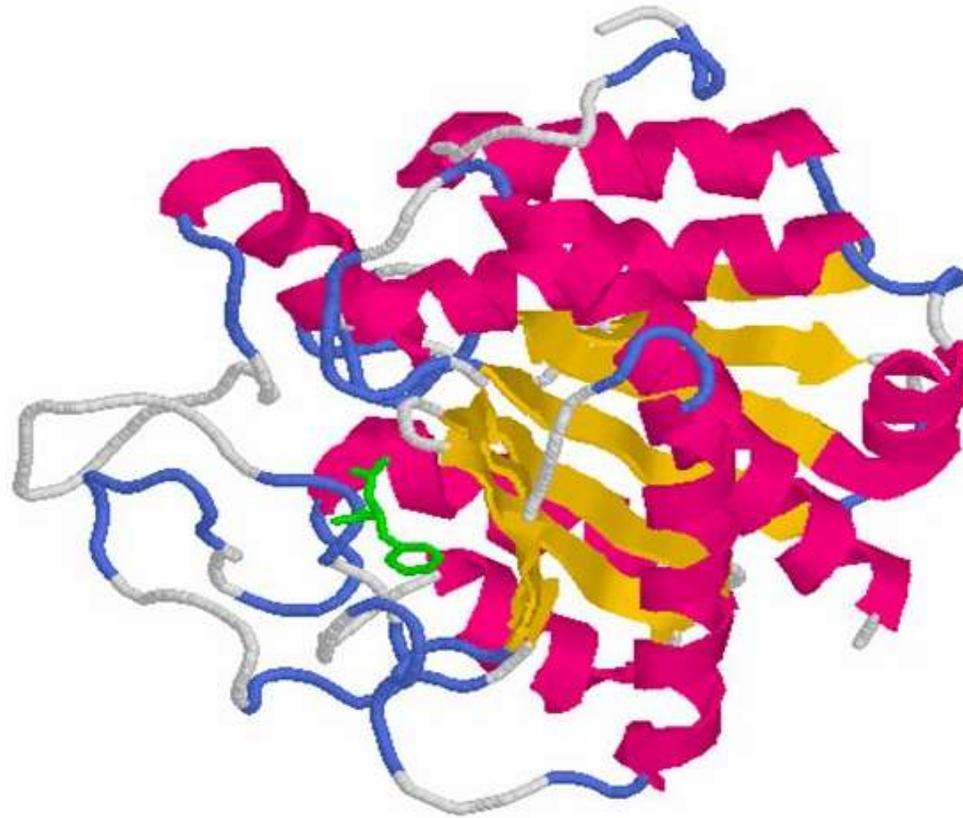


Produção de proteínas recombinantes



Bianca Zingales
IQUSP

Proteínas recombinantes

Definição:

Proteína produzida por outro organismo que não aquele que a produz normalmente

Exemplos:

Hormônio de crescimento humano produzido em bactérias

Vacina da hepatite B viral produzida em levedura

Biosurfactante de microorganismos produzido em bactérias

<http://pt.slideshare.net/labimuno/produo-protenas-recombinantes-presentation>

NOTA IMPORTANTE

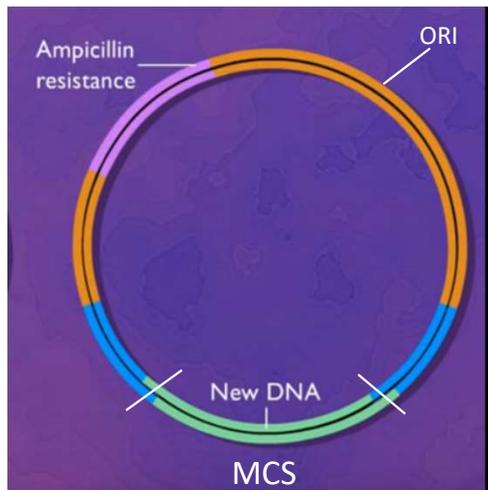
Na aula anterior vimos exemplos de Plasmídeos utilizados para a **AMPLIFICAÇÃO DO GENE** de interesse em um hospedeiro.

Esta classe de Plasmídeos **NÃO** permite a **EXPRESSÃO** do gene.

Para a obtenção de **PROTEINAS RECOMBINANTES** uma classe especial de vetores (Plasmídeos) deve ser utilizada

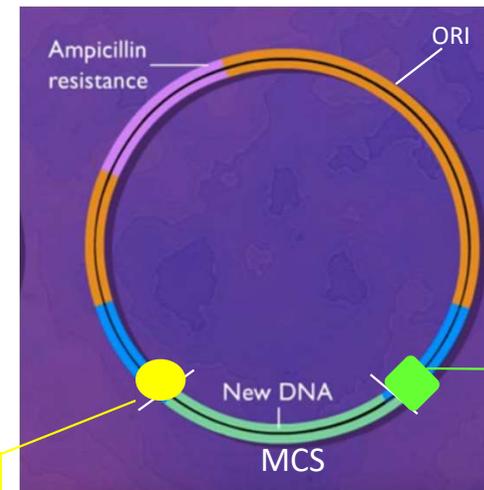
Características do vetor para expressão de Proteínas

Vetor NÃO de expressão



Só replica/multiplica o gene
O gene NÃO é expresso

Vetor de expressão



Seq. de terminação

Promotor para a RNA polimerase

O gene é replicado, transcrito e traduzido

- Um vetor de expressão, além dos mesmos elementos de um vetor de clonagem, deve ter uma região promotora e uma região de terminação da transcrição.
- A replicação, transcrição e a tradução são feitas pela maquinaria do organismo “hospedeiro”.

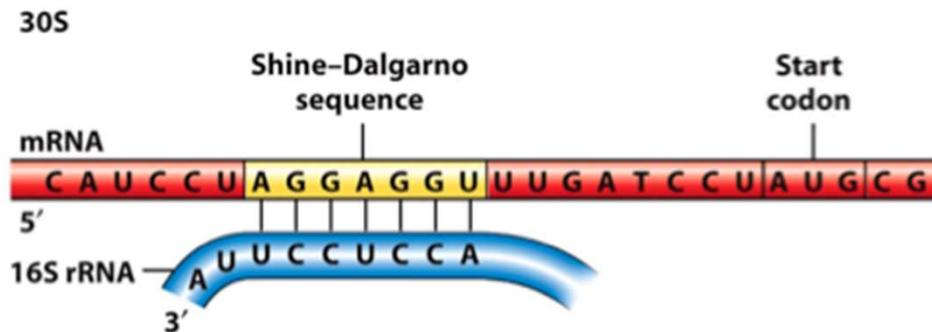
Sequências presentes nos Vetores de Expressão em Bactéria

Revisão

❑ Promotores de *E. coli*



❑ Sequência complementar a Shine-Dalgarno

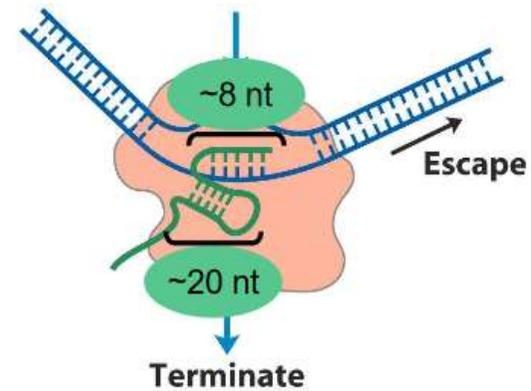
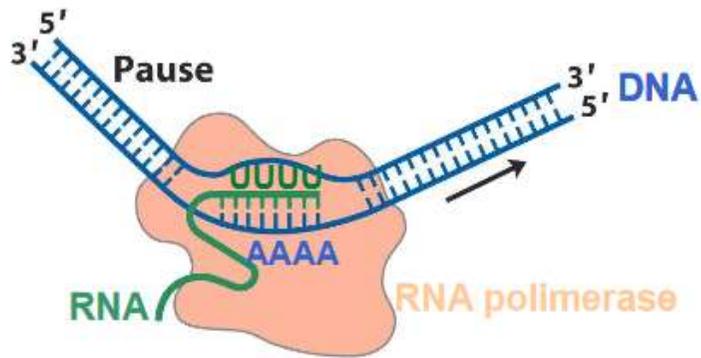


Sequência Shine-Dalgarno presente no mRNA, próximo ao códon de iniciação AUG. Sítio de ligação à subunidade 30S do ribossomo, mais especificamente interage com o rRNA 16S.

Sequências presentes nos Vetores de Expressão em Bactéria

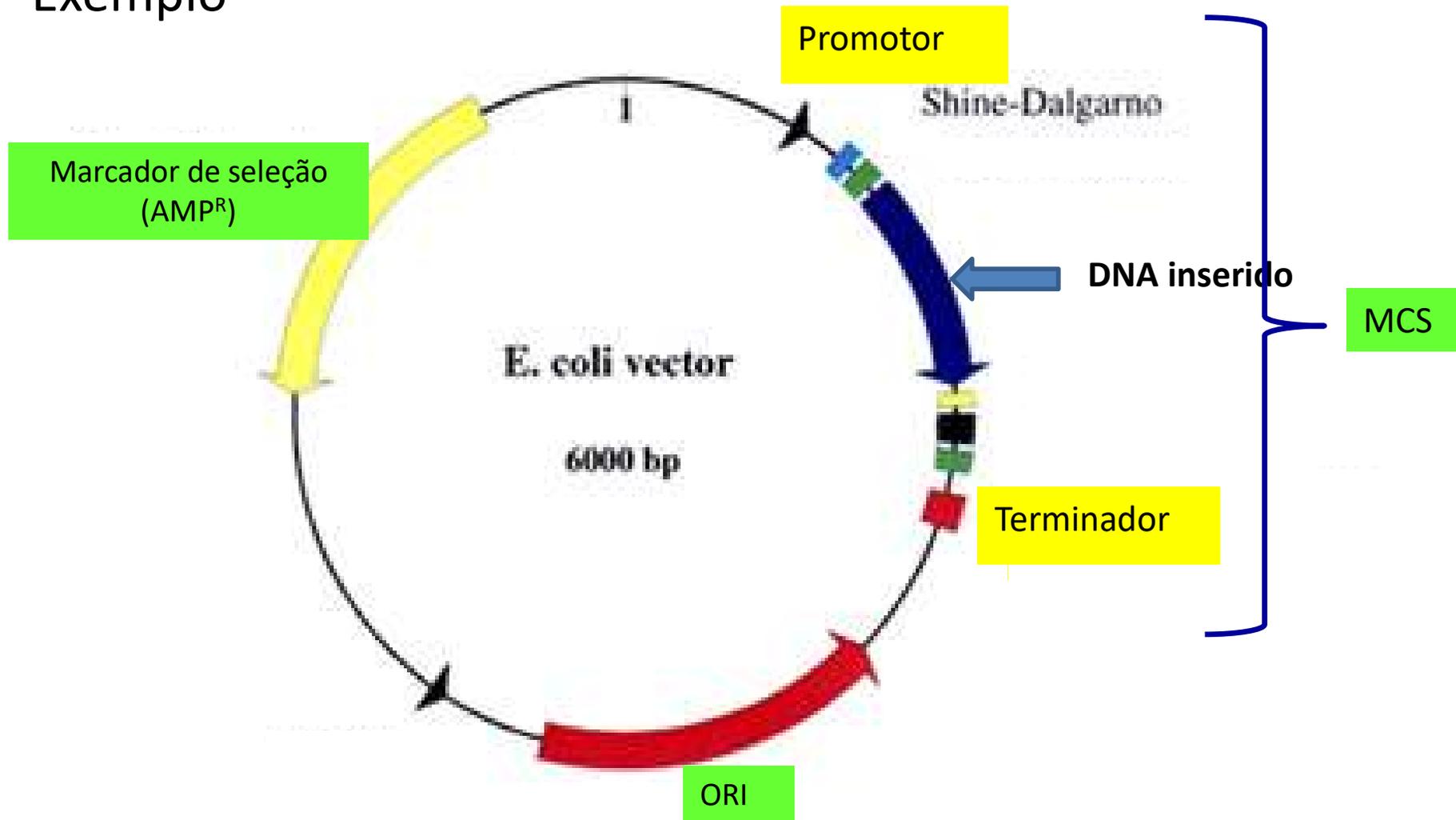
Revisão

□ Terminação da Transcrição Independente ou dependente de rho



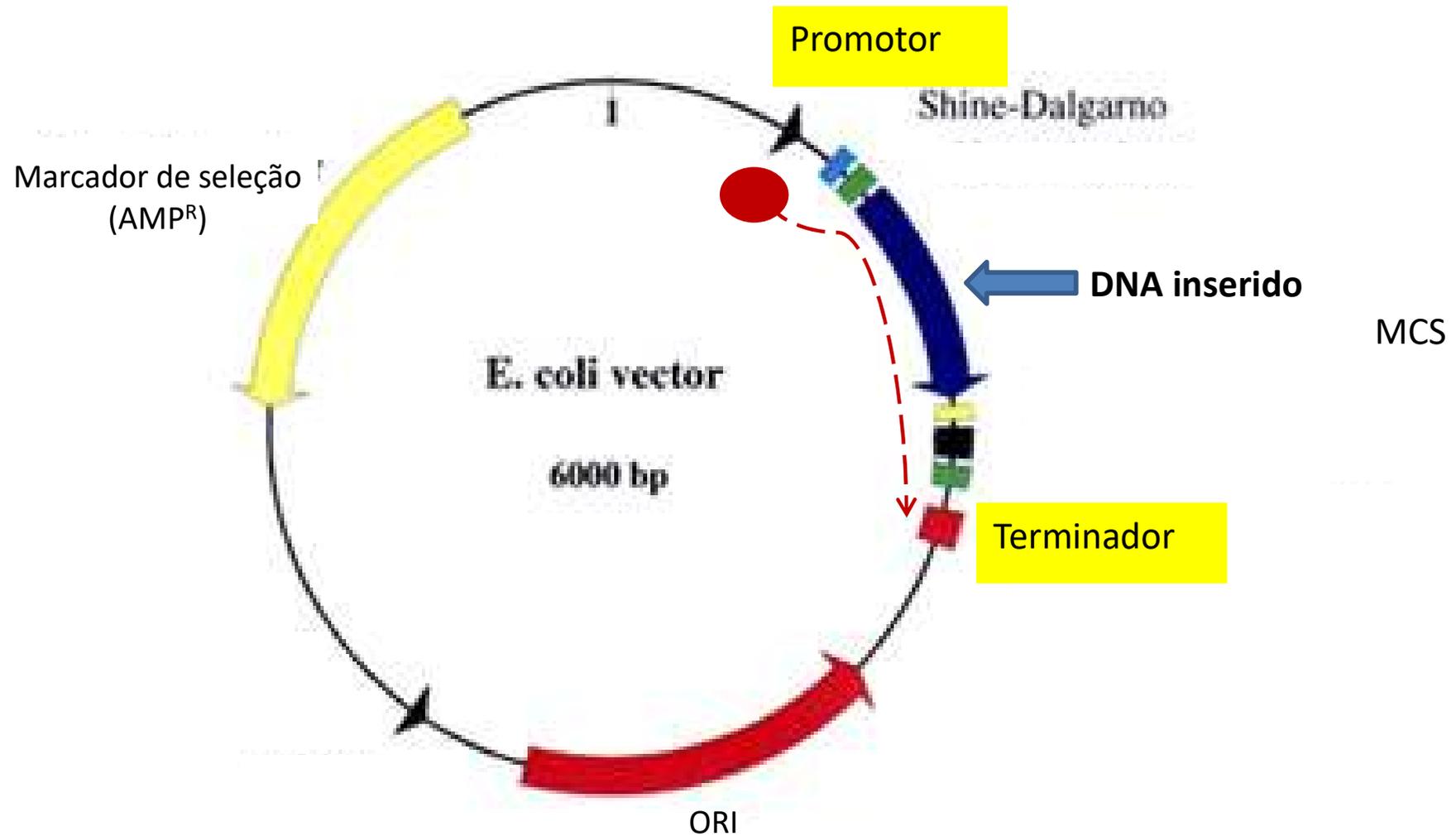
Vetores de Expressão em Bactéria

Exemplo



Na região MCS os biólogos moleculares introduziram sequências do Promotor e Terminador da transcrição que flanqueiam o DNA a ser inserido

Vetores de Expressão em Bactéria



● RNA polimerase bacteriana transcreve apenas o trecho de DNA inserido

Pergunta inicial

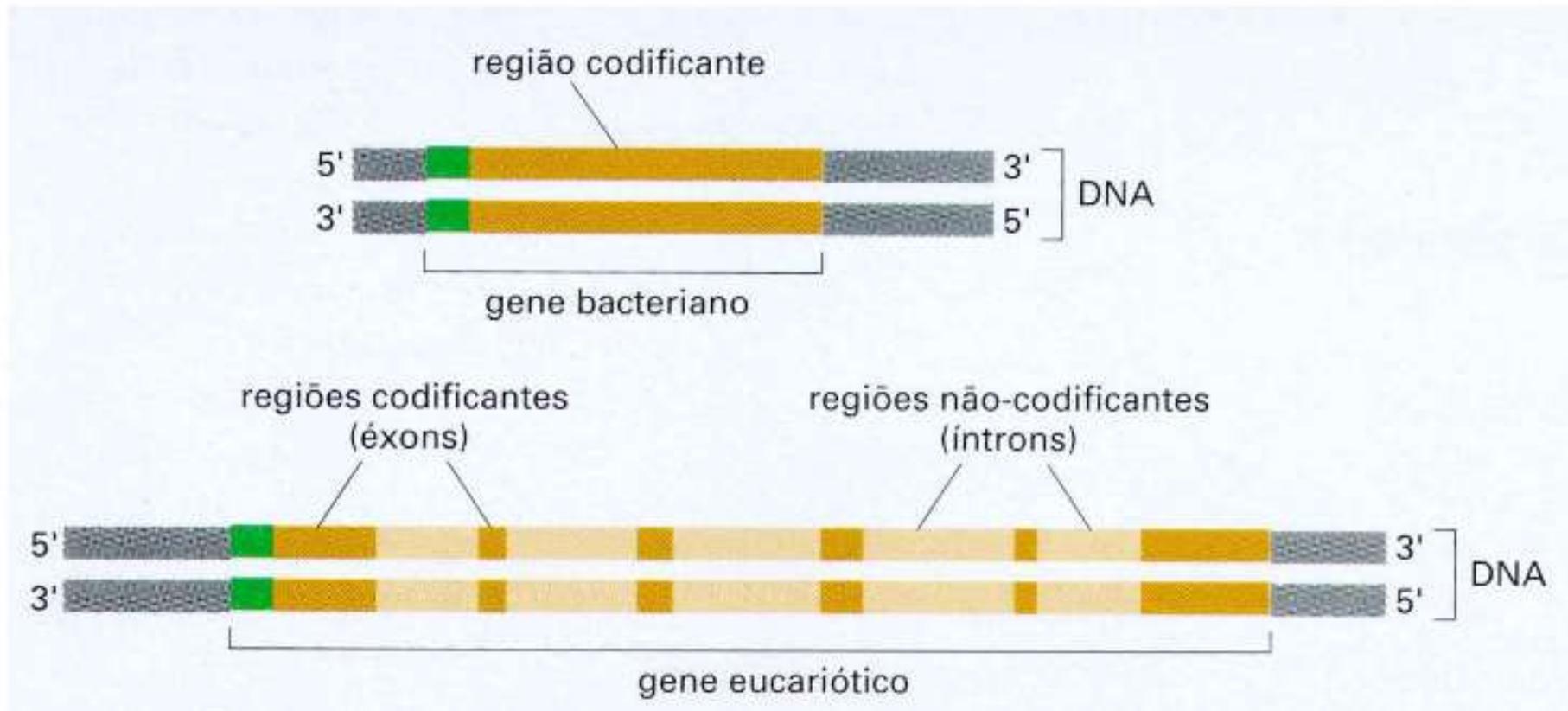
**A PROTEINA QUE EU QUERO EXPRESSAR É DE
PROCARIOTO OU EUCARIOTO?**

Procarioto – clonagem a partir de DNA genômico

Eucarioto – clonagem a partir do mRNA maduro

Por que?

Genes - Revisão



Bactérias e alguns eucariotos unicelulares (Ex. Protozoários)
NÃO TÊM INTRONS

Clonagem de gene de Procarioto

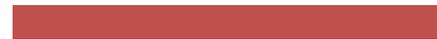
A Clonagem do gene é feita a partir do DNA total do organismo

O gene de interesse é amplificado por PCR e introduzido na Região do MCS na orientação correta

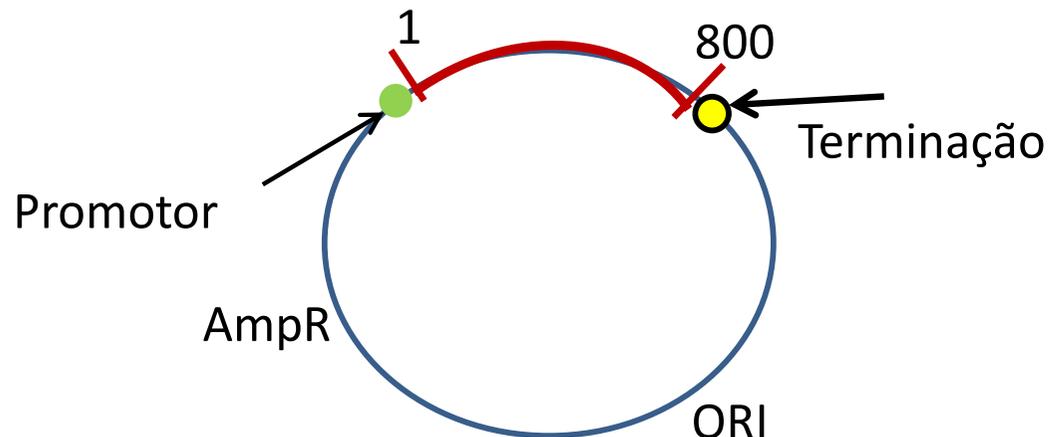
Produto da PCR

1

800 pb

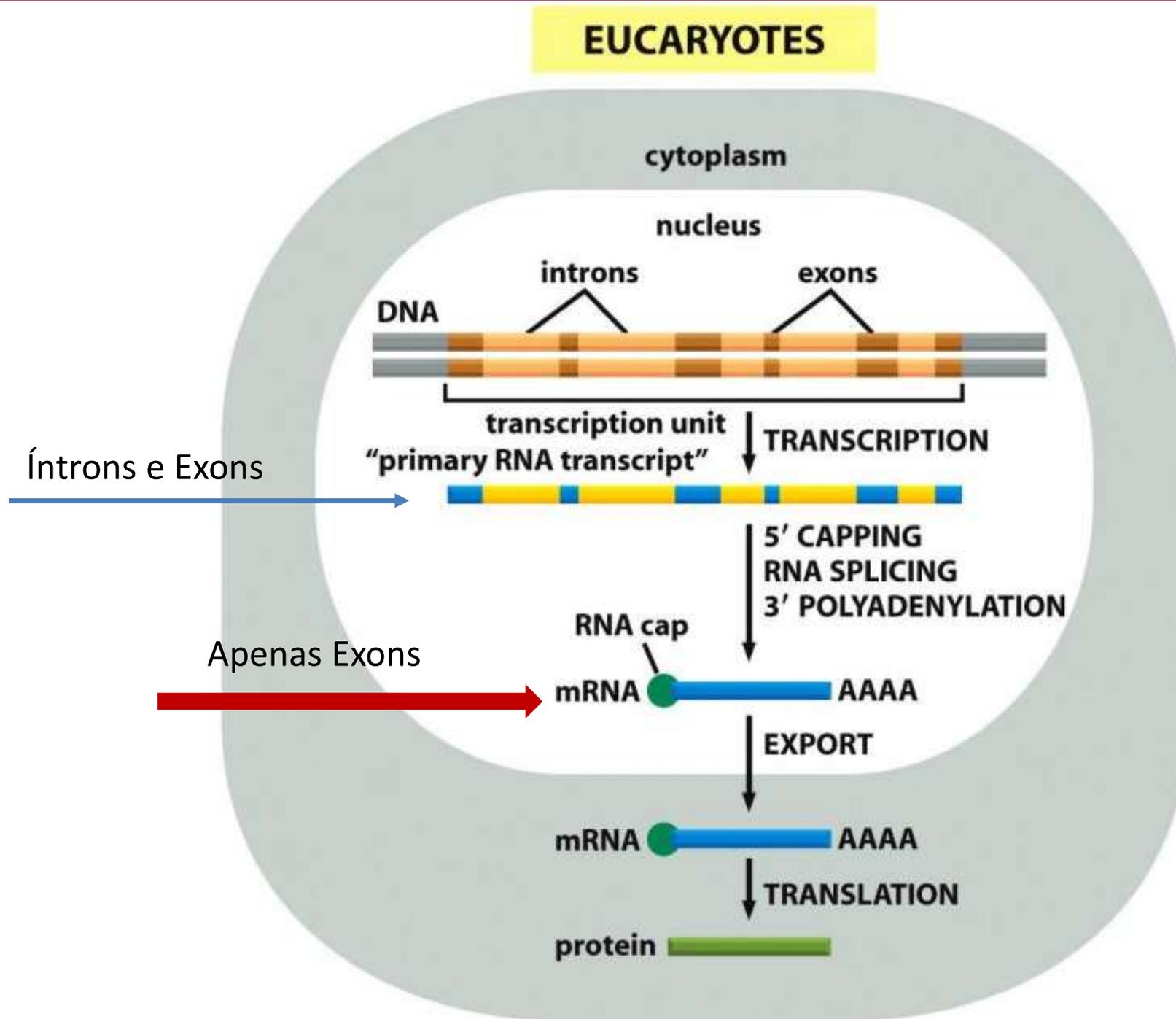


MCS



Clonagem de um gene de Eucarioto visando sua expressão

Processamento de mRNA em Eucariotos - Revisão



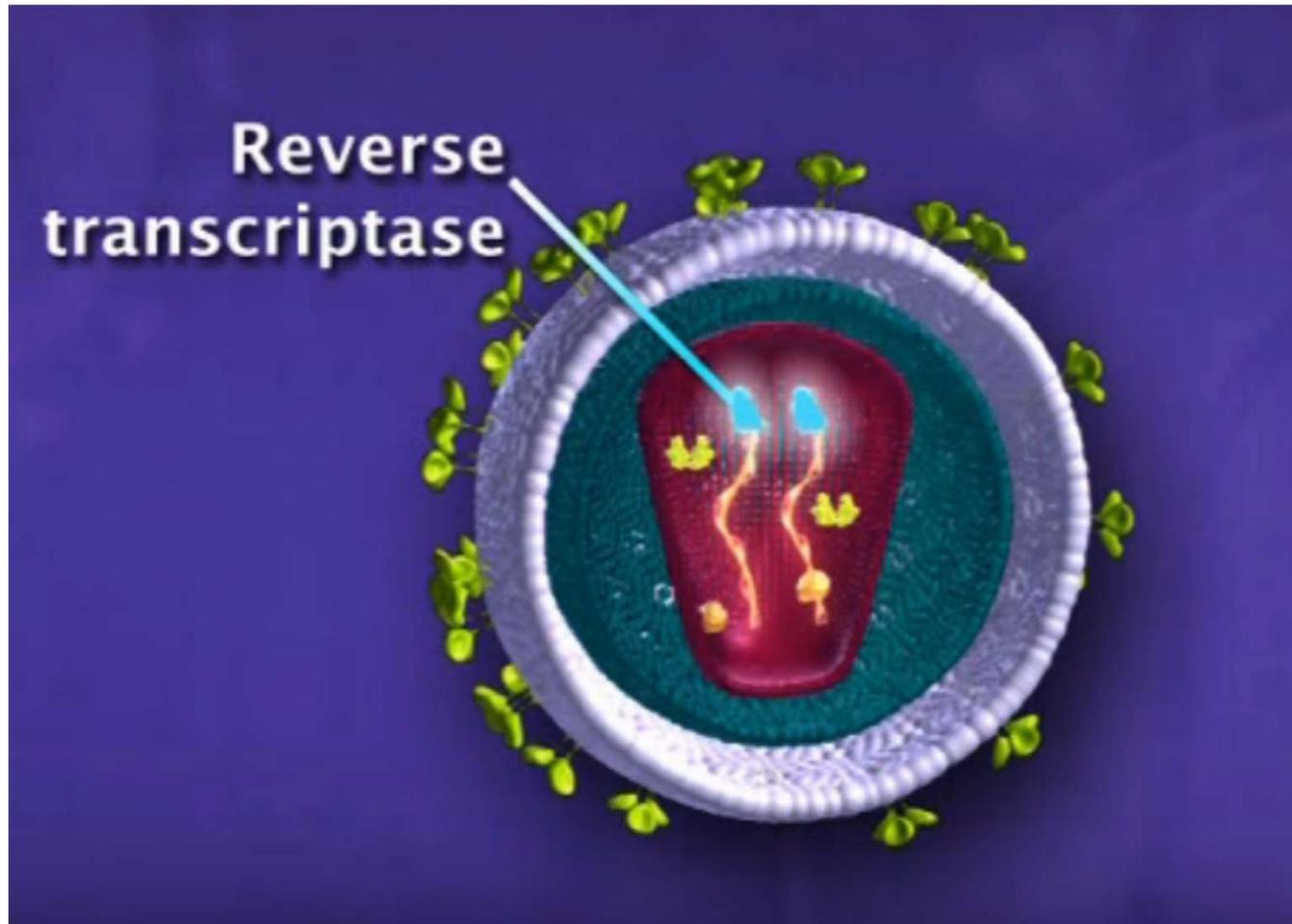
Clonagem de um gene de Eucarioto para EXPRESSÃO DE PROTEÍNA

- Não se pode clonar o transcrito primário (tem íntrons não codificantes)
- Bactéria não possui maquinaria para eliminar íntrons
- Não se pode clonar o mRNA maduro (só exons)
- Os plasmídeos são moléculas de DNA (dupla fita)
- Não se pode ligar RNA fita simples com DNA dupla fita do plasmídeo

Como transformar o mRNA maduro em DNA dupla fita?

Resposta: Usar a Enzima Transcriptase Reversa

Presente em vírus de RNA (Ex HIV)



<https://www.youtube.com/watch?v=eS1GODinO8w>

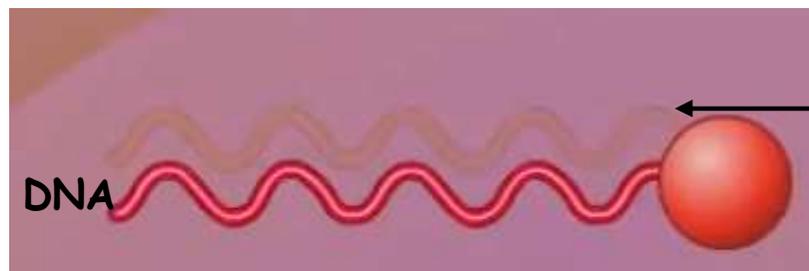
Reação da Transcriptase reversa (Revisão)

RNA (molde) + dNTPs + Primer de DNA \longrightarrow DNA (complementar fita simples) + PP

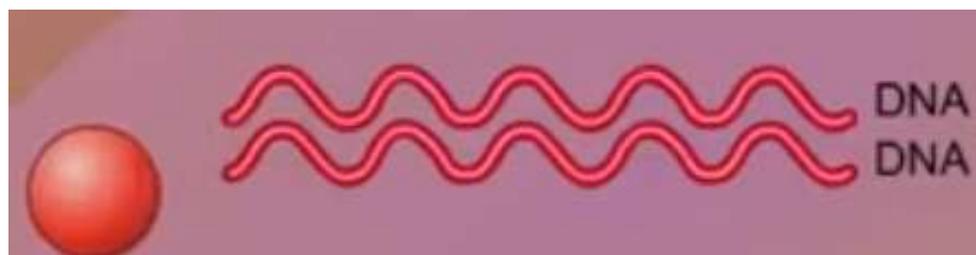
DNA (complementar fita simples) + dNTPs \longrightarrow DNA (dupla fita) + PP



DNA fita simples
complementar ao RNA
(cDNA)



RNA é hidrolisado



DNA dupla fita

Descoberta da Transcriptase reversa



Howard M. Temin y David Baltimore

Prêmio Nobel de Medicina em 1975

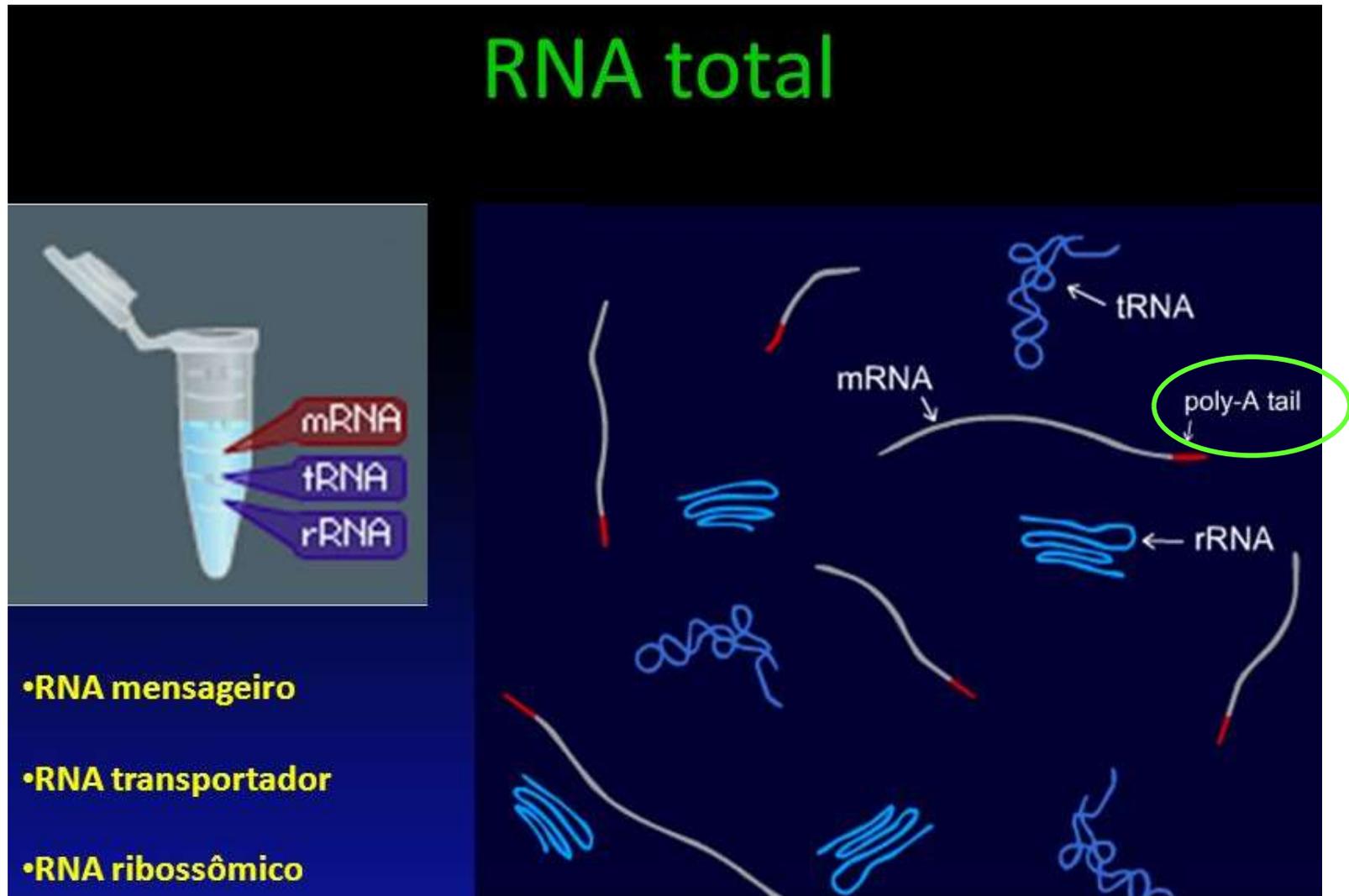
Transcriptase reversa de Retrovírus



Procedimento para Clonar um gene de Eucarioto visando produção de Proteína Recombinante

NOTA: Transcriptase reversa pode ser comprada!

1. Isolar o RNA TOTAL do Organismo



Todo o RNA mensageiro possui uma cauda de poli A na extremidade 3'

Para sintetizar cDNA fita simples do gene de interesse

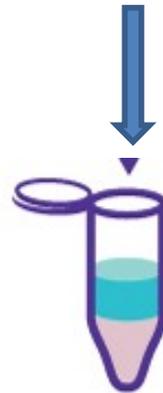
Utilizar como Primer oligo dTTTTTT = **polímero de desoxinucleosídeos de Timina**
Tem OH na extremidade 3'



Associa-se às caudas de poliA de **todas** as espécies de mRNAs
oligo dTTTTTT é comprado

2. Sintetizar cDNA dupla fita do gene de interesse

RNA TOTAL + Primer oligo dTTTTTT + Transcriptase reversa + dNTPs



oligo dTTTT só pareia com a cauda poliA de todos os mRNAs

Associação do primer. Formação de ligações de H



First strand synthesis

Transcriptase reversa



2. Sintetizar cDNA dupla fita dos mRNAs

Degradação do mRNA molde e síntese da segunda fita do DNA pela transcriptase reversa



Todos os mRNAs foram transformados em DNA dupla fita



Como amplificar o gene de interesse?

2. Amplificação do gene de interesse



Adição dos 2 Primers do gene de interesse
Só pareiam com o cDNA do gene

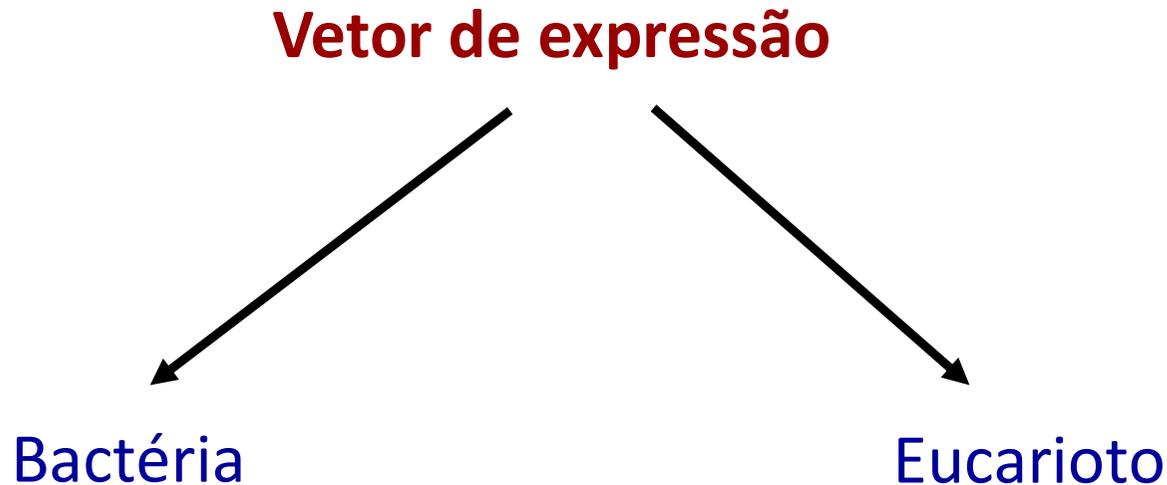


PCR com Taq polimerase



Purificação do produto da PCR

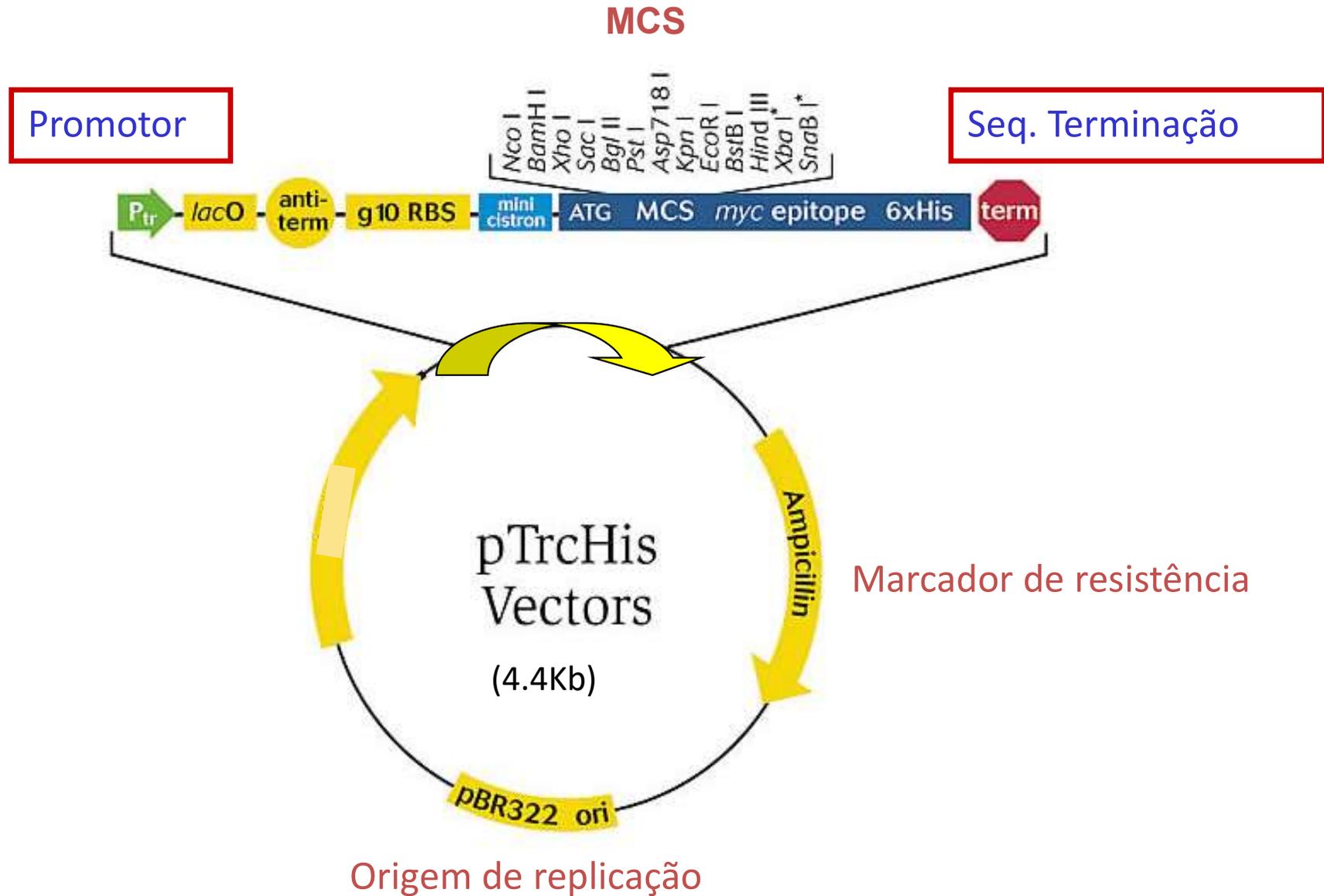
Clonagem do produto da PCR (cDNA de interesse)



- Nota: O gene de Procarioto ou de Eucarioto pode ser expresso em Bactéria, Levedura, Célula de Mamífero ou Célula Vegetal.
- A escolha depende do Objetivo.
- O código é universal.

Vetor de expressão de Bactéria

Exemplo



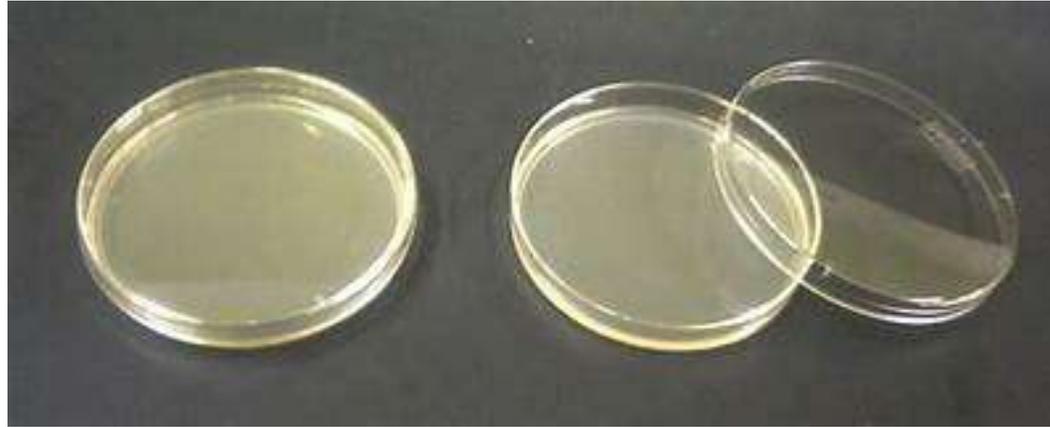
Ligar o produto da PCR no sítio do MCS

Procedimento para obtenção da Proteína Recombinante

Resumo das Etapas

1. Obtenção do cDNA dupla fita de interesse a partir do mRNA maduro
2. Clonagem do cDNA no vetor de expressão (usar enzimas de restrição e DNA ligase)
3. Transformação do vetor recombinante na bactéria ou na célula de eucarioto

4. Seleção das bactérias (ou outra célula) com o plasmídeo recombinante

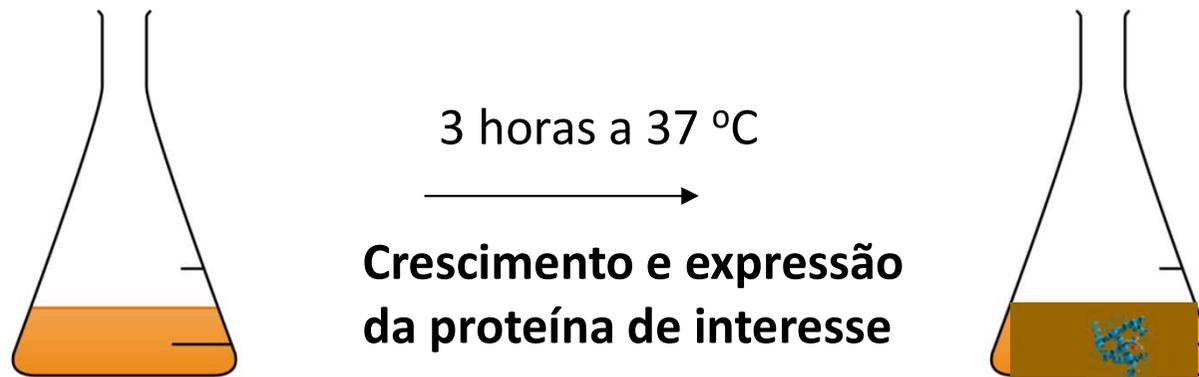


Sem Antibiótico

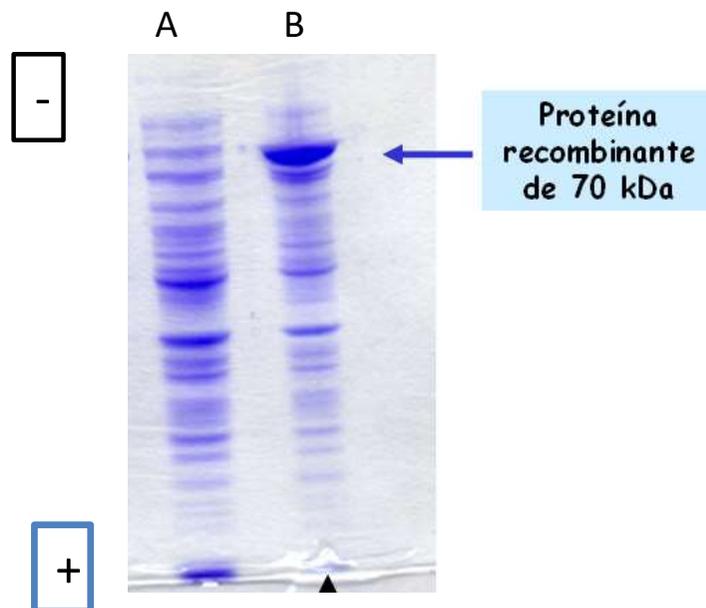
Com Antibiótico

Procedimento para a obtenção da proteína recombinante

5. Inocular a bactéria com o vetor recombinante em meio com antibiótico



6. Análise das proteínas da bactéria em gel de poliacrilamida-SDS

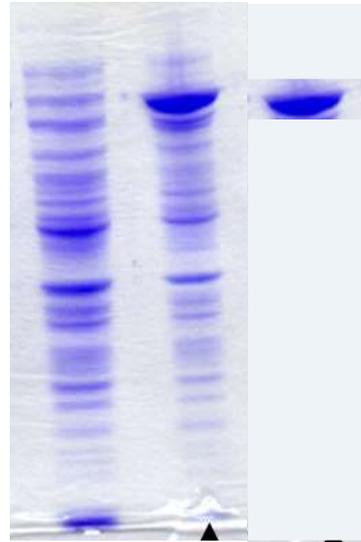


- A. E. coli sem plasmídeo (**controle**)
- B. E. coli com plasmídeo recombinante (expressão da proteína)

7. Purificação da proteína recombinante

Purificação por técnicas convencionais (Ex. Cromatografia)

Confirmação da pureza



← Proteína purificada

Crescimento da bactéria recombinante em larga escala



**Rendimento: 60 g de proteína
pura por litro de cultura
bacteriana.**

Exemplos de Aplicações

Enzimas recombinantes usadas na Indústria

- ❑ Xylanase – degrada hemicelulose
 - papel,
 - Indústria têxtil
 - Ração animal
- ❑ Celulase – degrada lignina/celulose
 - Ração animal
 - Produção de etanol

Proteínas recombinantes para a saúde

- ❑ Hormônio de crescimento
- ❑ Insulina
- ❑ Várias vacinas