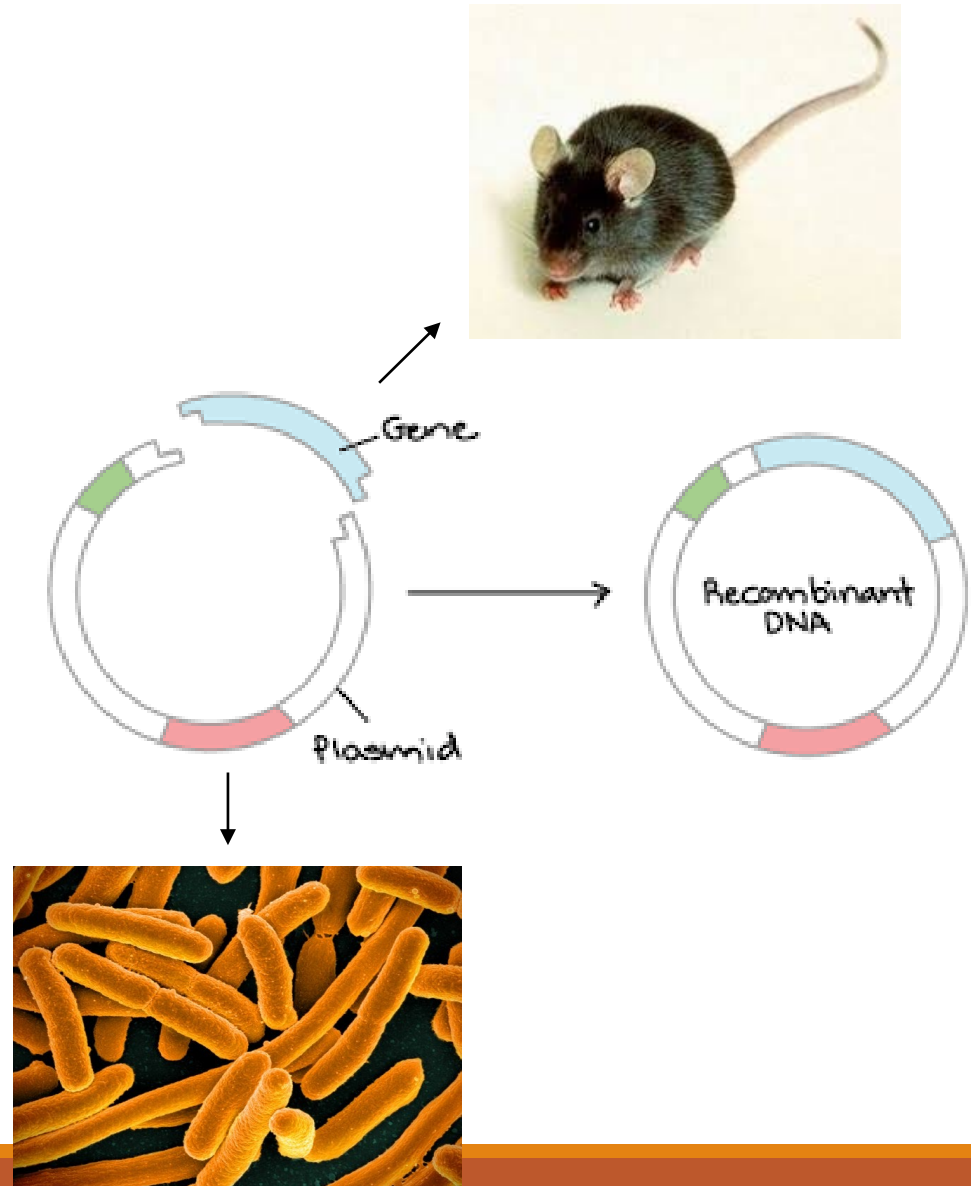


# Produção de proteínas recombinantes

**DNA Recombinante** são moléculas de DNA geradas no laboratório através da fusão de fragmentos de DNA derivados de duas ou mais fontes, geralmente de espécies diferentes.

**Proteínas recombinantes** são codificadas por DNA recombinante.



# Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

*E. coli* = hospedeiro mais comum para expressão de proteínas recombinantes



## Vantagens:

- Tempo rápido de duplicação (~20-30 min);
- Crescimento em meio de cultura simples;
- Proteínas de origem procariótica e eucariótica podem ser produzidas neste organismo;
- Células de *E.coli* podem ser facilmente lisadas para a purificação das proteínas recombinantes.

## Desvantagens:

- E.coli* não realiza *splicing*
- E.coli* não apresenta maquinaria de processamento pós-traducional (glicosilação, fosforilação etc).

# Expressão de proteínas eucarióticas em *E.coli*

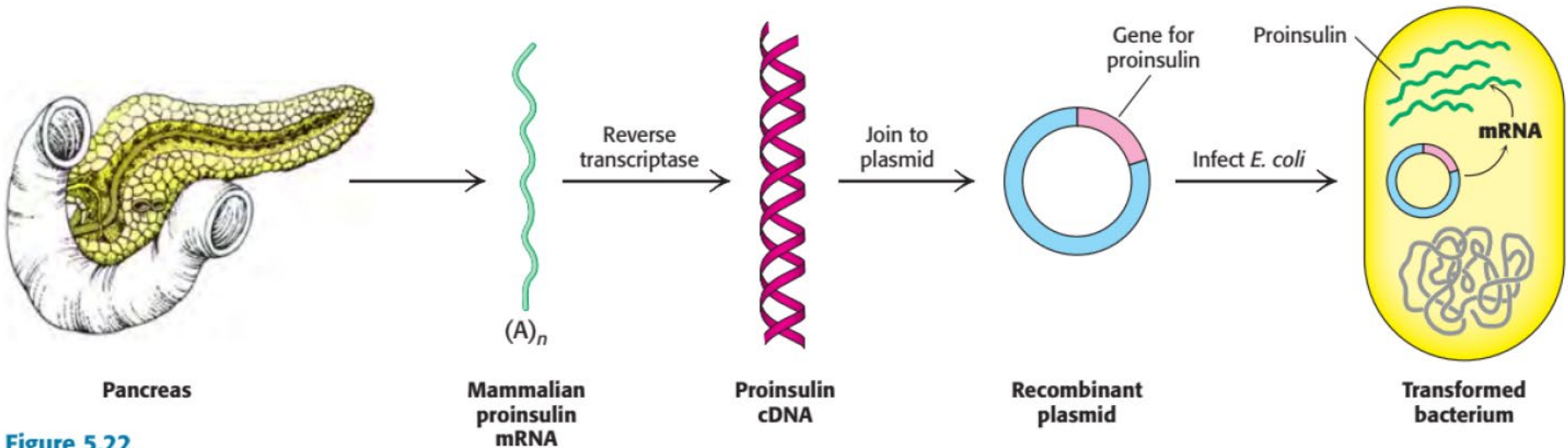


Figure 5.22

*E.coli* não realiza *splicing*, portanto genes eucarióticos com íntrons não podem ser diretamente expressos nas bactérias. Neste caso o RNAm processado do gene a ser expresso é purificado, convertido em cDNA e clonado no vetor de expressão.

# O sistema de expressão pET

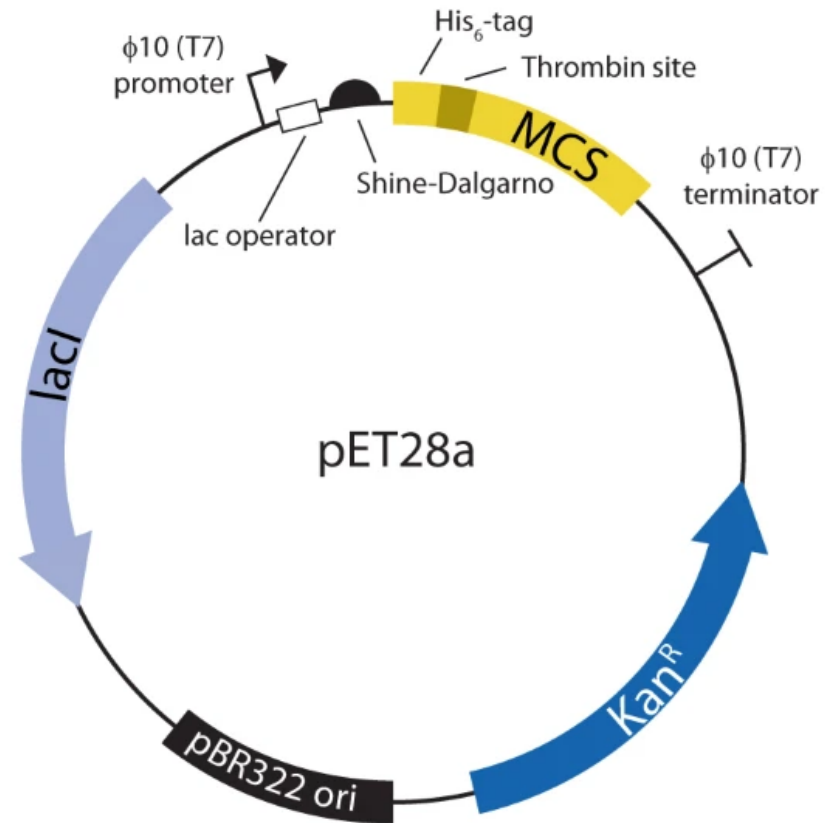
Vetor de expressão: pET28a  
*E.coli*: BL21(DE3) pLysS

# Vetor de expressão

Os plasmídeos para expressão de proteína recombinante possuem algumas diferenças com relação aos de clonagem:

Além da ORI, gene de seleção e sítio múltiplo de clonagem (MCS) precisam de:

- regiões que promovam e regulem a transcrição como promotores e operadores
- uma sequência de término da transcrição
- um sítio de ligação ao ribossomo (SD)



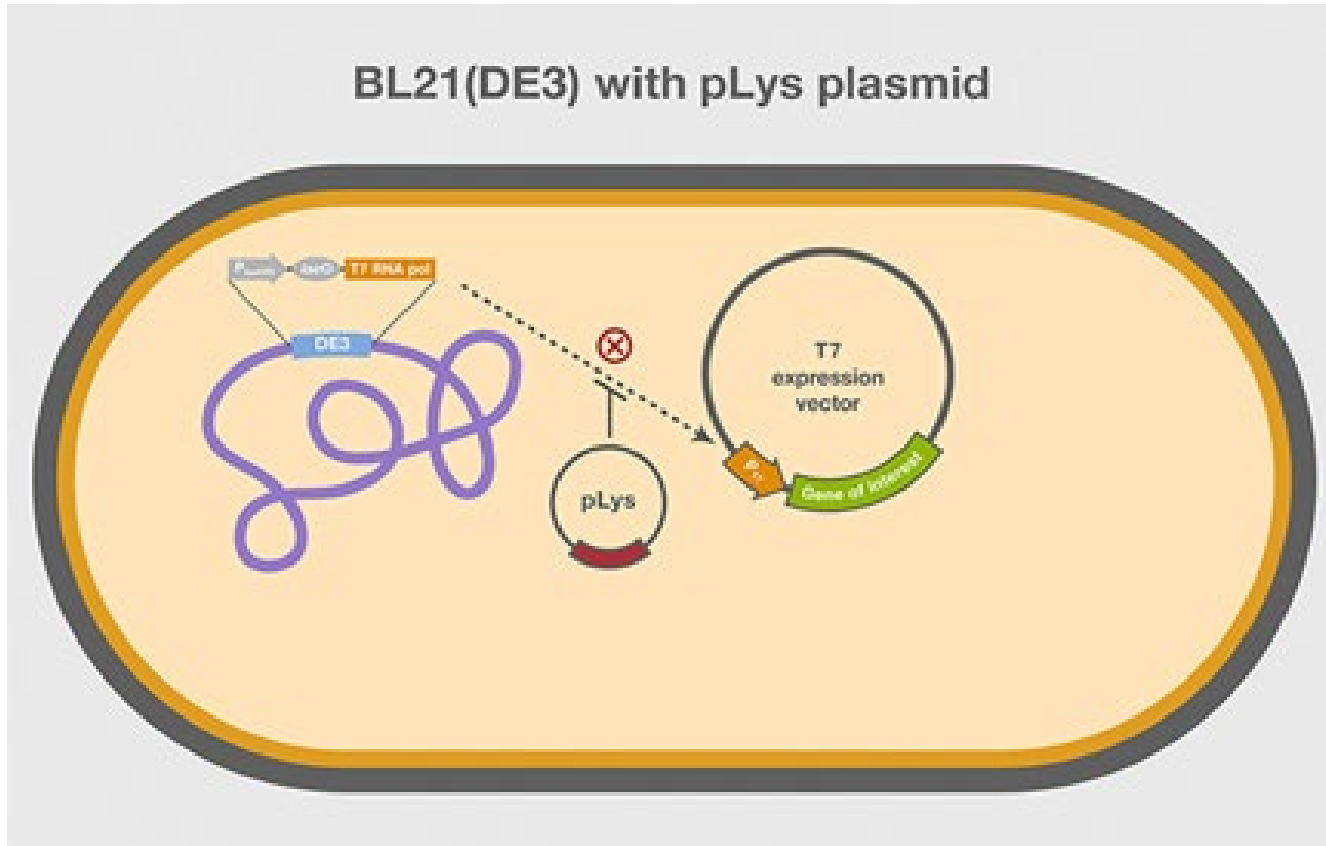
## *E. coli* BL21(DE3) pLysS

- DE3 é um profago lambda que codifica o gene T7 RNA polimerase.
- A T7 RNA polimerase é altamente específica para o promotor T7 e não reconhece eficazmente os promotores endógenos da *E. coli*.
- O promotor T7 é forte e fortemente regulado. Quando a transcrição é ativada a partir deste promotor pela T7 RNA polimerase, o gene alvo é transcrito com um elevado nível de expressão - cerca de 5 a 10 vezes superior à taxa de transcrição da própria RNA polimerase da *E. coli*
- A bactéria BL21 não apresenta algumas proteases (Lon e OmpT) que poderiam degradar a proteína recombinante.
- pLys- A lisozima T7 suprime a atividade da T7 RNA polimerase, o que reduz a expressão proteica de nível basal do gene de interesse. Isto é importante se a proteína for tóxica para as células *E. coli*.

# O sistema de expressão pET

Vetor de expressão: pET28a

*E.coli*: BL21(DE3) pLysS



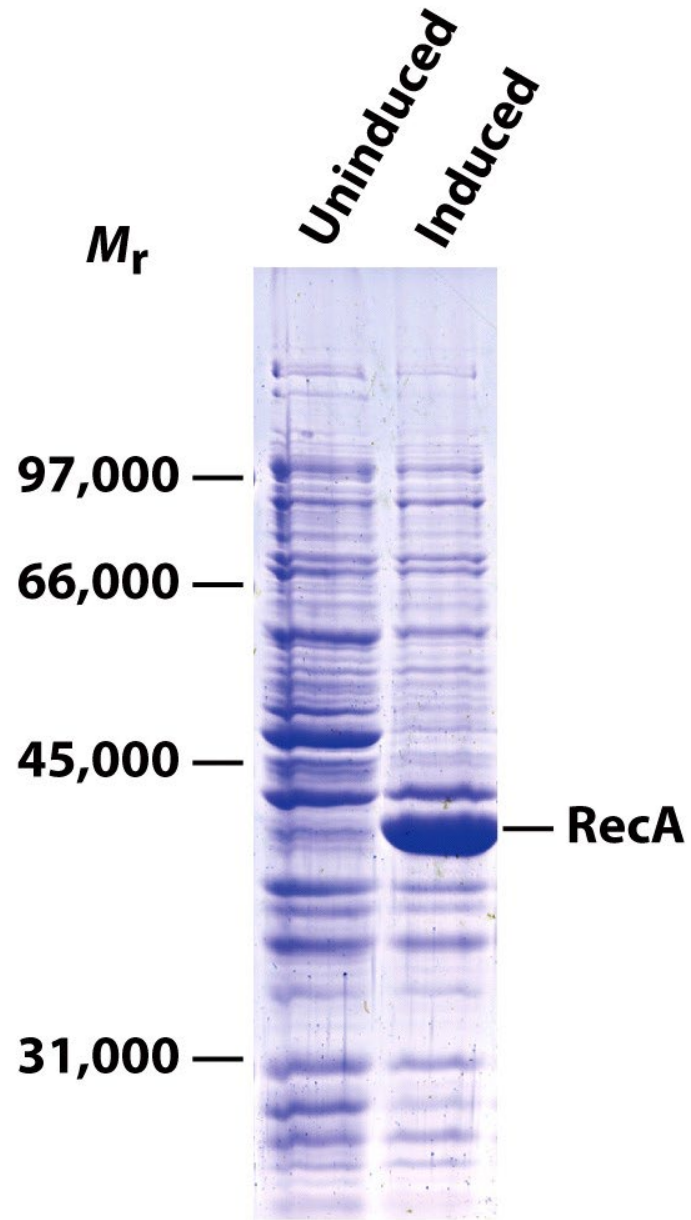
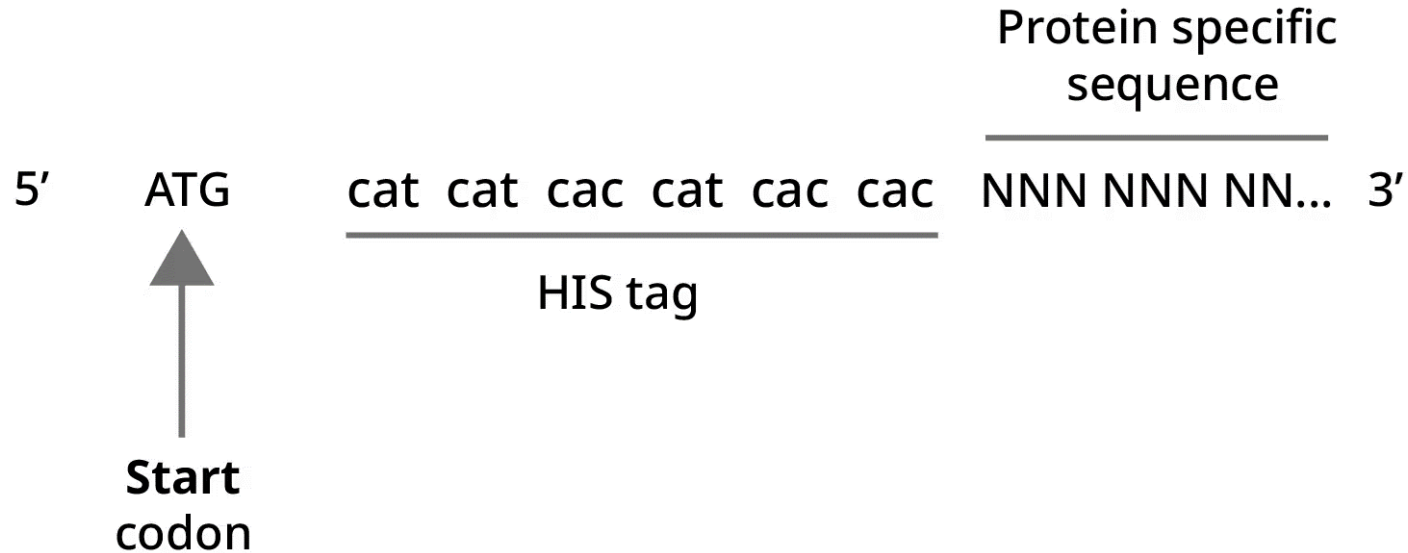


Figure 9-8

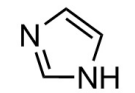
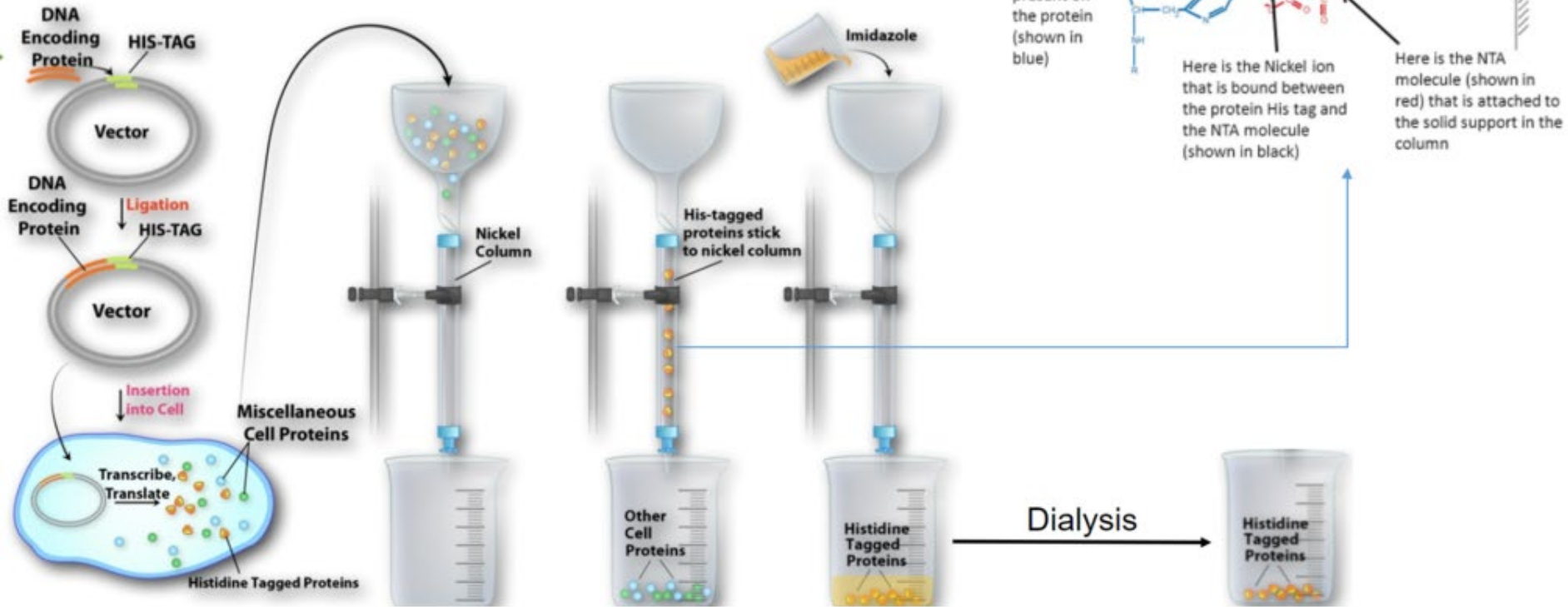


# Marcadores terminais fornecem instrumentos para purificação por afinidade

Ex: Cauda de histidina (*His-tag*).

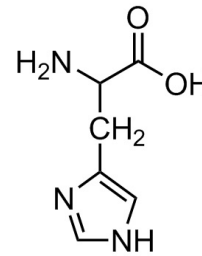


# Purificação por afinidade



Imidazole

vs



Histidine

