



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**CLONAGEM E HIPEREXPRESSÃO DE GENES
CODIFICADORES DE XILANASES**

Engenharia Zootécnica
Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Helena Maria Marques Lopes Moreira Santos

—◆—
CASTELO BRANCO
2008

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Parede celular vegetal	9
2.2 Celulose	9
2.3 Hemicelulose	10
2.4 Xílanos e arabinóxílanos	11
2.5 Outras hemiceluloses	12
2.6 Degradação da parede celular vegetal	12
2.7 Enzimas envolvidas na degradação de polissacáridos estruturais	14
2.8 Características bioquímicas das celulasas e hemicelulasas	14
2.9 Utilizações Biotecnológicas	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Reagentes químicos, águas e soluções	18
3.2 Estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados	18
3.3 Meio de cultura	19
3.4 Criopreservação de estirpes de <i>E. coli</i>	19
3.5 Lavagens e esterilização	19
3.6 Centrifugação	20
3.7 Antibióticos e X-Gal	20
3.8 Reacção em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction- PCR)	20
3.9 Electroforese e recuperação de DNA de géis de agarose	21
3.10 Clonagem do gene amplificado em pMOS e em pET21a	22
3.11 Preparação de DNA plasmídico de elevado grau de pureza	23
3.12 Preparação de células competentes	24
3.13 Transformação de células competentes	25
3.14 Avaliação da capacidade das estirpes de <i>E. coli</i> para expressar xilanases recombinantes	25
3.15 Cromatografia por Afinidade	26
3.16 Análise de proteínas por SDS-PAGE	26
3.17 Avaliação da actividade xilanásica	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Clonagem de um gene codificador de uma xilanase num vector de expressão pET	29
4.2 Produção e hiper-expressão de uma xilanase recombinante em <i>Escherichia coli</i>	32
4.3 Purificação da xilanase recombinante e confirmação da sua actividade xilanásica	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
AGRADECIMENTOS	44

ANEXO A

ANEXO B

RESUMO

Neste trabalho utilizou-se a tecnologia de DNA recombinante para amplificar um gene codificador de uma xilanase do *Clostridium thermocellum*, a partir de DNA genómico isolado da bactéria, usando a tecnologia da reacção em cadeia da polimerase (PCR). O gene foi clonado num vector de expressão procariótica da série pET (Novagen) e sequenciado para confirmar a ausência de mutações, potencialmente acumuladas durante a amplificação. Os plasmídeos recombinantes produzidos neste trabalho foram utilizados para transformar células de *Escherichia coli* das estirpes BL21, BL21 plys, Tuner e Origami. As estirpes geradas produziram quantidades significativas da enzima recombinante que foi purificada dos extractos proteicos solúveis por cromatografia de afinidade. Resultados preliminares aqui apresentados mostram que a enzima recombinante produzida apresenta actividade endo-xilanásica.

Palavras-chave: Parede celular vegetal, Xilano, Xilanase, *Clostridium thermocellum*