ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: **Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes**

Carga Horária: 360 horas

Coordenadores:

Wim M. S. Degrave e Leila de Mendonça Lima

Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, IOC.

**EMENTA:**

Sistemas de expressão bacterianos e seus elementos. Estratégias de clonagem. Seleção e avaliação de recombinantes. Estratégias de cultivo e indução. Purificação de proteínas.

**OBJETIVO;**

A disciplina tem por objetivo capacitar o aluno na obtenção de proteínas recombinantes expressas em sistemas procariotos, sua purificação e controle de qualidade do produto final. O aluno será apresentado aos fundamentos teóricos envolvidos na clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em sistemas bacterianos. Durante a disciplina o aluno executará as diferentes etapas experimentais, sendo capacitado também no manuseio dos equipamentos utilizados no laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular.

**CONTEÚDO PROGRAMÁTICO:**

Formação teórica:

1. Sistemas de expressão bacterianos: Cepas hospedeiras, vetores de clonagem e expressão.
2. Estratégias de clonagem: Reação em cadeia da Polimerase (PCR); endonucleases de restrição; ligação; métodos alternativos.
3. Transformação bacteriana
4. Seleção e avaliação de recombinantes: preparo de DNA plasmidial; sequenciamento de DNA; mapeamento por enzimas de restrição; eletroforese em gel de agarose.
5. Métodos de cultivo, indução e otimização da expressão de proteínas recombinantes
6. Avaliação da expressão: Lise bacteriana, fracionamento celular, eletroforese em géis SDS-PAGE, western blot, métodos para determinação da concentração de proteínas;
7. Purificação de proteínas: métodos de pré-fracionamento; cromatografia; diálise.

Atividades práticas:

1. Cultivo de *Escherichia coli*
2. Preparo de *E. coli* competentes para transformação; determinação da eficiência de transformação.
3. Extração de DNA plasmidial
4. Eletroforese em gel de agarose para visualização de DNA
5. Eletroforese em gel SDS-PAGE para visualização de proteínas
6. Amplificação de DNA (PCR)
7. Digestão de DNA com enzimas de restrição
8. Ligação de DNA
9. Cultivo e indução para expressão da proteína recombinante
10. Lise bacteriana e fracionamento
11. Métodos para pré-purificação de proteínas
12. Cromatografia (FPLC)
13. Métodos para determinação da concentração de proteínas
14. Diálise

**AVALIAÇÃO:**

A avaliação compreenderá um relatório a ser entregue no final da disciplina e elaboração de um pôster (no estilo de pôster para apresentação em congresso), detalhando todas as etapas envolvidas na obtenção de uma proteína recombinante. Esse pôster será apresentado oralmente no workshop do Curso de Especialização de nível Técnico em Biologia Parasitária e Biotecnologia (CENT), o qual realizar-se-á no final do Curso. Além da avaliação mencionada anteriormente, na qual o aluno deverá obter média maior igual a sete, o aluno deverá ter no mínimo, frequência de 75%. Tanto a frequência, quanto o desenvolvimento do aluno durante o estágio, serão acompanhados mensalmente pela coordenação do CENT, através de formulários que serão encaminhados à coordenação pelo Coordenador e/ou orientador do aluno.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. Michael R. Green e Joseph Sambrook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Biotecnologia**. MALAJOVICH M. A. 2011. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.