



UC Biotecnologia

## **Aula Laboratorial - Clonagem molecular**

ISA

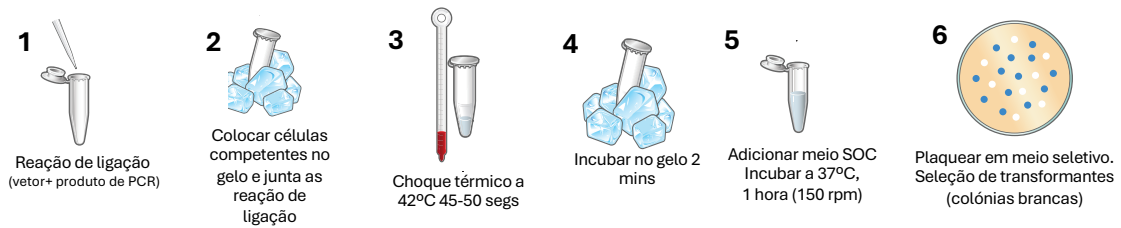
2025/2026

Filipa Monteiro

## INTRODUÇÃO

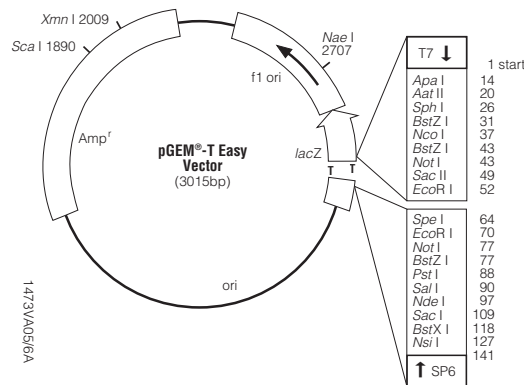
A **clonagem molecular** envolve o isolamento de um gene de interesse e a sua inserção num vetor adequado (vetor de clonagem), que é então introduzido num organismo hospedeiro (células bacterianas), permitindo que o gene se replique e se expresse dentro do sistema hospedeiro. A clonagem molecular tem como objetivo a obtenção de múltiplas cópias idênticas de um fragmento específico de DNA dentro de uma célula hospedeira e envolve várias etapas, incluindo isolamento do DNA/gene de interesse, inserção num vetor de clonagem, transformação num organismo hospedeiro e seleção (*screening*) de transformantes para verificar o sucesso da clonagem. Estão disponíveis muitas opções de kits de clonagem com estratégias e utilidades diferentes, mas sempre com o objetivo de obtenção de múltiplas cópias de um gene de interesse inserido num vetor de clonagem em bactérias bacterianas.

O **Sistema de clonagem por vetor pGEM-T Easy®** foi concebido para a clonagem eficiente de produtos PCR (Promega Corporation, 2025). 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. O Vetor pGEM-T Easy® é um plasmídeo linearizado com saliências complementares de 3'-timina (T). Esta complementaridade T-A aumenta significativamente a eficiência da ligação, prevenindo a auto-ligação do vetor e fornecendo extremidades compatíveis para o produto de PCR. Após uma reação de ligação do produto de PCR+ vetor com uma enzima Ligase, realiza-se o passo de **transformação por choque térmico**, uma técnica fundamental de clonagem molecular, usada para introduzir DNA plasmídico em células de *E. coli* quimicamente competentes (Froger & Hall, 2007). Ao submeter células bacterianas (previamente tratadas com cloreto de cálcio) a um pico súbito de temperatura — tipicamente 42°C por 30 a 90 segundos, depois no gelo — que permite a entrada de DNA externo através dos poros temporários criados na membrana. Posteriormente, o crescimento das células bacterianas transformadas em meio seletivo. Este vetor transporta o gene *lacZ* que permite a seleção de transformantes por colónias azuis/brancas. Para seleção de transformantes, os clones são plaqueados em meio seletivo com LB agar com ampicilina (antibiótico) e com IPTG e X-gal para a seleção azul/branco. Esta seleção de transformantes baseia-se na funcionalidade do gene *lacZ*, que codifica a  $\beta$ -galactosidase, uma enzima que quebra o X-gal. Assim, colónias azuis indicam um gene *lacZ* funcional (sem inserto), enquanto colónias brancas indicam o gene *lacZ* inativado (recombinante bem-sucedido- com inserto). Todo o processo de clonagem a ser elaborado durante a aula está ilustrado em esquema na **Figura 1**.



**Figura 1.** Esquema dos diferentes passos do processo de clonagem e transformação pelo sistema de vetor pGEM-T Easy.

O vetor de clonagem apresenta locais de reconhecimento para várias enzimas de restrição, incluindo *EcoRI*, *BstZI* e *NotI*, facilitando a excisão (restrição) do inserto clonado (**Figura 2**).



**Figure 2.** Mapa do vector pGEM-T Easy, com indicação os locais de reconhecimento de diversas enzimas de restrição, e das regiões complementares dos primers T7 e SP6 para realização de PCR (Fonte: Promega Corporation).

## Protocolo de Clonagem de um Produto de PCR com o vector pGEM-T Easy (Promega Corporation)

### 1. REAÇÃO DE LIGAÇÃO

- 1.1. Prepare a reação de clonagem pGEM-T Easy® de acordo com a **Tabela I**.
- 1.2. Prepare a reação de clonagem pGEM-T Easy® usando os reagentes na ordem indicada.
- 1.3. Realize o cálculo da concentração de produto de PCR para uma reação ótima de ligação, considerando a proporção de 3:1 (inserto:vetor). Aplique a fórmula seguinte, considerando que o inserto tem 500 bp, o vetor tem 3 000 bp, e a concentração do vetor pGEM-T Easy (50 ng):

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert:vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

**Tabela 1.** Reagentes para a preparação da reação de clonagem pGEM-T Easy.

| Reagente                                | Volume             |
|---|--------------------|
| Produto de PCR purificado (25 ng/μl)    | 0,5–3 μl           |
| 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase | 5 μl               |
| pGEM®-T Easy Vector (50 ng)             | 1 μl               |
| Água purificada (ddH2O)                 | Perfazer até 10 μl |
| T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl)        | 1 μl               |
| <b>Volume final</b>                     | <b>10 μl</b>       |

Após a adição dos reagentes de acordo com a tabela 1 siga os seguintes passos:

- 1.4. Misture a reação suavemente por pipetagem e incube por **20-60 minutos** à temperatura ambiente (22° C a 23 ° C).

**Nota:** Incubar *overnight* a 4°C para obtenção de máximo número de transformantes.

- 1.5. Coloque a reação no gelo e prossiga para a transformação das células.

### 2. TRANSFORMAÇÃO COM CÉLULAS COMPETENTES JM09

#### Material

- A reação de ligação pGEM-T Easy
- Placas LB/ampicilina/IPTG/X-Gal
- banho de água a 42 ° C
- incubadora a 37 ° C com agitação e sem agitação
- Espalhadores
- Meio S.O.C.
- 1 tubo de células JM109™ para cada transformação (descongelado no gelo).

## Procedimento

- 2.1. Centrifugue brevemente (*spin down*) a reação de ligação. Adicione 2µl de cada reação de ligação a um Tubo estéril de 1,5 ml em gelo.
- 2.2. Coloque as células competentes JM109 em gelo até que descongelem (5 minutos). Misture as células batendo suavemente o tubo.
- 2.3. Transfira cuidadosamente 50µl de células para os tubos de reação de ligação do passo 2.1, e incubar no gelo por 10 minutos.
- 2.4. Aplicar choque térmico nas células por 45–50 segundos a 42°C. NÃO AGITE. A seguir, colocar rapidamente os tubos no gelo por 2 minutos.
- 2.5. Adicione 950µl de meio SOC à transformação da reação de ligação, à temperatura ambiente. Incube por 1 hora a 37°C com agitação (~150rpm).
- 2.6. Plaquear 100µl de cada cultura de transformação em placas LB/ampicilina/IPTG/X-Gal pré-aquecidas.
- 2.7. Incube as placas durante a noite a 37°C. Selecione colónias brancas.

## 3. SELEÇÃO DE TRANSFORMANTES E CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO

A clonagem bem-sucedida de um inserto no vetor pGEM-T® Easy interrompe o gene *lacZα*, prevenindo a produção funcional da enzima β-galactosidase. Assim através do *screening* de colónias azuis e brancas realiza-se a seleção de transformantes. Os clones recombinantes podem ser identificados pela triagem de cores nas placas indicadoras: colónias azuis e brancas obtidas. Normalmente, clones que contêm produtos de PCR produzem colónias brancas, enquanto as colónias azuis não têm insertos, tendo o gene *lacZ* funcional.

A fórmula para calcular a eficiência da transformação (TE) é:

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

Dados para cálculo e exemplo:

- **Colónias:** Contagem de transformantes na placa.
- **Quantidade de DNA (µg):**

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

$$\text{Exemplo: } 1\text{ng} = 0.001\mu\text{g} \quad (25\text{ng} = 0.025 \mu\text{g})$$

- **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** 25 ng (0,025µg) de DNA.
- **Adicionar** meio SOC de 950µL (volume total = 1000µL)
- **Placa** 100µL (uma diluição 1:10 da mistura total).
- **Colónias de contagem** (ex. 300).
- **Calcular:**

$$TE = \frac{300}{0.025\mu\text{g}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{100\mu\text{L}} = 1.2 \times 10^5 \text{ cfu}/\mu\text{g}.$$

**Reagentes/Soluções:**

**Meio SOC** (meio rico para crescimento bacteriano)

- 2% Triptona
- 0.5% Extracto de levedura
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- 20 mM Glucose

**Meio LB** (Luria-Berthani- para 1 litro)

- 10 g de Triptona
- 5 g de Extrato de Levedura
- 10 g de NaCl

**Meio LB + Ampicilina + IPTG + XGal**

Adicione 15g de agar a 1 litro de meio LB. Autoclavar e permitir o meio arrefecer até 50°C antes de adicionar ampicilina a uma concentração final de 100µg/ml, suplementar com 0,5mM IPTG e 80µg/ml X-Gal e distribuir cerca de 30-35 ml em placas de petri. Guardar até 1 mês a 4°C.

Alternativamente, pode juntar 100µl de 100mM IPTG e 20µl de 50mg/ml de X-Gal podem ser distribuídos pela superfície de uma placa LB com ampicilina (30-35 ml) e deixada a absorver 30 minutos a 37°C antes do uso.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Promega Corporation (2025). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual, #TM042. [Dezembro 2025]. Available: <https://www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>.

Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*, (6), 253. <https://doi.org/10.3791/253>.

