

UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

Relatório de Estágio da Licenciatura em Bioquímica

PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA SALIVAR HUMANA
EM *NICOTIANA TABACUM* E EM *ARABIDOPSIS*
THALIANA

Tiago Miguel Martins Vieira

2009

Produção de uma proteína salivar humana em *Nicotiana tabacum* e em *Arabidopsis thaliana*.

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Luís Gustavo Pereira, no Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao professor Luís Gustavo Pereira por ter proposto este estágio tão interessante e por todo o apoio que me deu. O estágio foi muito importante para mim e fez-me decidir apostar na área de botânica nos meus estudos vindouros.

Gostava de salientar o apoio da Ana Barata ao longo do desenrolar do trabalho. A sua ajuda inicial foi indispensável para o decorrer do projecto.

Ao Mário Costa, Marta Mendes, Ana Marta um sentido muito obrigado! A sua companhia foi fantástica e o apoio fundamental. Em particular gostava de agradecer ao João Pedro Pinto, pela preciosa ajuda e pela sua enorme paciência.

Gostava também de estender os meus agradecimentos à Diana Soares da Costa, Cláudia Pereira que se dispuseram a ajudar sempre que necessário e que forneceram material essencial.

Finalmente, o apoio dos meus pais e irmão foi, como sempre, muito importante a todos os níveis.

1	Introdução.....	6
1.1	Taninos.....	6
1.2	Proteínas salivares	7
1.3	Interação entre taninos e bPRPs	8
1.4	Produção de proteínas heterólogas em plantas.....	8
1.4.1	Peptídeo-sinal de endereçamento vacuolar.....	10
1.5	Transformação de plantas mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
1.6	Objectivos do presente trabalho	11
2	Materiais e métodos	15
2.1	Extracção e purificação de plasmídeos.....	15
2.2	Extracção e purificação do DNA plasmídico para sequenciação.....	15
2.3	Amplificação e isolamento de um produto de PCR para sequenciação	16
2.4	Transformação de <i>E. coli</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
2.5	Rastreio de colónias transformantes por PCR	17
2.6	Infiltração de <i>Agrobacterium</i> em <i>Nicotiana tabacum</i>	17
2.7	Extracção de proteínas a partir de folhas de <i>Nicotiana tabacum</i>	17
2.8	Separação electroforética de proteínas em gel de poliacrilamida, com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	18
2.9	Electro-transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose	18
2.10	Imunodeteção em membrana de nitrocelulose.....	19
2.11	Sementeira e condições de crescimento	20
3	Resultados e Discussão	21
3.1	Transformação de <i>E. coli</i> e rastreio de colónias transformantes	21
3.2	Desenho de primers para sequenciação.....	22
3.3	Transformação de <i>Agrobacterium</i> e rastreio de colónias	24
3.4	Infiltração de <i>Nicotiana tabacum</i> e Western blot	25
3.5	Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
4	Considerações finais	28
5	Referências Bibliográficas	29

Sumário

Os taninos, nas plantas, funcionam como um mecanismo de defesa contra agressores por causa do seu sabor amargo e da sensação de adstringência que provocam. Esta última é provocada pela interacção entre os taninos e as proteínas básicas ricas em prolina (bPRPs) presentes na saliva de diferentes mamíferos.

Para poder estudar esta interacção *in vitro* é preciso possuir uma grande quantidade de proteína. A concentração de bPRPs na saliva é em regra extremamente baixa e de difícil isolamento. A expressão de proteínas heterólogas em plantas surge como uma solução para esta necessidade.

Este trabalho teve então como objectivo induzir a expressão da uma bPRP (o péptido IB6) num sistema vegetal. Para tal uma construção de DNA contendo a sequência pretendida foi inserida no vector pVKH18En6 e feita a transformação transiente de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Em paralelo enveredou-se também pela criação de linhas transgénicas estáveis de *Arabidopsis thaliana*.

1 Introdução

1.1 Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos presentes em vários produtos de origem vegetal. De uma forma geral, os taninos podem ser divididos em duas classes distintas: os taninos condensados (ou proantocianidinas) e os taninos hidrolisáveis. Os primeiros existem sobre a forma de oligómeros (solúveis), com vários monómeros de catequina, ou sobre a forma de polímeros (insolúveis). Os taninos sobre a acção de ácidos fortes dão origem a antocianidinas e é daí que provém o seu nome. No caso dos taninos hidrolisáveis a sua estrutura engloba normalmente um poliálcool a qual se ligam várias unidades de ácido gálico (1) (2) (3).

Os taninos, nas plantas, funcionam como um mecanismo de defesa contra agressores por causa do seu sabor amargo e da sensação de adstringência que provocam. Ao mesmo tempo conhecem-se os seus efeitos negativos no crescimento e metabolismo dos animais através da redução de digestibilidade, danos na mucosa gastrointestinal e à perda de azoto. A hidrólise dos taninos pode por sua vez levar à formação de ácido que, uma vez absorvido pelo intestino, pode ter efeitos tóxicos graves (3) (4).

Por outro lado estudos recentes demonstraram a sua capacidade antioxidante e antibacteriana *in vivo*. As suas propriedades quelantes já eram reconhecidas. Os taninos promovem também o aparecimento de ligações cruzadas entre as fibras de colagénio e são, por isso, usados no processamento de peles e no fabrico de couro (2) (5) (6).

No entanto a propriedade mais relevante para este trabalho é a capacidade dos taninos precipitarem certas proteínas nomeadamente as proteínas salivares. Esta interacção leva a uma diminuição da viscosidade e a um aumento da fricção diminuindo a capacidade lubrificante da saliva e provocando a sensação de adstringência mencionada anteriormente. No fabrico de vinhos, com especial atenção para o vinho tinto, é, então, importante ter em conta a quantidade de polifenóis presentes para produzir um produto com boa qualidade (7) (8).

1.2 Proteínas salivares

A saliva é um componente essencial não só para a digestão e limpeza do tracto digestivo mas também para a fala e para a resposta imunitária. A maior parte da saliva encontrada na boca (90%) é produzida pelos três pares de glândulas: sublingual, submandibular e parótida. Por sua vez, na saliva encontramos apenas 1% de sais e proteínas sendo os restantes 99% água (9).

A saliva contém uma mistura complexa de proteínas que varia de espécie para espécie. Existem vários tipos de proteínas salivares das quais se distinguem a família das Proteínas Ricas em Prolina (PRP) e as histatinas pela sua capacidade de se ligarem aos taninos. As PRPs, como o nome indica, contêm níveis elevados de prolina (35 a 40%) e constituem 70% das proteínas salivares produzidas pela parótida. A amilase, juntamente com outras proteínas minoritárias como a lisozima e a lactoferrina, constitui os restantes 30% (3) (10) (11).

Para além de uma grande quantidade de prolina, as PRP's demonstram também uma grande predominância dos aminoácidos glicina, glutamina e ácido glutâmico. Esta família de proteínas é codificada por 6 genes que, depois de transcritos e processados, dão origem a mais de 20 PRP's diferentes que apresentam em comum um péptido sinal, uma zona de transcrição, uma região de repetição e uma região C-terminal (4) (12).

As proteínas ricas em prolina dividem-se em 3 classes: ácidas, básicas e glicosiladas. As proteínas ácidas são segregadas por todas as glândulas salivares e ligam-se fortemente a Ca^{2+} inibindo o crescimento de cristais. Por sua vez, as proteínas glicosiladas estão envolvidas na lubrificação oral e ligam-se a certas bactérias. Por fim, e com maior relevância para este trabalho, temos as proteínas básicas ricas em prolina (bPRPs) que têm uma importante função no que toca à neutralização dos taninos. Julga-se ainda que estas proteínas bPRPs têm uma função defensiva mais geral que as restantes porque estão presentes noutras secreções como o muco nasal e bronquial (3) (4) (12) (13).

Neste trabalho vamos nos centrar numa bPRP que pode ser usada como uma representante desta família, a IB6. É, portanto, necessário compreender melhor como é que este tipo de proteínas interage com os taninos.

1.3 Interação entre taninos e bPRPs

Poder-se-ia pensar que a grande quantidade de prolina encontrada neste tipo de proteínas seria prejudicial à estrutura secundária e terciária da mesma e que, por isso, a sua função seria igualmente prejudicada. No entanto há estudos provaram exactamente o contrário. O facto de estas proteínas não terem uma estrutura definida e possuírem resíduos de prolina ajuda-as a interagirem mais fortemente com um grande número de taninos. A interacção entre estes taninos e as bPRPs é normalmente feita através de pontes de hidrogénio ou de reacções hidrofóbicas em que moléculas de taninos se vão acumulando à superfície dos péptidos estabelecendo depois ligações cruzadas entre si que levam à precipitação das proteínas (3) (14).

As diferenças de tamanho e complexidade envolvidas nestas interacções foram estudadas por Anders Bennick em 2002 que demonstrou que maiores taninos precipitam mais fortemente as bPRPs e que o tamanho do péptido tem igualmente importância na força da interacção. Um estudo semelhante do mesmo autor quatro anos antes demonstrava que as proteínas ricas em prolina glicosiladas possuíam igualmente a capacidade de interagir com taninos após eliminação dos açúcares por acção enzimática (15).

1.4 Produção de proteínas heterólogas em plantas

Cada vez mais as plantas oferecem uma alternativa para a cultura de células animais e microbianas na produção de proteínas recombinantes. A produção destas proteínas em plantas demonstrou ser não só mais segura que os sistemas animais ou bacterianos mas também, na maioria dos casos, ser mais económica e reprodutível. Para além disso, esta técnica permite reproduzir modificações pós-traducionais, como a glicosilação, que, de outra forma, não poderiam ser atingidas num sistema procariótico (16).

Por outro lado os outros sistemas têm falhas importantes no que toca ao processamento da estrutura terciária de proteínas como, por exemplo, a hiperglicosilação pelas leveduras. Ao mesmo tempo, o alto preço e o risco de contaminação de células animais torna as, em certos casos, uma opção menos viável (16) (17).

Há, no entanto, que considerar diferenças fundamentais nos mecanismos de produção de proteínas entre animais e plantas. Embora a produção de anticorpos tenha sido em vários casos bem sucedida, sem aparentes sinais de uma resposta imune por parte do receptor, é importante considerar que certas modificações pós-traducionais, como a glicosilação, ocorrem de forma diferente nos dois casos (18).

Embora o mecanismo envolvido na síntese de proteínas em animais e plantas seja idêntico, existem algumas diferenças nos seus padrões de glicosilação. Através de experiências noutros sistemas de produção foi demonstrado que pequenas mudanças na estrutura dos glicanos podem alterar a sua distribuição, activação e longevidade quando comparadas com as proteínas originais e dar origem a problemas imunogénicos quando administradas a seres humanos (19). Ainda que, em certos casos, não se observem respostas imunes a anticorpos, tem-se vindo a efectuar a transferência de enzimas humanas que efectuam estas modificações ou a provocar a sua expressão em plantas de forma a contornar possíveis problemas (17) (20).

Para aumentar a expressão e obtenção de proteína produzida é preciso ter em conta certos factores. Ainda que as proteases tenham um papel fundamental na construção das proteína, no que toca à produção de proteínas recombinantes podem ter efeitos indesejados. A presença destas enzimas pode comprometer a estabilidade e integridade da proteína pelo que em muitos casos é necessário incluir sinais de endereçamento das proteínas para compartimentos celulares, como os cloroplastos e retículo endoplasmático, onde a actividade das proteases é menos significativa (17).

Há também que considerar que, embora diferentes codões possam exprimir o mesmo aminoácido, a abundância relativa dos respectivos RNAs de transferência em diferentes espécies é diferente, e conseqüentemente pode haver necessidade de adaptar uma determinada sequência de DNA à espécie a que se destina. É importante então compreender as especificidades da síntese proteica de cada espécie em particular para otimizar os processos de tradução heterólogos. Através de uma construção genética cuidada a velocidade e fidelidade da síntese de uma proteína pode aumentar significativamente (17).

1.4.1 Peptídeo-sinal de endereçamento vacuolar

Uma única célula vegetal pode conter pelo menos dois tipos de vacúolos funcional e estruturalmente diferentes: os vacúolos líticos e os vacúolos de armazenamento. Os dois tipos de vacúolos encontram-se separados fisicamente para evitar a exposição das proteínas armazenadas ao ambiente acidificado e com enzimas hidrolíticas activas que as poderiam degradar (21).

Até à data vários estudos demonstraram a presença de sinais específicos de endereçamento para os diferentes tipos de vacúolos. A quitinase A (classe I) possui uma extensão localizada na respectiva região C-terminal (ct-VSD) com capacidade de direccionar as proteínas para vacúolos de armazenamento. Esta mesma sequência mostrou ser suficiente para endereçar outras proteínas para estes vacúolos específicos e foi escolhida por isso para o nosso trabalho (22).

1.5 Transformação de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria de solo, patogénica para uma grande variedade de dicotiledóneas que causa a formação de tumores e calos no local de infecção. Como parte deste sofisticado parasitismo a bactéria transfere uma porção do seu DNA (T-DNA) para o genoma da planta infectada. Todos os mecanismos necessários para esta transferência de T-DNA residem no seu plasmídeo Ti (23).

A transformação de sistemas mediada por *Agrobacterium* aproveita-se deste mecanismo natural de transformação da planta. A remoção de genes dentro do T-DNA não inibe a capacidade da transferência do DNA por parte da bactéria mas previne a formação de tumores (23).

A transformação genética de plantas ocorre espontaneamente na natureza e desde meados dos anos 70 que é usada em investigação científica para introduzir, de forma controlada, genes específicos em plantas (24).

A tecnologia de transformação de plantas oferece um grande leque de oportunidades para a investigação científica e modificação de alimentos e culturas. Plantas transgénicas são normalmente produzidas por meios complexos que requerem a preparação cuidadosa de células ou tecidos vegetais, a introdução de DNA por *Agrobacterium tumefaciens* ou bombardeamento de partículas, selecção de linhas celulares transformadas e regeneração de plantas.

Estes métodos de transformação requerem no entanto tempo, mão-de-obra qualificada e instalações laboratoriais relativamente dispendiosas (25).

Por outro lado o método de infiltração de *Agrobacterium* por vácuo é relativamente simples de utilizar em *Arabidopsis thaliana*. Na sua forma original o método envolvia o crescimento de *Arabidopsis* até à floração, aplicação de *Agrobacterium* à planta através de infiltração por vácuo, replantação, recolha de sementes umas semanas mais tarde e identificação da descendência transformada por um meio selectivo contendo antibiótico ou herbicida (25).

Esta infiltração é usada para introduzir a bactéria nos espaços intercelulares dos tecidos mas alternativamente pode-se simplesmente submergir as partes aéreas da planta numa solução de *Agrobacterium* por uns segundos, sem o uso de vácuo (flower dipping). Em (26) os autores mostraram que esta mudança não comprometia a eficácia da transformação (25).

A transformação transiente em plantas tem várias vantagens comparativamente ao uso de plantas transgénicas estavelmente transformadas e é especialmente útil para verificar a função e estabilidade de um produto antes de proceder a uma produção em larga escala. A criação de linhas estavelmente transformadas requer um investimento considerável de tempo até que as proteínas possam ser analisadas. Pelo contrário, a expressão transiente é um sistema muito mais rápido e flexível (26).

No geral este método é usado para testar a expressão e funcionalidade de proteínas recombinantes antes de produzir linhas geneticamente estáveis de plantas transformadas (26).

1.6 Objectivos do presente trabalho

Anteriormente tinha sido feita, no grupo de investigação, uma análise de sequências de diferentes bPRPs com dados retirados da “Universal Protein Resource” com o objectivo de encontrar um péptido representativo desta família. Foi verificada a existência de uma elevada homologia entre quatro péptidos precursores analisados (bPRP1,2,3 e 4).

O mesmo grupo concebeu e sintetizou a construção de DNA utilizada neste trabalho. O péptido escolhido foi o péptido IB-6 já que é conhecida a sua

capacidade de precipitar polifenóis e foi verificada a sua presença na saliva de alguns indivíduos. A construção do plasmídeo teve de ter em conta vários factores já discutidos na introdução deste relatório como por exemplo o endereçamento de proteínas para compartimentos sub-celulares. De facto a estrutura genética idealizada possui dois sinais de endereçamento independentes.

O primeiro, retirado do segmento N-terminal duma quitinase básica de tabaco, foi adicionado para o endereçamento da proteína para o retículo plasmático onde se dão processos de glicosilação. Este sinal vem substituir os possíveis sinais de endereçamento naturais da proteína cuja funcionalidade nas plantas não é garantida.

O segundo sinal faz parte da sequência C-terminal da quitinase A (GLLVDTM) de tabaco e funciona como sinal de endereçamento de proteínas para vacúolos neutros onde a proteína se pode manter protegida da actividade de proteases e outros agressores. Ao mesmo tempo o armazenamento da proteína neste tipo de compartimentos poderá ter um efeito positivo na quantidade da proteína produzida e facilitar a sua purificação.

De forma a poder testar o efeito da presença destes sinais na quantidade e integridade do produto final obtido inseriram-se locais de restrição à sua volta que permitem a sua remoção. Ao mesmo tempo estes locais de restrição permitem também a troca do sinal de endereçamento para os vacúolos por outros que se venham a querer testar. Para facilitar a purificação da proteína adicionou-se uma sequência codificante para uma cauda de histidinas que, através de uma técnica de cromatografia em coluna de afinidade, pode ser usada para separar a proteína do resto do conteúdo celular. No entanto este segmento de histidinas pode interferir com a estrutura tridimensional da proteína ou com a sua função e portanto foi também adicionado um local de clivagem da trombina de forma a poder separar os dois componentes (Figura 1), (27).

Este trabalho tem como objectivo último a produção do péptido IB6 (uma bPRP) num sistema heterólogo (*N. tabacum*).

Os objectivos imediatos a que nos propusemos foram:

1. A confirmação que a sequência da construção de DNA contendo o péptido IB6 estava correcta, e correctamente inserida, no vector de expressão.
2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o vector de expressão.
3. Transformação transiente de *N. tabacum* com a sequência do péptido IB6.
4. Produção de uma linha transgénica de *Arabidopsis thaliana*, geneticamente estável, que expressasse o péptido IB6.

2 Materiais e métodos

2.1 Extracção e purificação de plasmídeos

Para a extracção e purificação de plasmídeos em culturas de *E. coli* em meio líquido usou-se “GenElute™ Plasmid miniprep kit” segundo o método sugerido nesses mesmos kits.

No caso de culturas de *Agrobacterium*, procedeu-se à incubação *overnight* em meio líquido com canamicina (25 µg mL⁻¹) a 28 °C com agitação constante. De seguida centrifugou-se 3 ml de cultura e ressuspendeu-se em 200 µL de solução 1 (50 mM glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA) e 10 µL de lisozima (10 mg mL⁻¹). Depois de 10 minutos em gelo foram adicionados 400 µL de solução de lise (0,2 M NaOH, 1 % SDS) e deixou-se no gelo por mais 10 min. De seguida foram adicionados 300 µL de solução de neutralização [3 M KCH₃COO, pH 4,8]. Inverteu-se o tubo gentilmente e colocou-se no gelo por 5 a 10 minutos. Centrifugou-se a 8 °C à velocidade máxima por 20 min. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 0,7 volumes de isopropanol. Voltou-se a centrifugar à velocidade máxima por 30 minutos, a 8 °C. Lavou-se o sedimento com etanol, deixou-se secar e ressuspendeu-se o sedimento em 20 µL de água estéril.

2.2 Extracção e purificação do DNA plasmídico para sequenciação

Uma vez que pelos métodos anteriores não resultava uma quantidade óptima de DNA para sequenciação teve de se optar por um outro método. Partindo de uma cultura líquida de *E. coli* em meio LB com canamicina (25 µg mL⁻¹) procedeu-se ao seguinte protocolo. Centrifugou-se 3 ml de cultura e ressuspendeu-se em 110 µL solução 1 (50 mM glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA) com agitação vigorosa de forma a tornar a solução o mais homogénea possível. De seguida foram adicionados 220 µL de solução II (0.2N NaOH, 1% SDS) e incubada a mistura em gelo durante um minuto. Adicionaram-se 165 µL de solução III (60 ml de Acetato de potássio (5M), 11.5 ml de ácido acético glacial e 28.5 ml de H₂O para um total de 100ml de solução), vortexou-se por 10 segundos e incubou-se a mistura em gelo por 5 minutos. De seguida procedeu-se à centrifugação da amostra à velocidade máxima durante 5 minutos e a 8 °C.

Adicionou-se então 1 ml de etanol ao sobrenadante resultante num novo tubo, inverteu-se várias vezes para misturar e incubou-se em gelo mais 5 minutos. Esta nova amostra foi centrifugada mais uma vez nas mesmas condições. De seguida ressuspendeu-se em 50 µL TE (10 mM Tris HCL, pH 8 e 1 mM EDTA) contendo Rnase, com agitação constante, e incubou-se a amostra durante 5 minutos a 42 °C. A quantificação de DNA foi efectuada através do Fluorómetro Qubit™ seguindo as instruções por ele fornecidas.

2.3 Amplificação e isolamento de um produto de PCR para sequenciação

A obtenção do segmento de DNA de cerca de 600 pares de bases foi feita através de uma reacção de PCR, na qual se utilizaram os seguintes *primers*: 35S *Fw* (5'-CAACCACGTCTTCAAAGCAA-3') específico para a região promotora e IB6 *rev* (5'-AGCTTGTGGTTGCTGAGGAT-3') específico para a sequência codificante IB6. Seguiu-se o seguinte programa: 95 °C/2min, [95 °C/15 s, 56 °C/30 s, 72 °C/30 s]_{x30}, 72 °C/5 min, 8 °C/∞. A banda correspondente foi retirada do gel e purificada pelo kit "Gen Elute™ Gel Extraction Kit" seguindo as instruções sugeridas.

2.4 Transformação de *E. coli* e *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformar *E. coli* DH5α misturam-se 200 µL de células competentes com 10 µL de plasmídeo de interesse. Depois de 15 min no gelo foram incubadas 1 minuto e meio a 42 °C sendo de seguida adicionados 300 µL de LB. As bactérias foram então deixadas a incubar com agitação durante 30 minutos a 37 °C. Plaquearam-se as culturas de células em meio LB sólido com canamicina (25 µg mL⁻¹) e foram deixadas a incubar numa estufa a 37 °C *overnight*.

Para a *Agrobacterium* utilizou-se a técnica de electroporação seguindo o seguinte protocolo. Juntaram-se 50 µL de células electrocompetentes com 10 µL de miniprep do vector numa *cuvete* de electroporação, pré-lavada e arrefecida em gelo, de forma a realizar a transformação de *Agrobacterium*. Electroporou-se a mistura das células com o vector a 2,5 kV, 4,5 ms cada pulso. Adicionou-se 1 ml de meio LB e incubou-se cada amostra a 28 °C por 4 horas depois das quais se laqueou a cultura de células em meio LB, 25 µg mL⁻¹ de canamicina.

2.5 Rastreamento de colónias transformantes por PCR

Para testar a presença do plasmídeo pVKH18En6-IB-6 nas colónias retiraram-se com um palito esterilizado algumas células de diferentes colónias e procedeu-se à reacção de PCR. No caso de bactérias em meio líquido retirou-se 20 µL da solução. A reacção de PCR seguiu os procedimentos normais e usaram-se os primers IB6 Fwd (5'-CTCCTCCTCCTCCTGGAAAG-3') e IB6 rev (5'-AGCTTGTTGGTTGCTGAGGAT-3'). Seguiu-se o seguinte programa: 95 °C/2min, [95 °C/15 s, 55 °C/20 s, 72 °C/30 s] \times_{30} , 72 °C/5 min, 8 °C/∞. Os produtos daí resultantes foram corridos em gel de agarose 1% para se observar bandas na ordem dos 227 bp caso se verificasse a presença do plasmídeo.

2.6 Infiltração de *Agrobacterium* em *Nicotiana tabacum*

Centrifugou-se, à velocidade máxima, 1 ml de meio de cultura líquido de *Agrobacterium*, durante 1 min e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de tampão de infiltração (10x = 0.1066 g/ml de MES, 0.05 g/ml de glucose, 0.001 g/ml de Na₂PO₄.12H₂O, pH 5,6). Centrifugou-se de novo, à velocidade máxima, durante 1 min e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de tampão de infiltração, com acetosiringona (100 µM). Procedeu-se a uma outra centrifugação à velocidade máxima, durante 1 min e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de tampão de infiltração, com acetosiringona. As células foram então diluídas numa proporção 1:5 em tampão de infiltração, com acetosiringona, para um volume final de 1 ml. Realizou-se a infiltração e a planta foi colocada a 22 °C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz e uma humidade de 50-60% durante 2 dias. A infiltração foi feita em várias secções de uma só folha.

2.7 Extracção de proteínas a partir de folhas de *Nicotiana tabacum*

As zonas infiltradas foram recolhidas, pesadas e transferidas para um microtubo de 1,5 ml. De forma a produzir uma mistura homogénea foram adicionados dois volumes de tampão de extracção de proteínas e um pouco de areia de quartzo para facilitar a trituração. De seguida a mistura foi vortexada durante alguns segundos e aquecida a 95 °C durante 10 minutos. Posteriormente centrifugou-se à velocidade máxima durante 30 minutos, a 8 °C. O sobrenadante

resultante foi transferido para um novo microtubo e diluído numa proporção de 1:4 em tampão de amostra.

2.8 Separação electroforética de proteínas em gel de poliacrilamida, com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Após montar o sistema de electroforese, preparou-se o gel separador (4,18 ml de água, 3,12 ml de acrilamida/bis 40%, 2,5 ml de Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 100 µl de SDS 10%, 100 µl de APS 10% e 9 µl de TEMED). De seguida carregou-se o gel separador, até à distância de 1 cm do fundo dos poços, e foram adicionados 500 µl de etanol, tendo o cuidado de evitar que se misturasse com o gel, para acelerar a polimerização e criar um meio anóxico na superfície. Deixou-se o gel polimerizar, durante 30 – 45 min, e lavou-se a sua superfície com água destilada para eliminar qualquer vestígio de etanol. De seguida preparou-se o gel concentrador (2,2 ml de água, 371 µl de acrilamida/bis 40%, 375 µl de Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 1,5 µl de vermelho fenol, 30 µl de SDS 10%, 30 µl de APS 10% e 9 µl de TEMED). Logo após a sua aplicação foi introduzido um pente e deixou-se polimerizar durante 10 – 15 min. Ao mesmo tempo preparou-se o tampão de corrida 1x (10x = 15 g/l de tris, 72 g/l de glicina, 5 g/l de SDS, pH 8,3) e as amostras que vão ser carregadas no gel, às quais se adicionou previamente tampão de amostra, na proporção de 1 volume de amostra para 4 volumes de tampão. Estas devem ser preparadas, aquecendo-as a 50 – 60 °C, durante 5 min. Depois de concluída a polimerização do gel concentrador, retirou-se o pente e lavaram-se os poços com água destilada para remover os vestígios de gel. Depois de carregado o marcador de peso molecular e as amostras nos respectivos poços aplicou-se uma corrente de 30 mA. Foram testados diferentes volumes de amostra (15 a 30 µL) e utilizado um controlo positivo Multiple Tag Cell Lysate.

2.9 Electro-transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose

Enquanto decorria a separação electroforética de proteínas foi preparado tampão de transferência (200 ml de metanol, 3 g de tris, 14,4 g de glicina, água até perfazer 1000 ml). Quando esta terminou separaram-se os dois vidros, com auxílio de uma lâmina, e retirou-se o gel concentrador. De seguida o gel

separador foi mergulhado em tampão de transferência. Preparou-se então uma membrana de nitrocelulose da dimensão do gel e 2 bocados de papel de filtro do mesmo tamanho. O canto superior da membrana, que entrou em contacto com o gel, foi assinalado a lápis para efeitos de orientação futura. De seguida a membrana sofreu duas lavagens. A primeira em água, durante 5 min, e depois em tampão de transferência, durante outros 5 min. Num tabuleiro contendo tampão de transferência, e tendo o cuidado para não se formarem bolhas de ar entre o gel e a membrana, foi montada a cassette de transferência, obedecendo à seguinte ordem: lado vermelho da cassette de transferência, esponja, papel de filtro, membrana de nitrocelulose, gel, papel de filtro, esponja, lado preto da cassette de transferência. Ao colocar a cassette na tina de transferência, convém assegurar que a membrana fica voltada para o ânodo (pólo positivo) e o gel para o cátodo (pólo negativo). Antes de se iniciar a corrida, adicionaram-se 3 ml de SDS 10% ao tampão de transferência. Foi usada uma corrente de 75 mA, durante apenas 30 minutos (devido ao pequeno tamanho da proteína), à temperatura ambiente e com agitação constante.

2.10 Imunodeteccção em membrana de nitrocelulose

Todas as incubações e lavagens a que a membrana de nitrocelulose foi submetida foram efectuadas com agitação suave. É também importante impedir que a membrana seque.

Começou-se por lavar a membrana em PBS (10x = 80 g/l de NaCl, 2 g/l de KCl, 14,4 g/l de Na_2HPO_4 , 2,4 g/l de KH_2PO_4 , pH 7,4). A membrana foi então deixada a incubar em tampão de bloqueio (TPBS e leite em pó 5%), durante 1 hora. De seguida incubou-se a membrana em solução de anticorpo primário (anticorpo primário numa relação 1:1000 com TPBS e leite em pó 5%) e deixou-se em agitação durante a noite. Lavou-se depois a membrana em TPBS (Tween 20 0,05% em PBS), duas vezes, durante 15 min.

A membrana foi incubada novamente desta vez com uma solução de anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se a membrana em TPBS duas vezes durante 15 minutos e outras duas vezes em PBS durante 15 minutos. Adicionou-se por fim a solução de revelação (50 mg de DAB em 100 ml de PBS e 33 μl de H_2O_2 30%) e deixou-se reagir no escuro durante alguns minutos. Depois de se verificar o aparecimento das bandas

passou-se a membrana por água para parar a revelação e fotografou-se o resultado.

2.11 Sementeira e condições de crescimento

As sementes foram desinfectadas em etanol 70%, e vortexadas durante 3 minutos. De seguida foram transferidas para discos de papel de filtro esterilizados, no interior de uma câmara de fluxo laminar. Após evaporação total do etanol, as sementes foram transferidas para placas de Petri com meio MS, sem sacarose, e solidificado com agar a 0,7 %.

As placas, seladas com fita micropore, foram mantidas em obscuridade e a 4 °C durante 3 dias, após os quais foram transferidas para uma câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16 h, a 22 °C, com humidade relativa de 45 %, e uma qualidade de luz de 90-130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3 Resultados e Discussão

3.1 Transformação de *E. coli* e rastreio de colónias transformantes

Com o vector pVKH18En6-IB6 já construído foram então transformadas bactérias *E.coli* (estirpe DH5 α) competentes que depois de plaqueadas em meio LB com canamicina desenvolveram colónias. A presença de canamicina garante que só as bactérias transformadas sobrevivam já que teoricamente estas possuem o plasmídeo que lhes confere resistência ao antibiótico. Para verificar a presença do plasmídeo recombinante clonado, o DNA plasmídico foi extraído e analisado por PCR, usando primers (IB6-fw e IB6-rev) desenhados para flanquear uma secção específica do plasmídeo deve-se obter um amplificado de 227 bp.

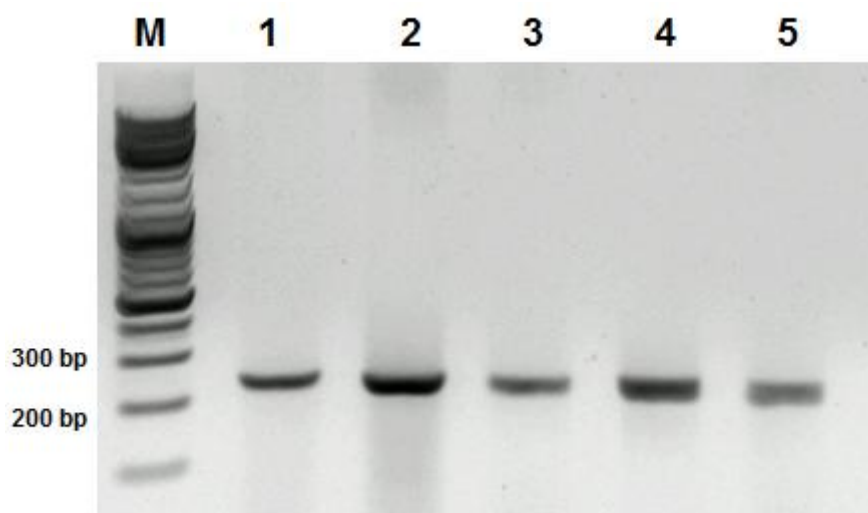


Figura 2. Electroforese em gel de agarose 1 %. Rastreio de colónias transformadas com pVKH18En6-IB-6 por PCR utilizando *primers* IB6 fw e IB6 rev que amplificam região do gene IB-6. M representa os marcadores de peso molecular e as restantes faixas correspondem às reacções de PCR. A banda apresentada indica a presença do constructo no vector.

De facto, pela análise da figura todas as colónias testadas mostram a presença do amplificado, daí poder-se concluir que foram transformadas com sucesso. A partir destas culturas de *E. coli* procedeu-se então aos passos necessários para a sequenciação do insert.

3.2 Desenho de primers para sequenciação

Para proceder à sequenciação de toda a extensão do insert foi necessário desenhar primers que englobassem a região. Uma vez que a sequenciação tende a ignorar os nucleótidos iniciais utilizou-se um primer que emparelhasse num segmento anterior ao início do insert (primer 35s fw) (fig. 3). De salientar que a sequência completa do vector não é conhecida.

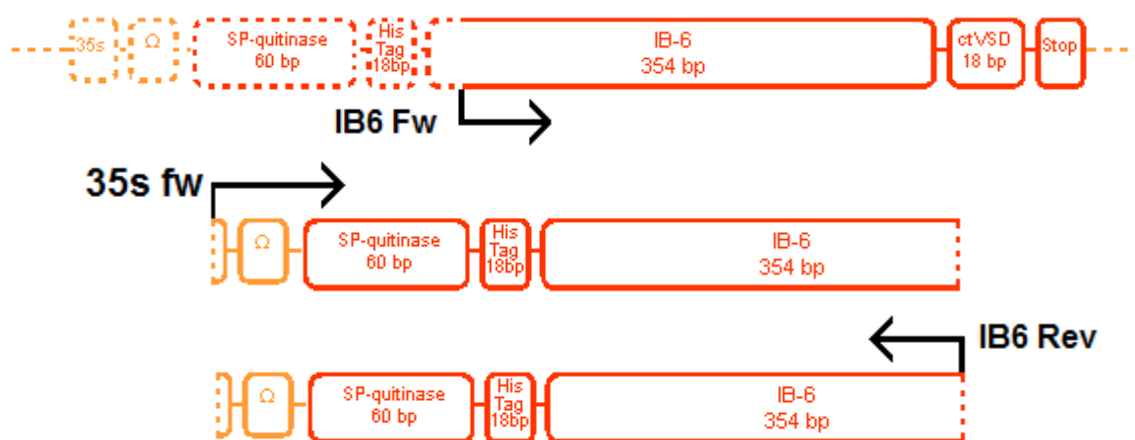


Figura 3. Primers usados para a sequenciação do construto de DNA contendo o péptido inserido em pVKH18En6.

Para analisar a sequência posterior ao insert usou-se o primer IB6-Fw já existente.

Ao analisar a especificidade dos primers por PCR verificou-se que, para o primer 35S-fw, havia a síntese de vários segmentos diferentes (fig. 4). Foi então necessário isolar a banda correspondente ao menor dos amplificados (fig. 5). Este segmento de cerca de 600 pares de bases (criado através de PCR com os primers 35S fw e IB6 rev) foi depois usado para a sequenciação (fig. 7).

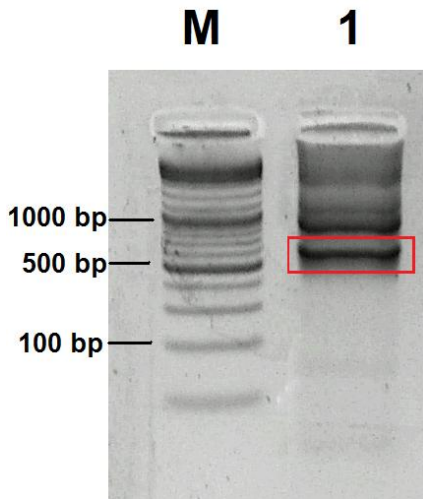


Figura 4. Electroforese em gel de agarose 1%. Teste da funcionalidade dos primers através de uma reacção de PCR. M representa o marcador de pesos molecular. A faixa 1 corresponde à reacção de PCR com os primers 35s fw e IB6 rev. A banda retirada apresenta-se rodeada a vermelho.

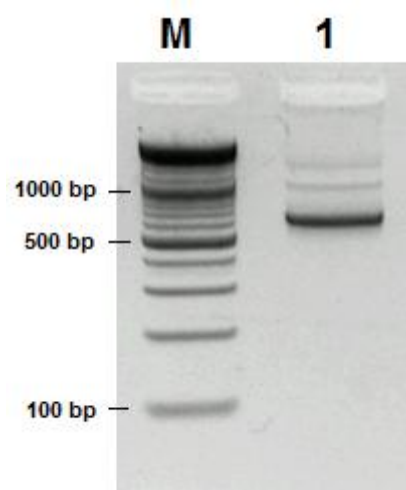


Figura 5. Resultado da purificação da banda retirada por electroforese em gel de agarose 1%. M representa o marcador de pesos molecular e 1 ao DNA extraído.

Já para a sequenciação da secção final foi usado o próprio plasmídeo juntamente com o primer IB6 fw (fig. 6). Os resultados obtidos corresponderam exactamente ao esperado.

```

gene      TCTAGAATGAAACAATTTGTTCCTTTTTCTTATTTTCTCACTTCTTCTTCAAGATCA 60
IB6_fw

gene      TCTGCTGCTAGCCATCATCATCATCATCATCAGGCTTGTTCCTAGGGTTCTGTG 120
IB6_fw

gene      GACTCACCCACGGAAGCCACAGGGTCCACCTCCACAGGTTGGAATCAACCTCAGGGT 180
IB6_fw

gene      CCTCCTCCTCCTCCTGGAAGCCTCAAGGACCCACTCCACAGGAGGAAATAAGCCTCAA 240
IB6_fw      -----AGCCTCAAGGACCACCTCCACAGGAGGAAATAAGCCTCAA 41
              *****

gene      GGACCACCCACTCCAGGAAGCCACAAGGTCCACAGCTCAAGGTGGATCAAATCTCAA 300
IB6_fw      GGACCACCCACTCCAGGAAGCCACAAGGTCCACAGCTCAAGGTGGATCAAATCTCAA 101
              *****

gene      TCTGCTAGGGTCCACAGGTAAGCCACAAGGACCCACACACAGAGGAAATAATCTCT 360
IB6_fw      TCTGCTAGGGTCCACAGGTAAGCCACAAGGACCCACACACAGAGGAAATAATCTCT 161
              *****

gene      CAAGGACCCACTCCTCCAGCTGTTGGAATCCTCAGCAACCACAGCTCCTCCAGCTGGT 420
IB6_fw      CAAGGACCCACTCCTCCAGCTGTTGGAATCCTCAGCAACCACAGCTCCTCCAGCTGGT 221
              *****

gene      CAACCTCAGGGACTCCAGACCCACCAAGGTGTTAGCCATCAAGGCTCCACAGAC 480
IB6_fw      CAACCTCAGGGACTCCAGACCCACCAAGGTGTTAGCCATCAAGGCTCCACAGAC 281
              *****

gene      GTCGTTTGTCTGTTACTATGTGAGAGCTC----- 510
IB6_fw      GTCGTTTGTCTGTTACTATGTGAGAGCTCGAATTCOCOGATCGTTCAAACATTTGCCA 341
              *****

gene      ----- 401
IB6_fw      ATAAAGTTTCTTARGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTCCGATGATTATCATATAATTTCT

gene      -----
IB6_fw      GTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCAAGCGTTAATTTAGAGATG 461

gene      -----
IB6_fw      GGTTTTTAT 470

```

Figura 6. Resultado das sequenciações do plasmídeo com o primer IB6 rev. A sequência de nome *gene* corresponde à sequência esperada. A azul encontra-se o codão de terminação, e a amarelo o primer IB6 rev. A sequência a vermelho corresponde a uma zona posterior à construção cuja sequência era, até agora, desconhecida.

```

35S_fw      -----
IB6_rev     GAGGTAGGGATGACGCAAGTACGTATTTTACACAAATTACCAACACACACACAAACA 60
gene       -----

35S_fw      -----AATCCCACATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGA 48
IB6_rev     ACACACACATTACATTTTAAATCCCACATCCTTNNCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGA 120
gene       -----

35S_fw      AGTTCATTTCAATCGGAGAGGTACGTATTTTACACAAATTACCAACACACACACAAAC 108
IB6_rev     AGTTCATTTCAATCGGAGAGGTACGTATTTTACACAAATTACCAACACACACACAAAC 180
gene       -----

35S_fw      AACACACACATTACATTTTACATTTACAACTACATCTAGAATCAAAACAAATTTGTTC 168
IB6_rev     AACACACACATTACATTTTAA--ATTCTACAACTACATCTAGAATCAAAACAAATTTGTTC 239
gene       -----TCTAGAATCAAAACAAATTTGTTC 25
              *****

35S_fw      TTTTCTTATTCTCAGTCTCTCTTTCAAGATCATCTGCTGCTAGCCATCATCATCATC 228
IB6_rev     TTTTCTTATTCTCAGTCTCTCTTTCAAGATCATCTGCTGCTAGCCATCATCATCATC 299
gene       TTTTCTTATTCTCAGTCTCTCTTTCAAGATCATCTGCTGCTAGCCATCATCATCATC 85
              *****

35S_fw      ATCAATTCATCAGGTCITGTTCTAGGGGTICTGTGACTCAACCAGGAAAGCCACAGG 288
IB6_rev     ATCAATTCATCAGGTCITGTTCTAGGGGTICTGTGACTCAACCAGGAAAGCCACAGG 359
gene       ATCAATTCATCAGGTCITGTTCTAGGGGTICTGTGACTCAACCAGGAAAGCCACAGG 145
              *****

35S_fw      GTCCACCTCCACAGGTTGAAATCAACCTCAGGTTCTCTCTCTCTCTGGAAGCCCTC 348
IB6_rev     GTCCACCTCCACAGGTTGAAATCAACCTCAGGTTCTCTCTCTCTCTGGAAGCCCTC 419
gene       GTCCACCTCCACAGGTTGAAATCAACCTCAGGTTCTCTCTCTCTCTGGAAGCCCTC 205
              *****

35S_fw      AAGGACCACTCCACAGGAGGAAATAAGCCTCAAGGACCAACCCTCCAGGAAGCCAC 408
IB6_rev     AAGGACCACTCCACAGGAGGAAATAAGCCTCAAGGACCAACCCTCCAGGAAGCCAC 479
gene       AAGGACCACTCCACAGGAGGAAATAAGCCTCAAGGACCAACCCTCCAGGAAGCCAC 265
              *****

35S_fw      AAGGTCACACGCTCAAGGTGGATCAAAATCTCAATCTGCTAGGCTCCACAGGTAAGC 468
IB6_rev     AAGGTCACACGCTCAAGGTGGATCAAAATCTCAATCTGCTAGGCTCCACAGGTAAGC 539
gene       AAGGTCACACGCTCAAGGTGGATCAAAATCTCAATCTGCTAGGCTCCACAGGTAAGC 325
              *****

35S_fw      CACAAGGACCAACACACAAAGGAAATAATCCTCAAGGACCAACCCTCCAGCTGGTG 528
IB6_rev     CACAAGGACCAACACACAAAGGAAATAATCCTCAAGGACCAACCCTCCAGCTGGTG 568
gene       CACAAGGACCAACACACAAAGGAAATAATCCTCAAGGACCAACCCTCCAGCTGGTG 385
              *****

35S_fw      GAAATCCTCAGCAACC----- 544
IB6_rev     GAAATCCTCAGCAACCACAGCTCTCCAGCTGGTCAACTCAGGGAOCTCCAGACCCAC 445
gene       -----

35S_fw      -----
IB6_rev     -----
gene       CACAAGGTGGTAGACCAICAAAGGCTCCACAAGAGTGGTTGCTTGTACTATGTGAG 505

35S_fw      -----
IB6_rev     -----
gene       AGCTC 510

```

Figura 7. Resultado das sequenciações do segmento de DNA de 600 bases com os primers 35S fw e IB6 rev respectivamente. A sequência de nome *gene* corresponde à sequência esperada. A azul encontra-se o codão de iniciação, a verde a cauda de histidinas, a roxo o primer IB6 fw. A sequência a vermelho corresponde a uma zona anterior à construção cuja sequência era, até agora, desconhecida.

3.3 Transformação de *Agrobacterium* e rastreio de colónias

O plasmídeo extraído no passo 3.2 foi então usado para transformar por electroporação uma estirpe GV3101::pMP90 de *Agrobacterium tumefaciens*. Como esperado quando plaqueadas em meio LB com canamicina desenvolveram colónias individuais visíveis. No entanto ao contrário da *E. coli* a *Agrobacterium* não permite uma extracção suficientemente pura para um rastreio directo por PCR. Assim o plasmídeo extraído da *Agrobacterium* teve de ser reintroduzido em *E. coli* (estirpe DH5 α) para se proceder ao rastreio da mesma forma que em 3.2.

Como se esperaria as colónias testadas possuíam a construção com o gene do péptido IB6 como se pode mais uma vez verificar pela figura 8.

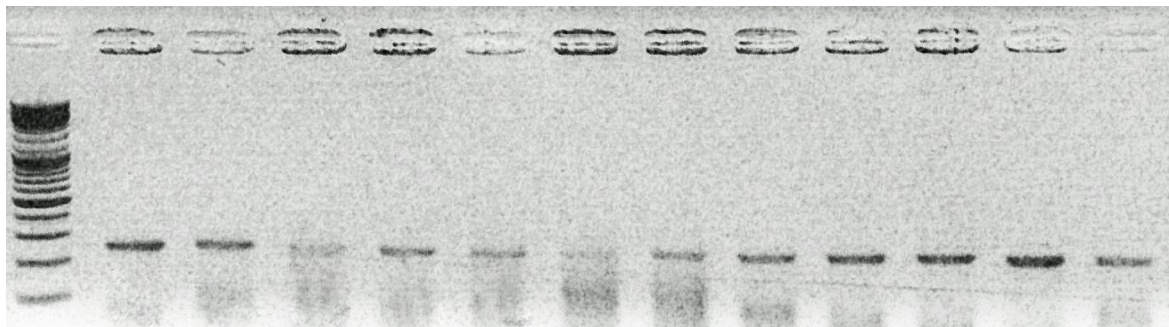


Figura 8. Resultado do produto de PCR, com os primers IB6 fw e IB6 rev, em electroforese para o rastreio de colónias de *E. coli* transformada com o plasmídeo extraído de *Agrobacterium*.

3.4 Infiltração de *Nicotiana tabacum* e Western blot

Células transformadas de *Agrobacterium* foram cultivadas em meio LB fresco com canamicina e posteriormente infiltradas numa única folha de *Nicotiana tabacum*. A planta foi deixada numa câmara de crescimento a 20 °C durante aproximadamente 2 dias. As zonas infiltradas foram então recolhidas, homogeneizadas e procedeu-se à extracção de proteínas.

O passo seguinte consistiu na separação electroforética das proteínas em Gel de poliacrilamida com SDS. As várias pistas continham o marcador de peso molecular, volumes diferentes de solução de proteínas e uma última com um controlo positivo para uma proteína com uma *Tag* de 6 histidinas. Depois de corridas todas as amostras fez-se a electrotransferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose tendo o principal cuidado de reduzir o tempo de electroforese já que a proteína pretendida tem um tamanho muito reduzido (≈ 16 kda) e poderia não ficar retida na membrana. Depois da transferência procedeu-se então à incubação com os anticorpos primário e secundário de forma a revelar a presença da proteína. No entanto como se vê na figura 9 não se verificou a presença da banda correspondente à proteína que deveria ter sido expressa.



Figura 9. Membrana de nitrocelulose. As duas pistas visíveis correspondem respectivamente ao marcador de pesos molecular e ao Multiple Tag Cell Lysate, utilizado como controlo positivo. Não se verificou a presença de bandas nos poços com amostras.

Embora não se tenha observado bandas na membrana isso não significa que a proteína não tenha sido expressa. O pequeno tamanho da proteína ($\approx 16\text{kda}$) levanta alguns problemas quanto à sua fixação na membrana. Por outro lado a corrida em gel de SDS-PAGE poderá ter sido demasiado prolongada deixando assim sair a proteína do gel. Por falta de tempo e material não foi possível repetir a experiência. Seria interessante tomar em conta a espessura da membrana de nitrocelulose utilizada assim como o tempo de corrida em gel. É claro que o problema pode ser outro, nomeadamente não podemos descartar a possibilidade de ter havido algum problema na própria transformação da planta por *Agrobacterium*.

3.5 Transformação de *Arabidopsis thaliana*

Em paralelo com a experiência de transformação transiente em *Nicotiana tabacum* procedeu-se também à obtenção de linhas transformadas de *Arabidopsis thaliana* por transformação estável. A cultura de *Agrobacterium* transformada com o plasmídeo pVKH18En6-IB-6 foi renovada para um meio fresco e procedeu-se a infiltração de *Arabidopsis* por mergulho directo na solução. No presente as sementes foram já recolhidas e plaqueadas em meio MS com Higromicina. Se a transformação tiver sido bem sucedida o gene de resistência incluído no plasmídeo inserido vai fazer com que o crescimento destas plantas seja favorecido neste meio. Será então necessário proceder a uma nova extracção de

proteínas destas novas plantas e testar a presença da IB6 através de Western blot ou ELISA.

4 Considerações finais

No decurso do presente trabalho foi confirmado que a inserção dum construção de DNA contendo a sequência codificante do péptido IB6 se encontrava correctamente inserida no vector de expressão desejado. Este aspecto foi de primordial importância para a prossecução do trabalho, pois qualquer mutação pontual poderia fazer alterar a grelha de leitura correcta.

Após transformação bem sucedida de *Agrobacterium* com o vector de expressão, foi tentado a transformação de plantas por dois processos diferentes. Estes métodos são, em regra, delicados e demorados, pois necessitam de algum trabalho de optimização experimental, que, dadas as restrições de tempo, não foi possível concretizar plenamente.

5 Referências Bibliográficas

1. Haslam E. (2007) "Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime" *Phytochemistry*. 68, 2713–2721
2. Hagerman A. (2002) "Tannin Chemistry"
3. Bennick A. (2002) "Interaction of plant polyphenols with salivary proteins" *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 13 (2), 184-196
4. Takuya S. (2006) "Salivary Proteins as a Defense Against Dietary Tannins" *Journal of Chemical Ecology*. 32 (6) 1149–1163
5. Rotava R., Zanella I, Picolli da Silva L., Palermo Manfron M. (2009) "Antibacterial, antioxidant and tanning activity of grape by-product" *Ciencia Rural*. 39 (3), 941-944
6. Tambi L., Frediani P., Frediani M., Rosi L., Camaiti M. (2007) "Hide Tanning with Modified Natural Tannins" *Journal of Applied Polymer Science*. 108, 1797-1809
7. Carvalho E., Mateus N., Plet B., Pianet I., Dufourc E., de Freitas V. (2006) "Influence of Wine Pectic Polysaccharides on the Interactions between Condensed Tannins and Salivary Proteins" *Journal of Applied Polymer Science*. 54, 8936-8944.
8. Dinnella C., Recchia A., Fia G., Bertuccioli M. (2009) "Saliva Characteristics and Individual Sensitivity to Phenolic Astringent" *Chemical senses*. 34, 295–304.
9. Pedersen A.M., Bardow A., Jensen S.B., Nauntofte B. (2002) "Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion" *Oral Diseases*. 5 (3), 117-129
10. Dodds M.W.J., Johnson D.A., Yeh C. (2005) "Health benefits of saliva: a review" *Journal of dentistry*. 33 (3) 223–233.
11. Yan Q., Bennick A. (2005) "Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva" *Biochem. J*. 311, 341-347
12. Schenkels L.C.P.M., Veerman E.C.I., Nieuw Amerongen A.V. (1995) "Biochemical Composition of Human Saliva in Relation To Other Mucosal Fluids" *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 47, 524-532
13. Pascal C., Bigey F., Ratomahenina R., Boze H., Moulin G., Sarni-Manchado P. (2006) "Overexpression and characterization of two human salivary proline rich proteins" *Protein expression and purification*. 47, 524–532.
14. Charlton A.J., Baxter N.J., Khan M.L., MOIR A.J.G., Haslam E., Davies A.P., Williamson M.P. (2002) "Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation" *J. Agric. Food Chem*. 50, 1593-1601.
15. Lu Y., Bennick A. (1998) "Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins" *Archives of oral biology*, 43 (9), 717-728

16. Streatfield S.J. (2007) "Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants" *Plant Biotechnology Journal*. 5, 2-15.
17. Lienard D., Sourrouille C., Gomord V., Faye L. (2007) "Pharming and transgenic plants" *Biotechnol. Annu. Rev.* 13, 115-147.
18. Faye L., Boulaflous A., Benchabanea M., Gomord V., Michaud D. (2005) "Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming" *Vaccine*. 23 (15), 1770–1778.
19. Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R. (2003) "Molecular farming in plants: host systems and expression technology" *Trends*. 21, 12
20. Chargelegue D., Vine N.D., van Dolleweerd C.J., Drake P.M., Ma J.K. (2000) "A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice" *Transgenic Research*. 9, 187–194
21. Neuhaus J., Rogers J.C. (1998) "Sorting of proteins to vacuoles in plant cells" *Plant Molecular Biology*. 38, 127–144
22. Neuhaus J., Sticher L., Meins F., Boller T. (1991) "A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole" *Plant Biology*. 88, 10362-10366
23. Klee, H. (2000) "A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors" *Trends in Plant Science*. 5 (10), 446-451
24. Bent, A.F. (2000) "Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species." *Plant Physiol*. 124, 1540–1547
25. Clough S.J., Bent A.F. (1998) "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*" *The Plant Journal*. 16 (6), 735-743
26. Fischer R., Vaquero-Martin C., Sack M., Drossard J., Emans N. Commandeur U. (1999) "Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants" *Biotechnol. Appl. Biochem*. 30, 113–116
27. Gaberc-Porekar V., Menart V. (2005) "Potential for Using Histidine Tags in Purification of Proteins at Large Scale" *Chemical Engineering & Technology*. 28 (11), 1306-1314.