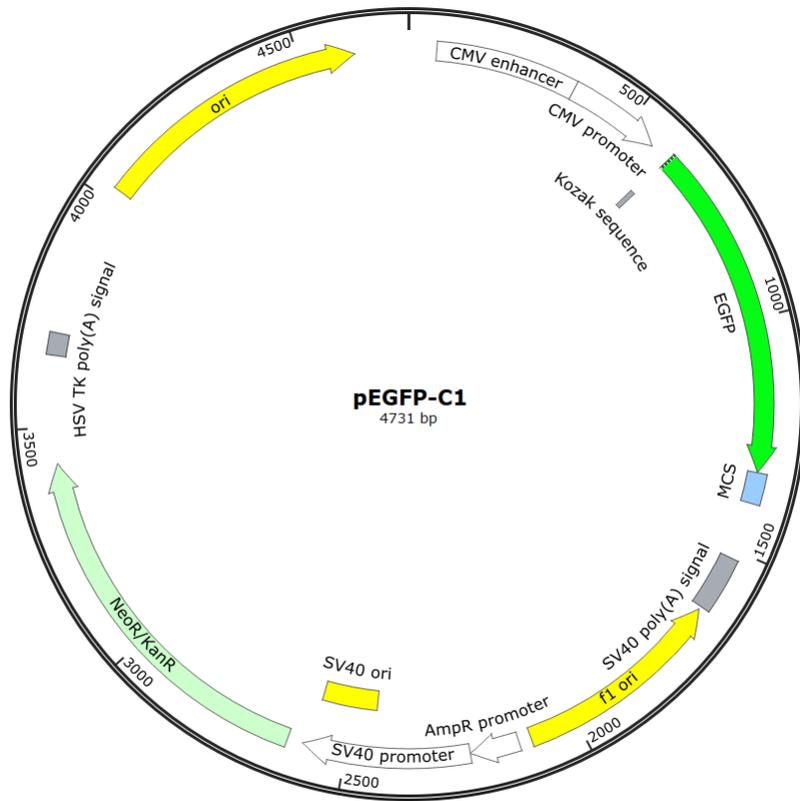
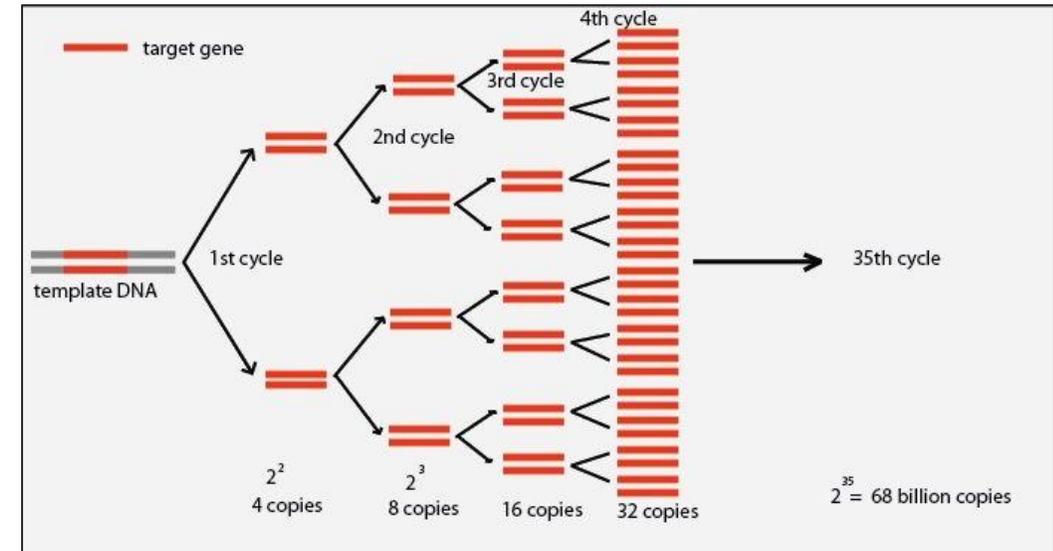


Vetores de Clonagem vs Vetores de Expressão



Prática de PCR



Nicolas Hoch
QBQ2457 – 2023

Aula 4

Clonagem

Expressão

Objetivo?

obter/fazer cópias do DNA de interesse

Expressar RNA/proteína codificada pelo gene de interesse em uma célula

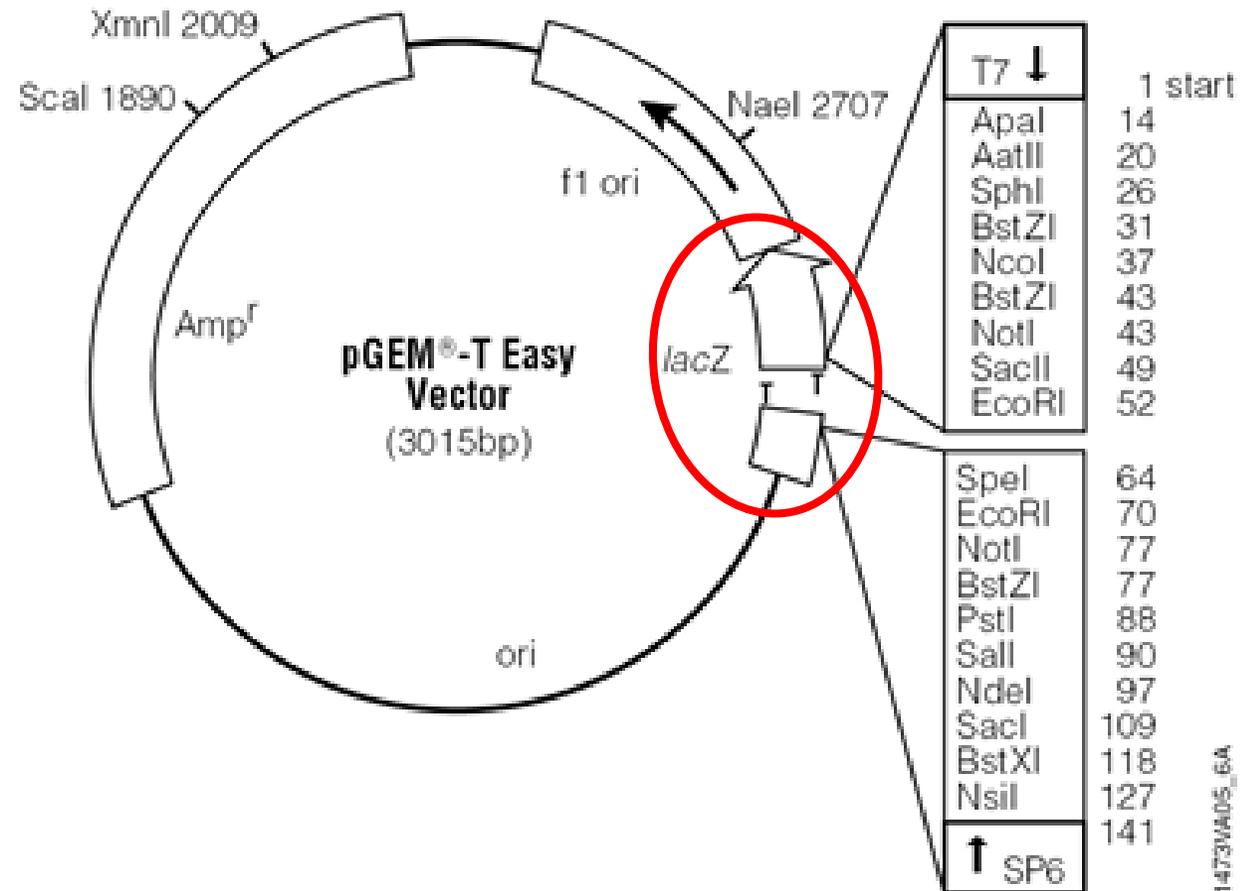
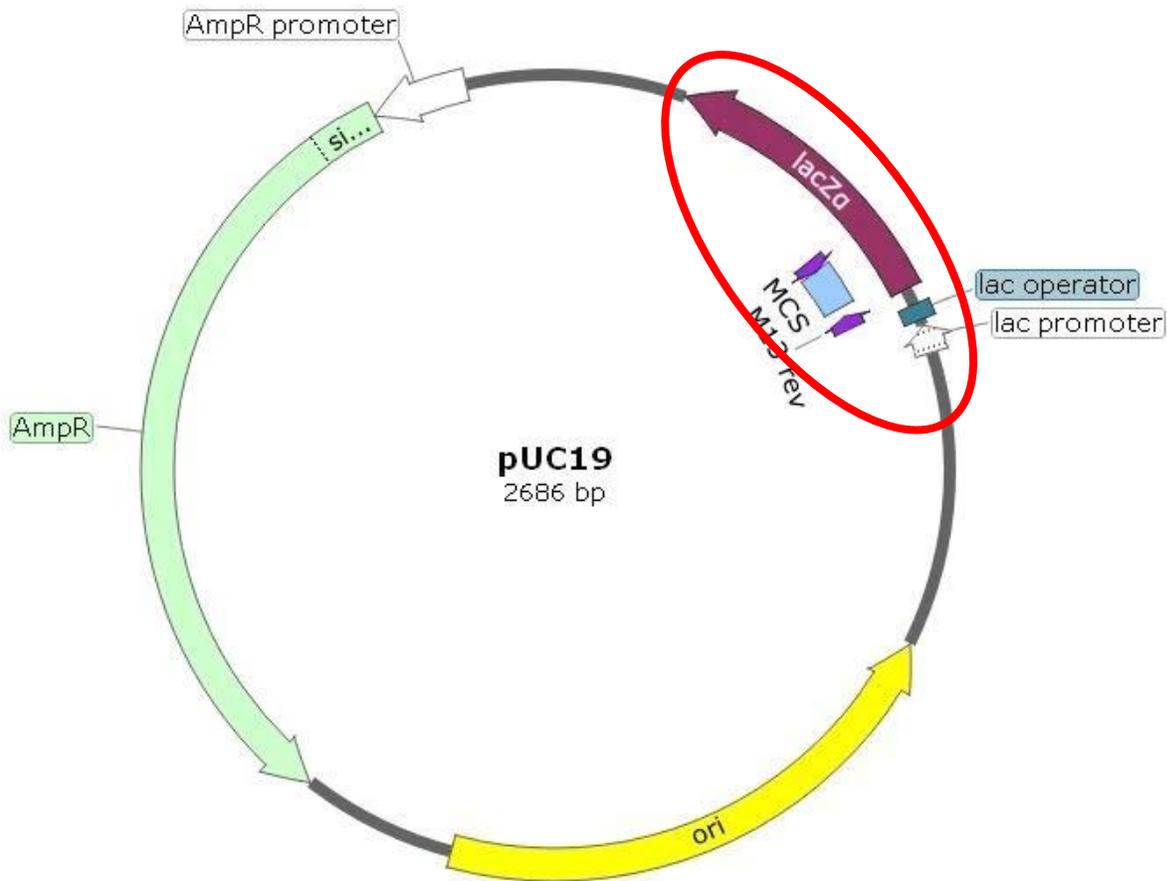
Elementos

- Gene de resistência
- Origem de replicação
- Sítio de clonagem*

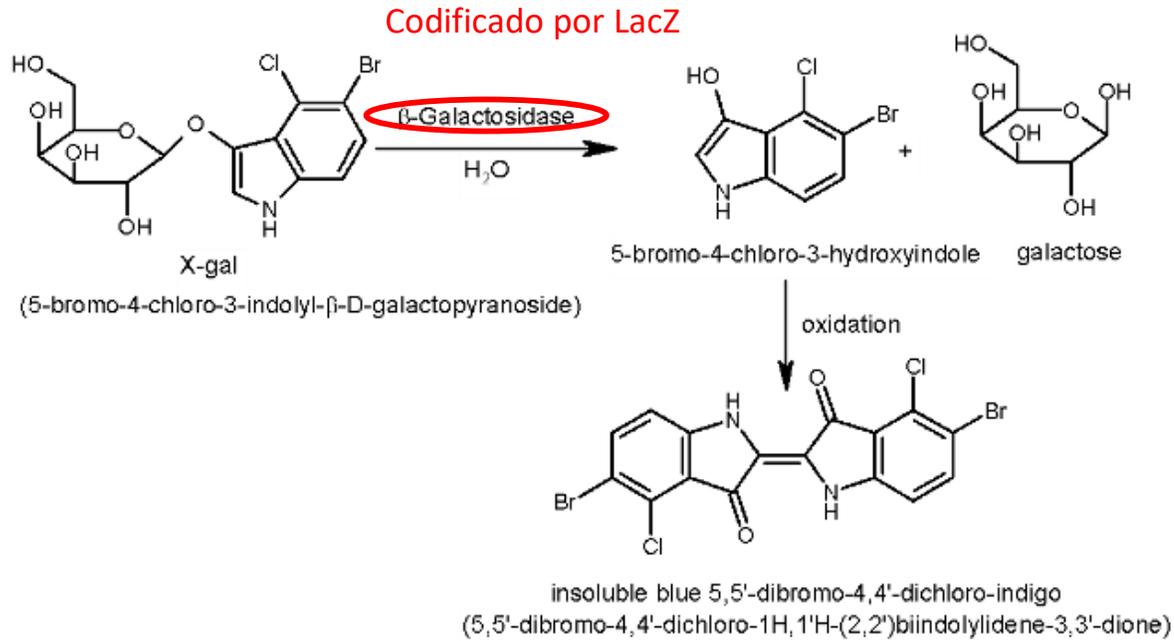
*localizado de maneira a ser selecionável?

- Gene de resistência
- Origem de replicação
- Sítio de clonagem
- Promotores, enhancers, iniciadores de transcrição, iniciadores de tradução, sequências terminadoras, etc.
- Tags

Vetores de clonagem



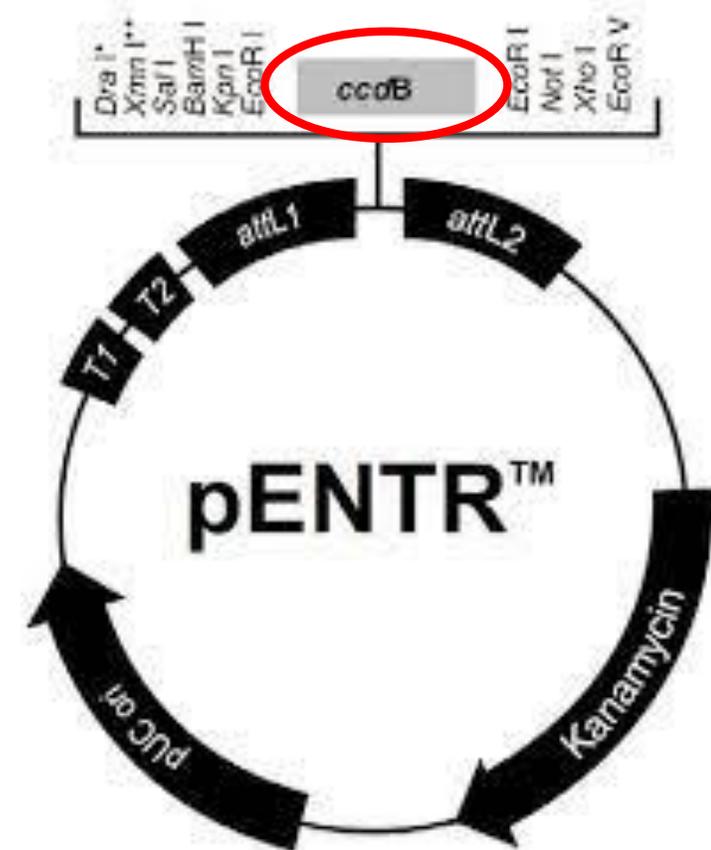
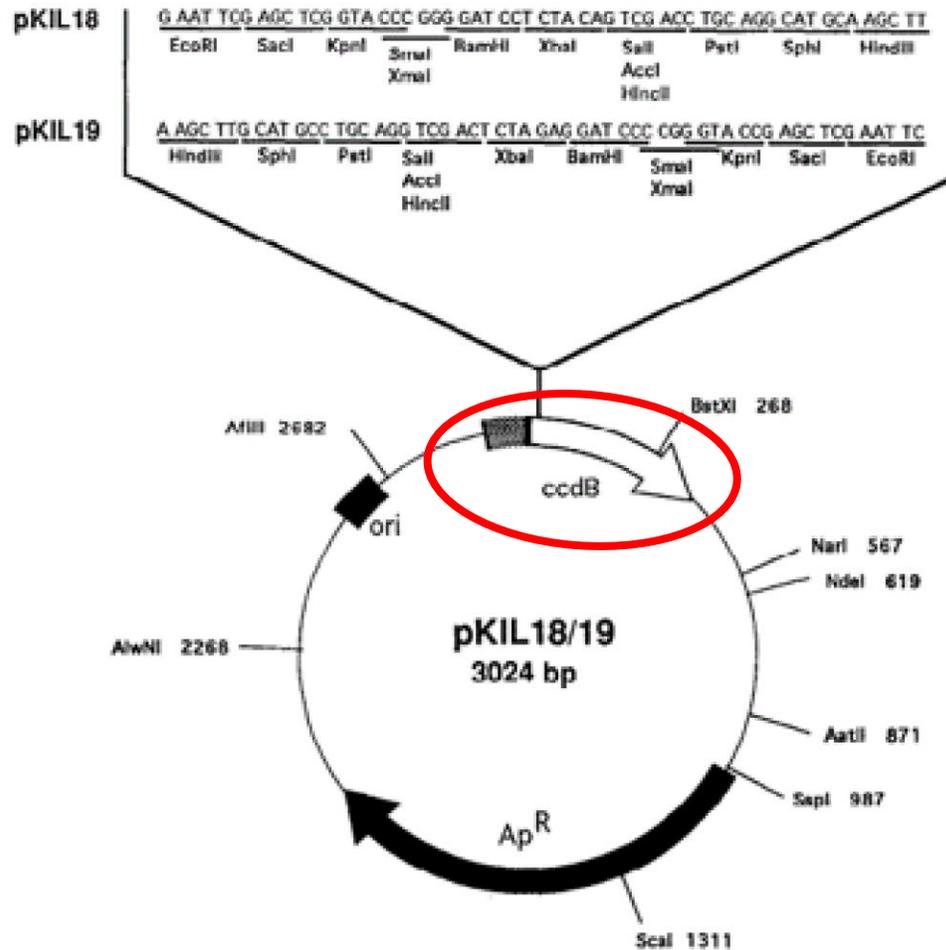
Seleção azul/branco com X-gal



Quais colônias você escolheria?

Isso funciona em qualquer linhagem de *E.coli*?

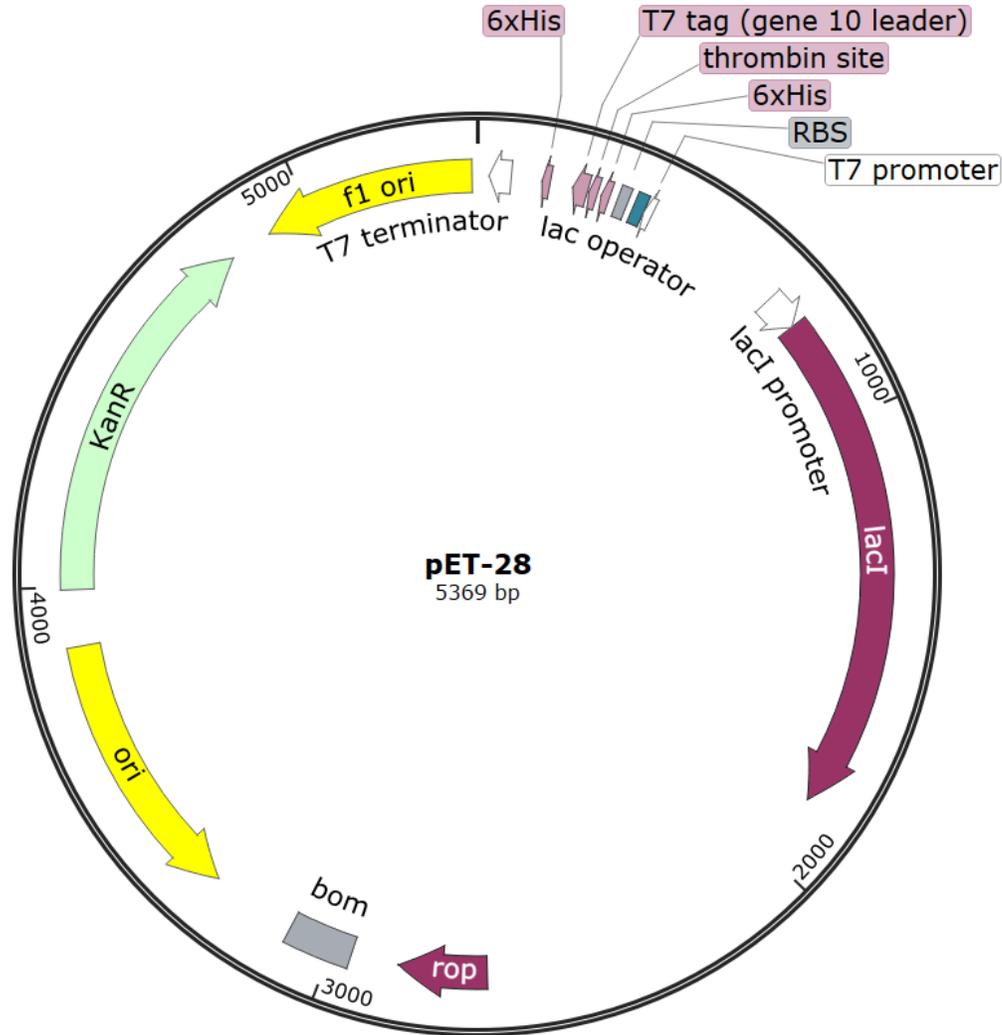
Seleção com ccdB



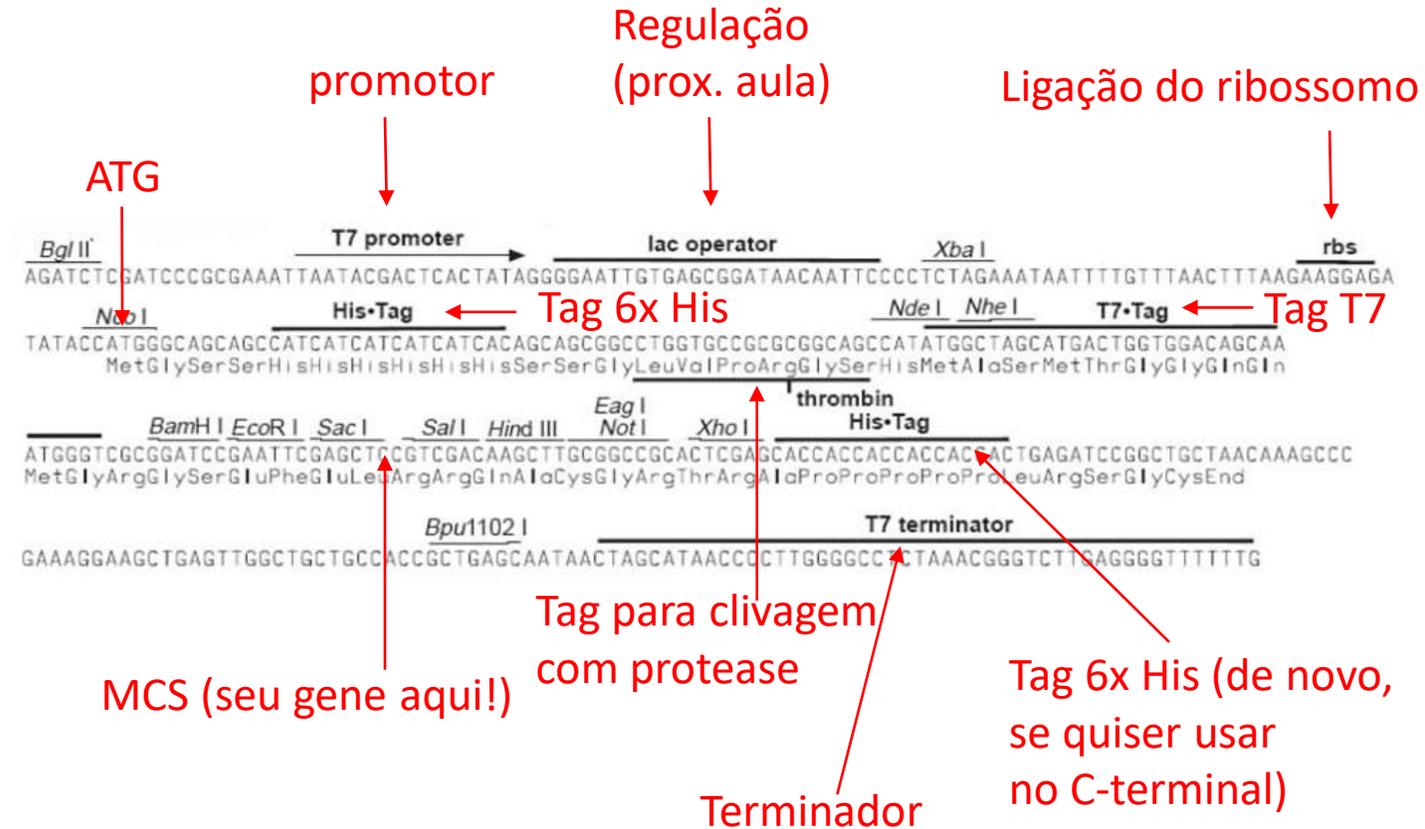
CcdB codifica uma proteína que mata células de bactéria (é um inibidor de DNA girase)

Sobrevivem e formam colônias somente as células que receberam um vetor em que ccdB está interrompido/ausente

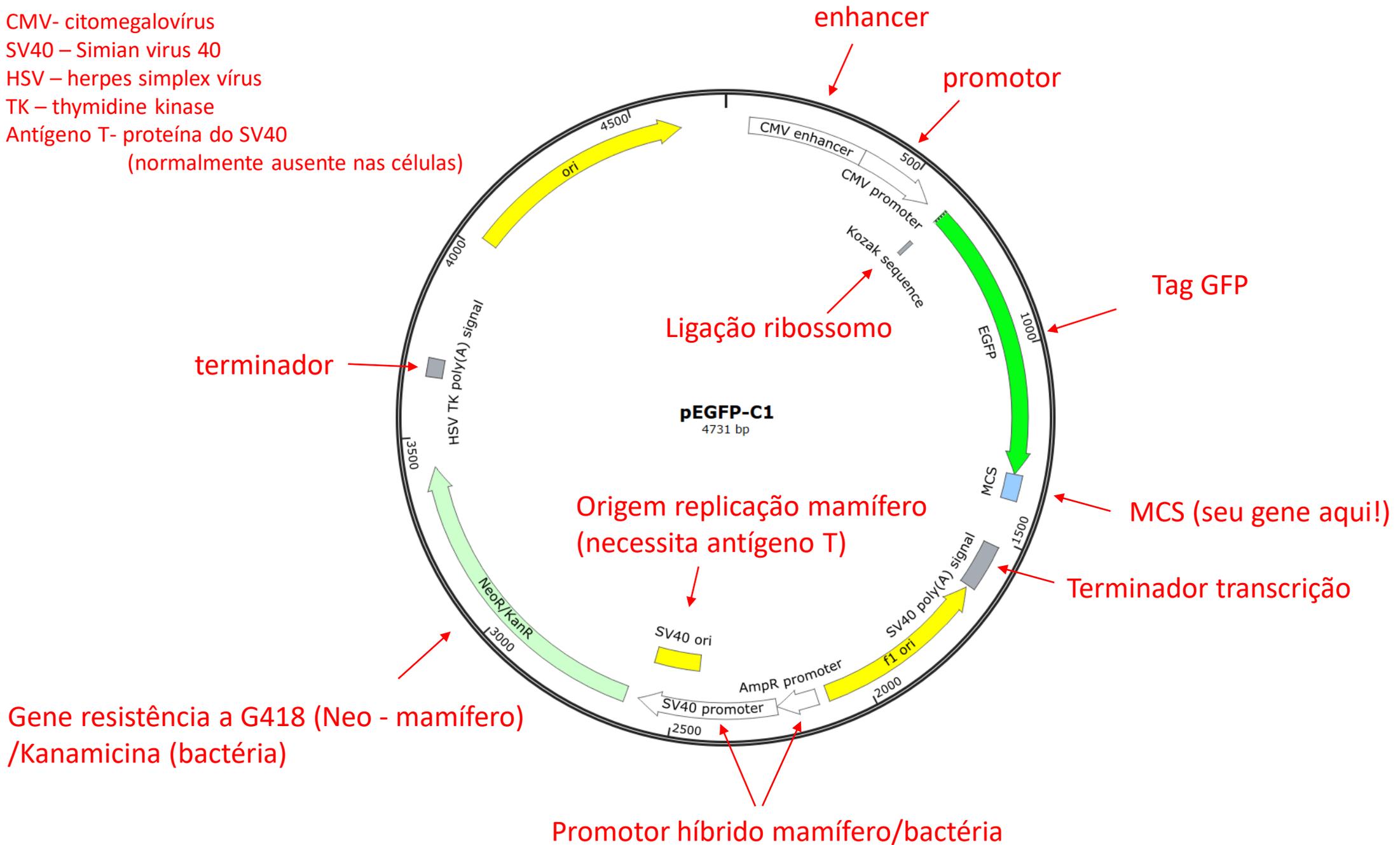
Vetores de expressão



T7 é um bacteriófago



CMV- citomegalovírus
SV40 – Simian virus 40
HSV – herpes simplex vírus
TK – thymidine kinase
Antígeno T- proteína do SV40
(normalmente ausente nas células)



Tipos de tags

Para purificação por afinidade ou para detecção com anticorpos específicos:

FLAG (artificial; 8 aminoácidos = DYKDDDDK) → anticorpos específicos

Myc (proteína c-myc humana; 10 aminoácidos = EQKLISEEDL) → anticorpos específicos

HA (hemaglutinina do vírus influenza; 9 aminoácidos = YPYDVPDYA) → anticorpos específicos

V5 (simian vírus 5; 14 aminoácidos = GKPIPPLLGLDST) → anticorpos específicos

Strep-tag (artificial, 8 aminoácidos = WSHPQFEK) → liga streptactina (uma proteína derivada da streptavidina)

GST (proteína de 211 aminoácidos) → liga glutationa (um peptídeo de três aminoácidos)

6x HIS (artificial, 6 aminoácidos = HHHHHH) → liga níquel ou cobalto

Proteína A (proteína de *S. aureus* de 42kDa) → liga IgG

Calmodulin binding peptide (CBP) (peptídeo 26aa de miosina humana) → liga calmodulina (uma proteína)

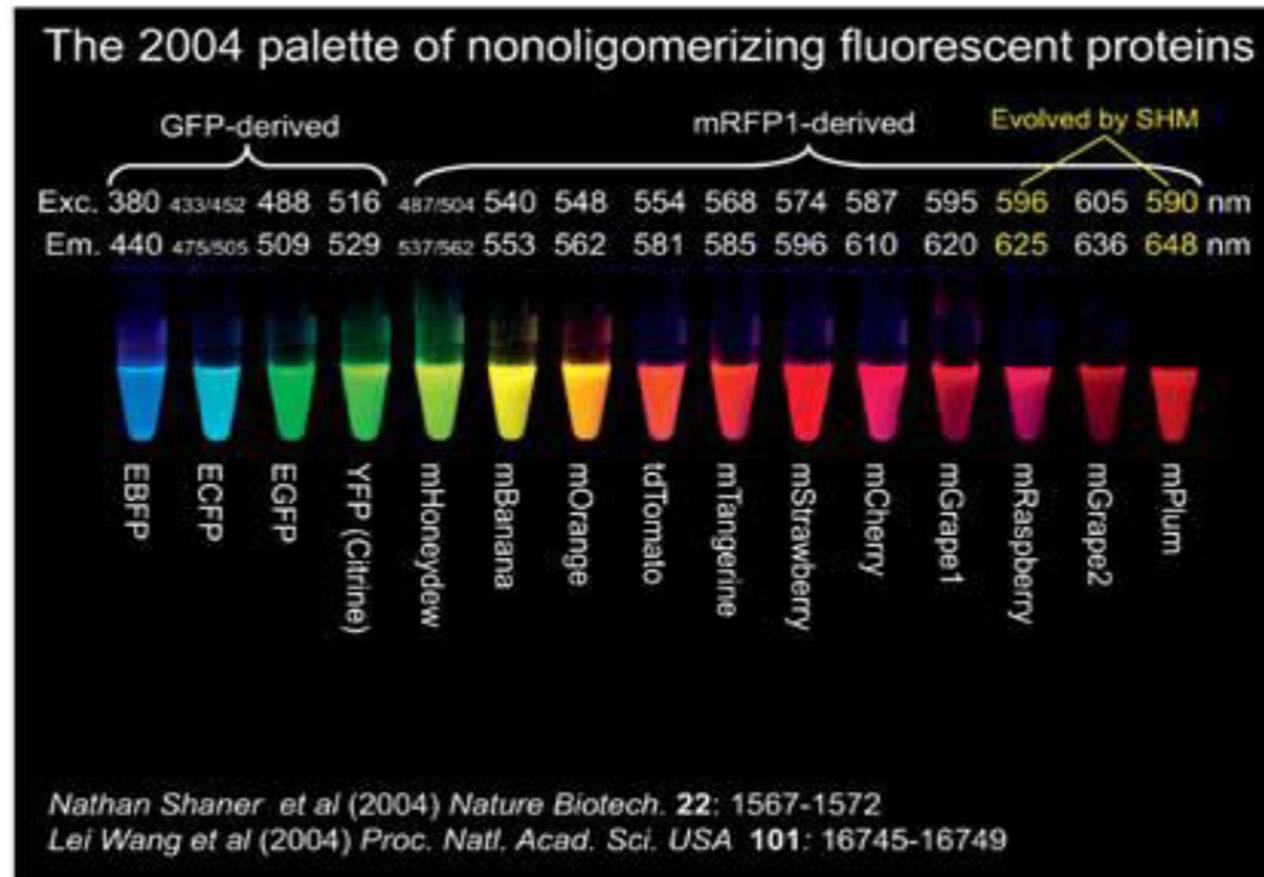
MBP (maltose binding protein de *E. coli* de 42 kDa) → liga maltose

Para clivagem por proteases:

TEV (tobacco etch virus) protease, Trombina, Fator Xa

Tags fluorescentes

GFP (proteína verde fluorescente de 28kDa, originalmente de água-viva) → microscopia e/ou anticorpos específicos
Diversas variantes com fluorescência em comprimentos de onda diferentes



<https://www.youtube.com/watch?v=N97cgUqV0Cg>