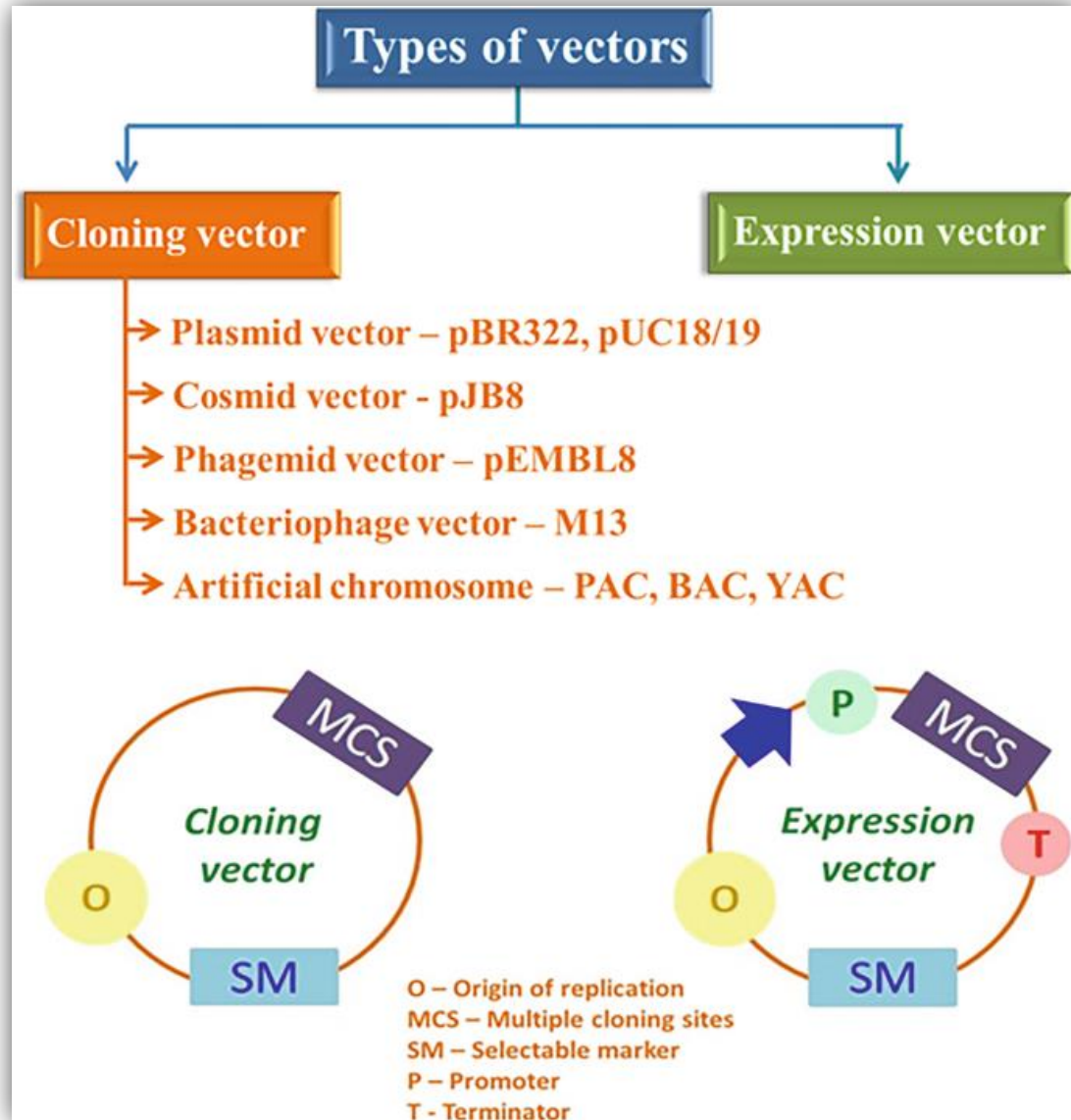
## Características necessárias:

- 1 origem de replicação
- 1 marca selectiva
- pelo menos, 1 local de restrição único
- Ex. Plasmídeos (insertos até *ca* 10 kb), bacteriófagos (insertos até *ca* 20 kb), cosmídeos (insertos até *ca* 47 kb), YACs (insertos até *ca* 500 kb)

## PLASMÍDEOS

- moléculas pequenas
- DNA circular extracromossómico
- genes de resistência a antibióticos
- baixo ou elevado número de cópias
- Limitação de clonagem de fragmentos de DNA de grandes dimensões.

# Tipos de vetores de clonagem



## Cloning vectors and their insert capacities

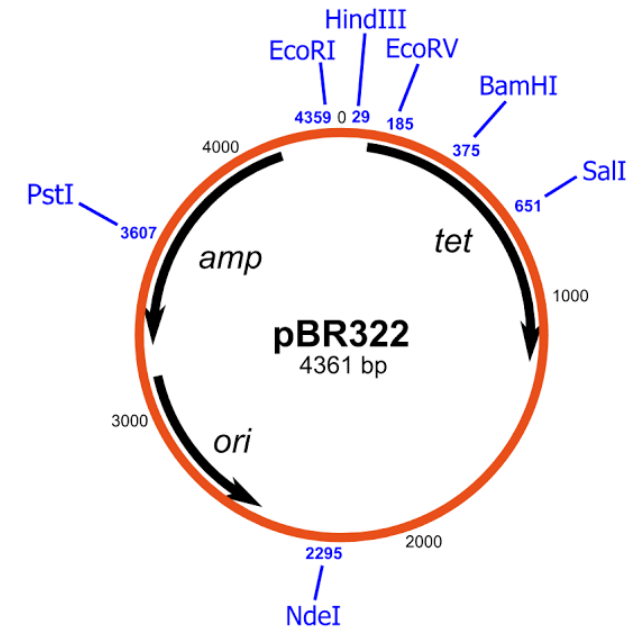
Vector system	Host cell	Insert capacity (kb)
Plasmid	<i>E. coli</i>	0.1-10
Bacteriophage $\lambda$	<i>E. coli</i>	10-20
Cosmid Fosmid	<i>E. coli</i>	35-45
Bacteriophage P1	<i>E. coli</i>	80-100
BAC (bacterial artificial chromosome)	<i>E. coli</i>	50-300
P1 bacteriophage- derived AC ( <b>PAC</b> )	<i>E. coli</i>	100-300
YAC	Yeast	100-2,000
Human AC	Cultured human cells	>2,000

# Plasmídeos usados como vetores de clonagem

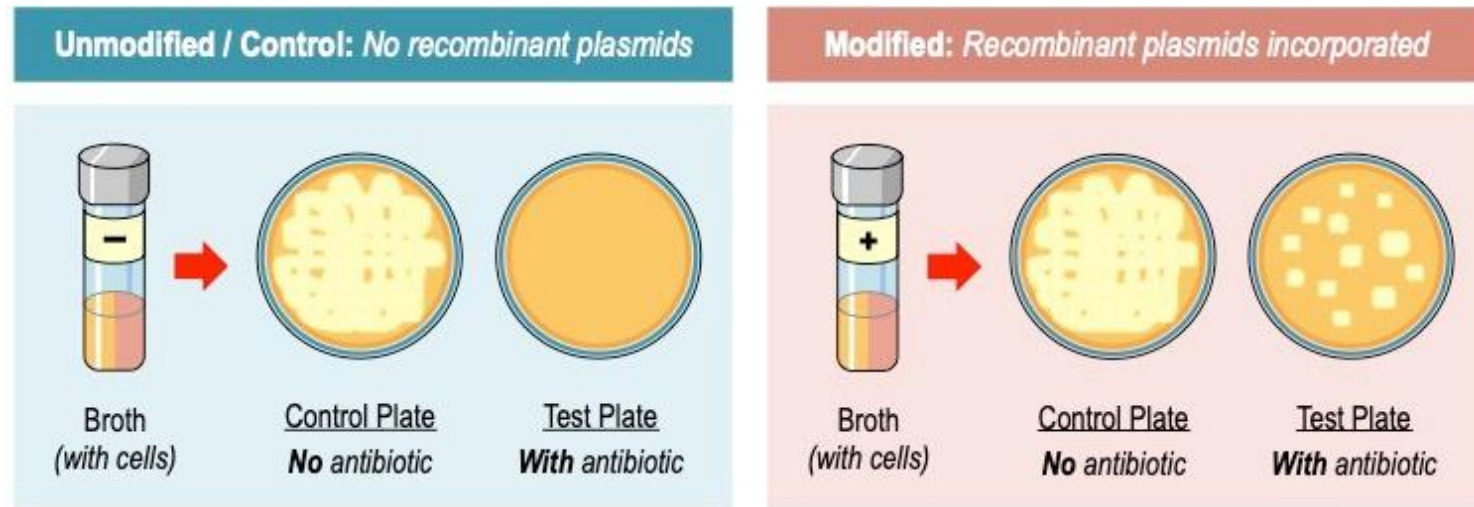
## pBR322 plasmídeo

Foi o primeiro plasmídeo artificial. Criado em 1977, o seu nome deriva de *p* e BR, Bolivar e Rodriguez, os criadores.

Comparado com vetores mais recentes, apresenta uma seleção menor de enzimas a linearizar e os resultados demoram mais a obter

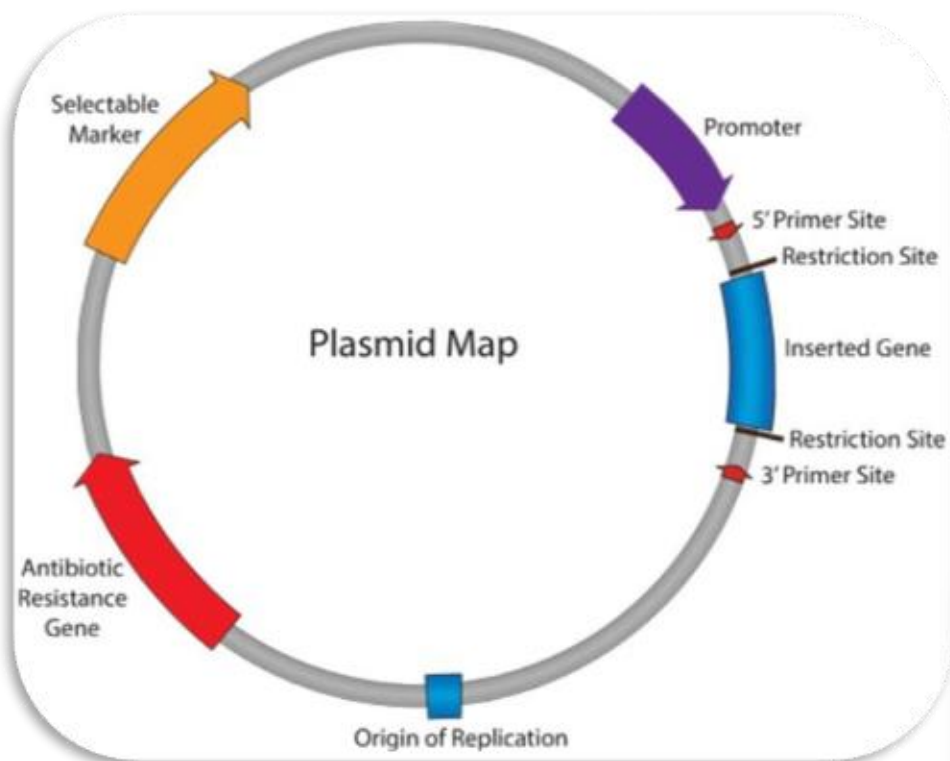


A seleção dos recombinantes é feita pela inativação de um gene de resistência a antibióticos (*Amp<sup>r</sup>*, *Tet<sup>r</sup>*).

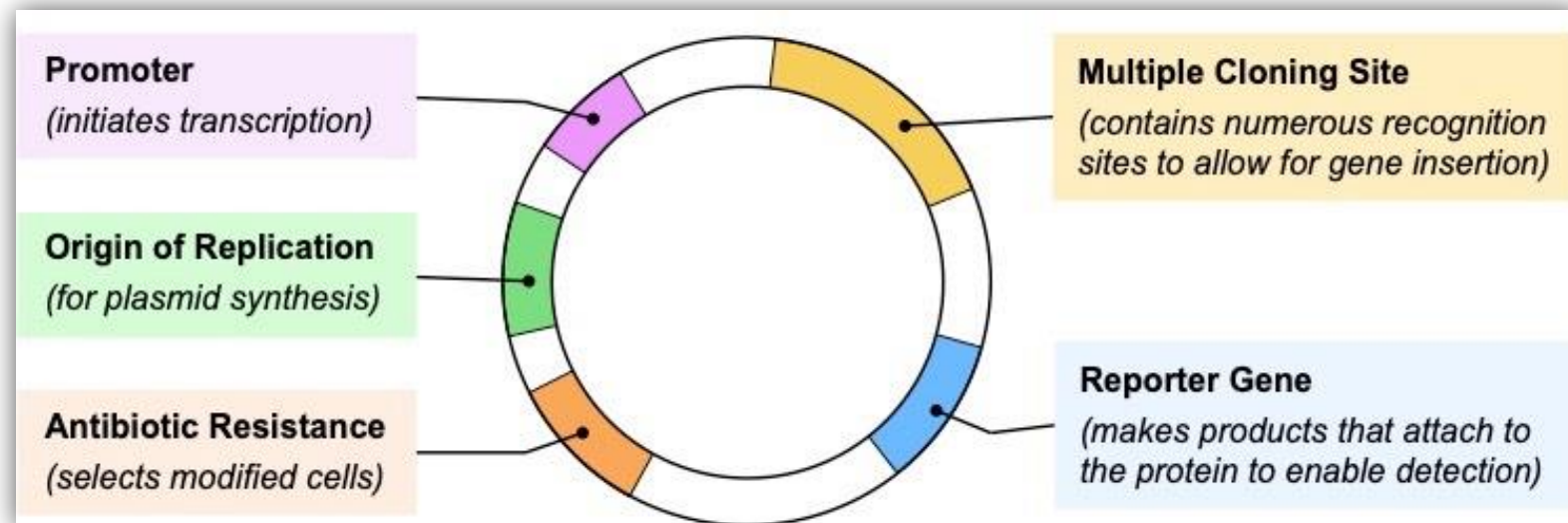
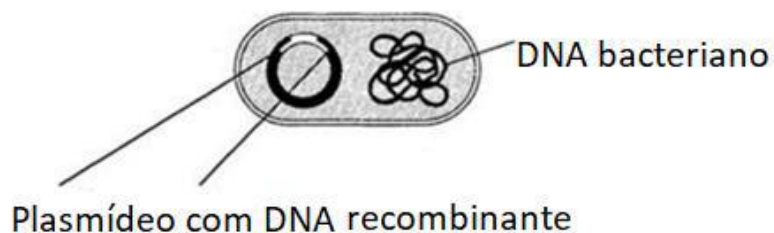


Only cells that are modified with the recombinant plasmid can grow on a medium containing antibiotic

# Plasmídeos usados como vetores de clonagem



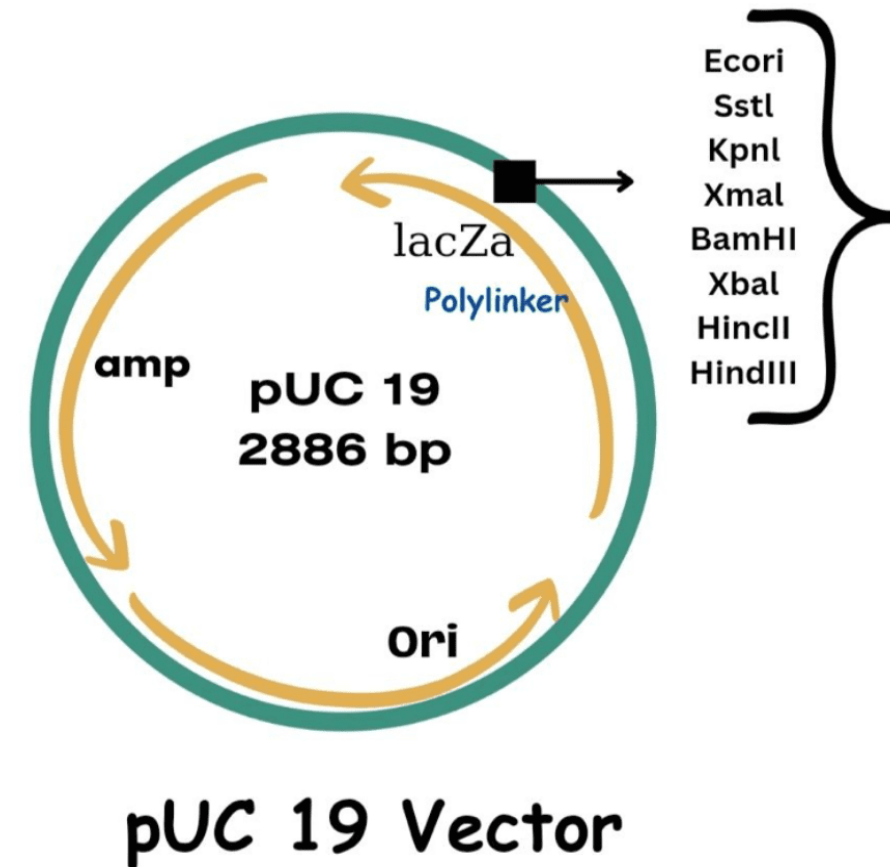
- uma fonte de replicação.
- um local de multi-clonagem.
- um marcador selecionável.
- Capacidade de autorreplicação produzindo múltiplas cópias.
- Ter uma massa molecular baixa.



## Plasmídeos usados como vetores de clonagem

p seguido das iniciais dos investigadores que o isolaram ou construíram.

- ✓ Exemplo: **pUC19** plasmídeo pUC19 desenvolvido por Joachim Messing e colegas.
- ✓ A designação "**pUC**" deriva do prefixo clássico "**p**" e da abreviatura de Universidade da Califórnia.
- ✓ O **pUC19** funciona por  **$\alpha$ -complementação**, tem um sítio de clonagem múltipla ("MCS" ou "Polylinker") dentro do gene *lacZ* e um gene de resistência à ampicilina (*Amp<sup>r</sup>*).
- ✓ Seleção de recombinantes (azul/branco) na presença de IPTG e X-gal, por inativação do gene *lacZa*\*



gene *lacZ $\alpha$*  ( $\alpha$ -fragmento, *lacZ*) que codifica a parte terminal da enzima  $\beta$ -galactosidase.

# “Gene de interesse-inserto”

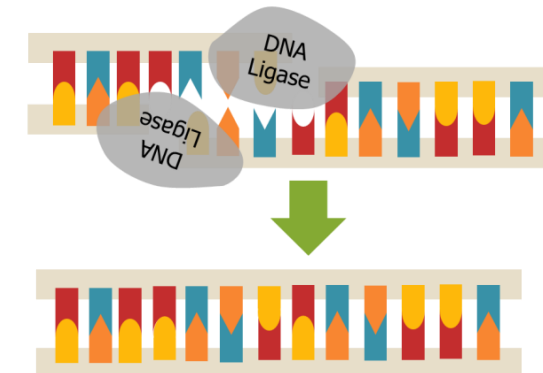
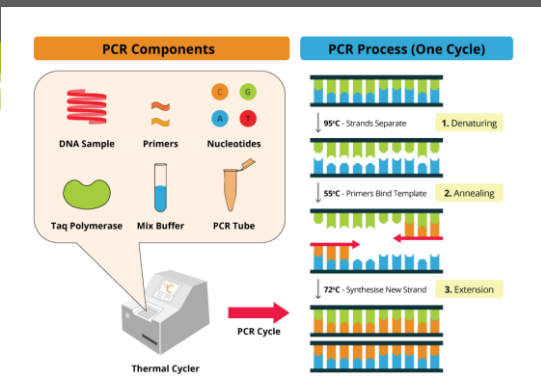
- PCR é frequentemente utilizada para amplificar o gene/fragmento de interesse.

## “cut and paste DNA”

Dois tipos de enzimas:

**Enzimas de restrição**- são endonucleases que reconhecem locais específicos (4-8 bp) de sequência de DNA (sítios de restrição) e clivam o DNA- **“Tesouras moleculares”**- corte do plasmídeo e o inserto (**Reação de Digestão**).

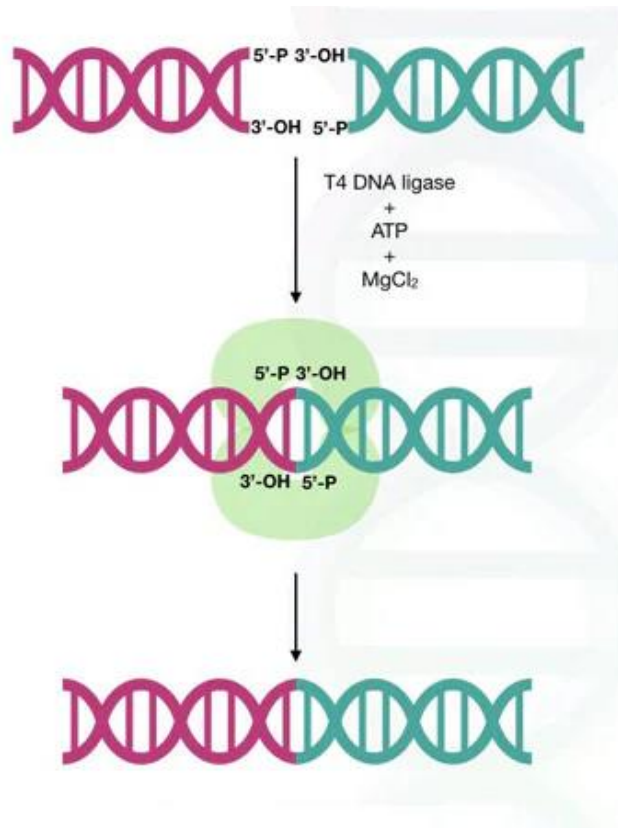
**DNA ligase**- É uma enzima que catalisa a ligação de cadeias de DNA para formar uma ligação fosfodiéster. Se dois fragmentos de DNA tiverem extremidades correspondentes, a ligase pode uni-los para formar uma única molécula de DNA intacta- **ligação do vetor ao inserto**





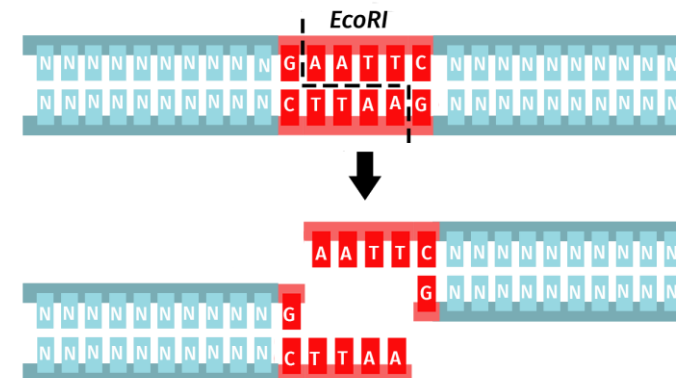
# DNA ligase

A DNA ligase une dois fragmentos de DNA formando uma ligação fosfodiéster entre eles, utilizando uma molécula de energia.



# Enzimas de restrição

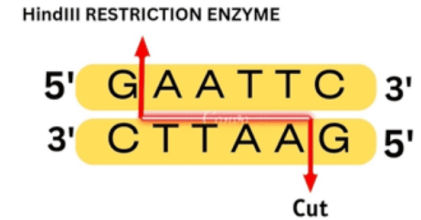
- As enzimas de restrição são enzimas que cortam o DNA.
- As enzimas de restrição protegem as bactérias das infecções virais.
- As endonucleases de restrição reconhecem uma sequência nucleotídica específica muito curta (geralmente de 4 ou 6 pares de bases) numa molécula de DNA de cadeia dupla, denominada **sítio de restrição**, e clivam o DNA nesse sítio de reconhecimento ou noutra local, dependendo do tipo de enzima.



# Enzimas de restrição (endonucleases)

Atualmente, foram identificadas mais de 800 enzimas de restrição de diferentes bactérias.

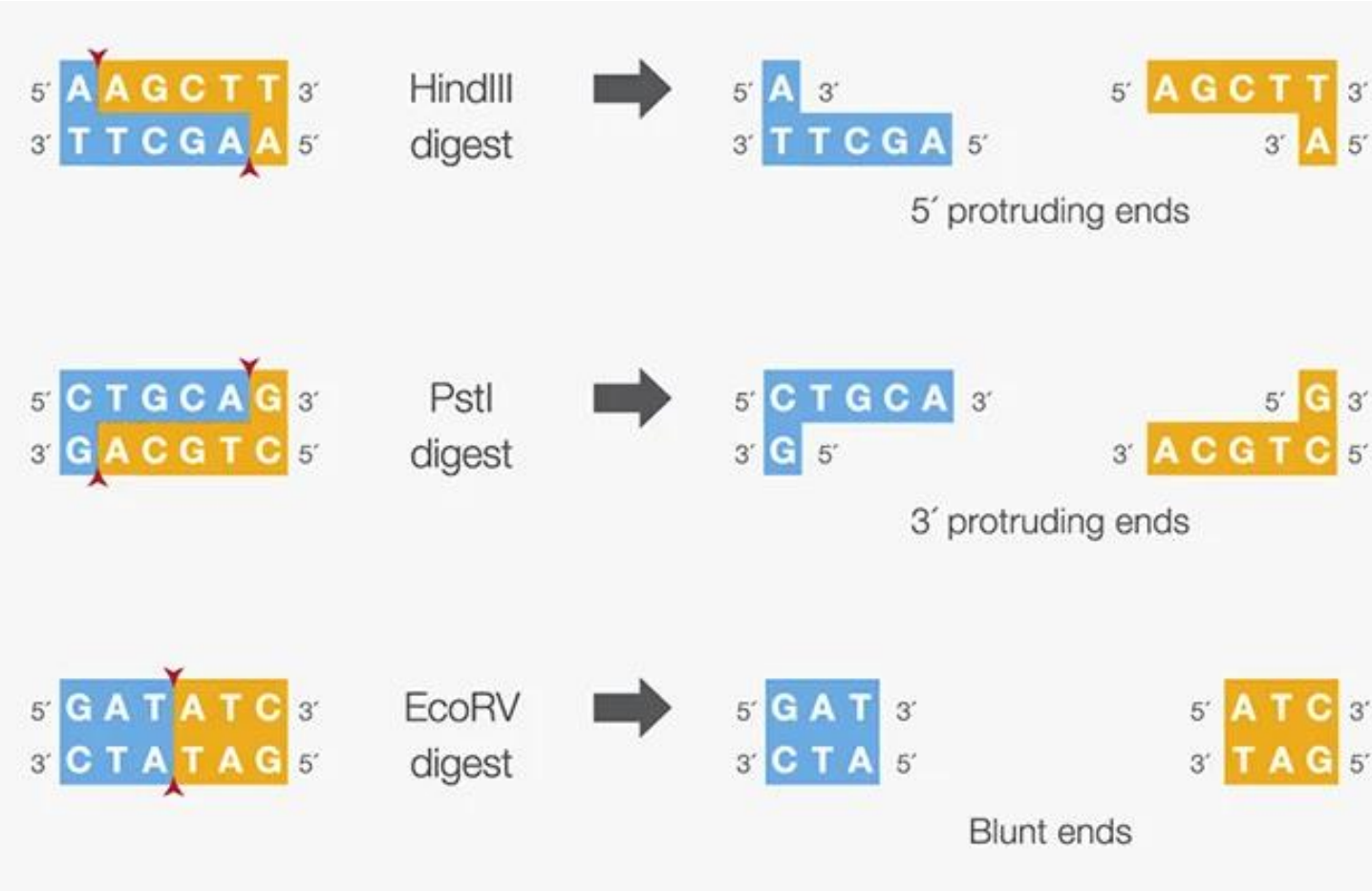
A maioria dos locais de restrição tem 4 a 8 pb, e a maioria é palindrômica, o que significa que a sequência é lida da mesma forma no sentido direto e inverso (5'-3' ou 3'-5').



As enzimas de restrição dividem-se em **4 tipos**:

- 1. Tipo I**, que reconhece sequências específicas de DNA, mas corta em locais aparentemente aleatórios que podem estar até 1000 pares de bases de distância do local de reconhecimento;
- 2. Tipo II**, que reconhece e corta diretamente no local de reconhecimento;- **Mais usadas**
- 3. Tipo III**, que reconhece sequências específicas, mas corta num sítio específico diferente, geralmente a cerca de 25 pares de bases do sítio de reconhecimento.
- 4. Tipo IV**: Estes têm como alvo específico e cortam DNA modificado ou metilado.

# Enzimas de restrição



## ✓ Overhangs (extremidade coesiva)

a enzima corta assimetricamente dentro do sítio de reconhecimento (quer pelas extremidades 5', como *HindIII*, quer pelas extremidades 3', como *PstI*)

## ✓ Blunt (extremidade cega)

A enzima (*EcoRV*) cortada em locais precisamente opostos nas duas cadeias de ADN gera extremidades retas sem saliências.

# ENZYMES IN RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY

## I. Nucleases

a) Restriction Endonucleases

b) Restriction Exonucleases

c) Ribonuclease H

## II. DNA Modifiers

a) DNA polymerase

b) Reverse transcriptase

c) Alkaline phosphatase

d) Polynucleotide kinase

e) Terminal nucleotidyl transferase

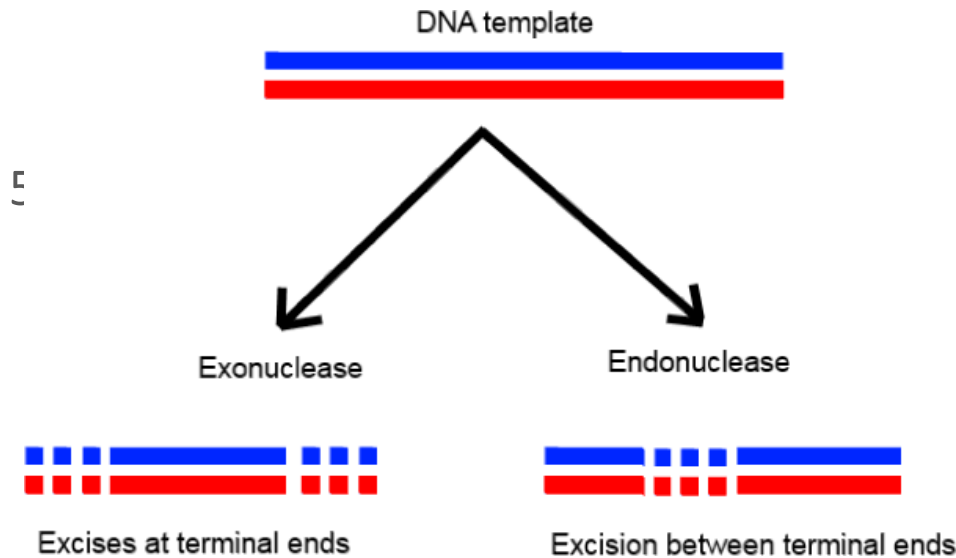
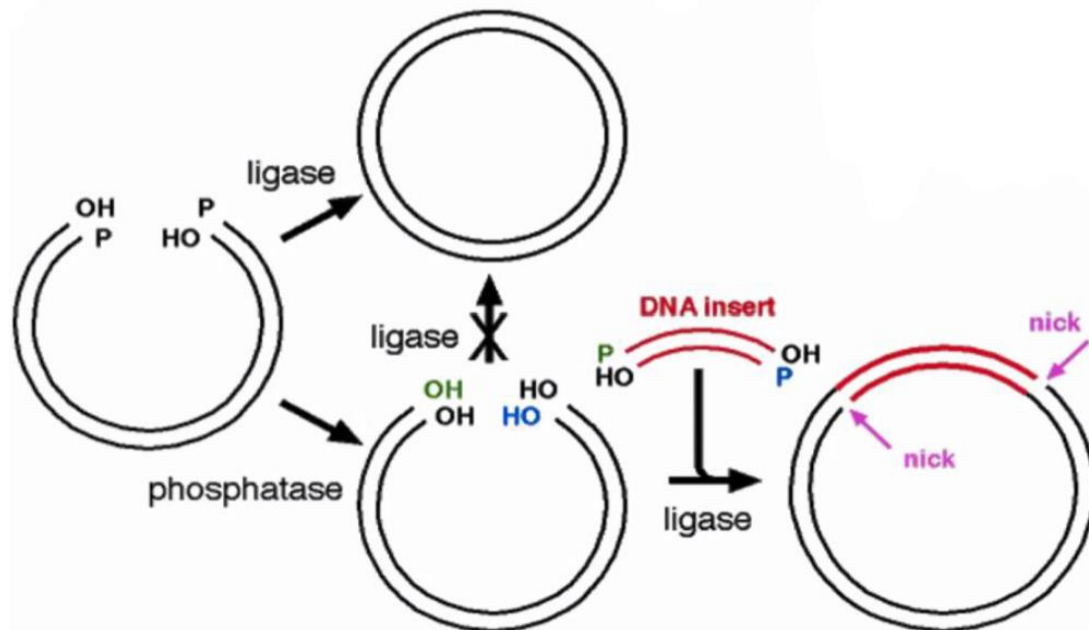
f) Methyl transferase

## III. DNA Ligases

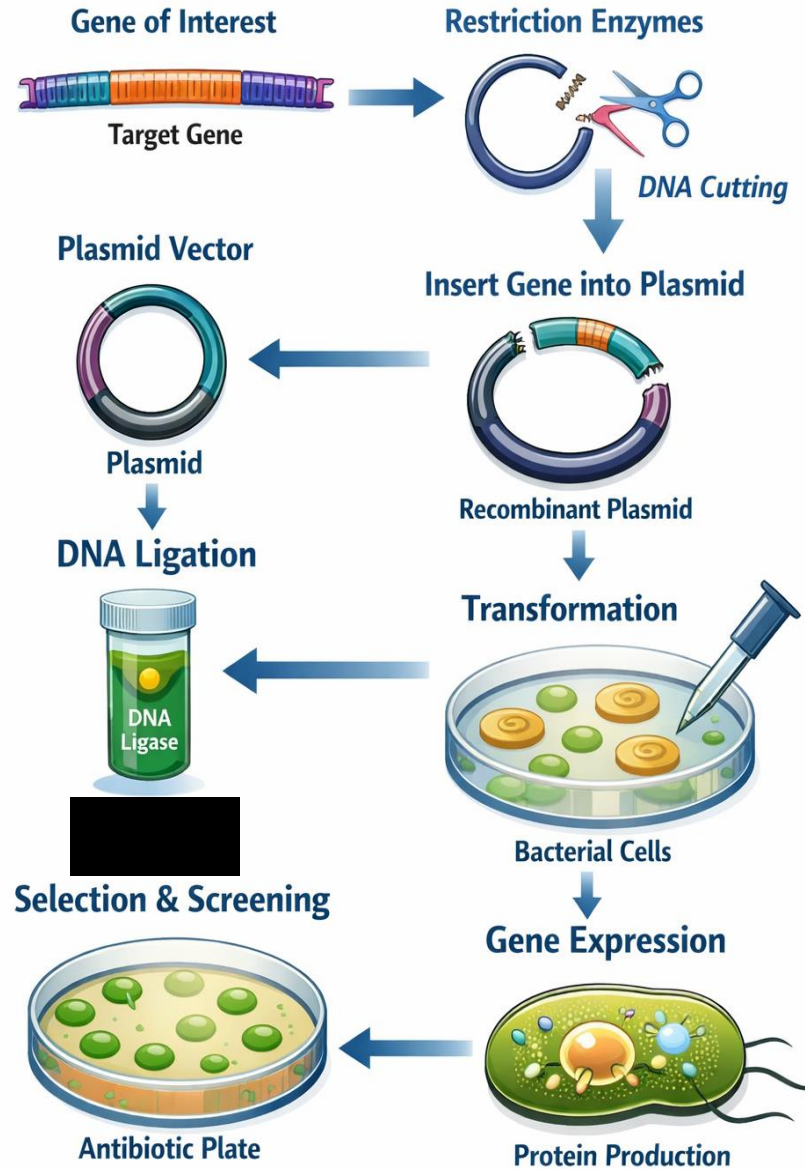
a) DNA ligase

# (Outras) Enzimas que modificam o DNA

- ✓ outras **endonucleases** não específicas (ex. *DNAse I*)
- ✓ **exonucleases** - degradam as extremidades das moléculas de DNA.
- ✓ **Fosfatase alcalina** - remove os grupos fosfato das extremidades 5' que o vetor se auto-ligue (desfosforilação impede a auto-ligação).



# Passos da clonagem molecular

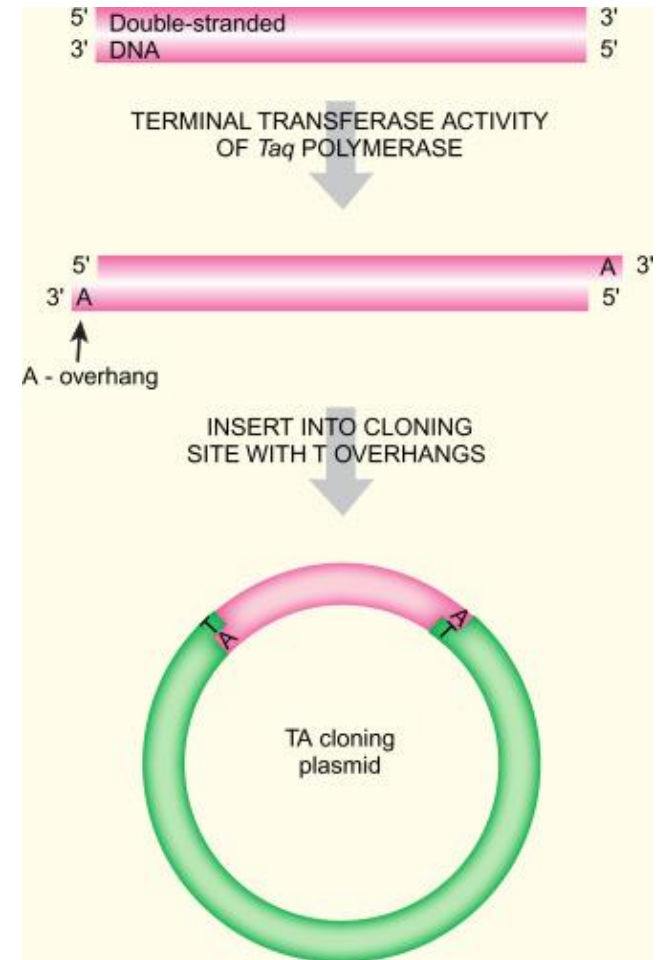
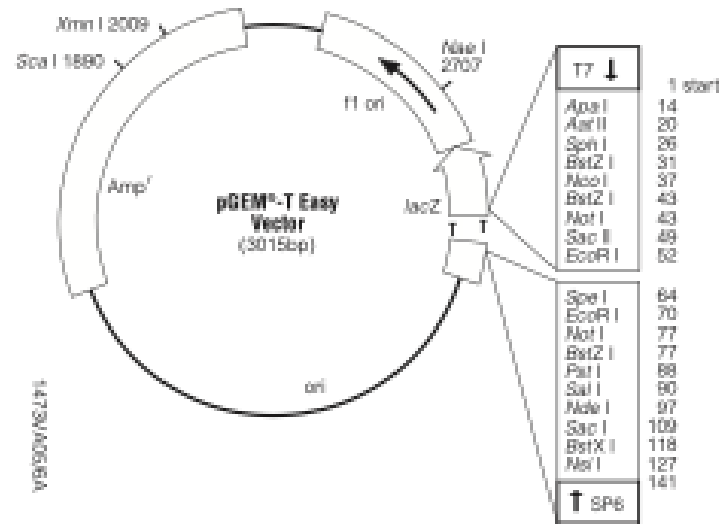


# Sistema de clonagem por vetor pGEM-T Easy®

Utiliza uma técnica conhecida como **clonagem TA**, que aproveita a atividade terminal de transferase de certas DNA polimerases, como a *Taq* DNA polimerase, que adiciona uma única saliência de 3'-adenina (A) aos fragmentos amplificados.

## Mapa vetor

Permite a utilização de enzimas de restrição (locais de reconhecimento) ou técnica de PCR para avaliação da eficácia da clonagem



# Transformação e seleção de recombinantes

## Transformação

Plasmídeos podem ser introduzidos em bactérias, como *E. coli*, num processo chamado **transformação**.



Durante a transformação, células bacterianas especialmente preparadas (competentes) conseguem absorver DNA recombinante.



## Seleção recombinantes

A **seleção** é normalmente feita pela resistência ao antibiótico devido à presença de genes de resistência na sequência dos plasmídeos.



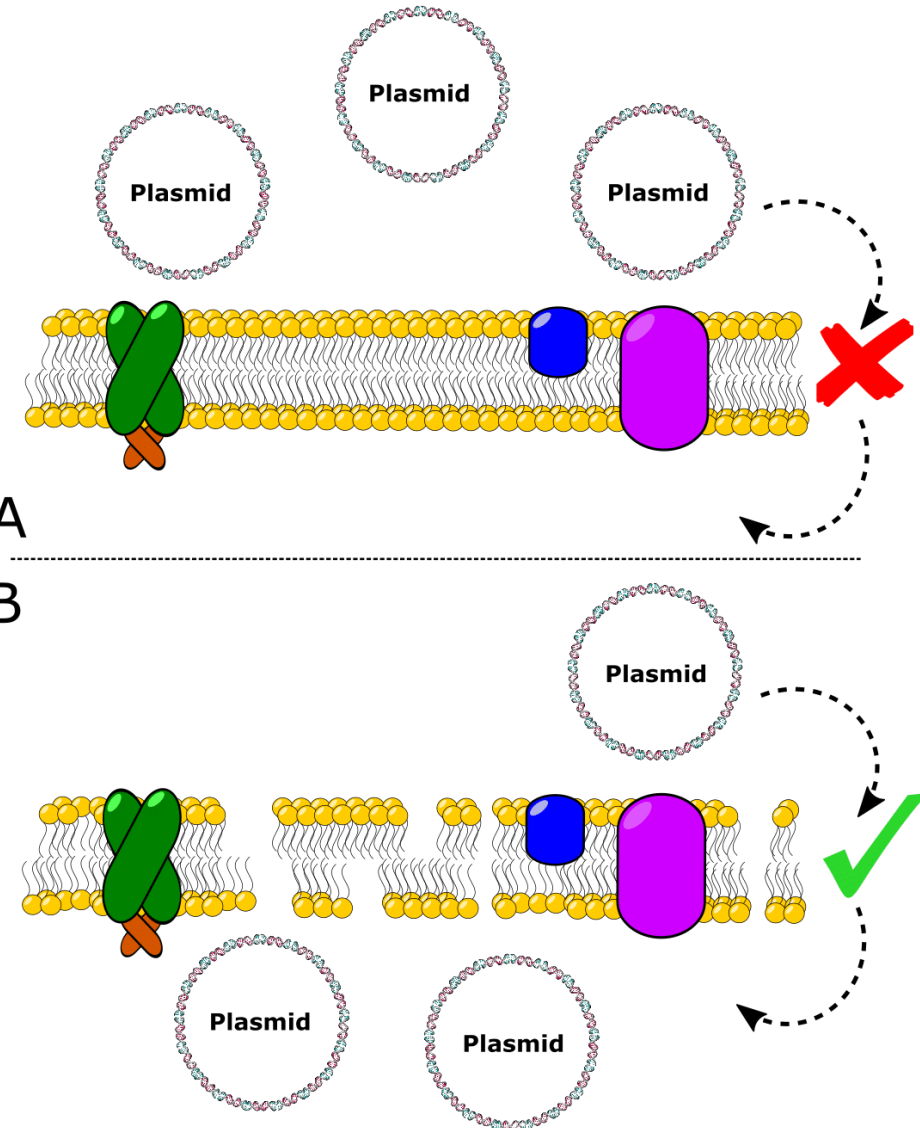
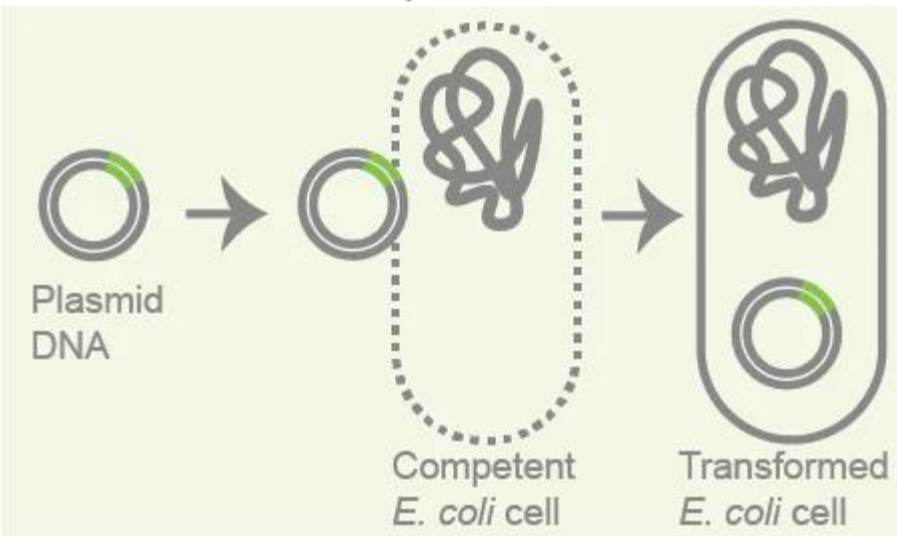
Bactérias transformadas (com o plasmídeo) podem ser selecionadas em placas de meio seletivo, que contenham o antibiótico.

# Transformação das bactérias

Plasmídeos com o DNA recombinante podem ser introduzidos em bactérias, como a *E. coli*, num processo chamado transformação.

Durante a transformação, as células bacterianas especialmente preparadas (competentes) são capazes de absorver o DNA recombinante

Transformation Step

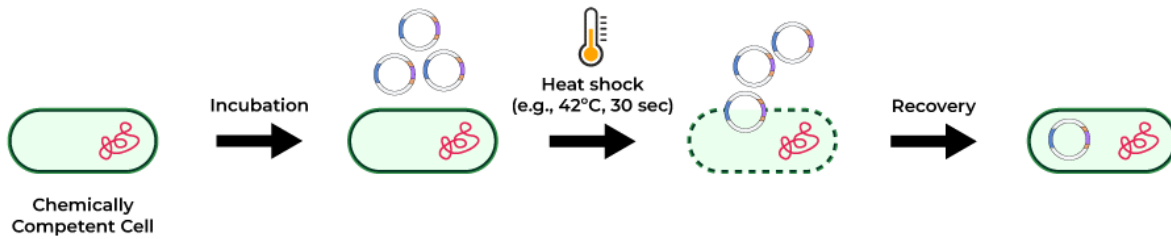


# Tipos de transformação

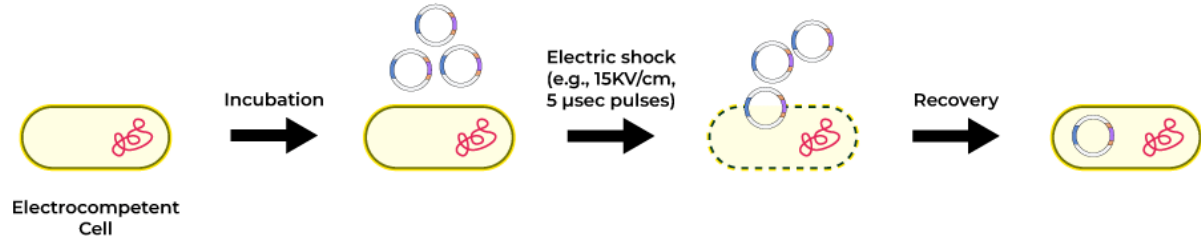
## 1) Transformação por choque térmico

## 2) Transformação por eletroporação (choque elétrico)

### Chemical Transformation



### Electroporation



tratamento das células com  $\text{CaCl}_2$  frio, seguido de choque térmico (ex. 42°C, 90 s).

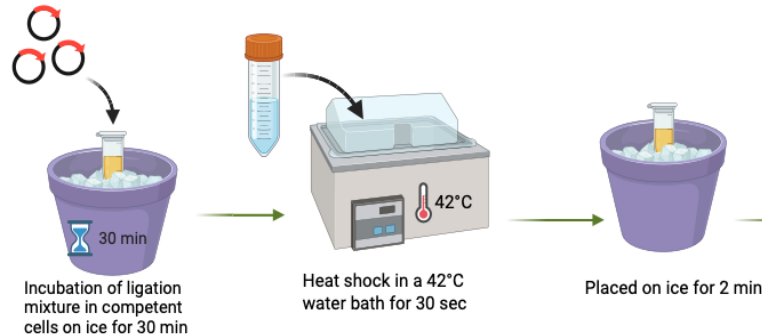
permeabilização momentânea da parede celular através da aplicação de impulsos elétricos

### Eficiência de transformação:

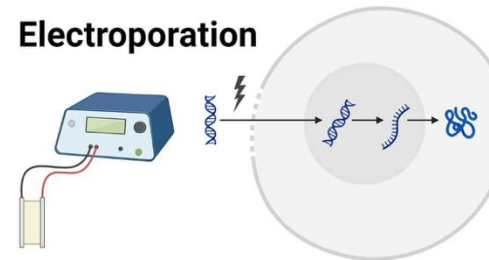
$(n^\circ \text{ de transformantes}/\mu\text{g de DNA}) \approx 10^7 \text{ cfu.c}/\mu\text{g DNA}$ .

### Eficiência de transformação:

$(n^\circ \text{ de transformantes}/\mu\text{g de DNA}) \approx 10^{10} \text{ u.f.c}/\mu\text{g DNA}$ .



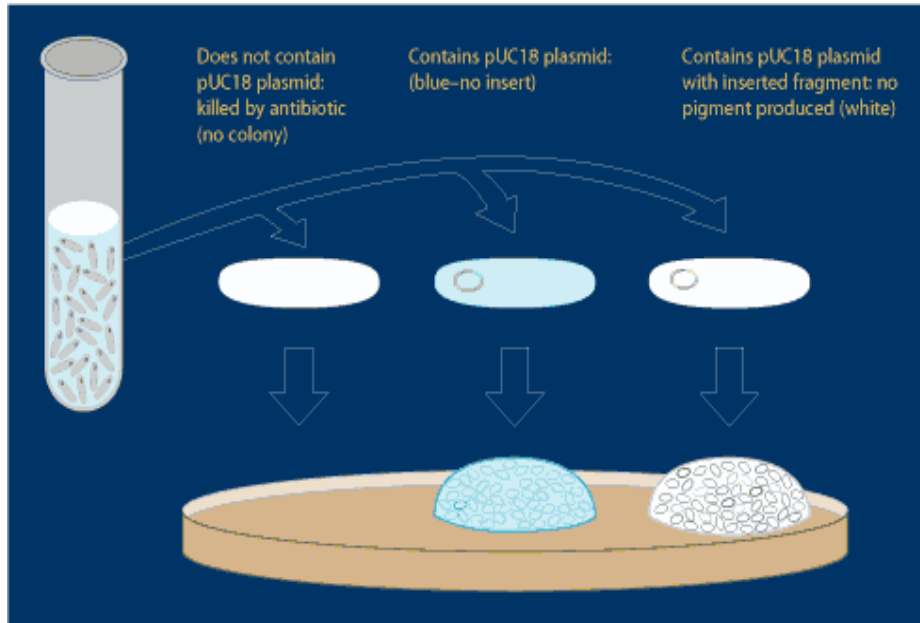
### Electroporation



Exemplo de condições para *E. coli*:

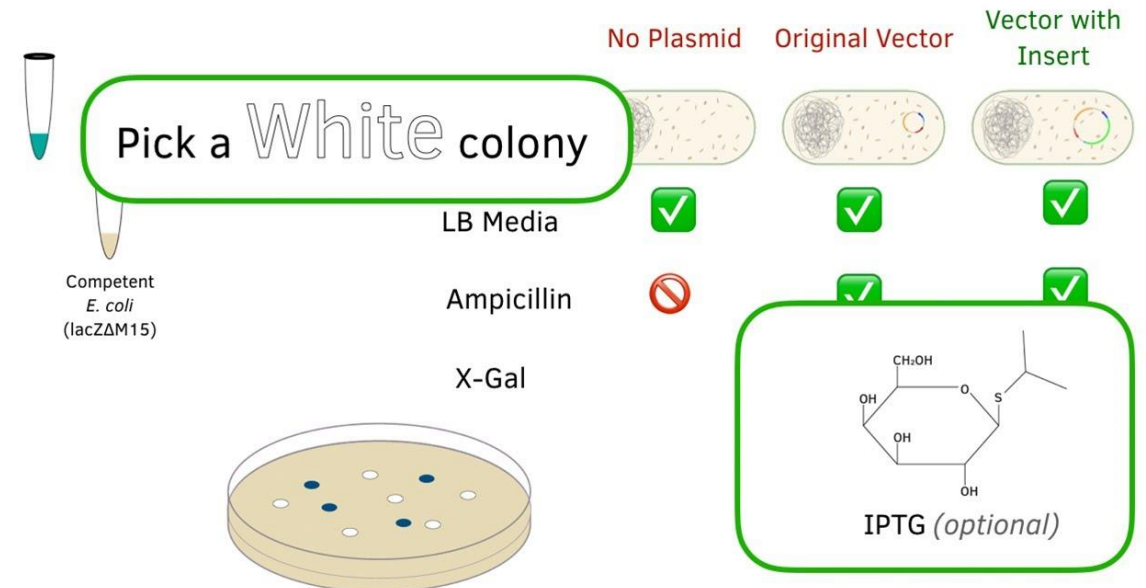
- Campo elétrico: 12,5 kV/cm
- Duração de impulso: 4 a 4,5 ms
- Capacitância: 25 µF
- Resistência: 200 Ω

# Seleção de transformantes: seleção azul/branca

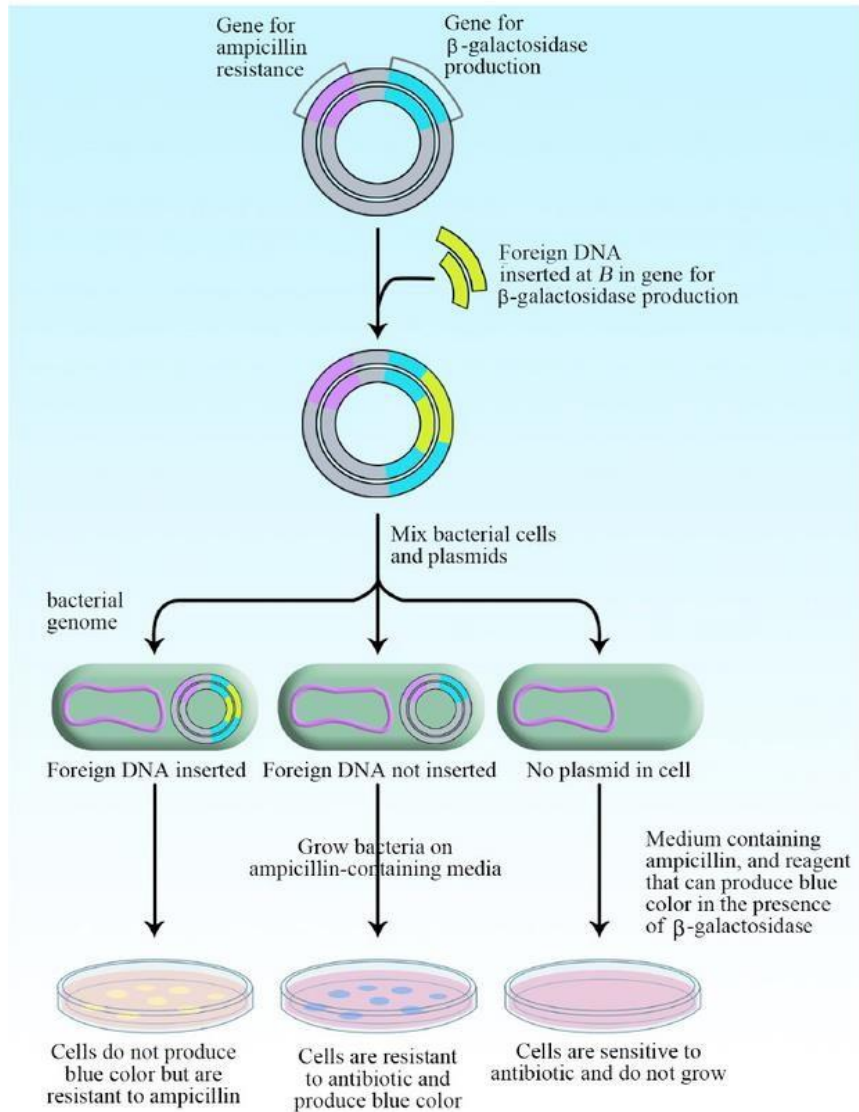


Para distinguir transformantes não recombinantes de recombinantes a "seleção de lacZ" (também chamada de **complementação  $\alpha$** ). É usada com o vetor contendo o gene *lacZ*.

As bactérias a selecionar são as brancas, cujo operon *lacZ* foi interrompido devido a inserção do fragmento de DNA.



# Seleção de transformantes: seleção azul/branca

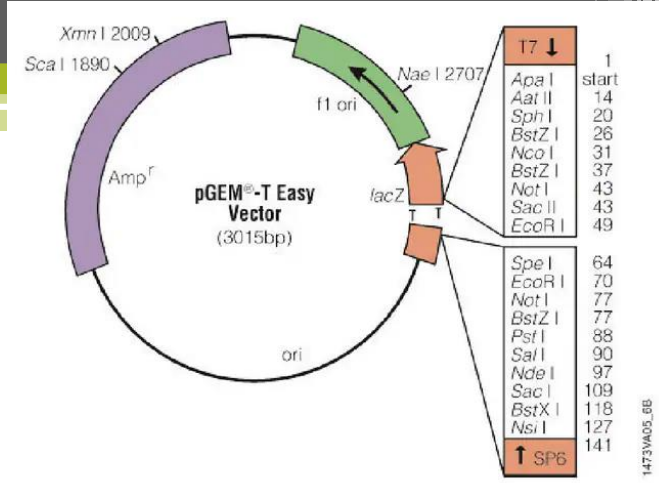


Na **seleção azul/branco**, o meio de cultura é suplementado com IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo), um indutor da expressão proteica de genes sob control do operador *lacZ*, que codifica o  $\alpha$ -peptido da  $\beta$ -galactosidase.

**X-gal**- Fica azul quando clivado pela  $\beta$ -galactosidase funcional.

Os vários locais de clonagem permanecem na região de codificação. Se a região *lacZ* não for interrompida pelo DNA inserido, a porção da  $\beta$ -galactosidase é sintetizada. Quando presente, a enzima  $\beta$ -galactosidase catalisa a hidrólise de X-gal, convertendo o substrato incolor num produto de cor azul.

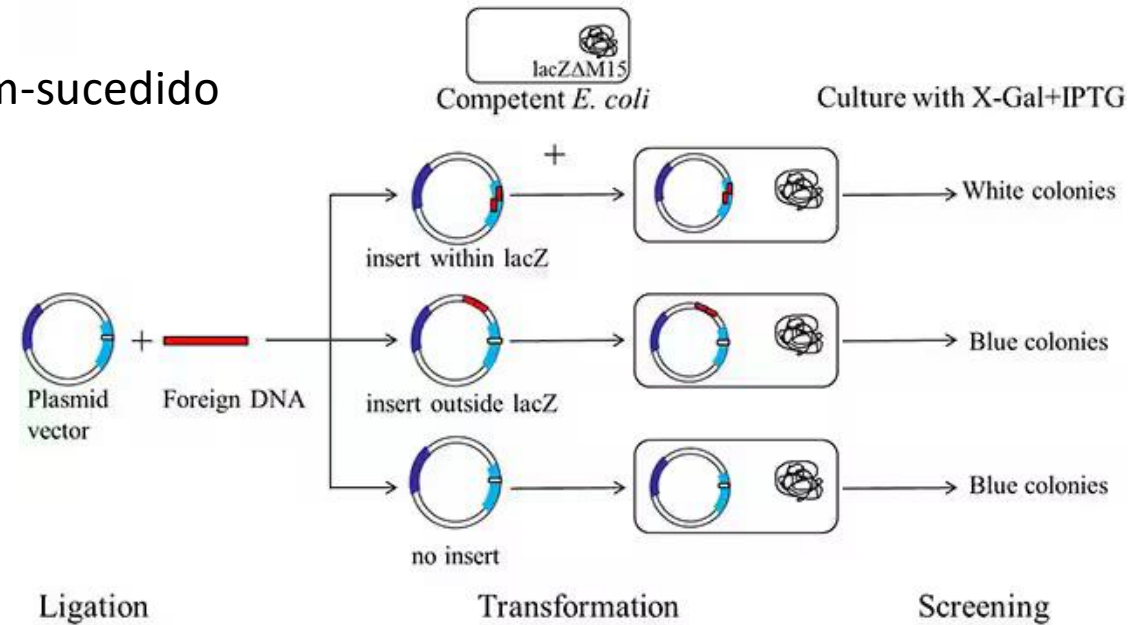
# Seleção de transformantes: seleção azul/branca



Esta seleção de transformantes baseia-se na funcionalidade do gene *lacZ*, que codifica a  $\beta$ -galactosidase, uma enzima que quebra o X-Gal colocado no meio seletivo.

**Colônias azuis** indicam um gene *lacZ* funcional (sem inserto)

**Colônias brancas** indicam o gene *lacZ* inativado (recombinante bem-sucedido com inserto).



# Seleção de transformantes: seleção positiva

Alguns plasmídeos permitem selecionar diretamente os recombinantes.

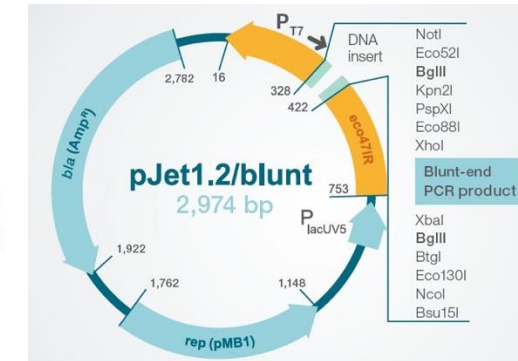
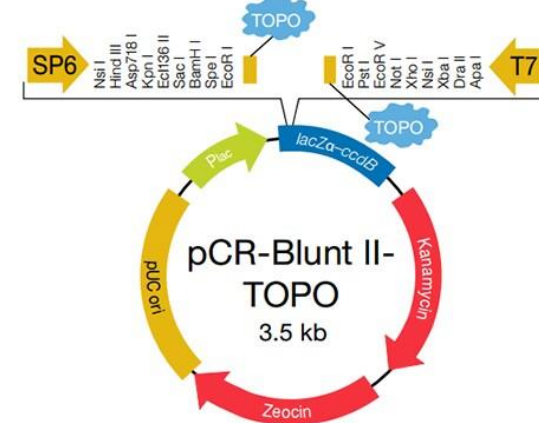
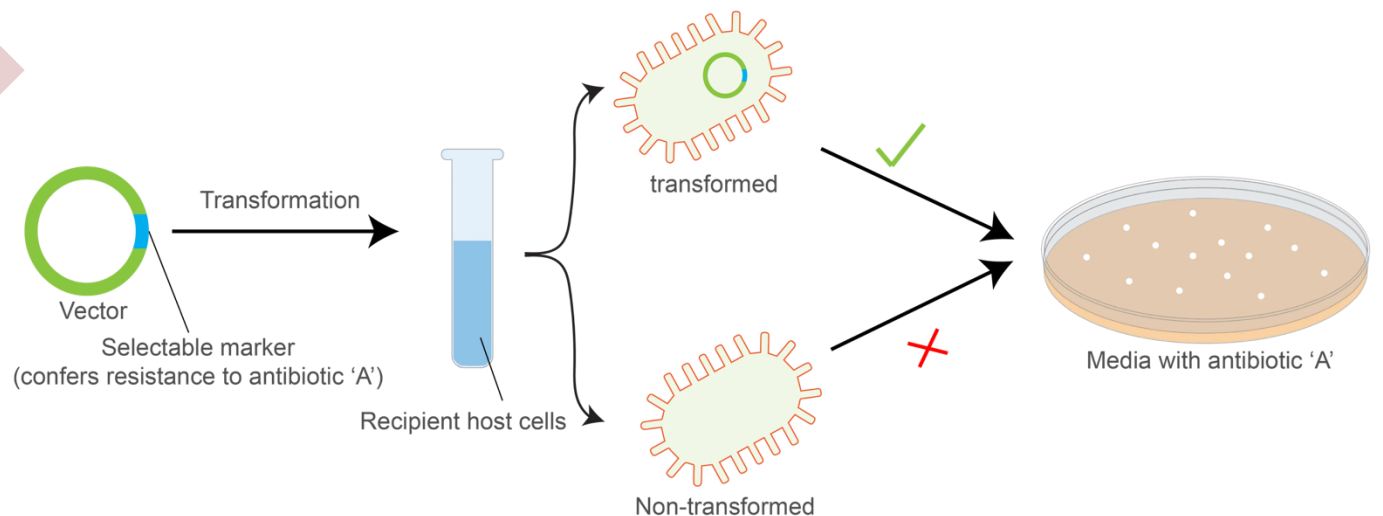
Esses plasmídeos contêm um gene de *E. coli* letal (e.g. *ccdB*, *Eco47I*)

1. Uma vez que a inserção do fragmento interrompe o gene *ccdB* que se encontra fundido com o terminal C do *lacZ*, o processo letal deixa de ocorrer.

2. A ligação de um produto de PCR interrompe a expressão do gene *lacZ-ccdB*

3. Esta fusão permite o crescimento apenas de recombinantes positivos após a transformação em células de *E. coli*.

4. As células que não contêm o vetor recombinante morrem após a transformação com o plasmídeo contendo o DNA recombinante.



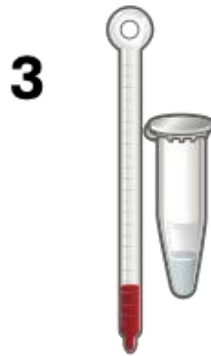
# Passos da Clonagem molecular por pGEM-T EASY



**1**  
Reação de ligação  
(vetor+ produto de PCR)



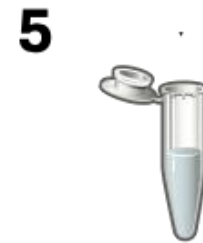
**2**  
Colocar células  
competentes no  
gelo e junta as  
reação de  
ligação



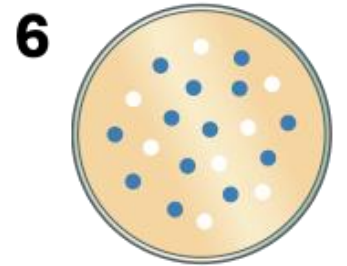
**3**  
Choque térmico a  
42°C 45-50 segs



**4**  
Incubar no gelo 2  
mins



**5**  
Adicionar meio SOC  
Incubar a 37°C



**6**  
Plaquear em meio seletivo.  
Seleção de transformantes  
(colónias brancas)

# Como Calcular a Eficiência de Transformação?

A eficiência é expressa em unidades formadoras de colónia (ufc ou *cfu*) por micrograma ( $\mu\text{g}$ ) de DNA plasmídico utilizado.

$$TE \text{ (cfu}/\mu\text{g)} = \frac{\text{Número de colónias (cfu)}}{\text{Quantidade de DNA plaqueado (}\mu\text{g)}}$$

Dados para cálculo:

Exemplo: 1ng = 0.001 $\mu\text{g}$  (10ng= 0.001  $\mu\text{g}$ )

**Colónias:** Contagem de transformantes na placa.

**Quantidade de DNA ( $\mu\text{g}$ ):**

Volume DNA usado ( $\mu\text{l}$ )  $\times$  Concentração( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )

**Fator de Diluição/Plaqueamento:** Se apenas uma parte da mistura de transformação for placada, o resultado deve ser multiplicado pelo volume total transformado dividido pelo volume de células transformadas colocadas nas placas de meio seletivo.

**Exemplo de cálculo (based on Promega protocol):**

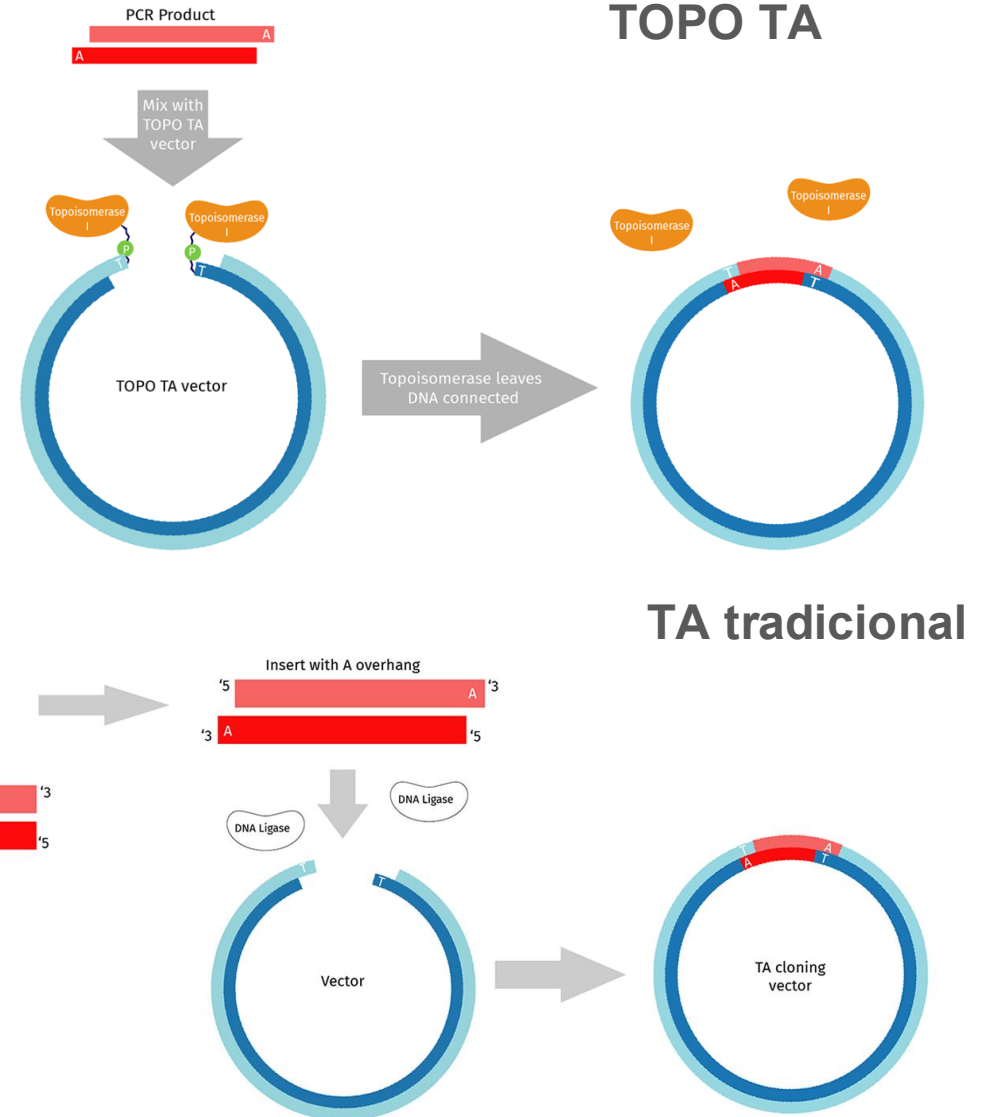
- Transforme 1 ng (0,001 $\mu\text{g}$ ) de ADN.
- Adicionar meio SOC de 950 $\mu\text{L}$  (volume total = 1000 $\mu\text{L}$ )
- Placa 100 $\mu\text{L}$  (uma diluição 1:10 da mistura total).
- Colónias de contagem (ex. 200).
- Calcular:

$$\text{DNA plaqueado} = 0.001\mu\text{g} \times \frac{100\mu\text{L}}{1000\mu\text{L}} = 0.0001\mu\text{g}.$$

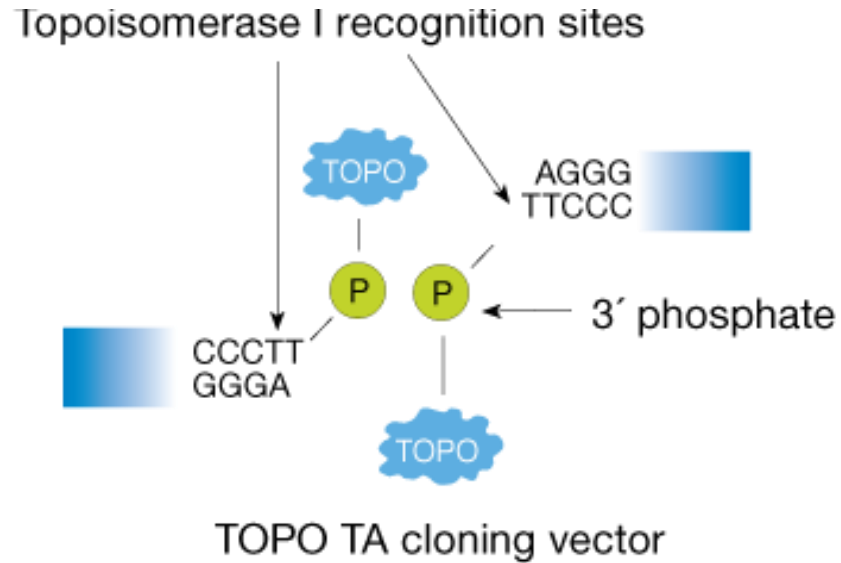
$$TE = \frac{200\text{cfu}}{0.0001\mu\text{g}} = 2 \times 10^6 \text{cfu}/\mu\text{g}.$$

# Outras estratégias de clonagem: clonagem sem ligase (Topoisomerase)

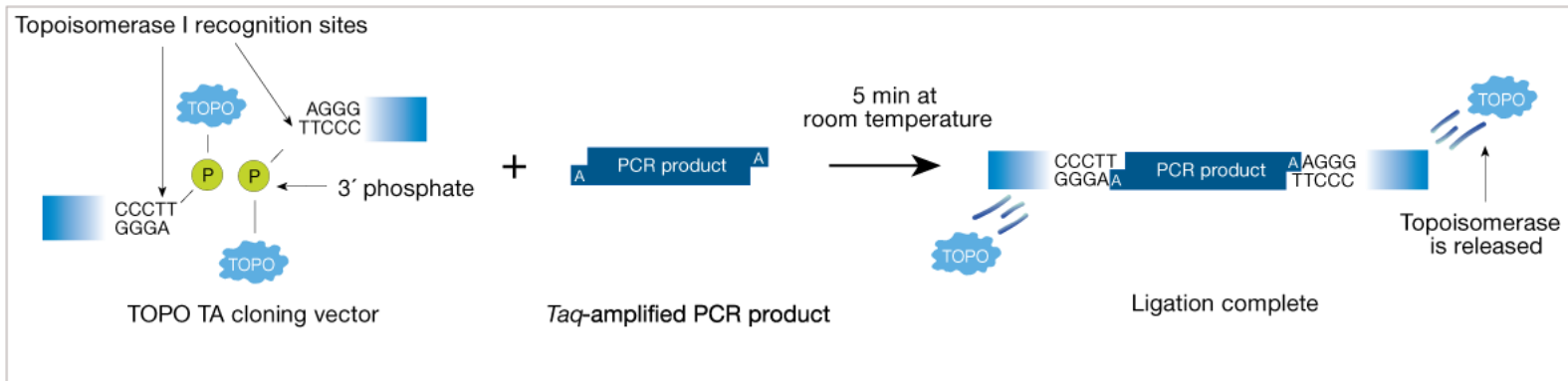
- A clonagem TOPO TA é uma clonagem sem reações de ligação ou restrição.
- O método tradicional de clonagem TA requer uma etapa de ligação para unir o vetor com o gene de interesse.
- Enzima DNA topoisomerase I, funciona tanto como uma enzima de restrição como uma DNA ligase.



# Cloning sem DNA ligase (Topoisomerase)



A topoisomerase I do vírus *Vaccinia* reconhece especificamente a sequência pentamérica 5'-(C/T) CCTT-3' e forma uma ligação covalente com o grupo fosfato ligado à 3'-T. Dessa forma então re-liga as extremidades da cadeia clivada e liberta-se da enzima.



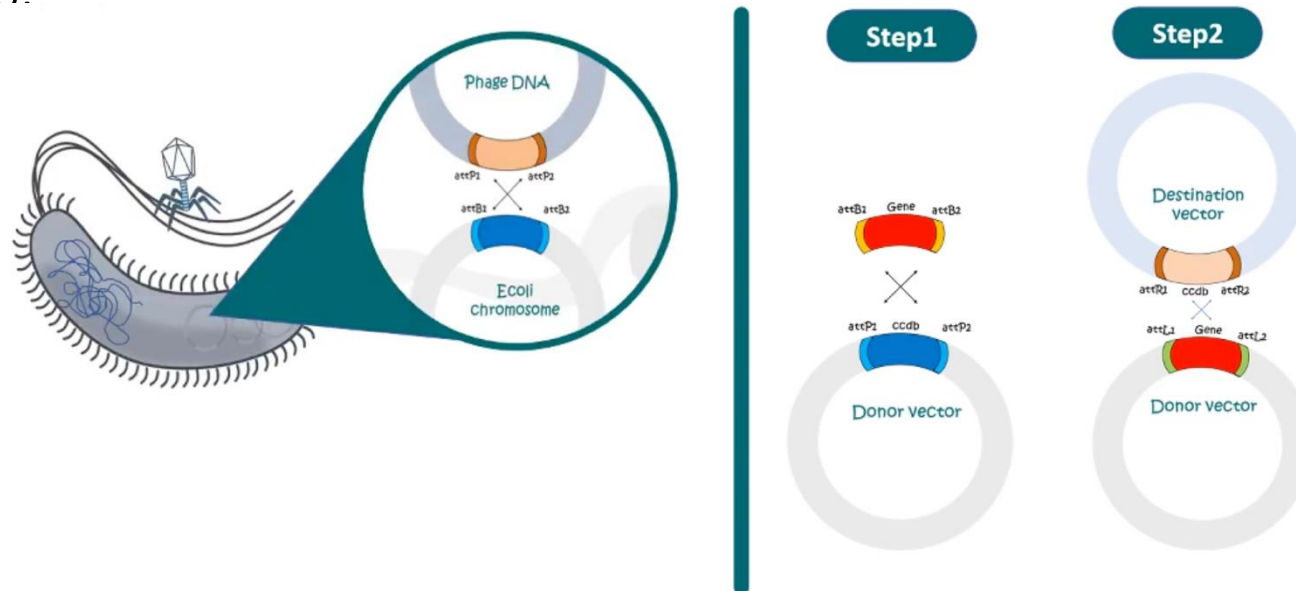
Os vetores ligam-se facilmente a sequências de DNA com extremidades compatíveis (A ligação está completa em apenas 5 minutos à temperatura ambiente).

# SISTEMA GATEWAY

## Mecanismo de Clonagem Gateway®

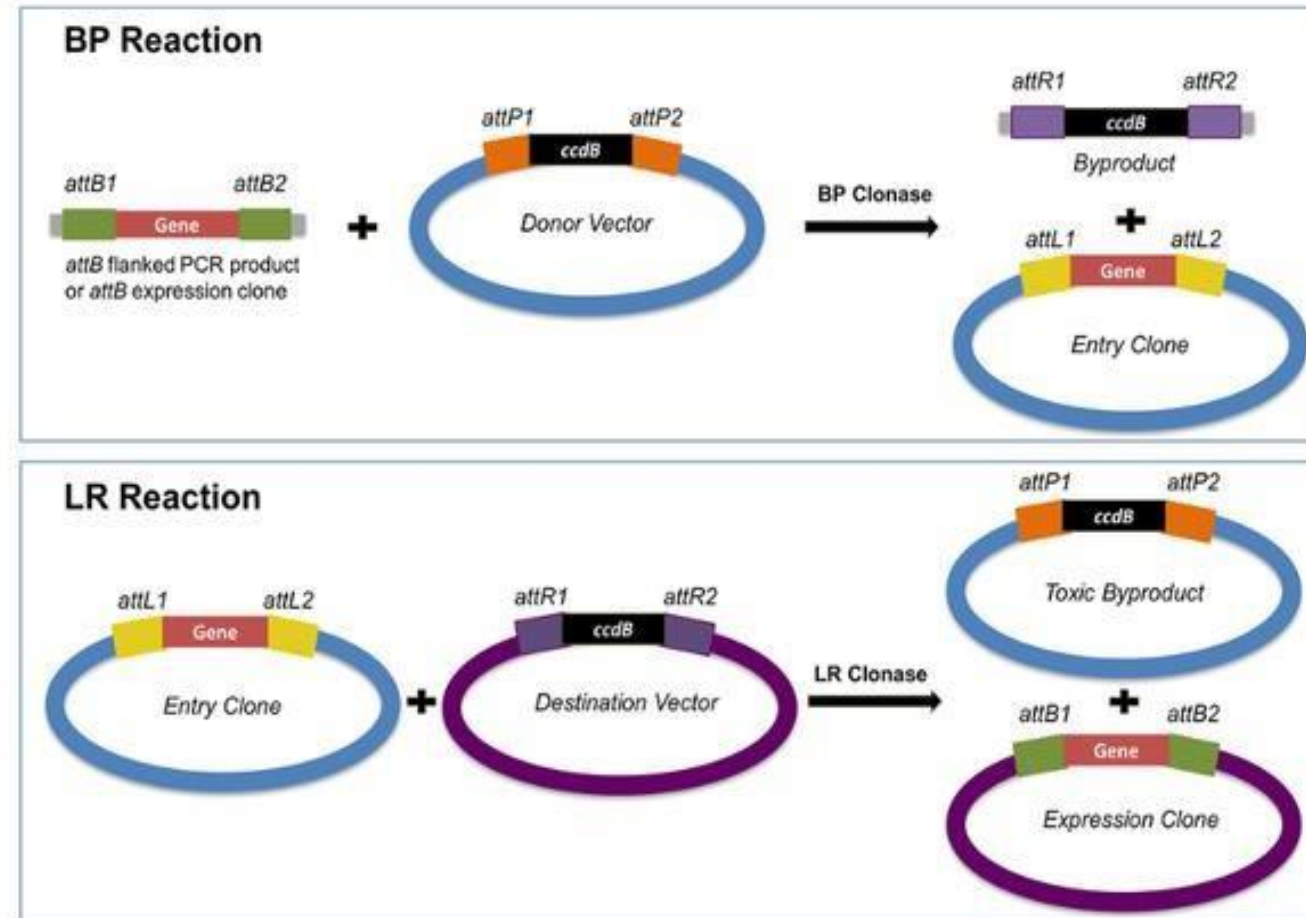
A Clonagem Gateway é um sistema de recombinação site-specific desenvolvido pela Invitrogen/Thermo Fisher, baseado no sistema de recombinação de fagos lambda (integrase  $\lambda$ ).

Permite a transferência de fragmentos de DNA entre vetores sem o uso de enzimas de restrição e ligases. Isto torna a clonagem mais rápida, eficiente e menos propensa a erros.



# Gateway

- A tecnologia de clonagem Gateway baseia-se no sistema de recombinação *site-specific* usado pelo *Phage I* para integrar o seu DNA em *E. coli*.
- Neste método, são usados primers específicos para inserir sequências genéticas específicas em ambos os lados do gene desejado por PCR.
- Processo em duas etapas, utilizando duas enzimas: **BP clonase** e **LR clonase**.
- O gene de interesse, flaqueado por sítios específicos, é primeiro clonado num vetor de entrada com sítios específicos a flanquear de ambos os lados, utilizando a **BP Clonase**.
- Este clone de entrada é usado para transferir o gene para um vetor de expressão flaqueado pelo sítio *attR*, utilizando **LR Clonase**.



# GATEWAY

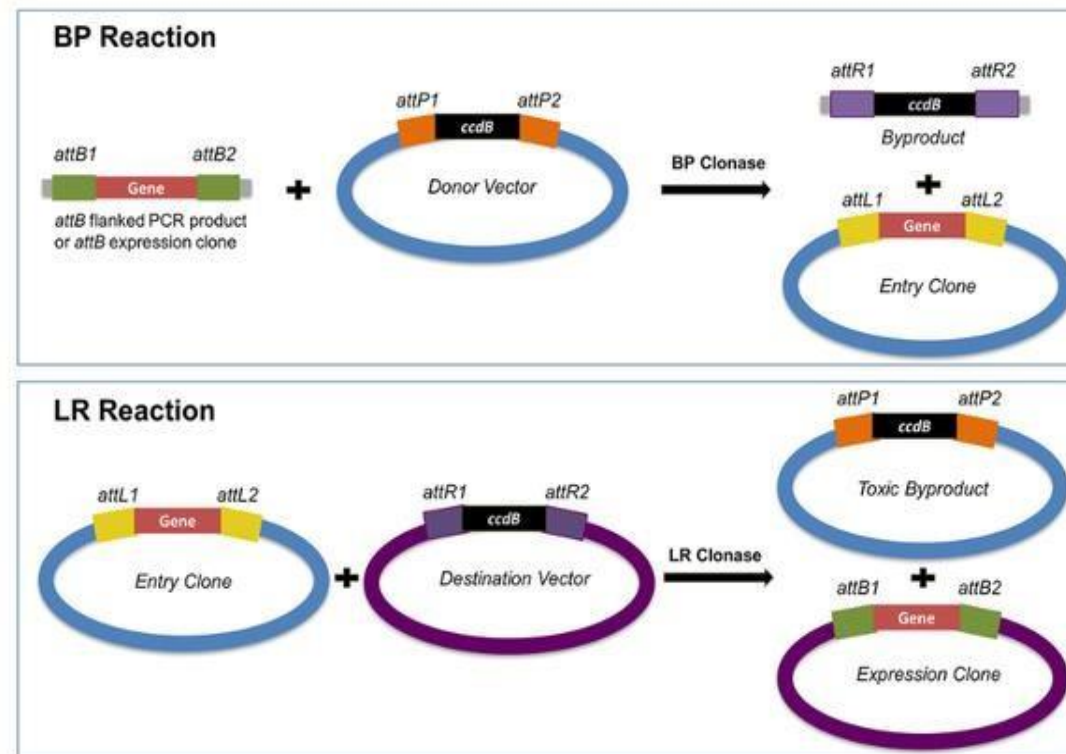
**Reação BP:** A recombinação entre os sítios *attB* e *attP* é catalisada pela mistura enzimática BP Clonase, produzindo o clone de entrada com sítios *attL* a flanquear o fragmento de DNA.

Esta reação é catalisada pela mistura de **enzimas Gateway® BP Clonase® II**.

**Reação LR:** Facilita a recombinação de um substrato *attL* (clone de entrada- entry clone) com um substrato *attR* (vetor de destino), resultando um clone de expressando (com *attB*).

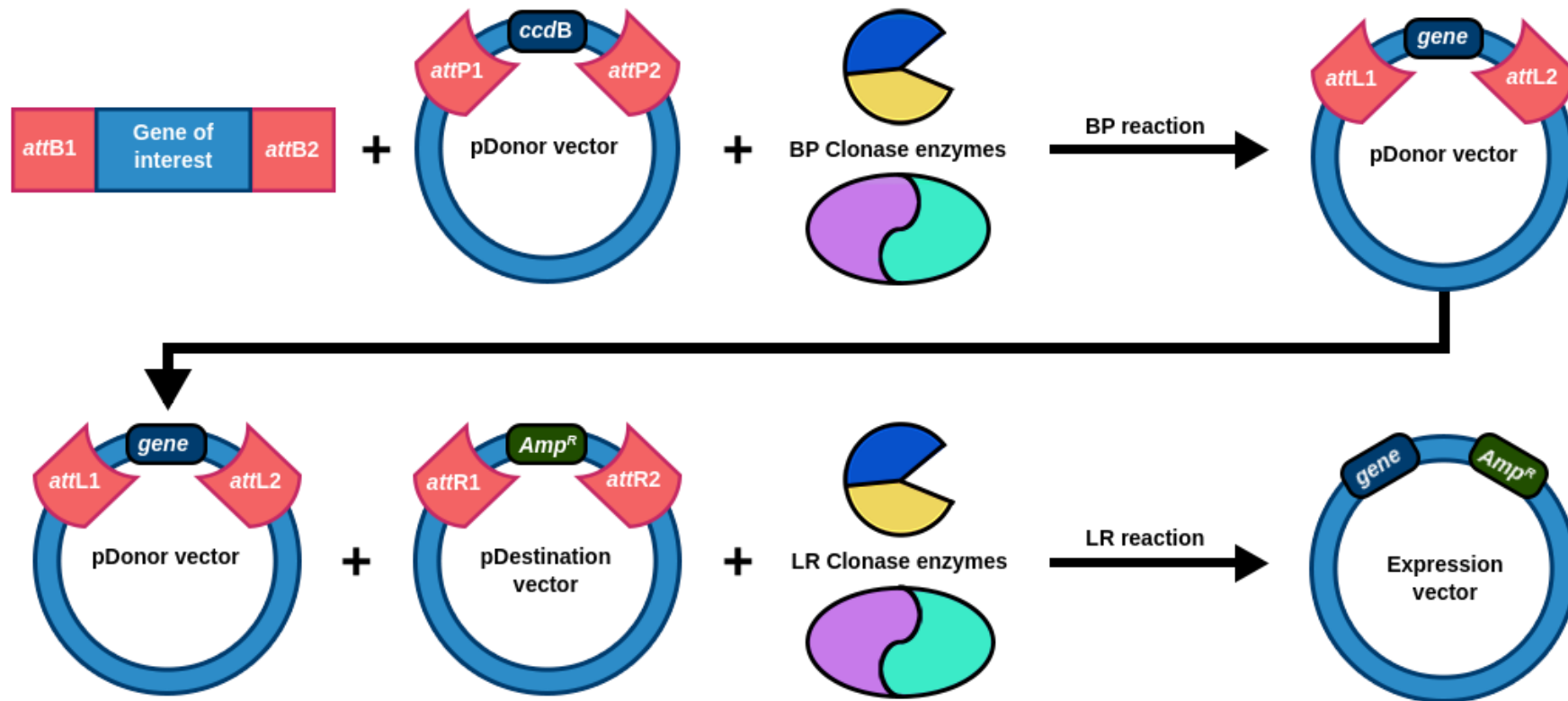
Esta reação é catalisada pela mistura de **de enzimas Gateway® LR Clonase® II**.

Dois locais de recombinação:  
***attB*** – fragmento DNA (gene de interesse)  
***attP*** – vetor doador



**Clone de expressão com o DNA pronto para transcrição e tradução.**

## Gateway technique workflow

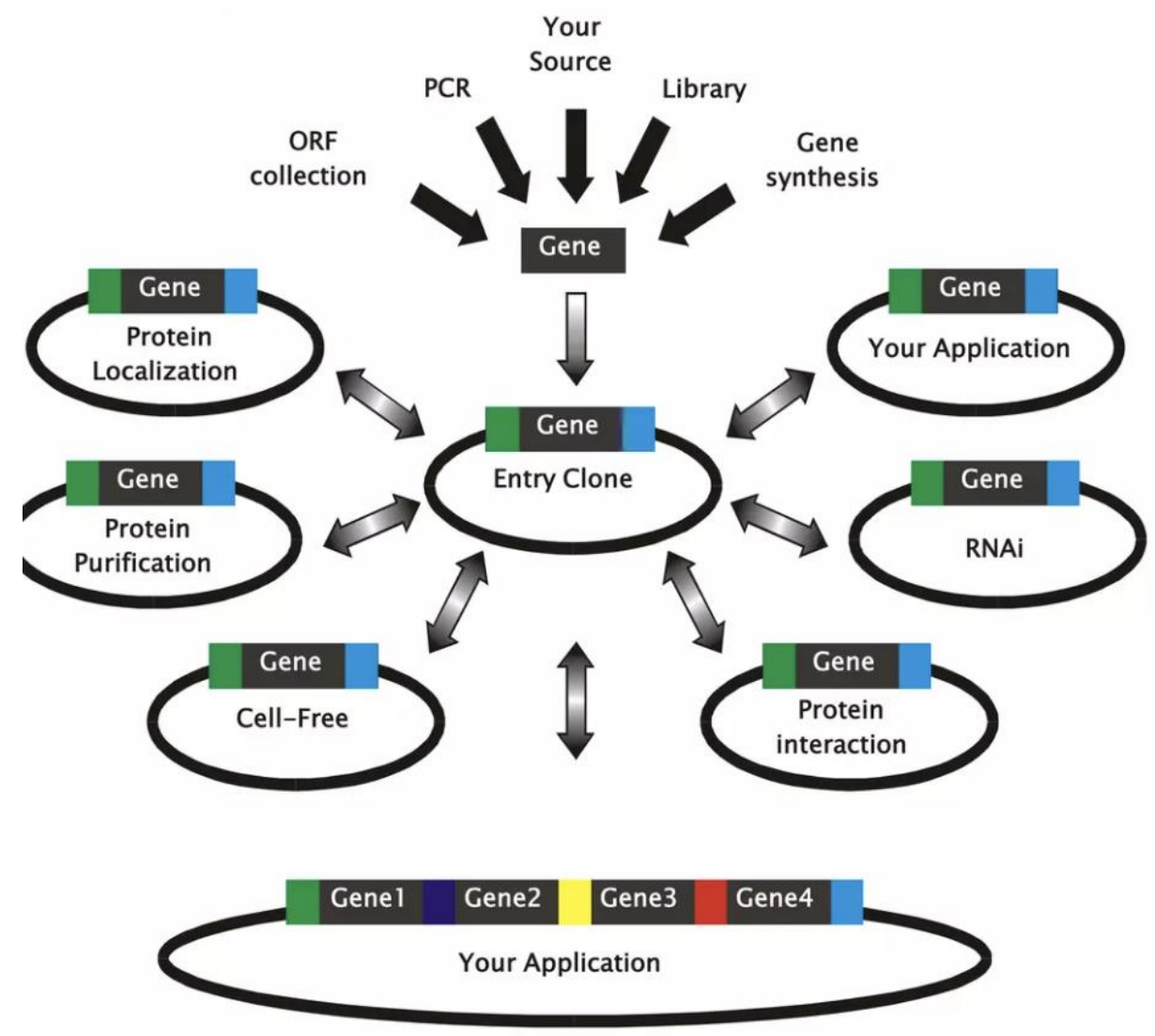


A tecnologia Gateway é crucial para a genómica funcional, acelerando a determinação das funções génicas em organismos diversos

# Tecnologia Gateway

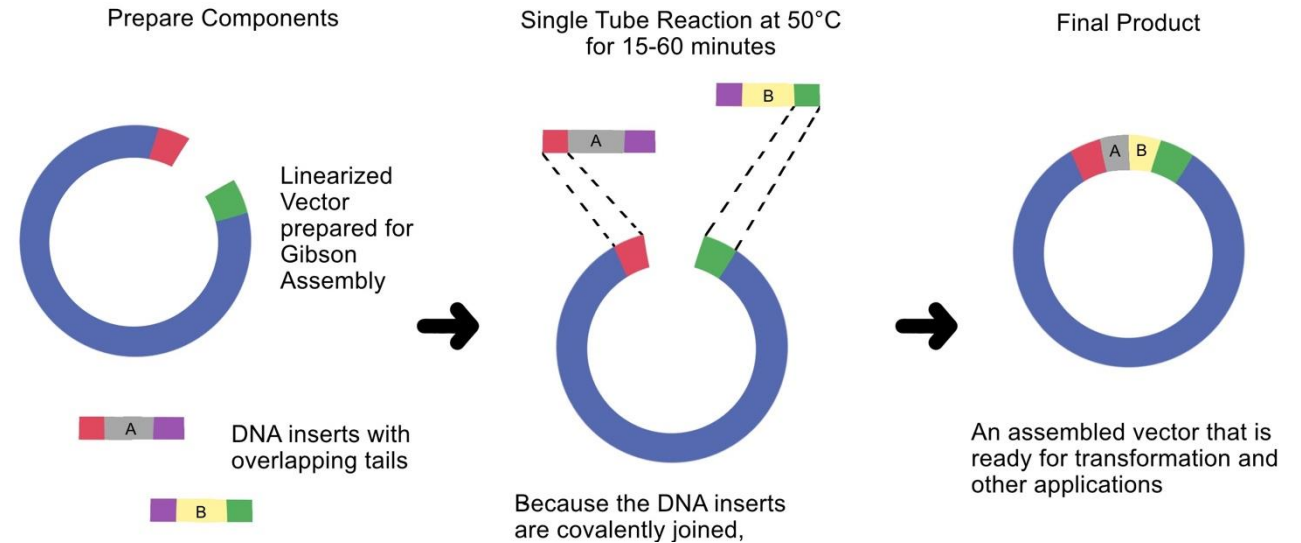
- ✓ Método de clonagem baseado na recombinação
- ✓ Forma fácil de transferir um fragmento de DNA de um plasmídeo para outro, através de reação de recombinação
- ✓ Simples, rápido e preciso
- ✓ O fragmento de DNA deve estar rodeado por locais de recombinação específicos (*attB1* e *attB2*).
- ✓ Assim sendo, o fragmento de DNA deve ser amplificado com os locais de recombinação específicos Gateway *attB1* e *attB2* ligados às extremidades 5' e 3'.
- ✓ O fragmento pode então ser clonado no plasmídeo dador Gateway.

# Representação da plataforma Gateway® demonstrando as suas diversas aplicações a partir de um clone de entrada.



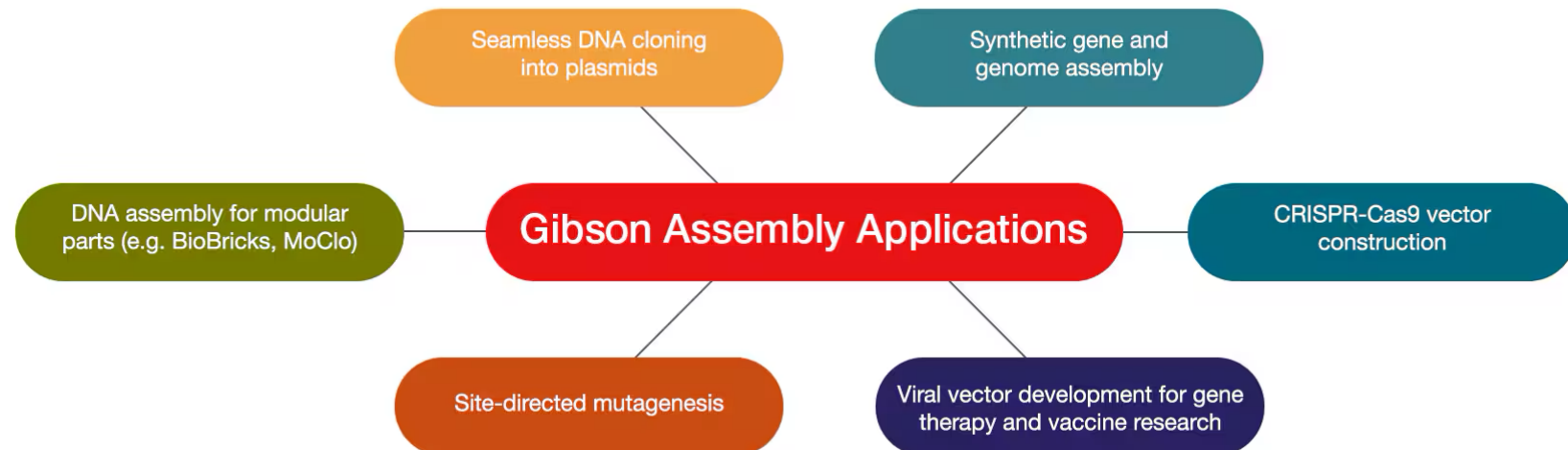
# Outras técnicas de clonagem: GIBSON ASSEMBLY

- Desenvolvida para montagem de múltiplos fragmentos de DNA numa única reação isotérmica (temperatura constante de 50 °C).



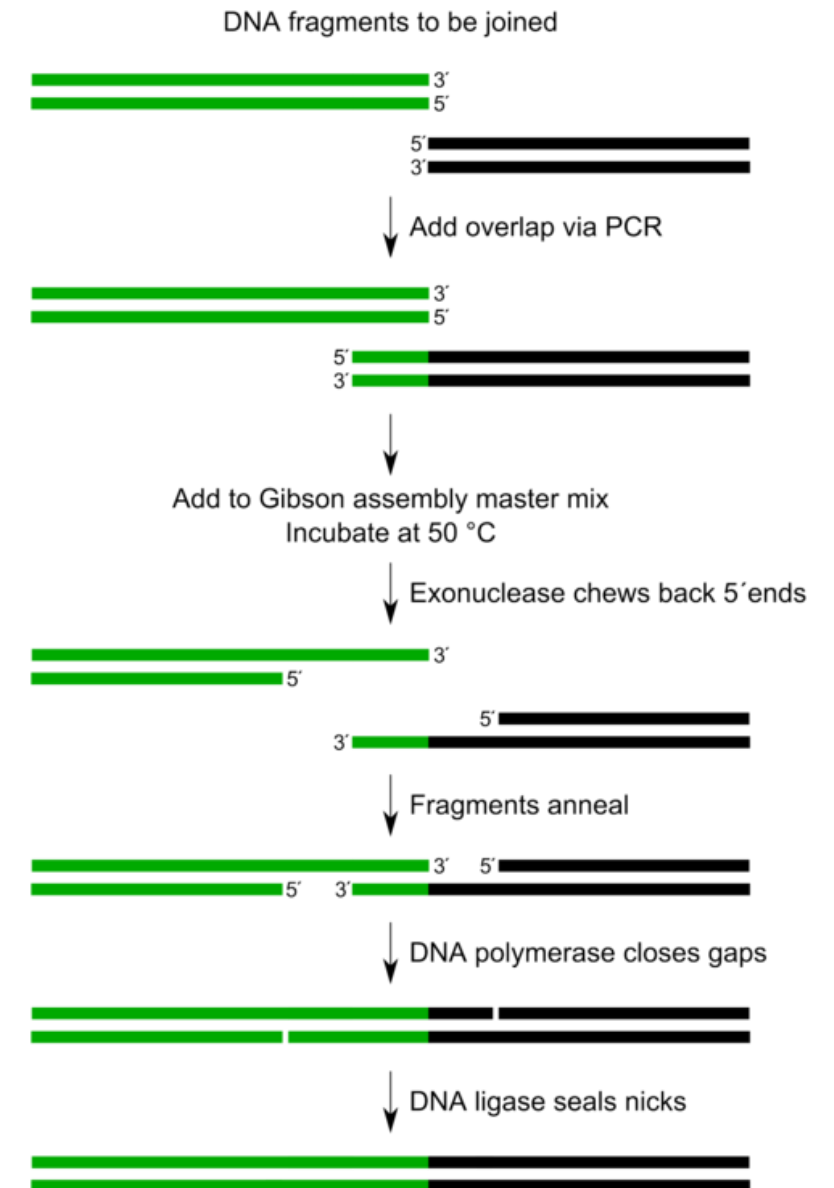
- Num único tubo, podem ser montados até 5 fragmentos de DNA.

- As extremidades sobrepostas (~20–40 pb) permitem recombinação precisa.



## Outras técnicas de clonagem: GIBSON ASSEMBLY

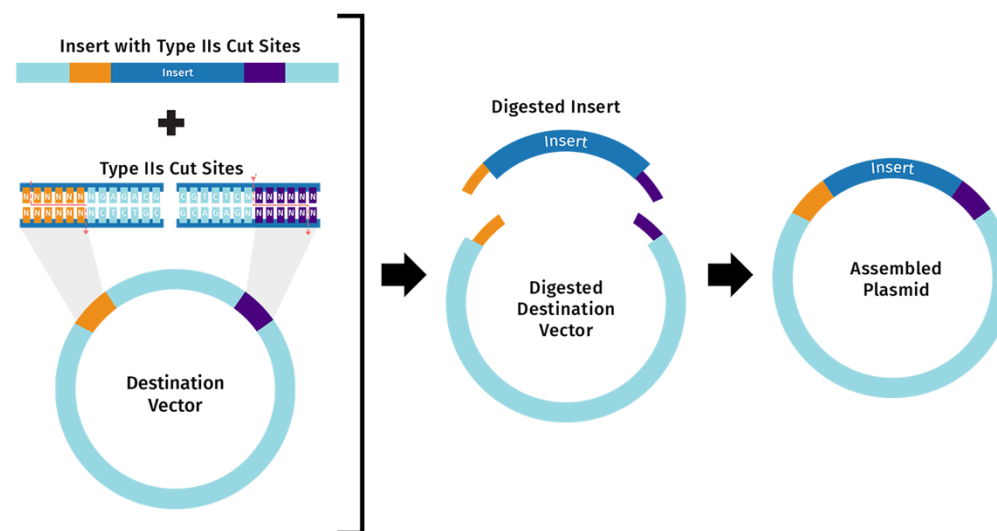
- São usadas **três atividades enzimáticas** principais:
  - ✓ **Exonuclease**- cliva a extremidade 5' dos fragmentos de DNA, permitindo que estes se emparelhem com o outro fragmento de DNA.
  - ✓ **DNA polimerase**- nucleótidos para preencher quaisquer lacunas.
  - ✓ **DNA ligase**- unir os fragmentos, removendo as quebras/nicks.



## Outras técnicas de clonagem: GOLDEN GATE CLONING

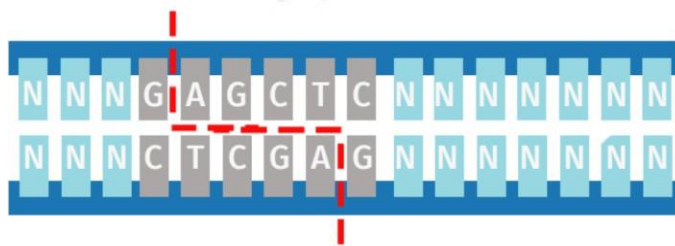
Técnica de montagem de DNA que usa enzimas de restrição do tipo IIS para montar vários fragmentos de DNA de forma ordenada e eficiente numa única reação.

Neste método de clonagem são utilizadas duas enzimas: **enzimas de restrição do tipo IIS** e **DNA ligase** (selar permanentemente as junções entre fragmentos de DNA depois que eles foram corretamente alinhados pelas extremidades coesivas - sticky ends).

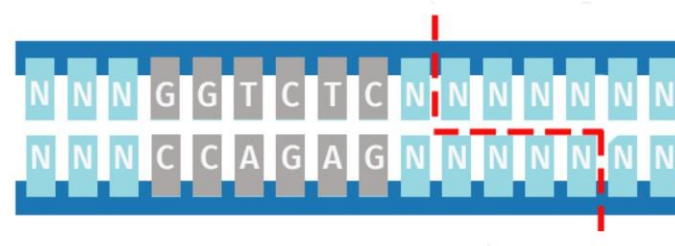


Utiliza em enzimas de restrição tipo IIS (ex: *BsaI*, *BsmBI*) que cortam fora do sítio de reconhecimento resultando em extremidades não palindrômicas.

Type IIP Enzyme



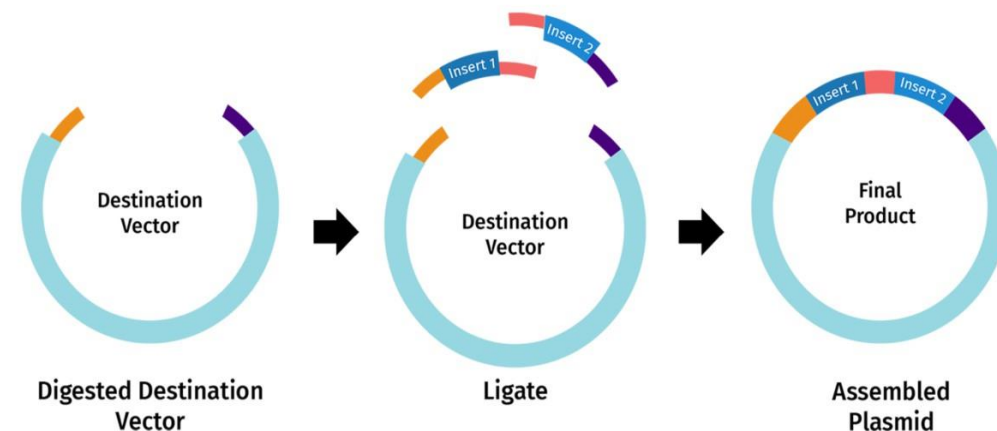
Type IIS Enzyme



As duas extremidades não têm simetria entre si- O fragmento só encaixa numa direção.

## Outras técnicas de clonagem: GOLDEN GATE CLONING

- ✓ Permite montagem direcional e “scarless” de múltiplos fragmentos unidos sem quebras
- ✓ Utilizada em biologia sintética e clonagem modular (MoClo).
- ✓ Ferramenta essencial para construção de circuitos genéticos em plantas.
- ✓ Engenharia metabólica: montagem de vias para produção de compostos (fármacos, químicos, biocombustíveis)
- ✓ Este é um método irreversível de montagem de genes; uma vez inserido o gene no vetor, nunca poderá ser cortado com a mesma enzima de restrição.



Multi-insert golden gate cloning

MoClo- permite a montagem rápida e hierárquica de múltiplos fragmentos de ADN numa única reação

## QUADRO COMPARATIVO – TÉCNICAS DE CLONAGEM

Técnica	Princípio	Enzimas-chave	Vantagem principal	Limitação	Palavra-chave de
<b>Restrição + Ligase</b>	Corte e ligação de DNA	Enzimas de restrição + DNA ligase	Barata, clássica	Depende de sítios específicos	“tradicional”
<b>TA Cloning</b>	Emparelhamento A–T	Taq polimerase	Simples e rápido	Sem controle de orientação	“produto de PCR”
<b>TOPO Cloning</b>	Ligação via topoisomerase	Topoisomerase	Muito rápido (minutos)	Custo alto	“sem ligase”
<b>Gateway</b>	Recombinação site-specific	Clonases (BP/LR)	Transferência fácil entre vetores	Sequências extras ( <i>att</i> )	“recombinação”
<b>Gibson Assembly</b>	Sobreposição de fragmentos	Exonuclease + polimerase + ligase	Seamless, múltiplos fragmentos	Requer design preciso	“sem cicatriz”
<b>Golden Gate</b>	Restrição tipo IIS + montagem	Enzimas tipo IIS	Alta precisão e ordem	Design mais complexo	“modular”

## Para além da clonagem: edição genética

Clonagem é usada para multiplicar DNA, enquanto **edição genética** é usada para alterar a sequência do DNA diretamente dentro do genoma de um organismo.



Aspeto	Clonagem	Edição genética
Função	copiar DNA	alterar DNA
Efeito no genoma	não muda	muda diretamente
Ferramentas típicas	plasmídeos, enzimas de restrição	CRISPR, TALENs, base editors
Objetivo	amplificação	modificação funcional
Exemplo	produzir gene em bactéria	corrigir mutação em célula

# Novas Técnicas Genómicas (NTGs)

Novas técnicas genómicas (NTGs) são métodos inovadores de melhoramento vegetal que permitem alterações precisas e rápidas no ADN, sem introduzir material genético estrangeiro, acelerando processos naturais.



## New genomic techniques



### Why is this important?

New Genomic Techniques enable highly precise and efficient plant breeding. They can help increase the sustainability of our food system through the development of improved plant varieties that are more resilient to droughts or other climate extremes, that require less fertilisers and pesticides, and that lead to higher yields.

5 July 2023  
#EUGreenDeal  
#EUFarm2Fork



### Why new rules?

Current rules lag behind scientific and technological progress and are not designed to facilitate the development and placing on the market of innovative NGT products. The EU needs an adapted framework for safe NGT plants tailored to their specificities to provide benefits to farmers, consumers and the environment.



### Objectives of the proposal:

- Ensure high level of protection of health and the environment. These rules apply only for NGT plants which are as safe as conventionally-bred plants. These plants are safe for humans, animals and

O genoma de um vegetal é modificado numa localização selecionada (mutagénese dirigida) ou é inserida uma sequência da mesma espécie ou de uma espécie relacionada (cisgénese).





# Nova Regulação da UE de NTGs (Dezembro 2025):

● Categoria 1 (NTG-1): Plantas equivalentes às convencionais, que não estarão sujeitas às regras rigorosas dos OGM, facilitando a sua comercialização.

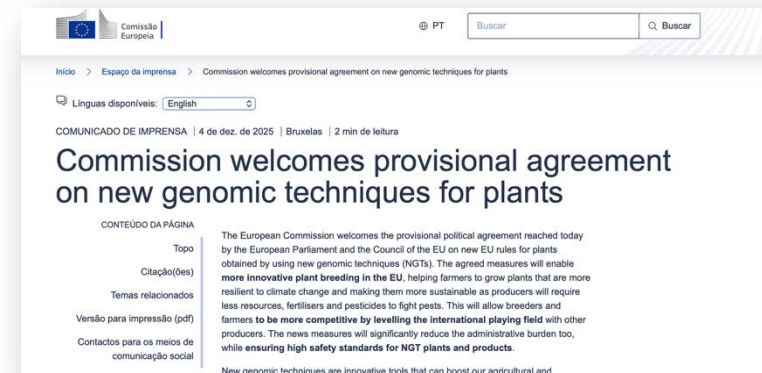


- **pequenas mutações**
- **substituições de bases**
- **knock-outs simples**
- **sem DNA estranho inserido**

● Categoria 2 (NTG-2): Plantas com modificações mais complexas, que manterão os requisitos atuais de rotulagem e autorização dos OGM.



- **inserção de genes novos**
- **modificações múltiplas**
- **construção de vias metabólicas**



# Clonagem em bactérias



Filipa Monteiro | [fmonteiro@isa.ulisboa.pt](mailto:fmonteiro@isa.ulisboa.pt)

Lisboa, 20 Abril 2026