

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Expressão e purificação de proteínas recombinantes

CARGA HORÁRIA: APROXIMADAMENTE 360 HORAS – de segunda a sexta-feira, período parcial (das 8 às 12 horas ou das 13 às 17 horas)

COORDENADOR: Marcos Gustavo Araujo Schwarz e Raquel Lima de Figueiredo Teixeira

EMENTA

Introdução a tecnologia do DNA recombinante. Vetores de clonagem e expressão. Principais hospedeiros procarióticos. Endonucleases de restrição. Transformação de bactérias: método químico e eletroporação. Sistemas induzíveis. *Tags* que auxiliam a purificação do produto recombinante.

OBJETIVOS

- 1- Apresentar a tecnologia de DNA recombinante para produção de proteínas recombinantes e sua aplicabilidade nas diferentes áreas da saúde.
- 2- Capacitar o aluno a realizar os experimentos desde a construção do clone produtor até a obtenção da proteína recombinante de interesse.
- 3- Conhecer técnicas gerais de biologia molecular para essa determinada aplicação.

CONTEÚDO PROGRAMÁTICO

Formação teórica a ser oferecida ao aluno:

- 1 – Tipos de vetores (clonagem e expressão) e de hospedeiros procarióticos comumente usados para produção de proteínas recombinantes.
- 2 – Técnicas para produção do inserto e como introduzi-lo no vetor para construção do DNA recombinante.
- 3 – Métodos de transformação bacteriana: químico e eletroporação.
- 4 – Métodos de seleção dos clones (plaqueamento em meio seletivo, PCR de colônia e sequenciamento de DNA pela metodologia de Sanger).
- 5 – Sistemas induzíveis: mecanismos de controle de expressão a nível transcricional.
- 6 – Variáveis que podem afetar a produção ou não da proteína após a indução.
- 7 – Métodos de polimento/purificação do produto final: *salting-in/out*, precipitação diferencial, métodos cromatográficos, diálise.

Atividades práticas a serem desenvolvidas pelo aluno durante o estágio:

- 1 – Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para clonagem

- 2 – Padronização da PCR e purificação dos produtos.
- 3 – Manuseio de cepas bacterianas em meio líquido e sólido dentro da cabine de biossegurança.
- 4 – Indução da expressão da proteína recombinante sob diferentes variáveis.
- 5 – Eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras.
- 6 – Abertura de amostra e purificação por cromatografia de afinidade por íons imobilizados.
- 7 – Polimento do produto final.

Avaliação

1. Um relatório parcial a ser enviado à coordenação do CENT na metade do curso (área de concentração). Esse relatório deverá ser avaliado e assinado pelo(a) aluno(a) e coordenador(a) da área.
2. Um relatório final a ser enviado à coordenação do CENT ao final do curso (área de concentração). Esse relatório deverá ser avaliado e assinado pelo(a) aluno(a) e coordenador(a) da área.
3. Participação em um workshop (elaboração e apresentação de pôster) ao final do curso (área de concentração). Os pôsteres serão avaliados por profissionais da área afim.
4. Participação ativa em atividades teórico-práticas relacionadas às áreas de concentração (seminários, estudos dirigidos, dentre outras), a critério do coordenador da área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GILEADI, O. Recombinant Protein Expression in E. coli : A Historical Perspective. Em: [s.l.: s.n.]. p. 3–10.
- GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli. **The Protein Journal**, v. 32, n. 6, p. 419–425, 30 ago. 2013.
- MISHRA, V. Affinity Tags for Protein Purification. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 8, p. 821–830, 9 nov. 2020.
- POROWIŃSKA, D. et al. Prokaryotic expression systems. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 67, p. 119–129, 1 mar. 2013.
- ZERBS, S.; GIULIANI, S.; COLLART, F. Small-Scale Expression of Proteins in E. coli. Em: [s.l.: s.n.]. p. 117–131.