

UC Biotecnologia

Clonagem molecular de produto de PCR

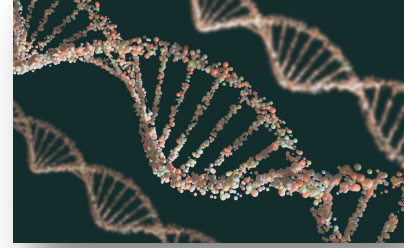
Aula Laboratorial

Filipa Monteiro
fmonteiro@isa.ulisboa.pt

Lisboa, 22 Abril 2026

Credits: [Slidesgo](#)

Clonagem Molecular



Para que serve?

copiar genes ou segmentos de DNA específicos. Utilizado extensivamente em investigação, terapia génica e biotecnologia.

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.

O que é Clonagem Molecular?

1. Produção de grandes quantidades de DNA recombinante
2. Expressão de proteínas de interesse
3. Engenharia genética

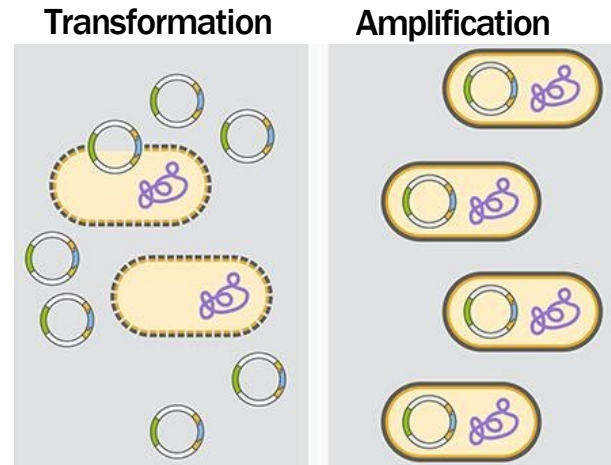
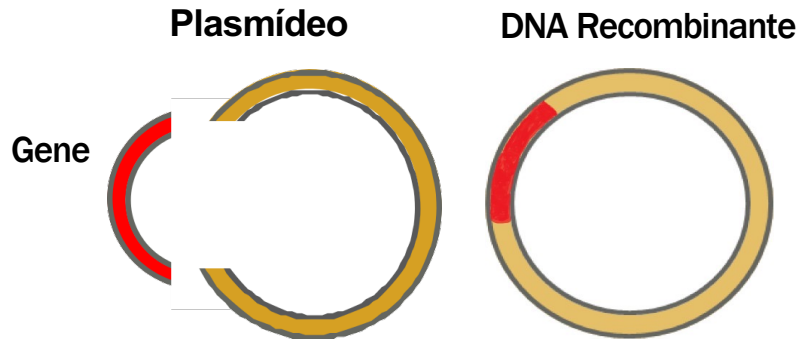
O que vamos fazer?

- Clonagem de um produto PCR

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.

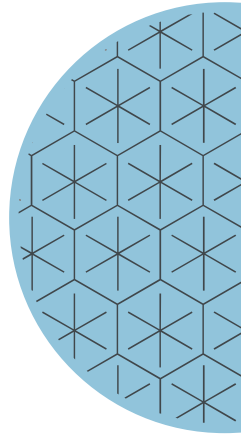


DNA Recombinant: Molécula híbrida de DNA, produzida *in vitro* pela inserção de um DNA exógeno num vetor.

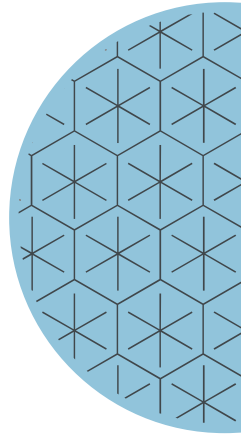
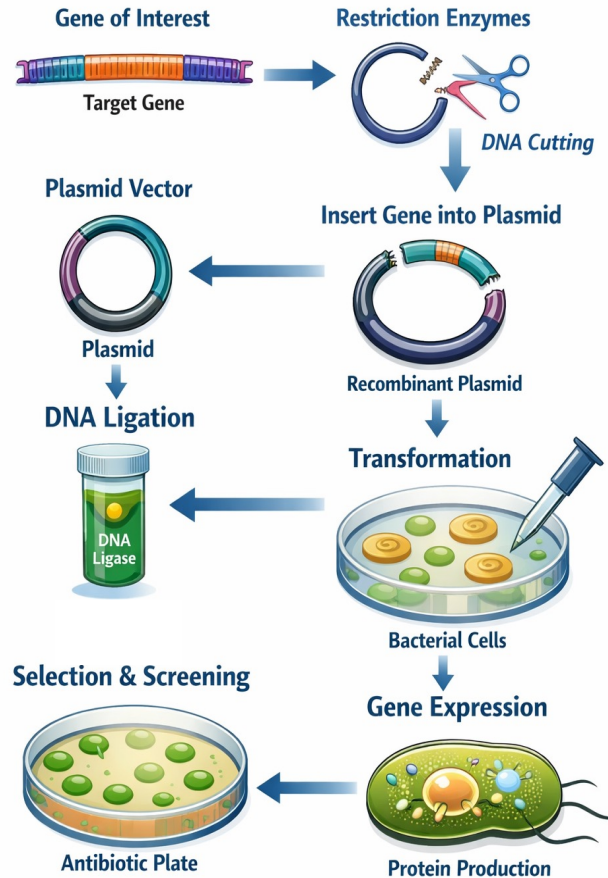
Componentes essenciais na clonagem

1. **DNA de Interesse:** Gene ou fragmento a ser clonado.
2. **Vetor de Clonagem:** "Veículo" que transporta o DNA.
3. **Enzimas de Restrição:** "Tesouras moleculares" que cortam o DNA.
4. **DNA Ligase:** "Cola" que une fragmentos.

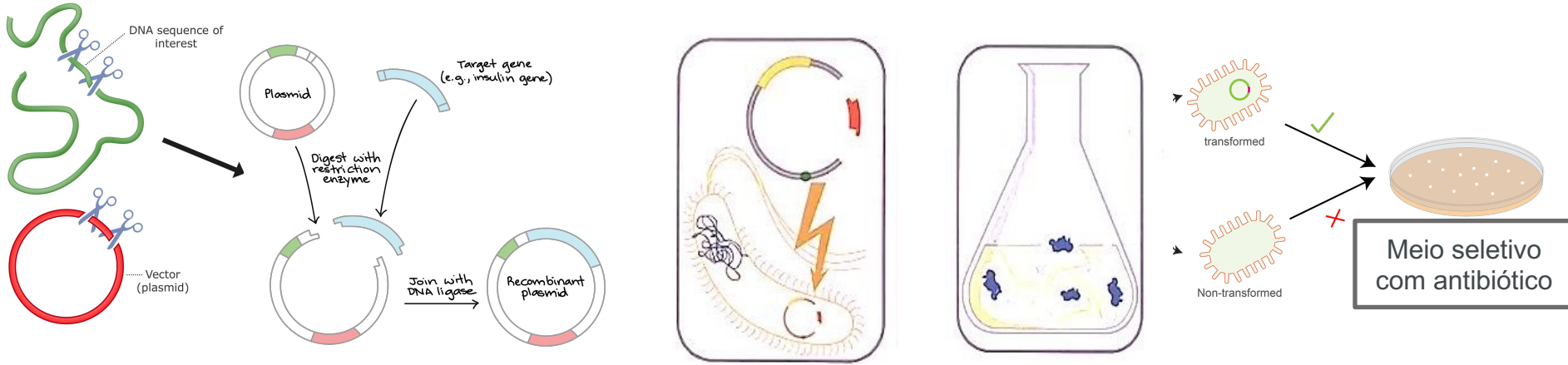
Organismo Hospedeiro: Onde o DNA recombinante será replicado



Passos da clonagem molecular



Passos da clonagem molecular



Gene de interesse

Ligação

Transformação

Cultura de bactérias

Seleção de transformantes

Amplificação por PCR do gene/fragmento a clonar ou Digestão do gene com enzimas de restrição

Ligação com DNA ligase

Transformação do vetor recombinante em bactérias competentes

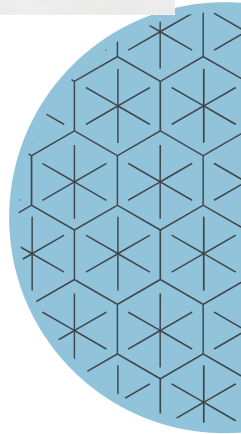
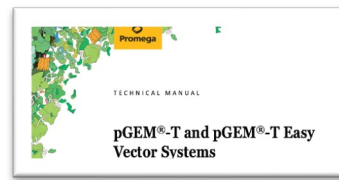
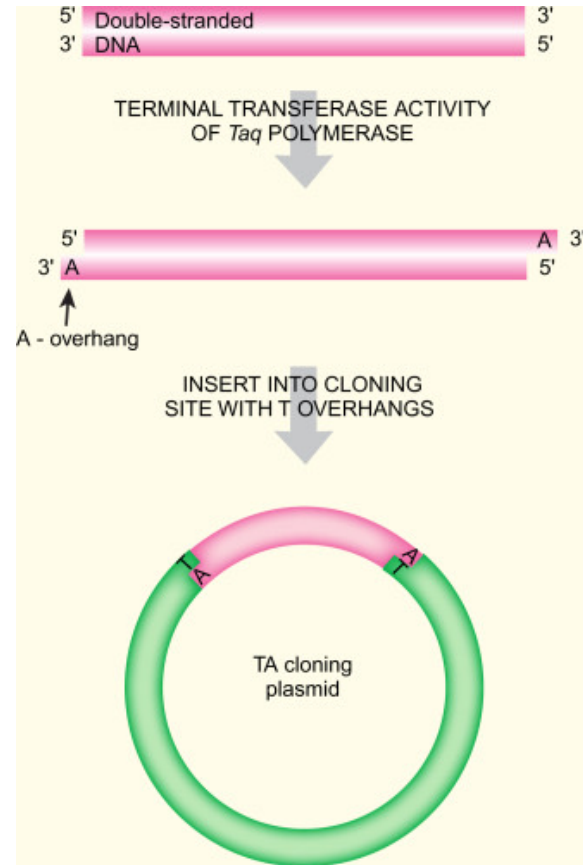
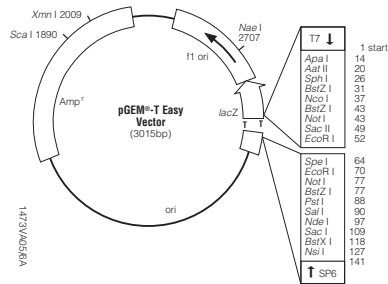
Crescimento bacteriano em meio de cultura para amplificar o gene/fragmento clonado em bactérias

Crescimento bacteriano em meio seletivo

Recombinantes selecionados por presença de colônias/screening azul branco

Sistema de clonagem por vetor pGEM-T Easy®

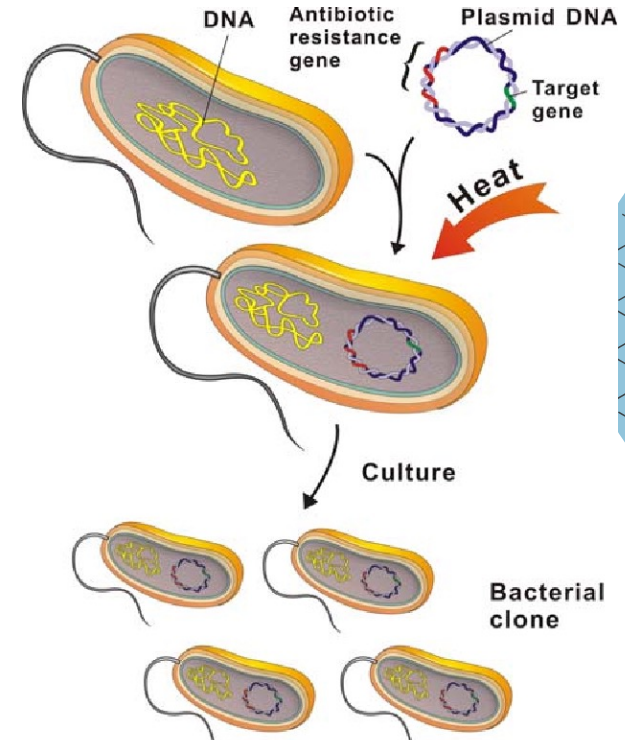
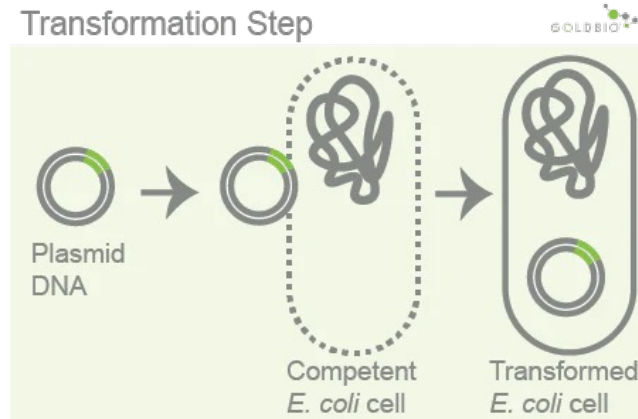
1. Utiliza uma técnica conhecida como clonagem TA, que aproveita a atividade terminal de transferase de certas DNA polimerases, como a *Taq* DNA polimerase, que adiciona uma única saliência de 3'-adenina (A) aos fragmentos amplificados.
2. Vetor com mapa conhecido
Permite a utilização de enzimas de restrição (locais de reconhecimento) ou técnica de PCR para avaliação da eficácia da clonagem



Transformação

1. Plasmídeos contendo o DNA recombinante podem ser introduzidos em bactérias, como a *E. coli*- transformação.
2. Transformação por choque térmico

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



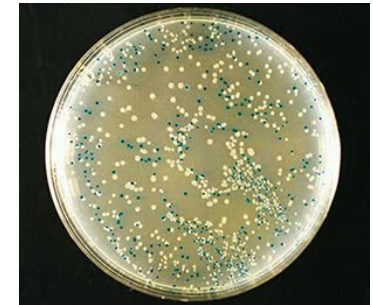
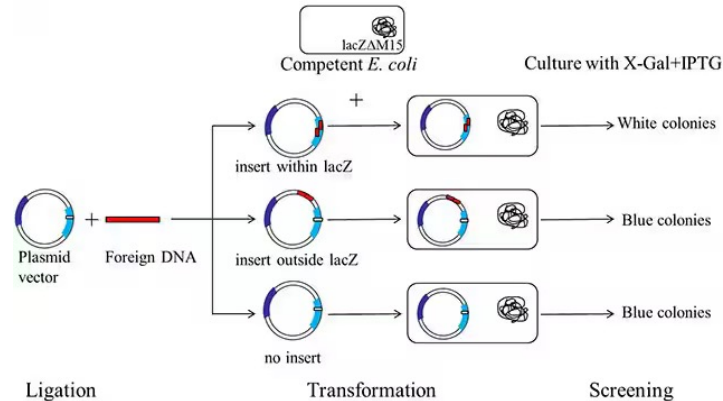
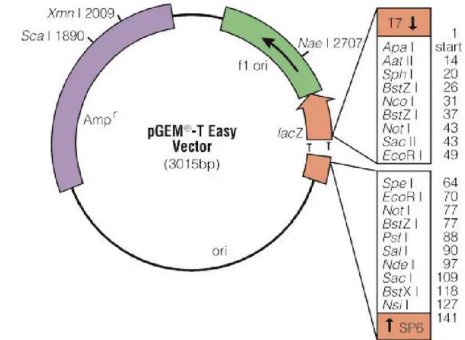
Seleção de recombinantes: Screening azul/branco

Esta seleção de transformantes baseia-se no **princípio da α -complementação** do gene β -galactosidase, proteína codificada pelo gene *lacZ* do *lac* operon (transporte e metabolismo da lactose em *E. coli*).

O plasmídeo transporta dentro da sequência *lacZ* um local interno de clonagem múltipla (MCS), e com a inserção do GOI*, o *lacZ* é interrompido e não existe produção funcional da β -galactosidase.

A presença de uma β -galactosidase ativa pode ser detetada por X-gal- **cor azul**.

A presença de um inserto em *lacZ* perturba a formação de uma β -galactosidase ativa, onde o onde o X-gal não é hidrolisado- **colónias brancas**.

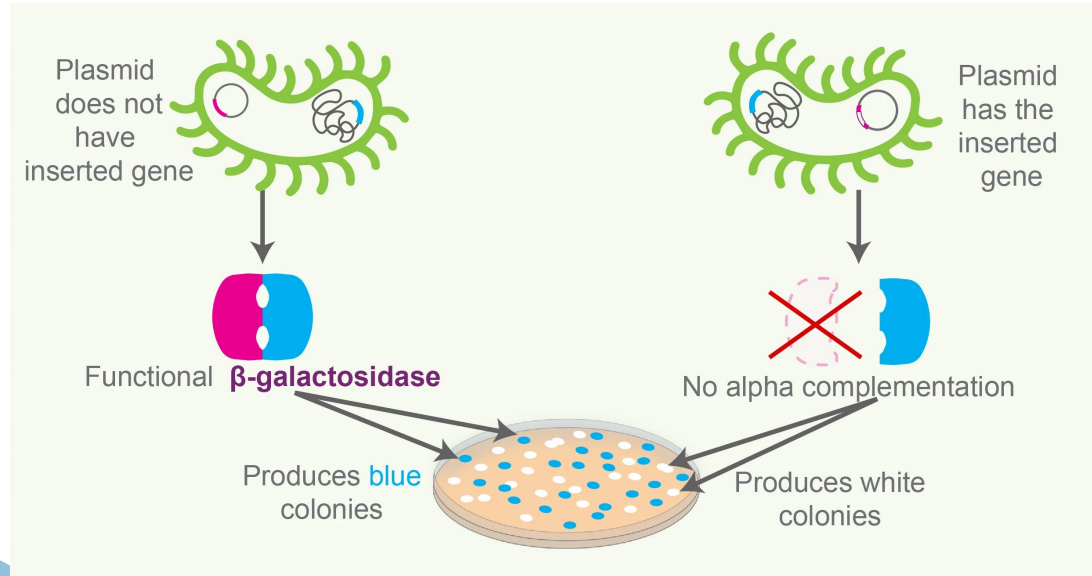


*GOI- Gene of Interest

Screening azul/branco

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

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





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



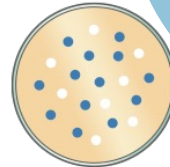
Incubar no gelo 2
mins

5



Adicionar meio SOC
Incubar a 37°C

6



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

Passos da Clonagem molecular por pGEM-T EASY

Seleção de transformantes: seleção positiva

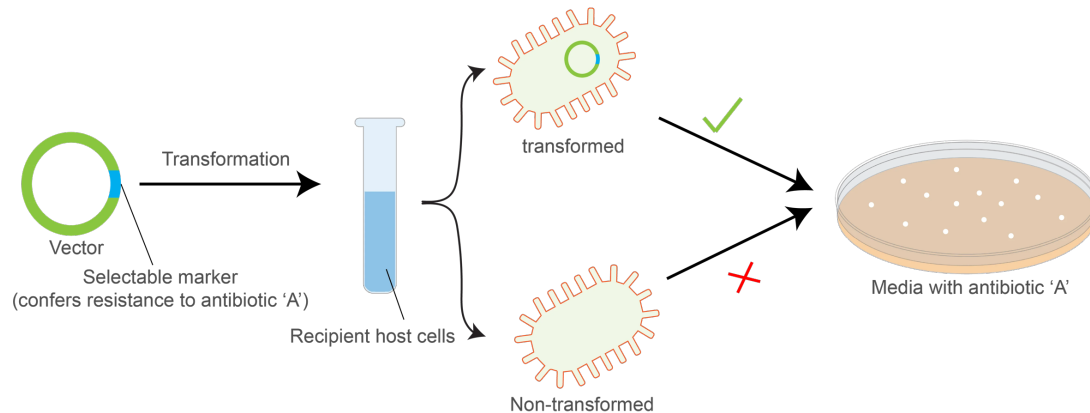
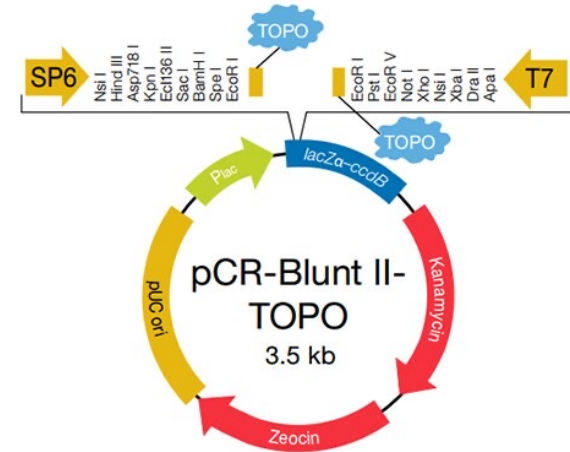
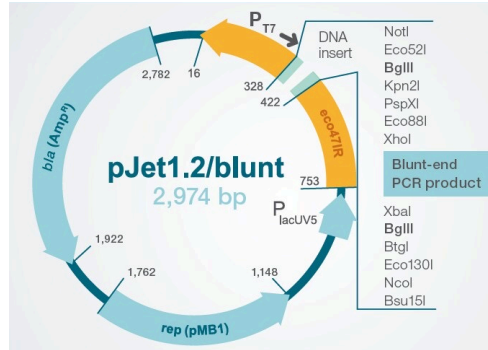
Alguns plasmídeos permitem selecionar diretamente os recombinantes.

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*.



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

1. REAÇÃO DE LIGAÇÃO

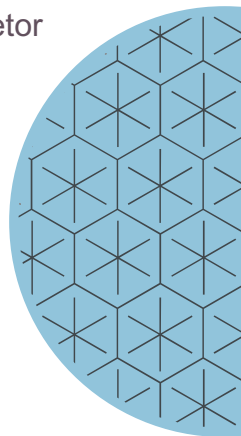
Efetuar cálculo da concentração de produto de PCR para uma reação ótima de ligação, considerando a proporção de 3:1 (**inserto:vector**). Aplique a fórmula seguinte, considerando que o inserto tem 500 bp, o vetor tem 3 000 bp, e a concentração do vetor pGEM-T Easy (50 ng):

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

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
Volume final	10 μl

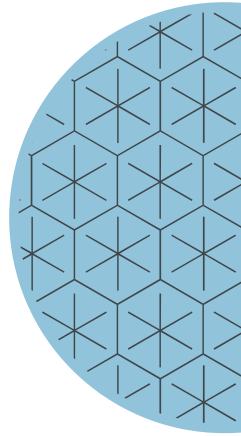
2. Misture a reação suavemente por pipetagem e incube por **20-60** minutos à temperatura ambiente (22°C a 23°C). Coloque a reação no gelo e prossiga para a transformação das células.



Transformação

Procedimento

- 2.1.** Centrifugue brevemente (*spin down*) a reação de ligação. Adicione 2 μ l 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 50 μ l 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 950 μ l 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 100 μ l 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 colônias brancas.



CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO

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

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

Dados para cálculo e exemplo:

• **Colónias:** Contagem de transformantes na placa (ex. 300).

• **Quantidade de DNA (μg):** Volume de DNA usado (μL) \times Concentração ($\text{ng}/\mu\text{L}$)

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

• **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 ($0,025\mu\text{g}$) de DNA.
- **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. 300).
- **Calcular:**

$$\text{DNA plaqueado} = 0.025\mu\text{g} \times \frac{100\mu\text{L}}{1000\mu\text{L}} = 0.0025\mu\text{g}.$$

$$TE = \frac{300\text{cfu}}{0.0025\mu\text{g}} = 1.2 \times 10^5 \text{cfu}/\mu\text{g}.$$