### 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. |