



**TECNOLOGIA
BARREIRO**

ESCOLA SUPERIOR
POLITÉCNICO SETÚBAL

ADRIANA DA
SILVA MATOS
ROBALO

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE
RECETORES DE
CITOTOXICIDADE EXPRESSOS
POR CÉLULAS *NATURAL
KILLER***

Relatório de Estágio do Mestrado em
Engenharia Biológica e Química

ORIENTADORA

Professora Doutora Marta Justino

SUPERVISOR

Doutor Gonçalo Justino

Dezembro de 2023

ADRIANA DA
SILVA MATOS
ROBALO

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE
RECETORES DE
CITOTOXICIDADE EXPRESSOS
POR CÉLULAS *NATURAL*
*KILLER***

JÚRI

Presidente: Professora Doutora Maria de Lurdes de
Figueiredo Gameiro, ESTBarreiro/IPS

Orientadora: Professora Doutora Marta Sofia
Guedes de Campos Justino, ESTBarreiro/IPS

Vogal: Professora Doutora Ana Gabriela Gonçalves
Neves Gomes, ESTBarreiro/IPS

Dezembro de 2023

“Para hacer las cosas bien es necesario: primero, el amor; segundo, la técnica”

Gaudí

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa, começo por agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram envolvidos na minha formação académica. Obrigado pela compreensão e paciência. Por me terem ajudado a crescer tanto a nível pessoal como profissional.

Gostaria de agradecer ao Instituto Superior Técnico – Universidade de Lisboa pela oportunidade de realizar a parte prática da minha tese de mestrado. Sou grata aos meus professores e orientadores Doutor Gonçalo Justino e Doutora Marta Justino por me aceitarem para desenvolver esta tese e pelo apoio extra por ser uma estudante trabalhadora por ensinarem a trabalhar com técnicas mais relacionadas com engenharia genética.

Sou grata ao Pedro Rosado que me apoiou no laboratório durante este tempo e por me ajudar a resolver muitos problemas.

Uma obrigada muito especial à minha família, ao meu namorado (Francisco), ao meu melhor amigo (Felipe), aos meus compadres (Alexandra e Fernando), ao meu afilhado (Leonardo) e as minhas irmãs (Tatiana, Rosalina e Veronica), por terem sempre acreditado em mim, por toda a paciência, apoio e incentivo que me deram e pela grande ajuda para superar momentos mais complicados.

As minhas amigas, com que partilho o mesmo o desespero, ideias e incertezas, em especial: Gabriela Barros, Mariana Matos e Catarina Pascoal. E por última e não menos importante um obrigado a minha querida amiga Filipa Fernandes por estar sempre desposta a apoiar-me em qualquer situação.

RESUMO

As células *Natural Killer* (CNK) expressam uma série de recetores codificados pela linha germinativa capazes de desencadear citotoxicidade. As células NK tendem a expressar muitos membros de famílias específicas de moléculas sinalizadoras. A presença de muitos recetores ativadores e de muitos membros de famílias específicas de moléculas sinalizadoras pode permitir que as células NK detetem diferentes tipos de células-alvo e iniciem diferentes tipos de resposta. Desta forma, este sistema contribui para a robustez da resposta das células NK. Na ausência de moléculas sinalizadoras selecionadas, a função citotóxica das células NK permanece frequentemente inalterada.

Esta dissertação teve como principal objetivo a sub-clonagem dos recetores de citotoxicidade natural NCR1, NCR2 e NCR4 expressos por células *Natural Killer*. Seguidamente, e através de transformação de células competentes pretendia-se a obtenção de estirpes bacterianas estáveis capazes de expressar as proteínas recombinantes, identificáveis através de amplificação por PCR dos genes de interesse, e tendo como objetivo final a purificação e caracterização das proteínas finais expressas.

Sendo este um estudo exploratório, o planeamento de atividades e tarefas foram moldadas tendo em conta a obtenção de resultados e por esse motivo, uma vez que os resultados não foram conclusivos, e apesar de tentadas abordagens distintas, não foi possível realizar os passos de purificação e caracterização das proteínas recombinantes.

PALAVRAS-CHAVE: Clonagem, Sub-clonagem, PCR, recetor de citotoxicidade natural, células *Natural Killer*

ABSTRACT

Natural Killer (NK) cells express a series of germline-encoded receptors capable of triggering cytotoxicity. NK cells tend to express many members of specific families of signaling molecules. The presence of many activating receptors and many members of specific families of signaling molecules may allow NK cells to detect different types of target cells and initiate different types of responses. In this way, this system contributes to the robustness of the NK cell response. In the absence of selected signaling molecules, the cytotoxic function of NK cells often remains unchanged.

This dissertation had as its main objective the sub-cloning of the natural cytotoxicity receptors NCR1, NCR2, and NCR4 expressed by Natural Killer cells. Subsequently, and through the transformation of competent cells, the aim was to obtain stable bacterial strains capable of expressing recombinant proteins, identifiable through PCR amplification of the genes of interest, and with the ultimate objective of purifying and characterizing the final expressed proteins.

As this is an exploratory study, the planning of activities and tasks was shaped taking into account the achievement of results for this reason, since the results were not conclusive, and despite trying different approaches, it was not possible to carry out the purification steps. and characterization of recombinant proteins.

Keywords: Cloning, Sub-cloning, PCR, natural cytotoxicity receptor, Natural Killer cells

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENGENHARIA GENÉTICA, CLONAGEM MOLECULAR E SUBCLONAGEM	1
1.2. CÉLULAS CITOTÓXICAS OU NATURAL KILLER CELLS.....	2
1.3. RECETORES KILLER OU KR.....	3
1.4. RECETORES DE CITOTOXICIDADE NATURAL OU NCR.....	5
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	7
2.1. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE E.COLI.	7
2.2. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE E.COLI	7
2.3. SELEÇÃO DE COLÓNIAS TRANSFORMADAS.....	8
2.4. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMÍDICO	8
2.5. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE	8
2.6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	9
2.7. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DO GEL DE AGAROSE	9
2.8. DIGESTÃO ENZIMA DE RESTRIÇÃO	10
2.8.1. DIGESTÃO DO PET28A(+)	10
2.8.2. DIGESTÃO NCR1/NCR2/NCR4	11

2.9. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE NO VETOR DE EXPRESSÃO.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1. PRIMEIRA ABORDAGEM	13
3.2. SEGUNDA ABORDAGEM	16
4. CONCLUSÃO	20
5. CONCLUSION.....	22
6. BIBLIOGRAFIA.....	24
ANEXOS – PROTOCOLOS	26
Anexo 1– Protocolo de extração de plasmídeo.....	26
Anexo 2– Protocolo de purificação de DNA em gel de agarose.	27
Anexo3– Protocolo de purificação de produtos de digestão enzimática/PCR.....	29
Anexo 4– Protocolo T4 DNA ligase.	31
Anexo 5– Protocolo Speedy XhoI.	32
Anexo 6– Protocolo XhoI.....	34
Anexo 7– Protocolo NdeI.....	35
Anexo 8– Protocolo Speedy NdeI.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Relações entre as células NK e as células alvo, de acordo com a presença ou ausência de ligandos HLA. HLA=antígeno leucocitário; KIR=Killer immunoglobulin-like receptor; NK=Natural Killer. 4
- Figura 2 Amplificação dos genes de interesse com VWR Red DNA polimerase. O programa de PCR: 98°C 2 min; 35x [98°C 10s; Tan [60°C(2°C) -70°C] 30s; 72°C 45s]; 72°C 5 min. As reações foram feitas em 50µl volume final com as quantidades na tabela 5 resetivas a cada pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel..... 14
- Figura 3 Amplificação dos genes de interesse com VWR Red DNA polimerase. O programa de PCR: 98°C 2 min; 35x [98°C 10s; Tan [55°C(2°C) -65°C] 30s; 72°C 45s]; 72°C 5 min. As reações foram feitas em 50µl volume final com as quantidades na tabela 5 resetivas a cada pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel..... 15
- Figura 4 Scale- up dos genes NCR1 e NCR4 nas condições ótimas de amplificação. O programa de PCR: 98°C 2 min; 35x [98°C 10s; Tan [63°C] 30s; 72°C 45s]; 72°C 5 min. As reações foram feitas em 100µl volume final com 34,28 e 39,79 µl pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel. 15
- Figura 5 Amplificação dos genes NCR1, NCR2 e NCR4. O programa de PCR: 98°C 2 min; 35x [98°C 10s; Tan [60°C(2°C) -70°C] 30s; 72°C 45s]; 72°C 5 min. As reações foram feitas em 50 µl volume final com 10 ng pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel..... 16
- Figura 6 Placas com pET28a(+) não digerido imagem da esquerda com um espalhamento com 75µl e a da direita com o espalhamento 25 µl. 18
- Figura 7 Placas com pET28a(+) digerido em DH5α imagem da esquerda com um espalhamento com 75µl e a da direita com o espalhamento 25 µl. 18
- Figura 8 Riscados com crescimento das colônias obtidas anteriormente. 19
- Figura 9 Amplificação da região de clonagem do pET28a(+), dos clones de ligação dos genes NCR1, NCR2, NCR4. O programa de PCR: 95°C 2 min; 35x [95°C 30s; Tan [57°C] 40s; 72°C 40s]; 72°C 10 min. As reações foram feitas em 50 µl volume final com 10 ng pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel..... 19

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 componentes para a reação de PCR.....	8
Tabela 2 Sequencias de reconhecimento das enzimas de restrição utilizadas neste trabalho.....	10
Tabela 3 Reação de ligação para o vetor pET -28 (+) com o NCR 1	11
Tabela 4 Concentração dos genes de interesse.....	13
Tabela 5 Quantificação dos pDNA contendo os genes após transformação em <i>E.coli</i> DH5 α	13
Tabela 6 Concentração de DNA obtida em cada digestão.....	15
Tabela 7 Concentração dos genes alvos após extração das bandas amplificadas com o DNA polimerase.....	17
Tabela 8 Concentração de DNA obtida após a digestão.....	17

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

bp – pares de bases

cDNA - DNA codificante, amplificado a partir de mRNA

CTL – linfócitos T citotóxicos, do inglês, *Cytotoxic T Cells*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

HA - Hemaglutininas

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

ILC - Células linfoides inatas

KIR – tipo de recetor, do inglês, *Killer-cell Immunoglobulin like Receptors*

KLR - tipo de recetor, do inglês, *Killer-cell Lectin-like Receptors*

KR- Recetores *killer*

LILR - tipo de recetor, do inglês, *Leucocyte Immunoglobulin like Receptors*

LB –*Luria–Bertani*, meio de cultura

LBK30 – meio de cultura *Luria–Bertani* suplementado com o antibiótico canamicina a 30µg/mL

LBagar - meio de cultura sólido *Luria–Bertani* com agar

LRC – complexo recetor de leucócitos, do inglês, *Leucocyte Receptor Complex*

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*

NdeI – enzima de restrição isolada da *Neisseria denitrificans*.

NCR – recetor de citotoxicidade natural, do inglês *Natural Cytotoxicity Triggering Receptors*

NCR1 - recetor tipo NCR 1, do inglês *Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 1*

NCR2 - recetor tipo NCR 2, do inglês *Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 2*

NCR4 - recetor tipo NCR 4, do inglês *Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 4*

NK - Células *Natural Killer*

pDNA - DNA de plasmídeo

PCR – reação em cadeia da polymerase, do inglês, *Polymerase chain reaction*

SOC – meio de cultura *Super Optimal Broth*

Tan – Temperatura *annealing* ou hibridização dos *primers*

XhoI – enzima de restrição isolada da *Xanthomonas holcicola*

Símbolos Gregos

α – alfa

μ - micro

γ – gama

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENGENHARIA GENÉTICA, CLONAGEM MOLECULAR E SUBCLONAGEM

A Engenharia genética surge como uma tecnologia complexa, não nos seus aspetos teóricos, mas sim no seu domínio de ordem prática, devido à multiplicidade de vetores, enzimas de restrição e ainda, por causa dos processos de clonagem molecular.

Embora muitas técnicas diferentes e complexas estejam envolvidas, os princípios básicos da manipulação genética são bastante simples. A tecnologia baseia-se na premissa de que a informação genética, codificada pelo DNA e organizada em forma de genes, é um recurso que pode ser manipulado de várias maneiras para atingir determinados objetivos na ciência pura e aplicada, assim como na medicina. (*Genome Editing*, 2016)

Por exemplo, a engenharia genética pode envolver a adição de um gene de uma espécie a um organismo de uma espécie diferente para produzir uma característica desejada. Usada na medicina, na indústria alimentar, indústria farmacêutica, indústria agroalimentar e também na produção de biocombustíveis. (*Genome Editing*, 2016)

As tecnologias de DNA recombinante têm sido críticas para impulsionar os avanços biotecnológicos e facilitar os estudos voltados para a compreensão dos princípios biológicos básicos. Apesar de suas limitações, a clonagem baseada em digestão e ligação ainda é amplamente utilizada para gerar construções de DNA para uma variedade de aplicações de biologia molecular. Ao mesmo tempo, as técnicas para a montagem do DNA têm-se expandido rapidamente, permitindo uma manipulação genética mais precisa na biologia sintética e na engenharia metabólica. (*Genome Editing*, 2016)

A clonagem molecular consiste na montagem e replicação do DNA recombinante em organismos hospedeiros enquanto a subclonagem consiste em extrair ou criar cópias de um gene alvo a partir de um plasmídeo já construído e inserir o gene de interesse num novo vetor. Esta técnica é frequentemente usada para obter uma proteína de interesse que é natural de um organismo complexo, por exemplo do corpo humano e produzi-lo em escala laboratorial para futuras pesquisas. (*Genome Editing*, 2016)

O sistema de expressão pET (como o pET28a(+), o vetor de expressão usado neste trabalho) é o sistema mais poderoso já desenvolvido para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E.coli*. Os genes alvo que são clonados em plasmídeos pET ficam sob o controle da forte transcrição do T7 RNA polimerase, podendo ser introduzido sinas e “tag” de produção, dependendo da opção tomada na clonagem. A expressão é induzida pelo

fornecimento de uma fonte de T7 RNA polimerase na célula hospedeira. A T7 RNA polimerase é tão seletiva e ativa que quase todos os recursos da célula são convertidos para a expressão do gene alvo; o produto desejado pode compreender mais de 50% da proteína celular total algumas horas após a indução.

Outro benefício importante deste sistema é sua capacidade de manter transcricionalmente silenciosos os genes-alvo, no estado não induzido. Os genes-alvo são inicialmente clonados usando hospedeiros que não contêm o gene T7 RNA polimerase, eliminando assim a instabilidade do plasmídeo devido à produção de proteínas potencialmente tóxicas para a célula hospedeira. Quando estabelecido num hospedeiro para expressão, com controle *lacUV5* a expressão é induzida pela adição de IPTG. (Matthijssens et al., 2008)

O objetivo principal nesta dissertação foi clonar os receptores NCR1, NCR2 e NCR4 (de células do sistema imune humano) no pET28a(+), de modo a obter estirpes estáveis de *Escherichia (E.) coli* a partir das quais obter as proteínas purificadas.

1.2. CÉLULAS CITOTÓXICAS OU NATURAL KILLER CELLS

As células natural killer (NK) e os linfócitos T citotóxicos (CTL, do inglês Cytotoxic T Cells), são células com propriedades citotóxicas, que intervêm em diferentes fases da resposta imune, inata e adaptativa, respetivamente. A sua ação consiste na eliminação de células estranhas ao organismo, nomeadamente células tumorais ou células infetadas por vírus, através da ação da perforina e das granzimas existentes nos grânulos, que levam à lesão da membrana e induzem a apoptose dessas células (morte celular programada). (Correia & Pessoa, 2013)

Estas células citotóxicas são reconhecidas, do ponto de vista morfológico, como “linfócitos grandes granulares” (Correia & Pessoa, 2013), pois são ligeiramente maiores do que os restantes linfócitos e apresentam no seu citoplasma grânulos citotóxicos. (Genome Editing, 2016) Do ponto de vista fenotípico, caracterizam-se, entre outros aspetos, por apresentarem nas suas membranas receptores que permitem, de uma forma controlada, a ativação ou inibição da função citotóxica. Estes receptores são designados genericamente por receptores “assassinos” ou receptores killer. (KR, do inglês Killer Receptors) (Correia & Pessoa, 2013)

Alguns trabalhos já relacionaram a expressão dos KR com diversas doenças imunológicas e hematológicas, bem como com a resposta imune a infeções vírias, tumores e células transplantadas. (Correia & Pessoa, 2013)

O conhecimento da diversidade dos KR expressos à superfície das células NK e dos CTL permitirá compreender melhor a função destas células na resposta imune a tumores e às infeções, bem como o seu papel em várias patologias de foco imunológico e hematológico.

As células Natural Killer ou NK pertencem a uma categoria de células coletivamente denominada células linfoides inatas (ILC) (que também englobam as ILC1, ILC2 e ILC3). As células NK representam 5 a 15% das células mononucleares do sangue periférico e têm um núcleo arredondado e citoplasma granular. Como outras células linfoides inatas, não têm receptores para antígenos específicos (como por exemplo anticorpo IgH); apesar de evidências

recentes sugerirem que algumas células NK tenham algum tipo de memória imunológica.(Diefenbach et al., 2014; Moretta et al., 2000)

Acredita-se que as células NK típicas sejam importantes na vigilância contra certas células tumorais. Elas expressam tanto recetores ativadores como recetores inibitórios. Os recetores ativadores nas células NK podem reconhecer muitos ligantes nas células-alvo, os recetores inibitórios nas células NK reconhecem moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I. As células NK só podem destruir os seus alvos quando não há sinal forte de recetores inibitórios. A presença nas células, das moléculas MHC-I (expressas normalmente nas células nucleadas) previne a destruição dessas células. Pelo contrário, a sua ausência indica que a célula está infetada por alguns vírus que inibem a expressão dos complexos MHC-I ou que sendo a expressão do MHC-I células tumorais, sofreram modificações/mutações genéticas.(Diefenbach et al., 2014; Moretta et al., 2000)

As células NK também podem inibir citocinas que é uma fonte importante de interferão gama (IFN- γ) gama. Ao diminuírem as citocinas as células NK influenciam a imunidade, promovendo a diferenciação das células T auxiliares do tipo (Th1) e inibindo células T auxiliares do tipo 2 (Th2).(Diefenbach et al., 2014; Foster et al., 2003)

Indivíduos com deficiências nas células NK (p. ex., alguns tipos de imunodeficiência combinada grave) são especialmente suscetíveis a infeções pelos vírus herpes e papilomavírus humano, enquanto um excesso de células NK pode contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes.(Marangon et al., 2008; Togawa et al., 2014)

1.3. RECETORES KILLER OU KR

O reconhecimento de células alvo acontece pela interação de sinais provenientes de respostas de vários recetores ativadores, presentes na membrana das NK e dos CTL, quando estes se associam com os respetivos ligandos, que estão presentes nas membranas das células alvo.(Marangon et al., 2008; Pinheiro et al., 2020)

As células NK e os CTL exercem a sua função citotóxica sobre as células estranhas ao organismo, sejam elas células modificadas (como no caso de células tumorais ou infetadas por vírus) ou células estranhas (p.ex. aloenxertos e/ou transplantes), mas não em células normais. Sabe-se hoje que é uma função controlada por recetores killer (KR) expressos à superfície das células citotóxicas que reconhecem moléculas do MHC-I e que têm funções ativadoras ou inibitórias.(Lima et al., 2001)

Atualmente são conhecidos vários tipos de KR que se podem classificar tendo em conta a estrutura do recetor, o tipo de ligando e a função, nas seguintes as famílias de KR:

- Recetores de citotoxicidade natural (NCR, do inglês Natural Cytotoxicity Receptors);
- Recetores killer semelhantes às imunoglobulinas (KIR, do inglês Killer cell Immunoglobulin like Receptors);

- Recetores killer semelhante à lectina (KLR, do inglês Killer cell Lectin-like Receptors);
- Recetores leucocitários semelhantes às imunoglobulinas (LILR, do inglês Leucocyte Ig-like Receptors).

Existem ainda outros recetores não integrados nestas famílias, com funções ativadoras, inibitórias ou co-estimuladoras. De uma forma geral, os ligandos dos KR podem ser moléculas do MHC classe I ou moléculas não MHC (como é o caso dos NCR). (Jobim & Jobim, 2008)

Inicialmente sugeriu-se que as células NK teriam a capacidade de reconhecer moléculas do complexo MHC-I através de KR, que ativariam ou inibiriam a sua função. (Jobim & Jobim, 2008)

As células NK têm funções de imunovigilância, isto é, vigiam o organismo procurando células com ausência ou diminuição de expressão de moléculas MHC-I do próprio, bem como de células com aumento de ligandos para recetores ativadores (moléculas estruturalmente relacionadas com as do MHC da classe I). Por exemplo, complexos como o antígeno Leucocitário Humano (HLA) ajudam células NK a distinguir antígenos próprios do organismo e antígenos exógenos ou anormais e, conseqüentemente, a combaterem invasores e anomalias (Fig 1). Assim, os KR que estas células possuem permitem que a citotoxicidade aconteça num ambiente adequado e controlado, evitando a destruição inadvertida de células normais. (Lima et al., 2001; Marangon et al., 2008)

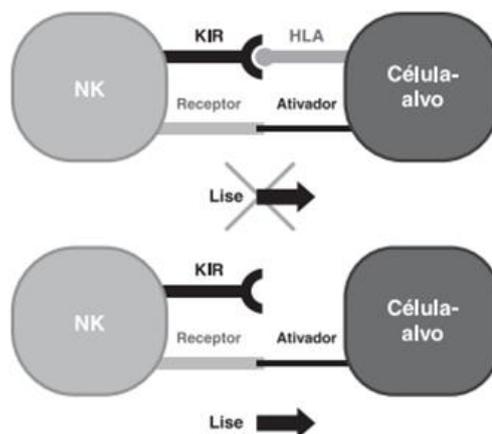


Figura 1 Relações entre as células NK e as células alvo, de acordo com a presença ou ausência de ligandos HLA. HLA=antígeno leucocitário; KIR=Killer immunoglobulin-like receptor; NK=Natural Killer.

As propriedades inibitórias ou ativadoras dos KR são atribuídas a domínios existentes na sua porção citoplasmática e à sua interação com outras moléculas, respetivamente.

Os recetores KR com funções inibitórias apresentam na sua porção citoplasmática domínios ITIM (do inglês *Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*), os KR com funções ativadoras devem a sua função à sua associação com proteínas que contêm domínios designados de ITAM (do inglês *Immunoreceptor tyrosine based activatory motif*). (Jobim &

Jobim, 2008) Os motivos ITIM não são mais que sequências de aminoácidos que, ao interagirem com o seu ligando, fosforilam, por ação de tirosina cinases, conduzindo ao recrutamento de outras enzimas como a fosfo-tirosina-fosfatase. Estas últimas enzimas, ao desfosforilarem, transmitem sinais inibitórios ao interior das células. (Jobim & Jobim, 2008)

Os motivos ITAM, presentes em proteínas como a proteína ativadora DNAX de 10 kDa (DAP10), a proteína ativadora DNAX de 12 kDa (DAP12), o recetor para o fragmento Fc da imunoglobulina IgE (FceRI) e a cadeia zeta do CD3 (CD3 ζ), são responsáveis por ativarem as NK por mecanismos de fosforilação e desfosforilação. (Jobim & Jobim, 2008)

1.4. RECETORES DE CITOTOXICIDADE NATURAL OU NCR

Como referido, esta dissertação incide sobre um grupo de recetores de células NK, nomeadamente o NCR1, NCR2 e NCR4.

Os NCR são específicos das NK, pertencem à família das imunoglobulinas e têm função ativadora. Os ligandos destes recetores são ainda em pouco conhecidos, mas alguns deles parecem ter um papel importante no reconhecimento de células tumorais e das células infetadas por vírus, como é o caso das hemaglutininas (HA) virais (p.ex. HA do vírus influenza). (Jobim & Jobim, 2008; Marangon et al., 2008)

Os recetores NCR contêm três membros de recetores: o NCR1 ou NKp46, NCR2 ou NKp30 e NCR3 ou NKp44.

Enquanto o NCR1 ou NKp46 é codificado por um gene que se localiza no cromossoma 9, no complexo dos recetores leucocitários ou LCR (sigla do inglês, *Leucocyte Receptor Complex*), os genes que codificam para o NCR2 ou NKp30 e para o NCR3 ou NKp44 localizam-se no cromossoma 6. (Foster et al., 2003)

O NCR1 e o NCR3 são expressos constitutivamente nas células NK circulantes (CD56+ e CD56++), enquanto o NCR2 é expresso apenas nas células NK ativadas. (FOSTER, [et al.], 2003)

O NCR1 e o NCR3 exercem a sua função através dos motivos ITAM de outras moléculas, como a cadeia zeta do CD3 (CD3 ζ) e as cadeias gama do recetor de alta afinidade para o fragmento Fc da IgE.

Já o NCR2 associa-se, através do seu domínio citoplasmático, à DAP12/KARAP, uma molécula adaptadora usada para a transmissão do sinal de ativação. (Moretta et al., 2000)

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. COLI*.

Para iniciar este trabalho foi necessário prepara células competentes de *E.coli* da estirpe DH5 α que é uma estirpe com alta eficiência para transformações e clonagem.(*Genome Editing*, 2016)

As células competentes para transformação foram preparadas usando o método clássico de cloreto de cálcio. De uma forma resumida, as células de *E. coli* foram cultivadas em placa com meio Luria–Bertani (LB) com agar a 1,2% (m/V) (LB-agar) e a partir daí, uma colónia foi usada para inocular 5 mL de meio Luria broth (LBBroth), (Fisher Bioreagents) e incubada em uma incubadora orbital (Orbital Shaker-Incubator ES-20, Grant-Bio) a 37 °C, 220 rpm durante 16h. Esta pré-cultura foi usada para inocular a 2% (v/v) meio LB fresco, e cultivada em condições idênticas até ser atingida uma densidade ótica de 0,4 – 0,5, correspondendo a fase de crescimento exponencial. Após o tempo de incubação, alíquotas de 1,5 mL de cultura foram transferidas para diferentes microtubos e centrifugadas numa microcentrifuga (Gyrozen 1750 R) por 5 min a 16 000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 750 μ L de CaCl₂ 0,1 M gelado. As células ressuspensas foram mantidas em gelo por 1 hora e depois coletadas por centrifugação com antes, desprezando o sobrenadante.

Quando essas células não são utilizadas no próprio dia, a última etapa de ressuspensão foi realizada usando 50 μ L de CaCl₂ 0,1M e 10% glicerol gelado, e as células foram armazenadas a -80 °C.

Se usadas no próprio dia, foram ressuspensas em 50 μ L CaCl₂ 0,1M gelado e mantidas em gelo.

2.2. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. COLI*

Para realizar o processo de transformação, células competentes de *E. coli* preparadas conforme descrito acima são descongeladas e mantidas em gelo, 50 μ L de células competentes foram adicionados 20 μ L das reações de ligação ou com 5 μ L de plasmídeo pretendidos neste trabalho.

A mistura de células competentes e DNA plasmídico foi mantido no gelo por 30 minutos. Um choque térmico foi aplicado às células, transferindo o microtubo para um banho a 42 °C por 45 segundos. Os tubos foram colocados novamente no gelo por 2 minutos, e 900 µL de meio SOC (caldo Super Optimal com repressão catabólica, da NZYTech, Portugal) foram adicionados, as células foram incubadas a 37°C com agitação durante 1h, e recolhidas por centrifugação. O sobrenadante foi desprezado deixando 100µl. Estes foram usados para ressuspender as células, para serem semeadas em placas de LB ágar, suplementadas com canamicina na concentração final de 30µg/µl. 25 µL da suspensão celular foram usados para inocular uma placa, e os 75 µL restantes foram usados para inocular outra placa. Todas as placas foram incubadas durante a noite a 37°C.

2.3. SELEÇÃO DE COLÓNIAS TRANSFORMADAS

Após a incubação durante a noite, cada colónia nas placas de transformação DH5α foi coletada individualmente, inoculada em 5mL de meio LB suplementado com canamicina em uma concentração final de 30µg/µL (LBK30) e em simultâneo semeadas numa nova placa de LB agar suplemento com o mesmo antibiótico. As culturas líquidas foram cultivadas por 16 h a 37 °C com agitação a 250 rpm.

2.4. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMÍDICO

Usando esses crescimentos noturnos, o DNA plasmídico foi extraído de células transformadas, através do método de lise alcalina com o Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extração do DNA plasmídico realizou-se a amplificação por PCR dos genes neles clonados.

2.5. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE

A amplificação foi realizada num termociclador (Cleaver GTC96S) usando os seguintes reagentes (tabela 1), as quantidades variam conforme a quantidade necessária ao longo do trabalho.

Tabela 1 componentes para a reação de PCR.

Componentes	Final concentração
Taq 1.1x Master Mix	1x
Primer forward	(0.1-1.0µM)
Primer reverse	(0.1-1.0µM)
pDNA	(0.1-1ng)

H₂O

Prefazer ao vol. pretendido

O PCR em si consiste em uma reação enzimática com três estágios principais em um ciclo a ser repetido 25-35 vezes (desnaturação, *annealing* e extensão) e dois estágios não cíclicos que podem ocorrer uma vez cada, (desnaturação inicial e extensão final). Uma reação completa abrangeria todas essas etapas na seguinte ordem (Artika et al., 2022):

- Desnaturação inicial – a mistura de reação é aquecida até a temperatura (T) ser 98°C durante 2 minutos. Isto assegura a separação completa do DNA de cadeia dupla (dsDNA) em cadeias simples;
- Desnaturação – a primeira etapa cíclica com o mesmo objetivo da etapa anterior no mesmo T e com duração muito menor (ca. 10 segundos);
- *Annealing*– ocorre uma diminuição de T para permitir que os primers hibridem adequadamente com cada uma das cadeias; dependendo da concentração de sais do tampão de reação e da temperatura de *melting* dos primers, a temperatura de *annealing* ideal (esta pode ser alvo de otimização).
- Extensão – T é então aumentado para 72 °C durante 0,15 seg, para iniciar a síntese da sequência alvo complementar;
- Extensão final – nesta última etapa reacional, T é mantido a 72 °C por 5 minutos para garantir que quaisquer finais incompletos sejam corrigidos;

2.6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As amostras de DNA amplificadas por PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão 1x Tris-Acetato-EDTA (TAE). As reações do PCR foram misturadas com 1,75 µl de green safe em simultâneo foi preparado NZYDNA Ladder VI (marcador de peso molecular especialmente desenvolvido para facilitar a quantificação e determinação de tamanho de pequenos fragmentos de DNA em géis de agarose). Os géis foram corridos em cuba de eletroforese horizontal a 100 V em tampão TAE 1x. O gel foi posteriormente fotografado, sob luz ultravioleta (365 nm).

2.7. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DO GEL DE AGAROSE

As bandas de interesse referentes aos DNAs amplificados a partir de PCR ou aqueles tratados enzimaticamente foram purificados com o kit Wizard SV Gel clean-up System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os DNAs plasmídicos foram quantificados com a leitura de absorbância a 260 nm em equipamento Nanodrop (Thermo Scientific).

2.8. DIGESTÃO ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Foram utilizadas as enzimas comerciais NdeI ou speedy NdeI, uma endonuclease isolada de *Neisseria denitrificans* e XhoI ou Speedy XhoI uma endonuclease isolada de *Xanthomonas holcicola* da marca Nzytech. As sequências de reconhecimento são dadas na Tabela 2.

Tabela 2 Sequências de reconhecimento das enzimas de restrição utilizadas neste trabalho.

Enzima de restrição	Sequência de reconhecimento
Xho I	5'...C↓TCGAG...3' 3'...GAGCT↓C...5'
NdeI	5'...CA↓TATG...3' 3'...GTAT↓AC...5'

2.8.1. DIGESTÃO DO PET28A(+)

O plasmídeo pET28a(+) foi digerido com as enzimas de restrição Xho I e Nde I, de acordo com as instruções padrão dos fabricantes, para poder receber os genes de interesse.

Para a digestão, Xho I/NdeI pET28a (+) digeriu-se 3,93µg pET28a (+) (60µL a 65,49 ng/µl) com 1µL da enzima de restrição XhoI (NZYTech, Portugal) e 2µL de NdeI (NZYTech, Portugal) em uma reação com 10 µL de Tampão 10x NZY Buffer U e 27 µL de água estéril, num volume final de 100 µL. A digestão do plasmídeo ocorreu a 37°C, por 1 hora, seguida de inativação da enzima a 65°C por 20 minutos. Estas duas enzimas apresentam eficiência no mesmo tampão NZY Buffer U (10x) e por isso foram realizadas reações de dupla digestão.

Foi efetuada também a digestão do Pet28a(+) com o par de enzimas pET28a (+) (100µL, 17,14µg/µL) foram digeridos com 4µL da enzima de restrição speedy XhoI (NZYTech, Portugal) e speedy NdeI (NZYTech, Portugal) em uma reação com 16 µL de Tampão NZYSpeedyBuffer (10x) e 36 µL de água estéril, num volume final de 160 µL. A digestão do plasmídeo ocorreu a 37°C, por 30 min, seguida de inativação da enzima a 65°C por 20 minutos. Estas duas enzimas apresentam eficiência no mesmo tampão (NZYSpeedyBuffer) e foram realizadas reações de dupla digestão.

O DNA digerido foi purificado usando o Clean-Easy PCR PurificationKit (Canvax, Espanha). Resumidamente, 195 µL da reação foram diluídos com 5 volumes de tampão PB de ligação ao plasmídeo e carregados na coluna e centrifugados a 13.000 xg por 1 minuto. O fluxo foi descartado e a coluna foi lavada com 700 µL de tampão PE de lavagem por centrifugação a 13.000 xg por 1 minuto. Uma segunda centrifugação a 13.000xg por 1 minuto foi realizada para remover todos os vestígios de tampão PE. A coluna foi transferida para um tubo de coleta e o plasmídeo foi eluído adicionando 30 µL de tampão EB de eluição à membrana, incubado

em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 13.000 x g por 1 minuto. O DNA plasmídico digerido e limpo foi quantificado. Medindo sua absorbância a 260 nm, assumindo que Abs (260 nm) de 1 corresponde a uma concentração de dsDNA de 50 ng/μL. Este pET28a(+) digerido com XhoI/NdeI foi quantificado e armazenado a -20°C para uso posterior.

2.8.2. DIGESTÃO NCR1/NCR2/NCR4

Os recetores NCR1/NCR2/NCR4 purificados como descrito em cima foram digeridos pelas as mesmas enzimas de restrição do pET28a(+) em que foi usado uma quantidade aproximadamente 1,80μg de DNA de cada recetor usando as enzimas XhoI ou speedy XhoI e NdeI ou speedy NdeI, seguindo um protocolo idêntico ao da digestão de pET28a(+).

2.9. REAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE NO VETOR DE EXPRESSÃO

As reações de ligação do Pet28a(+) NdeI/XhoI com cada gene digerido foram realizados na presença de enzima T4 DNA ligase. Estas reações foram realizadas com diferentes razões (3X;5X;10X) de insert para vetor, de modo a maximizar as probabilidades de sucesso. As reações de ligação foram feitas na presença da enzima T4 DNA ligase (NZYtech) em um banho a 16°C-20°C por 16 horas e estão representados na tabela 3, para o gene NCR1.

Foram feitas reações idênticas para os genes NCR2 e NCR3.

Tabela 3 Reação de ligação para o vetor pET -28 (+) com o NCR 1

	Ligação Controlo	Ligação 1 3X	ligação 2 5X	Ligação 3 10X
pET-28(+) NdeI/XhoI (~10ng/μL)	-	1,85	1,85	1,85
DNA digerido NCR1 (~60ng/μL)	-	0,45	0,75	1,5
T4 DNA ligase (1 U/μL)	1 μL	1	1	1
Tampão 10X	5 μL	2	2	2
H2O	10 μL	14,7	14,4	13,65
Volume total	20 μL	20	20	20

Para obter as razões 3x;5x e10X foi cálculo como forme a equação 1 que é sugerida pelo fabricante.

$$\frac{ng \text{ do vetor} \times Kb \text{ do insert}}{Kb \text{ do vetor}} \times razão \frac{insert}{vetor} = ng \text{ de insert} \quad (1)$$

Após incubação das reações de ligação, estas foram usadas para transformar células competentes de *E.coli* como descrito em 2.2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho iniciou-se com a preparação de células competentes *E.coli* DH α , que é uma estirpe de *E.coli* usada com mais frequência para aplicações de clonagem. Antes de iniciar as transformações foram quantificados os plasmídeos que continham os cDNA de cada gene de interesse obtidas da biblioteca da Sino Biological, como se pode observa na tabela 4.

Tabela 4 Concentração dos genes de interesse

pDNA (referencia)	Recetores	Absorvância a 260 nm	Concentração (ng/ μ l)
NK _p 46 HG13772-G	NCR1	134,03	7,5
NK _p 44 HG11550-M	NCR2	117,19	8,5
NK _p 80 HG10984-M	NCR4	120,32	8,31

Após a transformação das células competentes *E.coli* DH5 α com os plasmídeos com o genes de interesse, estas foram plaqueadas em placas de meio LB agar e incubadas a 37 $^{\circ}$ C durante a noite. No dia seguinte 2 colónias de cada foram selecionadas, e inoculadas em meio líquido para extrair os plasmídeos com o kit "Quick reference protocolo card". Posteriormente os plasmídeos foram quantificados e as quantidades obtidas de plasmídeo de cada gene estão na tabela 5.

Tabela 5 Quantificação dos pDNA contendo os genes após transformação em *E.coli* DH5 α

Recetores	pDNA		Media (ng/ μ l)
NCR2	Nkp44	1	41,96
	Nkp44	2	129,58
NCR1	Nkp46	1	34,18
	Nkp46	2	39,79
NCR4	Nkp80	1	32,72
	Nkp80	2	30,48

3.1. PRIMEIRA ABORDAGEM

Na primeira abordagem para clonar as sequencias codificantes dos recetores NCR1, NCR2 e NCR4, foi utilizada o VWR Red DNA polimerase para amplificar os cDNA a partir dos plasmídeos providentemente purificados. Foi elaborado o protocolo de PCR com um gradiente

de temperatura annealing (Tan) entre 60 e 70°C, com intervalo de 2°C, com o objetivo de encontrar a melhor Tan para cada gene. Após a amplificação realizou-se o gel de agarose 2% em TAE 1X que se pode observar na figura 2.

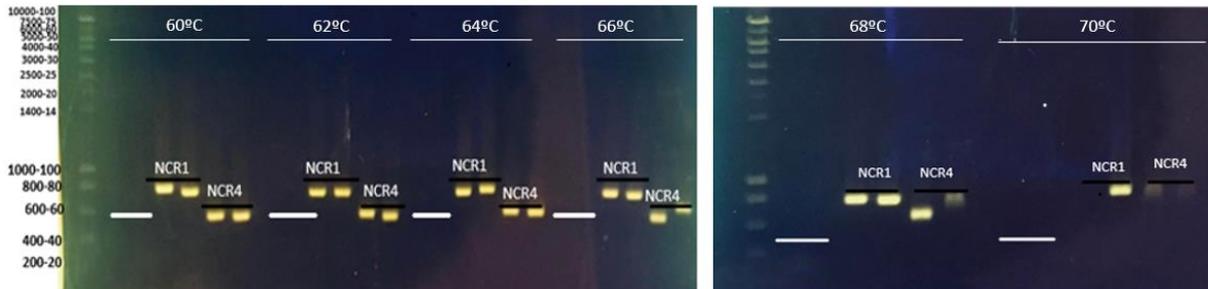


Figura 2 Amplificação dos genes de interesse com VWR Red DNA polimerase. O programa de PCR: 98°C 2 min; 35x [98°C 10s; Tan [60°C(2°C) -70°C] 30s;72°C 45s]; 72°C 5 min. As reações foram feitas em 50µl volume final com as quantidades na tabela 5 resetivas a cada pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel.

Com a análise do gel da figura 2 é possível observar que para o alvo NCR2 não houve amplificação pois não apresentou nenhuma banda (traço branco corresponde onde apresentaria as bandas do gene NCR2 se tivéssemos resultados) em nenhuma das Tan. Já os outros genes alvos apresentam bandas em quase todas as Tan. Contudo com todo nas temperaturas mais elevadas observa-se algum aumento das bandas e em certas reações não apresentam o tamanho esperado correto. Cada gene com têm um tamanho específico o NCR1 é de 710 bp, o NCR2 é de 600bp e o NCR4 é de 520bp.

Com este gel foi possível concluir que as melhores bandas do NCR1 foram Tan 60°C, 62°C, 64°C e 66°C e o NCR4 nas Tan T60°C, T62°C e T64°C.

Quanto mais elevada a Tan, maior a abrangência no emparelhamento dos primers. Fase ao insucesso para amplificar o gene alvo o NCR2, repetiu-se a amplificar dos genes com Tan um pouco mais baixas (55°C a 65°C). O resultado das reações foi analisado em gel de agarose (fig3) o NCR1 apresentava bandas em todas as temperaturas e todas continham o tamanho pretendido (melhores temperaturas 61°C e 63°C), para o NCR4 obtiveram bandas nas temperaturas 63°C e 65°C e com os tamanhos desejados.

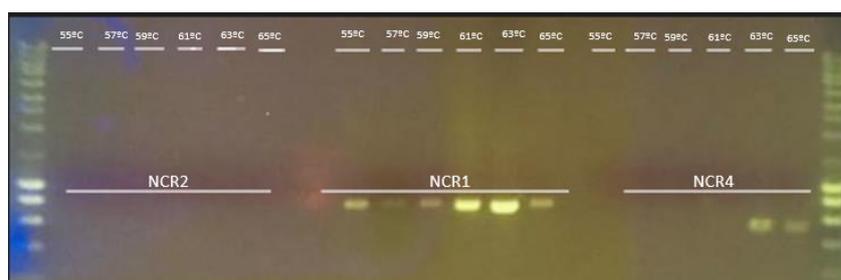


Figura 3 Amplificação dos genes de interesse com VWR Red DNA polimerase. O programa de PCR: 98°C 2 min; 35x [98°C 10s; Tan [55°C(2°C) -65°C] 30s;72°C 45s]; 72°C 5 min. As reações foram feitas em 50µl volume final com as quantidades na tabela 5 respectivas a cada pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel.

Com estes resultados fez-se mais uma amplificação do gene NCR1 e NCR4 a como se pode observar, obtiveram-se resultados similares aos anteriores: nenhuma banda foi obtida na amplificação do NCR2 à Tan de 63°C e preparou-se um gel agarose 2% com poços de 50 µl com o objetivo de extrair da banda e purificar o fragmento de DNA do gene.

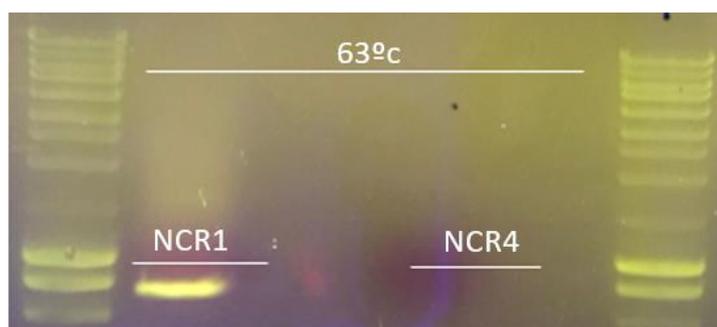


Figura 4 Scale- up dos genes NCR1 e NCR4 nas condições ótimas de amplificação. O programa de PCR: 98°C 2 min; 35x [98°C 10s; Tan [63°C] 30s;72°C 45s]; 72°C 5 min. As reações foram feitas em 100µl volume final com 34,28 e 39,79 µl pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel.

Como é possível observar na figura 4 o único gene amplificado a 63°C foi o NCR1. Este foi extraído e purificado conforme descrito em 2.2. Quantificou-se o gene, e foi obtido uma média de 15,40 ng/µl.

Para clonar o gene NCR1 no vetor pET28a(+) o gene foi digerido com o conjunto de enzimas Xho1/Nde1. O pET28a(+) também foi digerido pelo mesmo par de enzimas. Todos os fragmentos digeridos com essas enzimas foram limpos e purificados usando o Clean-Easy™ PCR e depois os fragmentos de DNA foram quantificados; os resultados da quantificação são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 Concentração de DNA obtida em cada digestão.

DNA digerido		[NdeI/XhoI] ng/µl		Media ng/µl
pET 28 a (+)	pET 28 a (+)	25,65	28,36	27,005

NCR1	NCR1	45,23	48,72	45,48
------	------	-------	-------	-------

Efetuiu-se a ligação com T4 DNA ligase em que se ligou 50ng de pET28 a (+). Realizaram três razões insert/vetor do NCR1 em que a primeira (X3) 20,48 ng (0,45 µl), a segunda (X5) 34,13 ng (0,75µl) e por último (X10) 68,26 ng (1,5 µl) de NCR1 digerido e purificado.

Ao terminar a ligação efetuou-se a transformação com células competentes de *E.coli* DH5α no final espalhou-se em duas placas de petri (uma que continha 25 µl e a outra os restantes 75 µl da suspensão celular) em meio seletivo (LB agar contendo kanamicina).

A primeira parte deste trabalho não foi bem-sucedido. Os resultados obtidos nas placas no dia seguinte não continham nenhum crescimento o que impediu a continuação do trabalho proposto inicialmente. Para além disso, não foi possível amplificar o gene alvo NCR2, nem o NCR4 (apesar para este último, terem sido identificadas condições ótimas de amplificação. Existe vários fatores que podem justificar a falta de resultados iniciando pelo um simples erro na realização de alguma técnica, até a não ligação entre o vetor pET28a(+) com os genes. Como havia muitas possibilidades optou-se por iniciar o procedimento desde o início abordagem alterando alguns procedimentos.

3.2. SEGUNDA ABORDAGEM

Na segunda abordagem utilizou-se o supreme Nzyproof DNA polimerase para amplificar os cDNA dos 3 genes a partir dos plasmídeos purificados com a Tan [55°C[2°C]70°C]. Na figura 5 é possível concluir que o gene NCR1 apresentava bandas, algumas bandas aproximam-se do tamanho pretendido, o gene NCR2 só apresentava bandas em três das temperaturas (60°C,62°C e 66°C) contendo o tamanho (entre os 500 - 600bp) aproximadamente correto (600bp). Desta vez foi possível observar duas bandas com o gene NCR4 nas Tan 58°C e 64°C com o tamanho ligeiramente próximo a 520 bp.



Figura 5 Amplificação dos genes NCR1, NCR2 e NCR4. O programa de PCR: 98°C 2 min; 35x [98°C 10s; Tan [60°C(2°C) -70°C] 30s;72°C 45s]; 72°C 5 min. As reações foram feitas em 50 µl volume final com 10 ng pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel.

As bandas foram cortadas do gel, extraídas e quantificadas como na primeira parte experimental obtendo as seguintes concentrações que se encontram na tabela 7.

Tabela 7 Concentração dos genes alvos após extração das bandas amplificadas com o DNA polimerase.

Genes	D1	D2	Media ng/μl
NCR1	127,7	128,5	128,10
NCR2	85,51	90,01	87,76
NCR4	39,5	43,2	41,35

A digestão dos genes extraídos foi efetuada com outro protocolo de digestão recorrendo Speedy NdeI/Speedy XhoI. Esta alteração foi efetuada para poder realizar a digestão mais rápido.

Todos os fragmentos de DNA digeridos foram limpos e purificados usando o Clean-Easy™ PCR e depois quantificados; os resultados da quantificação são mostrados na tabela 8. Foi também preparado novo pET28a(+) digerido com estas enzimas.

Tabela 8 Concentração de DNA obtida após a digestão.

Gene	D1	D2	Media ng/μl
NCR1	94,87	95,23	95,05
NCR2	64,03	68	66,02
NCR4	32,73	35,12	33,93
pET 28 a (+)	23,44	28,46	25,95

A procedimento da ligação foi elaborado da mesma forma que na primeira parte experimental com razões vetor/insert de 1/5 e 1/10 para cada gene (NCR1, NCR2 e NCR4). Cada ligação foi transformado por choque térmica em células de *E.coli* DH5α competentes, e a suspensão celular foi plaqueado em duas placas com meio LB com K30, uma com uma inoculação de 25 μl e a outra de 75μl. Como controlo positivo da transformação foi plaqueado DH5α com pET28a(+) não digerido com o intuito de comprovar que as células competentes estavam funcionais como se pode ver na figura 6.

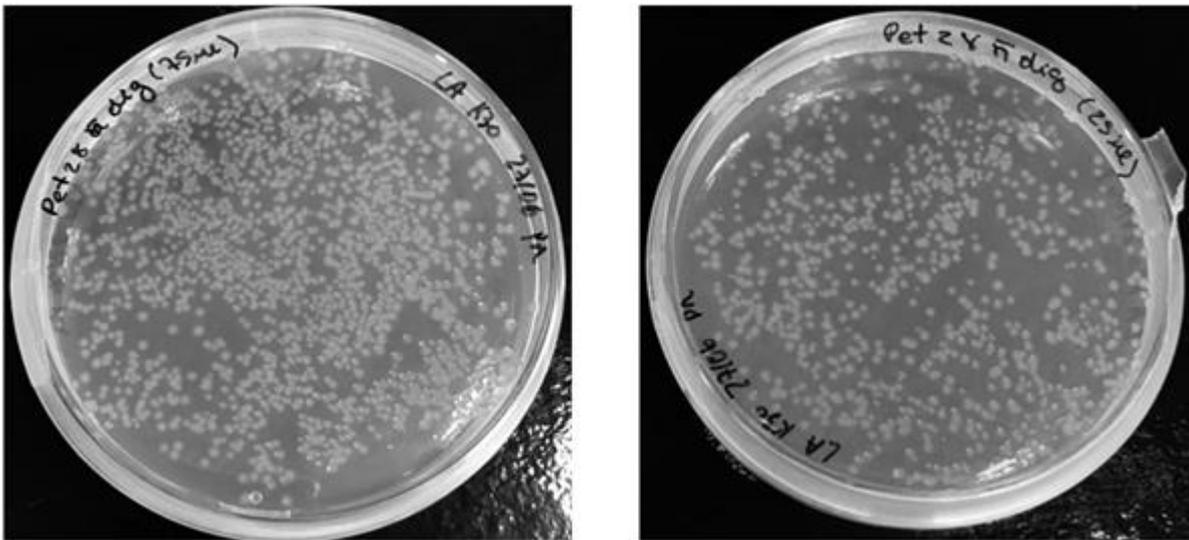


Figura 6 Placas com pET28a(+) não digerido imagem da esquerda com um espalhamento com 75µl e a da direita com o espalhamento 25 µl.

Efetou-se também um controlo da ligação, transformando com o pET28a(+) digerido, mas sem adição de insert.

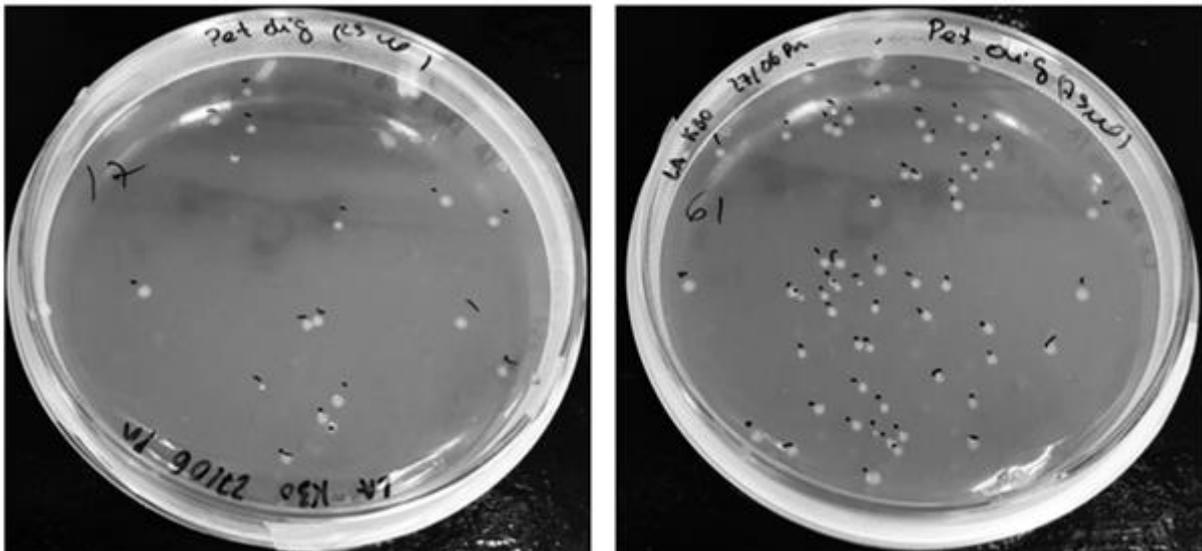


Figura 7 Placas com pET28a(+) digerido em DH5α imagem da esquerda com um espalhamento com 75µl e a da direita com o espalhamento 25 µl.

Na figura 7 demonstra um exemplar das placas com o meio LB K30 com crescimento de colónias (com 24h de incubação). Contaram-se as colónias tendo-se obtido: 26 colónias para as placas com a ligação pET28a(+) com o gene NCR1, 31 colónias para placas com a ligação pET28a(+) gene NCR2 e 42 colónias para as placas com a ligação pET28a(+) gene NCR4. Para as placas com o pET28a(+) digerido foram obtidas 78 colónias e as placas com o pET28a(+) não digerido estavam incontáveis.

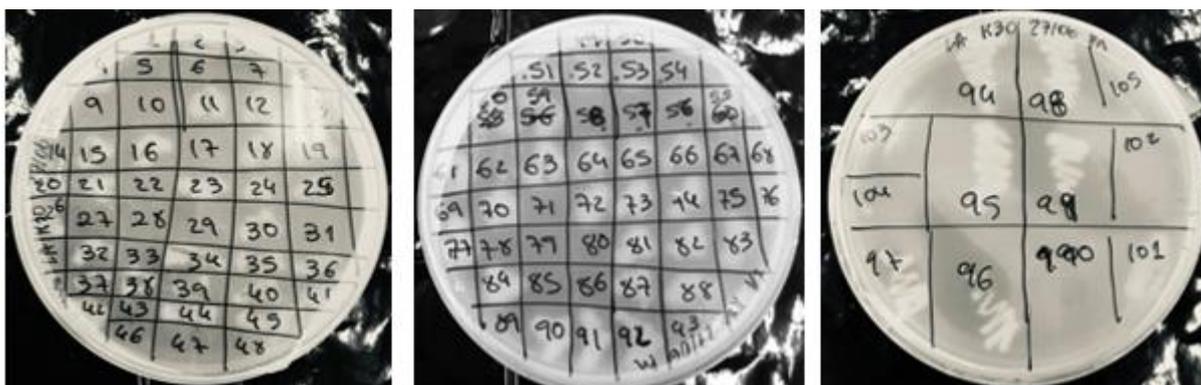


Figura 8 Riscados com crescimento das colónias obtidas anteriormente.

As colónias das ligações pET28a(+) genes alvos foram repicadas para novas placas LB agar com canamicina. Os riscados obtidos na figura 8 foram analisados por PCR de colónias que consiste em colocar um pouco dos riscados para um eppendorf com 50µl H₂O dispensar as células com vortex vigoroso, e ferver durante 5 min e depois centrifugado 1 min e 30 seg. á 16000 rpm para efetuar a extração direta do DNA. Após a extração direta a suspensão de DNA é aplicada numa mistura racional e amplificada por PCR, usando primers que emparelham no plasmídeo pET28a(+). As reações são analisadas em gel de agarose.

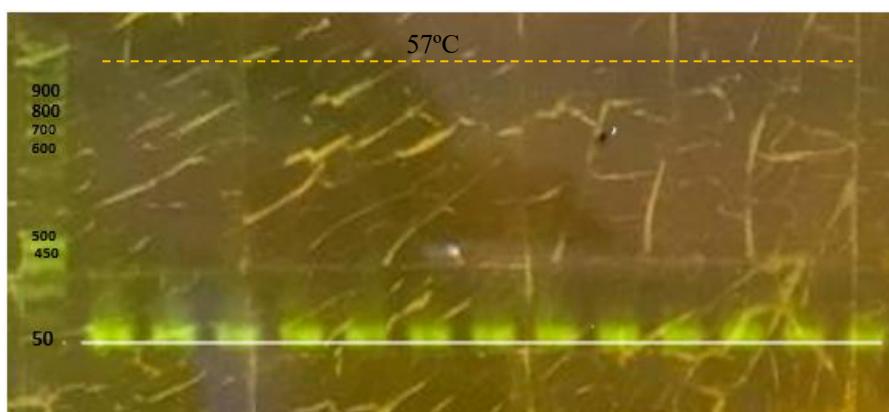


Figura 9 Amplificação da região de clonagem do pET28a(+), dos clones de ligação dos genes NCR1, NCR2, NCR4. O programa de PCR: 95°C 2 min; 35x [95°C 30s; Tan [57°C] 40s; 72°C 40s]; 72°C 10 min. As reações foram feitas em 50 µl volume final com 10 ng pDNA, e foram aplicadas na totalidade no gel.

Na figura 9 podemos observar que todos os clones analisados apresentam uma banda com cerca de 50 bp. Pode-se concluir que o insert não ficou inserido no vetor em nenhuma das tentativas de clonagem (NCR1, NCR2 e NCR4) como pretendido. As restantes colónias obtidas nas transformações foram igualmente analisadas e o resultado foi sempre idêntico.

Com estes resultados não foi possível avançar para as próximas etapas que estavam propostas no plano de estágio, nomeadamente, a expressão da proteína.

4. CONCLUSÃO

O principal objetivo desta dissertação de mestrado baseava-se na sub-clonagem dos recetores NCR1, NCR2 e NCR4 expressos por células Natural Killer. Seguidamente, e através de transformação de células competentes pretendia-se a obtenção de estirpes bacterianas estáveis capazes de expressar as proteínas, identificáveis através da amplificação por PCR os genes de interesse. Tendo como passo final a purificação e caracterização das proteínas finais expressas.

Em sequência deste trabalho as conclusões que se conseguiu obter são as seguintes:

As células transformadas com os genes de interesse foram amplificadas com temperaturas de *annealing* diferentes com o objetivo otimizar o protocolo do PCR. Na primeira tentativa as temperaturas de *annealing* com as melhores bandas foram 60°C, 62°C, 64°C e 66°C pois nestas temperaturas as bandas correspondiam ao tamanho dos genes. Nesta primeira tentativa de *scale up*, o único gene que se conseguiu obter em quantidade suficiente para as próximas fases foi o NCR1 que após ser digerido com o par de enzimas XhoI/NdeI obteve uma concentração média de 45,48 ng/μl e o pET 28 a (+) obteve uma média de 27,005 ng/μl. Não foi possível obter resultados após a realização da ligação, pois não houve crescimento de colónias nas placas de LB agar com canamicina.

Sendo assim voltou-se ao princípio do trabalho dando assim o início da segunda tentativa. Utilizando outra DNA polimerase, na amplificação as temperaturas de *annealing* foram reduzidas sendo desta vez Tan [55°C [2°C] 64°C]. O que levou a o aparecimento de uma ligeira banda nas Tan 57°C e 64°C para o gene NCR4 em relação ao gene NCR2 foi obtido três bandas na Tan 55°C, 57°C e aos 61°C. Com estas bandas obteve-se as seguintes concentrações medias produtos de PCR dos genes: NCR1 128,10 ng/μl, NCR2 87,76 ng/μl e o NCR4 41,35 ng/μl.

A digestão destes fragmentos foi realizada com enzimas tipo *speedy* (que atuam mais rapidamente), mas com os mesmos pares de enzimas. Desta vez, depois da ligação obteve-se resultados nas placas de LB agar com canamicina. Fez-se também um controlo positivo da eficiência de transformação das células competentes (com o pET28a(+) não digerido), que teve sucesso. Efetuou-se uma transformação controlo para aferir a qualidade do pET28a(+)

digerido, e de facto o nº de colónias resultantes de auto-ligação foi superior ao nº de colónias obtidas na transformação das ligações ao genes dos NCR.

Para analisar o sucesso das ligações e das clonagens, as colónias obtidas foram analisadas por PCR de colónias, amplificando-se a região de clonagem (*multiple cloning site*) do plasmídeo. A análise do gel de agarose só apresentava bandas referentes ao vetor utilizado pET28a(+), demonstrando serem clones negativos. Com isto não foi possível realizar todos objetivos propostos na dissertação.

5. CONCLUSION

The main objective of this master's thesis was based on the sub-cloning of the NCR1, NCR2, and NCR4 receptors expressed by Natural Killer cells. Then, through the transformation of competent cells, the aim was to obtain stable bacterial strains capable of expressing proteins, identifiable through PCR amplification of the genes of interest. The final step is the purification and characterization of the final expressed proteins.

Following this work, the conclusions that were obtained are the following:

Cells transformed with the genes of interest were amplified at different annealing temperatures with the aim of optimizing the PCR protocol. In the first attempt, the annealing temperatures with the best bands were 60°C, 62°C, 64°C, and 66°C because at these temperatures the bands corresponded to the size of the genes. In this first scale-up attempt, the only gene that was able to be obtained in sufficient quantity for the next phases was NCR1, which after being digested with the XhoI/NdeI enzyme pair obtained an average concentration of 45.48 ng/μl and pET 28 to (+) I obtained an average of 27.005 ng/μl. It was not possible to obtain results after the ligation was carried out, as there was no growth of colonies on the LB agar plates with kanamycin.

Therefore, we returned to the beginning of the work, thus beginning the second attempt. Using another DNA polymerase, during amplification the annealing temperatures were reduced, this time being Tan [55°C [2°C] 64°C]. This led to the appearance of a slight band at Tan 57°C and 64°C for the NCR4 gene in relation to the NCR2 gene, three bands were obtained at Tan 55°C, 57°C and 61°C. With these bands, the following average concentrations of PCR products from the genes were obtained: NCR1 128.10 ng/μl, NCR2 87.76 ng/μl, and NCR4 41.35 ng/μl.

The digestion of these fragments was carried out with speedy enzymes (which act faster), but with the same pairs of enzymes. This time, after binding, results were obtained on LB agar plates with kanamycin. Positive control of the transformation efficiency of competent cells (with undigested pET28a(+)) was also carried out, which was successful. A control transformation was carried out to assess the quality of the digested pET28a(+), and in fact, the number of colonies resulting from self-ligation was higher than the number of colonies obtained in the transformation of connections to the NCR genes.

To analyze the success of ligations and cloning, the colonies obtained were analyzed by colony PCR, amplifying the cloning region (multiple cloning sites) of the plasmid. The agarose gel analysis only showed bands referring to the vector used pET28a(+), demonstrating that they were negative clones. As a result, it was not possible to achieve all the objectives proposed in the dissertation.

6. BIBLIOGRAFIA

- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/genes13122387>
- Correia, R. N., & Pessoa, U. F. (2013). *Qual O Papel Das Células Natural Killer Na Infecção Por Vih – Sida*.
- Diefenbach, A., Colonna, M., & Koyasu, S. (2014). Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity*, 41(3), 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.005>
- Foster, C. E., Colonna, M., & Sun, P. D. (2003). Crystal Structure of the Human Natural Killer (NK) Cell Activating Receptor NKp46 Reveals Structural Relationship to Other Leukocyte Receptor Complex Immunoreceptors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 46081–46086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308491200>
- Genome editing*. (2016). Nuffield Council on Bioethics. <http://www.nuffieldbioethics.org>
- Jobim, M., & Jobim, L. F. J. (2008). Natural killer cells and immune surveillance. *Jornal de Pediatria*, 84(4 SUPPL.), 58–67. <https://doi.org/10.2223/JPED.1780>
- Lima, M., Dos Anjos Teixeira, M., Queirós, M. L., Leite, M., Santos, A. H., Justiça, B., & Orfão, A. (2001). Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 27(4), 731–743. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2001.0443>
- Marangon, A. V., Guelsin, G. A. S., Rudnick, C. C. C., Franceschi, D. S. A., Visentainer, J. E. L., & Sell, A. M. (2008). Receptores ker de células natural killer. *Ciência, Cuidado e Saúde*, 7(0), 153–160. <https://doi.org/10.4025/ciencucuidsaude.v7i0.6588>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., Palombo, E. A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J. T., Rahman, M., & Van Ranst, M. (2008). Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *Journal of Virology*, 82(7), 3204–3219. <https://doi.org/10.1128/jvi.02257-07>
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., & Moretta, A. (2000). Human NK-cell receptors. *Immunology Today*, 21(9), 420–422. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01673-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01673-X)
- Pinheiro, P. F., Justino, G. C., & Marques, M. M. (2020). NKp30 - A prospective target for new cancer immunotherapy strategies. *British Journal of Pharmacology*, 177(20), 4563–4580. <https://doi.org/10.1111/bph.15222>
- Togawa, J., Nakaoku, Y., Hagiwara, M., Murakami, G., Mitsueda-Ono, T., & Matsui, M. (2014). Improvement of pontine perfusion with steroid therapy in a patient with chronic lymphocytic inflammation with pontine perivascular enhancement responsive to steroids: A case report.

Clinical and Experimental Neuroimmunology, 5(3), 367–370. <https://doi.org/10.1111/cen3.12134>

ANEXOS – PROTOCOLOS

Anexo 1– Protocolo de extração de plasmídeo

Quick Reference Protocol Card

illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit

28-9042-69 (50 purifications)

28-9042-70 (250 purifications)

Protocol for 1.5 & 3 ml culture volumes

• Check appropriate volume of ethanol added to Wash buffer type 1

⊕ :Add ⊖ :Spin ⌚ :Incubate

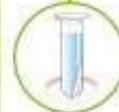
1. Harvesting of bacterial culture

- ⊕ 1.5 ml bacterial culture
- ⊖ 30 seconds 16 000 × g
 - Pour off and discard supernatant
 - Repeat for 3 ml culture volume
- ⌚ 30 seconds 16 000 × g (for all culture volumes)
 - Remove residual supernatant



2. Lysis

- ⊕ 175 µl Lysis buffer type 7; re-suspend pellet
- ⊕ 175 µl Lysis buffer type 8; gently invert
- ⊕ 350 µl Lysis buffer type 9; gently invert
- ⌚ 4 minutes 16 000 × g



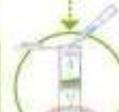
3. Plasmid binding

- Transfer supernatant to plasmid mini column inside Collection tube
- ⊖ 30 seconds 16 000 × g
 - Discard flowthrough



4. Wash (optional-stain dependent)

- ⊕ 400 µl Lysis buffer type 9
- ⊖ 30 seconds 16 000 × g
 - Discard flowthrough



5. Wash & Dry

- ⊕ 400 µl Wash buffer type 1
- ⊖ 1 minute 16 000 × g
 - Discard flow-through and Collection tube



6. Elution

- Transfer plasmid mini column to a new DNase-free microcentrifuge tube
- ⊕ 100 µl Elution buffer type 4
- ⌚ 30 seconds at room temperature
- ⊖ 30 seconds 16 000 × g
 - Retain eluant
 - Store purified plasmid DNA at -20°C



Anexo 2– Protocolo de purificação de DNA em gel de agarose.

Data sheet

Clean-Easy Agarose Purification Kit

Cat. No: AN0070 (50 reactions)
 Cat. No: AN0071(100 reactions)

Description

Clean-Easy Agarose Purification Kit provides a rapid and efficient method to extract DNA from agarose gels. It is based on the solubilisation and binding of DNA to a silica membrane in presence of chaotropic salts. Clean-Easy minispin columns contains an exclusive membrane that allows to bind an unique DNA fragment, previously excised from agarose gel.

Features

- Simple and Just a few minutes procedure.
- Wide spectrum of size fragments could be purified, (suitable since 100 bp up)
- High Percentage of Recovery, greater than 80% on 0.7-1% agarose. Recovery is lower in more concentrated agarose gels (50-60% on 2% agarose).
- DNA purified **Ready to use** in all molecular biology procedures.
- Suitable for any kind of agarose and gel buffer systems.

Applications

- Purification of DNA fragments (obtained by PCR or digestion with restriction enzymes) from agarose gels.
- The purified DNA can be used in all molecular biology applications.

Kit Components		
Item	AN0070	AN0071
Clean-Easy minispin columns	50	100
Collection tubes (2 mL)	50	100
QG Buffer	60 ml	2X60 ml
PE Buffer*	11.25 ml	2X11.25 ml
EB Buffer	10ml	10ml

* Add ethanol (96%-100%) [not included] to PE Buffer prior to initial use. After ethanol has been added, mark the bottle to indicate that this step has been completed.

Storage:
 Clean-Easy Agarose Purification Kit should be stored at room temperature (15–25°C) for up to 12 months without any reduction in performance.

Quality Certifications
 Clean-Easy Agarose Purification Kit is tested in the purification of a 0.5 kb DNA fragment excised from 2% agarose gel. The purified band is analysed in agarose gel electrophoresis.

(Continued on reverse side)

Canvax Biotech, S.L. C/Astrónoma Cecilia Payne, Edif. Canvax. 14014 Córdoba, Spain.

☎ : +34 957 348 066

☎ : +34 957 346 217

✉ : info@canvaxbiotech.com



DETAILED PROTOCOL

1. Using a clean, sharp razor blade or scalpel, excise the DNA band from the agarose gel. Remove the extra agarose to reduce the size of gel slice. Place the gel slice in a 1.5 ml preweighed tube and weigh the gel slice (The maximum amount of gel slice per column is 400 mg).
2. Add 3 volumes of QG Buffer to 1 volume of gel. (For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 300 μ l of QG buffer)
For gels containing more than 2% agarose, add 6 volumes of QG Buffer per mg of gel.
3. Incubate at 50 °C in a water bath for 10 min or until the gel slice has completely dissolved. During incubation at 50 °C, mix by vortexing or inverting the tubes every 1 minute. **Make sure the gel slice completely dissolved. For >2% gels, increase incubation time.**
Important! For fragments <500 bp and >4 kb, add 1 volume of isopropanol to the sample and mix (For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100 μ l isopropanol)
4. Label the lid of a new minispin column placed in a 2 ml collection tube. Carefully apply the mix from previous step to the spin column and Centrifuge at 13000 rpm for 1 minute. For mixture volumes of more than 750 μ l, load and centrifuge again using the same column.
5. Place the spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the filtrate. Add 700 μ l of PE buffer to the minispin column and centrifuge at 13000 rpm for 1 minute.
Remember! Before using for the first time, add ethanol (96–100%) to PE Buffer as indicated on the bottle.
6. Discard the flow-through and centrifuge again at 13000 rpm for 1 minute. This step is essential for removing trace buffer PE.
7. Transfer the column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 30 μ l of Elution Buffer (EB) or H₂O (pH=7.0-8.5) to the center of the column membrane and incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge at 13000 rpm for 1 minute to elute and collect DNA.

*To increase the DNA yield you can warm the buffer EB/H₂O to 65 °C



PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, and is not suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.canvaxbiotech.com for the Material Safety Data Sheet of the product.

Canvax Biotech, S.L. C/Astrónoma Cecilia Payne, Edif. Canvax. 14014 Córdoba, Spain.
☎ : +34 957 348 066
☎ : +34 957 346 217
✉ : info@canvaxbiotech.com



Anexo3– Protocolo de purificação de produtos de digestão enzimática/PCR.

Data sheet

Clean-Easy PCR Purification Kit

Cat. No: AN0063-5 (20 reactions)
 Cat. No: AN0063 (50 reactions)
 Cat. No: AN0064 (100 reactions)

Description

Clean-Easy PCR Purification kit provides a rapid and efficient method to purify DNA and remove contaminants from reaction mixtures (e.g. PCR, digestion or labeling reactions,). Clean-Easy minispin columns contain an exclusive membrane that allows DNA adsorption in presence of chaotropic salts and the removal of contaminants.

Kit Components		
ITEM	AN0063	AN0064
Clean-Easy minispin columns	50	100
Collection tubes (2 mL)	50	100
PB Buffer	25 ml	50 ml
PE Buffer *	11.25 ml	22.5 ml
EB Buffer	9 ml	9 ml

* Add the volume ethanol (96%-100%) specified [Not included] prior to initial use (see bottle label for volume). After ethanol has been added, mark the bottle to indicate that this step has been completed.

Features

- Simple and Just a few minutes procedure.
- 70-90% DNA recovery.
- Suitable for DNA fragments as short as 75 bp.
- DNA purified **Ready to use** in all molecular biology procedures.

* **Store at RT.**

Applications

- Removal of proteins and salts from PCR, restriction digestion, dephosphorylation, ligation or labelling reactions.
- Changing of a restriction enzyme buffer.
- Re-purification of genomic DNA

Quality Certifications

Clean-Easy PCR Purification Kit is tested in the purification of a 0.6 kb DNA fragment from PCR mixture. The purified band is analysed in agarose gel electrophoresis.

(Continued on reverse side)

Canvax Biotech, S.L. C/Astrónoma Cecilia Payne, Edif. Canvax, 14014 Córdoba, Spain.

☎ : +34 957 348 066

☎ : +34 957 346 217

✉ : info@canvaxbiotech.com



Assay procedure

1. Add 5 volumes of **Buffer PB** to one volume of PCR solution and mix thoroughly by pipette.
2. Label the lid of a new spin column placed in a 2 ml collection tube. Carefully apply the mix from step 1 to the spin column and Centrifuge at 13000 rpm for 1 minute.
3. Place the spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the filtrate.
4. Add 700 µl of **buffer PE** for Wash to the minispin column and centrifuge at 13000 rpm for 1 minute.
Remember! Before using it for the first time, add ethanol (96–100%) to the PE Buffer as indicated on the bottle.
5. Discard the flow-through and centrifuge at 13000 rpm for 1 minute. *This step is essential for removing traces of PE buffer.*
6. Transfer the minispin column into a new, labeled 1.5 ml microcentrifuge tube.
7. Carefully open the minispin column and pipet 30 µl **Buffer EB** or H₂O (pH=7.0-8.5) directly onto the membrane. Close the cap and incubate for 1 min at room temperature, then centrifuge at 13000 rpm for 1 min to elute DNA. *To increase the DNA yield you can warm the buffer EB/H₂O to 65 °C before adding to the column.*



PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, and is not suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.canvaxbiotech.com for the Material Safety Data Sheet of the product.

Canvax Biotech, S.L. C/Astrónoma Cecilia Payne. Edif. Canvax. 14014 Córdoba, Spain.
☎ : +34 957 348 066
☎ : +34 957 346 217
✉ : info@canvaxbiotech.com



Anexo 4– Protocolo T4 DNA ligase.



T4 DNA Ligase

Catalogue number: MB00703, 500 U

Description

T4 DNA Ligase is an ultrapure recombinant enzyme purified from *Escherichia coli* and supplied with an optimized 10× Reaction Buffer. T4 DNA ligase catalyses the formation of a phosphodiester bond between juxtaposed 5'-phosphoryl and 3'-hydroxyl termini in duplex DNA. It repairs single-strand nicks in duplex DNA and will join both blunt and cohesive-end restriction fragments of duplex DNA or RNA. The enzyme requires ATP as cofactor.

Storage temperature

T4 DNA Ligase should be stored at -20 °C in a constant temperature freezer. The protein will remain stable till the expiry date if stored as specified.

Unit definition

One unit catalyses the exchange of 1 nmol of radiolabelled phosphate from pyrophosphate into Norit-absorbable material in 20 min at 37 °C under standard assay conditions.

Enzyme concentration: 5 U/μL

Inactivation

T4 DNA ligase is heat inactivated at 65 °C for 10 min.

System components and Reaction conditions

T4 DNA Ligase is provided with a dedicated highly optimized NZYTech reaction buffer, which contains ATP that is critical for this enzyme. Repeated freeze-thaw cycles will affect the stability of ATP, so we recommend making 10-20 μL aliquots of the reaction buffer and store at -20 °C. Vortex the reaction buffer solution thoroughly after thawing and prior to use.

The enzyme performs well at temperatures ranging from 16 °C to 25 °C. The optimal temperature for a ligation reaction is a balance between the enzyme's optimal temperature and the temperature required to ensure annealing of the DNA fragment ends, which can vary with the length and base composition of the terminal sequences.

Ligation Protocol

We recommend using a 1:3-10 molar ratio of vector:insert. To calculate optimal amounts of insert DNA in ligation reaction, see below:

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

Example: If using 50 ng of a vector plasmid with 3 kb, for a 1:10 molar ratio of vector:insert then you will require the following amount of a 500 bp insert:

$$\frac{50 \times 0.5 \times 10}{3} = 83 \text{ ng}$$

1. On ice, in a sterile, nuclease-free microcentrifuge tube, prepare a reaction mixture, combining the following components (volumes for a 20 μL reaction):

Component	Volume
10× Reaction buffer (provided)	2 μL
Vector DNA (20-50 ng)	x μL
Insert DNA (3-10 molar excess)	y μL
T4 DNA Ligase (5 U/μL)	1 μL
Nuclease-free water	up to 20 μL

2. Mix and centrifuge briefly to bring the contents to the bottom of the tube.

3. Incubate at 16-20 °C for 16 hours.

4. Use the ligation reaction to transform NZYTech competent cells.

Important notes

- It is extremely important not to change the ratio between the volume of T4 DNA Ligase and the reaction final volume to prevent decrease in efficiency of cloning reactions.
- For blunt-end ligations, use higher quantities of both vector and insert DNA.
- For sticky (cohesive)-end ligations, we recommend to heat both vector and insert DNA prior to the ligation.
- If the ligation mixture will be used for electroporation, a DNA purification step is recommended before the transformation. Use a spin column purification method (NZYGelpure, Cat. No. MB011) or chloroform extraction.

Quality control assays

Purity

Recombinant T4 DNA Ligase is >95% pure as judged by SDS polyacrylamide gel electrophoresis followed by BlueSafe (NZYTech, Cat. No. MB152) staining.

Nuclease assays

0.2-0.3 μg of pNZY28 plasmid DNA are incubated with 5 U of T4 DNA Ligase in 1× Reaction buffer for 14-16 hours at 37 °C. Following incubation, the DNA is visualized on a GreenSafe-stained agarose gel. There must be no visible nicking or cutting of the DNA.

Functional assay

Linearized pNZY28 plasmid (leaving either blunt-end or cohesive ends) is re-ligated with 5 U of T4 DNA Ligase. The DNA is then transformed into NZY5α competent cells that are plated on ampicillin plates. The re-ligation efficiency is determined by counting transformed bacterial colonies.

Related products

Product name	Cat. No.
NZY5α	MB004
NZYStar	MB005
Speedy Ligase	MB130
NZYGelpure	MB011

V2101

Anexo 5– Protocolo Speedy XhoI.



Speedy XhoI

Catalogue number:

MB10701, 200 reactions

MB10702, 1000 reactions

5'...C↓TCGAG...3'

3'...GAGCT↓C...5'

Description

NZyTech's Speedy restriction enzymes are a new generation of DNA modifying enzymes developed for rapid DNA digestion. All Speedy enzymes are 100% active in the NZySpeedyBuffers and are able to digest DNA in 5-15 minutes. NZySpeedyBuffers are universal and enable any combination of NZy Speedy restriction enzymes to work simultaneously. It's ideal for double or multiple digestions, eliminating the need for sequential digestions. NZySpeedyBuffer Orange also allows ready gel load after digestion. Speedy XhoI activity is impaired by CpG methylation (CG methylase cleaves CT^{5m}CGAG very slowly). NZyTech's Speedy XhoI is a fast enzyme that performs its reaction usually in 5-15 minutes at 37 °C.

Concentration

One µL of enzyme can completely digest up to 1 µg of DNA in 5-15 min.

Reagents supplied with the enzyme

10× NZySpeedyBuffer Colourless

10× NZySpeedyBuffer Orange

Storage buffer

25 mM NaHepes, pH 7.5, 500 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 2.5 mM CaCl₂, 50% (v/v) glycerol.

Recommended reaction conditions

Speedy XhoI	1 µL
10× NZySpeedyBuffer	2 µL
Substrate DNA	≤ 1 µg
Sterilized ultrapure water	up to 20 µL

Incubation temperature

37 °C for 5-15 minutes.

Heat inactivation

65 °C for 20 minutes.

Quality control

Purity

Speedy XhoI has been determined to be >90% pure as judged by SDS-PAGE followed by BlueSafe staining (MB15201).

DNases assay

10 U of Speedy XhoI were incubated with 0.2-0.3 µg of pNZY28 for 14-16 hours at 37 °C. No nicking activity was observed following agarose gel electrophoresis.

Functional assay

Speedy XhoI was tested for performance in a digestion of 1 µg of a recombinant pNZY28 derivative using 1 µL of enzyme. The resulting digestion was visualized in an agarose gel.

Storage conditions

Speedy XhoI should be stored at -20 °C at all times. Do not keep it on ice while working at the bench.

Shipping conditions

Dry ice.

Product life

Please see the product labels.

V1901

Certificate of Analysis	
Assay	Result
Protein purity	Pass
DNases assay	Pass
Functional assay	Pass
Approved by:	
	
Patrícia Ponte Senior Manager, Quality Systems	

For research use only.



Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal

Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168

www.nzytech.com

Anexo 6– Protocolo XhoI.



XhoI

Catalogue number:

MB07401, 2000 U
MB07402, 10000 U

5'...C↓TCGAG...3'
3'...GAGCT↓C...5'

Description

XhoI is a Restriction Endonuclease purified from an *Escherichia coli* strain that carries the XhoI gene from *Xanthomonas halicicola*. XhoI activity is impaired by CpG methylation (CG methylase cleaves CT5^mCGAG very slowly). The optimum reaction temperature is at 37°C.

Concentration

10000 U/mL.

Reagents supplied with the enzyme

NZYTech provides XhoI with a specific buffer, NZYBuffer A (500 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT).

Shipping & Storage conditions

Shipped on dry ice. After delivery, product should be stored at -20°C in a non-frost freezer. Minimize exposure of enzyme to temperatures higher than -20 °C. To reduce freeze-thaw cycles, we recommend making small aliquots of the enzyme. XhoI will remain stable till the expiry date if stored as specified.

Unit definition

One unit is defined as the amount of this enzyme required to digest completely 1 µg of plasmid DNA in 50 µL of the reaction mixture at 37 °C for one hour.

General protocol

The recommended protocol includes a 10-fold overdigestion, which generally is sufficient to overcome variations than can occur in DNA type, quantity and purity, as well as on frequency of recognition sites. In general, we recommend using 10 units of enzyme to digest 1 µg substrate DNA (or 10-20 units for genomic DNA) in 1 hour at appropriate temperature.

Typical reaction mixture

1. On ice, add the following reaction components into a sterile, nuclease-free microcentrifuge tube (**Note:** Enzyme should be the last component added to reaction):

Substrate DNA	≤ 1 µg
10× NZYBuffer A (*)	2 µL (1x)
XhoI	1 µL (10 units)
Sterilized ultrapure water	up to 20 µL

(*) for double digestions, use NZYBuffer U (not provided, Cat. No. MB110)

2. Mix reaction components gently by pipetting or by “flicking” the tube (do not vortex) and spin down.

3. Incubate at 37 °C for one hour.

Note: In some situations, digestion may be improved by increasing the incubation time.

Important notes

- Enzyme should not exceed 10% of total reaction volume.
- It is preferable to keep enzyme at -20 °C while working at the bench and just remove it at moment of addition to reaction. Do not keep enzyme on ice for a longer period of time.
- Variation on final volume has influence on the reaction. In some situations, small reaction volumes may be beneficial; however, caution should be taken when reducing reaction volume because it may lead to star activity by concentrating glycerol (should not exceed 5-8%), enzyme or salts, as well any contaminant present in the reaction. The recommended final volume is 20 µL but reaction volumes from 10 to 50 µL per µg of substrate DNA can be tested.
- Care must be taken during reaction incubation: keep the temperature constant and avoid sample evaporation. This is special critical for long incubation periods (more than 1 hour) and small reaction volumes (less than 15 µL).

Stopping a reaction

Depending on downstream applications, reaction can be stopped alternatively by:

- Heat inactivation (20 min. at 65 °C)
- Addition of 20-30 mM EDTA pH 8.0 (*)
- Gel Electrophoresis and Band Excision
- Spin Column DNA Purification
- Phenol-Chloroform Extraction or Ethanol Precipitation

(*) **Note:** the chelating property of EDTA may inhibit some downstream applications.

Activity in NZYTech Buffers

NZYTech Buffers	A	B	C	U
Activity in NZYTech buffers (% of max)	100	160	60	100

(j) weak star activity is detected

Quality control assays

Purity

XhoI has been determined to be >90% pure as judged by SDS-PAGE followed by BlueSafe staining (Cat. No. MB15201).

DNases assay

10 U of XhoI were incubated with 0.2-0.3 µg of pNZY28 for 14-16 hours at 37 °C. No nicking activity was observed following agarose gel electrophoresis.

Functional assay

XhoI was tested for performance in a digestion of 1 µg of a recombinant pNZY28 derivative using 10 U, 5 U and 2 U of enzyme. The resulting product was visualized in an agarose gel.

Anexo 7– Protocolo NdeI.



NdeI

Catalogue number: MB06901, 500 U
MB06902, 2500 U

5'...CA[↓]TATG...3'
3'...GTAT[↑]AC...5'

Description: NdeI is a Restriction Endonuclease purified from an *Escherichia coli* strain that carries the NdeI gene from *Neisseria denitrificans*. NdeI activity is not affected by *dam* methylation, *dcm* methylation or CpG methylation. NZYTech provides NdeI with a specific buffer, NZYBuffer A. NZYTech's NdeI is an enzyme that acts at 37 °C. For double digestions please use NZYBuffer U (not provided, MB110).

Concentration: 10000 U/mL.

Unit definition: One unit is defined as the amount of this enzyme required to digest completely 1 µg of plasmid

DNA in 50 µL of the reaction mixture at 37 °C for one hour.

Reagents supplied with the enzyme:
10× NZYBuffer A (500 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT).

Storage buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 µg/mL BSA, 50% (v/v) glycerol.

General reaction mixture:

NdeI	1 µL
10× NZYBuffer A or 10× NZYBuffer U	2 µL
Substrate DNA	≤ 1 µg
Sterilized ultrapure water	up to 20 µL

Incubation temperature: 37 °C for one hour.

Heat inactivation: 65 °C for 20 minutes.

Activity in NZYTech Buffers:

NZYTech buffers	A	B	C	U
Activity in NZYTech buffers: (% of max)	100	100	80	100

Quality control:

Purity: Speedy NdeI has been determined to be >90% pure as judged by SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining.

DNases assay: 10 U of Speedy NdeI were incubated with 0.2-0.3 µg of pNZY28 for 14-16 hours at 37 °C. No nicking activity was observed following agarose gel electrophoresis.

Functional assay: Speedy NdeI was tested for performance in a digestion of 1 µg of a recombinant pNZY28 derivative using 1 µL of enzyme. The resulting digestion was visualized in an agarose gel.

Storage conditions: Speedy NdeI should be stored at -20 °C at all times. Do not keep it on ice while working at the bench.

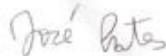
Shipping conditions: Dry ice.

Product life: Please see the product labels.

Certificate of Analysis

Assay	Result
Protein purity	Pass
DNases assay	Pass
Functional assay	Pass

Approved by:



José Prates
Senior Manager, Quality Systems

Revised 03/16



Estrada do Paço do Lumiar,
Campus do Lumiar - Edifício E, R/C
1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514
Fax: +351.217151168
www.nzytech.com

Anexo 8– Protocolo Speedy NdeI.

nzytech
genes & enzymes

Speedy NdeI

Catalogue number:
MB10101, 50 reactions
MB10102, 250 reactions

5'...CA^ITATG...3'
3'...GTAT^IAC...5'

Description: NZYTech's Speedy restriction enzymes are a new generation of DNA modifying enzymes developed for rapid DNA digestion. All Speedy enzymes are 100% active in the NZYSpeedyBuffers and are able to digest DNA in 5-15 minutes. NZYSpeedyBuffers are universal and enable any combination of NZY Speedy restriction enzymes to work simultaneously. It's ideal for double or multiple digestions, eliminating the need for sequential digestions. NZYSpeedyBuffer Orange also allows ready gel load after digestion. Speedy NdeI activity is not affected by *dam* methylation, *dcm* methylation or CpG methylation. NZYTech's Speedy NdeI is a fast enzyme that performs its

reaction usually in 5-15 minutes at 37 °C.

Concentration: One µL of enzyme can completely digest up to 1 µg of DNA in 5-15 min.

Reagents supplied with the enzyme:
10× NZYSpeedyBuffer Colourless
10× NZYSpeedyBuffer Orange

Storage buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 µg/mL BSA, 50% (v/v) glycerol.

Recommended reaction conditions:

Speedy NdeI	1 µL
10× NZYSpeedyBuffer	2 µL
Substrate DNA	≤ 1 µg
Sterilized ultrapure water	up to 20 µL

Incubation temperature: 37 °C for 5-15 minutes.

Heat inactivation: 65 °C for 20 minutes.

Quality control:

Purity: Speedy NdeI has been determined to be >90% pure as judged by SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining.

DNases assay: 10 U of Speedy NdeI were incubated with 0.2-0.3 µg of pNZY28 for 14-16 hours at 37 °C. No nicking activity was observed following agarose gel electrophoresis.

Functional assay: Speedy NdeI was tested for performance in a digestion of 1 µg of a recombinant pNZY28 derivative using 1 µL of enzyme. The resulting digestion was visualized in an agarose gel.

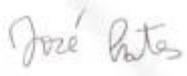
Storage conditions: Speedy NdeI should be stored at -20 °C at all times. Do not keep it on ice while working at the bench.

Shipping conditions: Dry ice.

Product life: Please see the product labels.

Certificate of Analysis

Assay	Result
Protein purity	Pass
DNases assay	Pass
Functional assay	Pass

Approved by: 
José Prates
Senior Manager, Quality Systems

Revised 03/16



Estrada do Paço do Lumiar,
Campus do Lumiar - Edifício E, R/C
1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514
Fax: +351.217151168
www.nzytech.com