

A tecnologia de clonagem gateway, desenvolvida pela Invitrogen life technologies, tem por base um sistema de recombinação conservativa e direcionada que permite a transferência de fragmentos de DNA entre diferentes vetores de clonagem, mantendo a grelha de leitura e sem que haja ganho ou perda de nucleótidos. Com o uso desta técnica deixou de ser necessário o uso de endonucleases de restrição (eliminando quaisquer constrangimentos inerentes ao uso de enzimas de restrição) e DNA ligases <sup>[1]</sup>. Esta tecnologia, quando comparada com os métodos de clonagem convencionais, é mais rápida, mais eficiente e menos dispendiosa.

Esta técnica permite obter uma eficiência de clonagem extremamente alta (superior a 90%) <sup>[2]</sup>. Esta tecnologia é um excelente método de clonagem para a síntese de proteínas e a análise funcional <sup>[3]</sup>.

O mecanismo de clonagem gateway faz uso da recombinação sítio-específica (entre os locais attP e attB e, attL e attR), através de duas reações, as reações BP e LR.

Para que a reação BP ocorra, procedemos primeiro à amplificação do gene de interesse com a ajuda de um par de primers incluindo a sequencia attB <sup>[1,3]</sup> (o vetor dador inclui locais attP <sup>[1]</sup>). O produto de PCR que inclui os locais attB combina com o vetor dador que inclui os locais de attP, resultando na formação de um clone de entrada <sup>[1]</sup>. Esta reação de integração entre os locais attB e attP está na génese desta reação que dá origem ao clone de entrada que contém o gene de interesse ladeado pelos locais attL (sequência composta pela recombinação de attB e attP) <sup>[1]</sup>. A Reação LR é uma reação de recombinação entre os locais attL do clone de entrada e os locais attR do vetor de destino resultando num clone de expressão <sup>[3]</sup>. O clone de entrada obtido a partir da reação BP inclui os locais attL já o vetor de destino é construído de modo a incluir os locais attR <sup>[1]</sup>.

A reação LR tem como objetivo transferir o gene de interesse para um vetor de destino e, portanto, o clone de entrada é misturado com o vetor de destino apropriado e com a LR Clonase. A recombinação entre esses locais gera duas moléculas <sup>[2]</sup>, uma contém o segmento de DNA de interesse e, a outra molécula é um subproduto que contém o gene ccdB, gene esse que interfere na DNA girase da *E. coli* impedindo o seu crescimento <sup>[3]</sup>. Tanto o vetor de destino usado na reação LR como o vetor dador usado na reação BP têm entre os respetivos locais att o gene ccdB. Este gene é importantíssimo para esta tecnologia, pois impede a *E. coli* de crescer, permitindo a realização de uma seleção negativa. Ou seja, após a ocorrência da recombinação em ambas as reações vamos ter um produto (que terá o gene de interesse no local onde estava o gene ccdB), e um subproduto (que terá por sua vez o gene ccdB no local onde estava o gene de interesse), portanto aquando da seleção apenas vão crescer as colónias que têm o vetor que contém o gene de interesse, facilitando muito a seleção dos clones de entrada e de expressão (este é um dos fatores que torna a tecnologia de clonagem gateway uma técnica de clonagem de alto rendimento). Para obter e propagar vetores que contenham o gene ccdB temos que recorrer à estirpe de *E. coli* DB3.1, que tem uma mutação na DNA girase (*gyrA462*) que a torna resistente aos efeitos letais deste gene <sup>[3]</sup>.

Depois de clonado o gene de interesse ou fragmento de DNA num clone de entrada, podemos transferi-lo para vários vetores de destino, desde proteínas de expressão em células de *E. coli*, leveduras, insetos, mamíferos, entre outros [4].

Algumas das principais aplicações deste método são, o facto de permitir a subclonagem de um vetor de entrada para outros, a rapidez e a facilidade do processo de subclonagem, baseada na recombinação sítio-específica permitindo cada reação de subclonagem manter a grelha de leitura apropriada.

## Referencias

- [1] Premierbiosoft.com. (2019). Gateway® Cloning. [online] Disponível em: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/Gateway\\_Cloning.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Gateway_Cloning.html)
- [2] Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. Expert Opinion on Drug Discovery, 2(4), pp.571-589.
- [3] Tools.thermofisher.com. (2019). [online] Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/gatewayman.pdf>
- [4] Thermofisher.com. (2019). Gateway Recombination Cloning Technology | Thermo Fisher Scientific - UK. [online] Disponível em: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/gateway-technology.html>