### PROGRAMA DE DISCIPLINA

|  |  |
| --- | --- |
| CÓDIGO: | CIB 134 |
| DISCIPLINA: | EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS |
| PRÉ-REQUISITOS: |  |
| CARGA HORÁRIA | TEÓRICA: | 60 horas | PRÁTICA: |  | TOTAL: | 60 horas |
| CRÉDITO: | TEÓRICA: | 04 | PRÁTICA: |  | TOTAL: | 04 |
| PROFESSOR (A): | Abelmon da Silva Gesteira  |
|  |  |
| EMENTA: | Clonagem, expressão e purificação de proteínas heterólogas de interesse agronômico: A disciplina fornecerá uma introdução dos principais métodos e aplicações na produção e uso de proteínas recombinantes, expressas em sistemas heterólogos. A disciplina será dividida em aulas práticas e teóricas. A parte teórica abordará as estratégias de clonagem e expressão em diferentes sistemas, além de noções básicas de purificação de proteínas. Na parte prática os discentes terão contato técnicas de desenho de primers e amplificação de genes com o uso de PCR, preparação de células competentes, purificação de DNA, clivagem de DNA com enzima de restrição e ligação de inserto e vetor com DNA ligase, clonagem em vetores de expressão, transformação de bactérias, indução da expressão em E. coli, eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida e purificação de proteínas por cromatografia líquida de afinidade. |
| OBJETIVOS: | **Objetivo geral:**Propiciar aos alunos da pós-graduação o aprendizado prático das técnicas de clonagem, expressão e purificação de proteínas heterólogas, de interesse agronômico, em sistemas procarióticos.**Objetivos Específicos:**1. Desenhar os primers para o gene específico inserindo sítios de restrição que não ocorra no gene.
2. Amplificar por PCR o gene de interesse.
3. Eletroforese em agarose e recuperação do DNA em gel de agarose.
4. Clivar com enzimas de restrição o inserto e o vetor bacteriano.
5. Realizar a ligação entre vetor e inserto.
6. Preparar células competentes por cloreto de cálcio.
7. Transformar células competentes com o produto de ligação.
8. Selecionar colônias positivas.
9. Purificar o DNA plasmidial.
10. Transformar células competentes de expressão.
11. Induzir a expressão gênica.
12. Verificar a expressão por eletroforese de proteína – SDS-PAGE.
13. Lisar as células induzidas por congelamento.
14. Purificar a proteína de interesse por cromatografia de afinidade.
15. Discutir técnicas de clonagem e expressão em sistemas eucariotos.
 |
| METODOLOGIA: | Serão Utilizadas Estratégias De Ensino Diversificadas: Aulas Expositivas, Seminários, Aulas Práticas E Uso De Bioinformática Na Internet. |
| AVALIAÇÃO: | Serão Avaliados O Interesse Pelas Aulas, A Participação Nas Discussões, A Proposição De Questões Sobre Os Temas Da Disciplina, O Desempenho Nas Avaliações Em Apresentações De Seminário E Nas Atividades Práticas. |
| CONTEÚDO PROGRAMÁTICO: | 1. Sistemas de clonagem e expressão procarióticos.
2. Sistemas de clonagem e expressão eucarióticos.
3. Técnicas de clonagem, expressão e purificação de proteínas.
 |

|  |  |
| --- | --- |
| REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA: | **Bibliografia Básica:**Sambrook, J. Fritsch, E. Maniats, T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring harbor Press, New York, 1989.pET Manual System. Novagen, 2000.PMAL Protein Fusion and Purification System Instruction Manual. New England Biolabs, 2000.IMPACT – CN Instruction Manual. New England Biolabs, 2000.**Periódicos**: Artigos atuais dos principais periódicos relacionados ao tema, a saber:Biotechnology Advances, Applied Microbiology and Biotechnology, Scientific Reports, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Protein Expression and Purification dentre outras.  |