

UFABC

Bacharelado em Biotecnologia

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes

Sergio Daishi Sasaki

(NHZ6006-18)



Universidade Federal do ABC

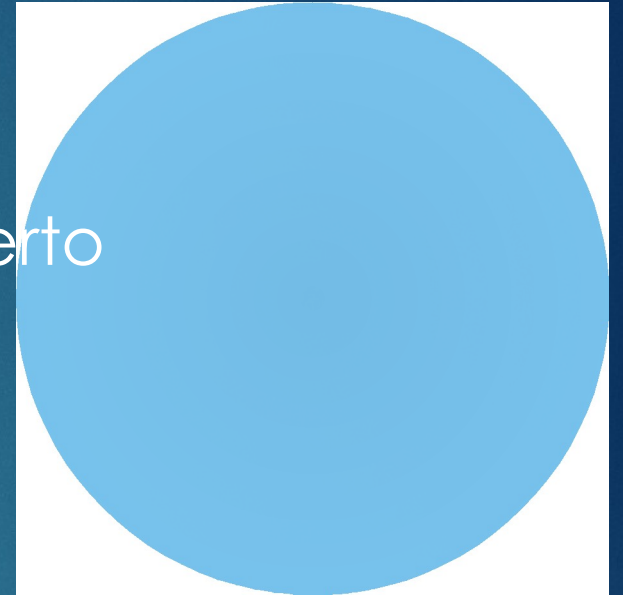
De busca no pubmed

Para sistema de expressão em leveduras: 20948 artigos



ETAPAS DA EXPRESSÃO PROTÉICA EM MICROORGANISMOS

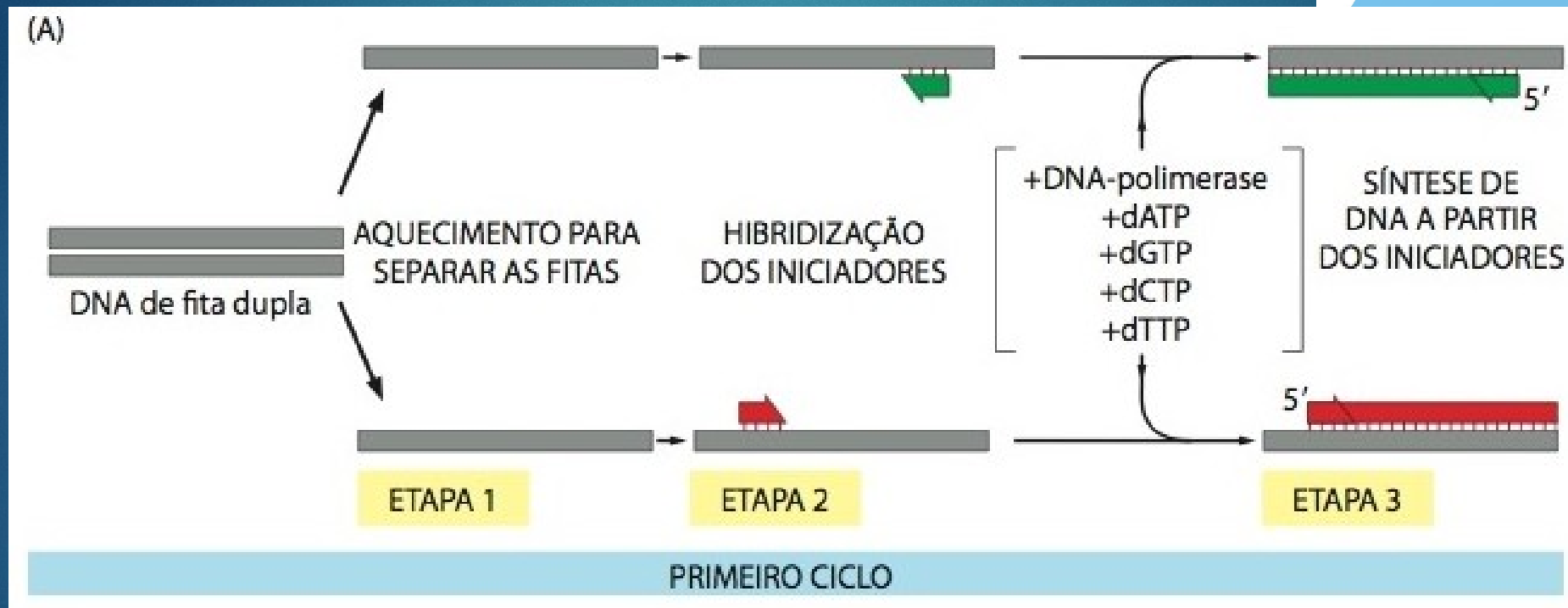
1. Amplificação do gene de interesse.
2. Elaboração do constructo de vetor mais inserto (constructo recombinante).
3. Preparo do constructo recombinante em quantidade.
4. Preparo das células competentes de expressão recombinantes.
5. Cultura das células com o constructo recombinante para expressão das proteínas.
6. Purificação e avaliação da expressão.



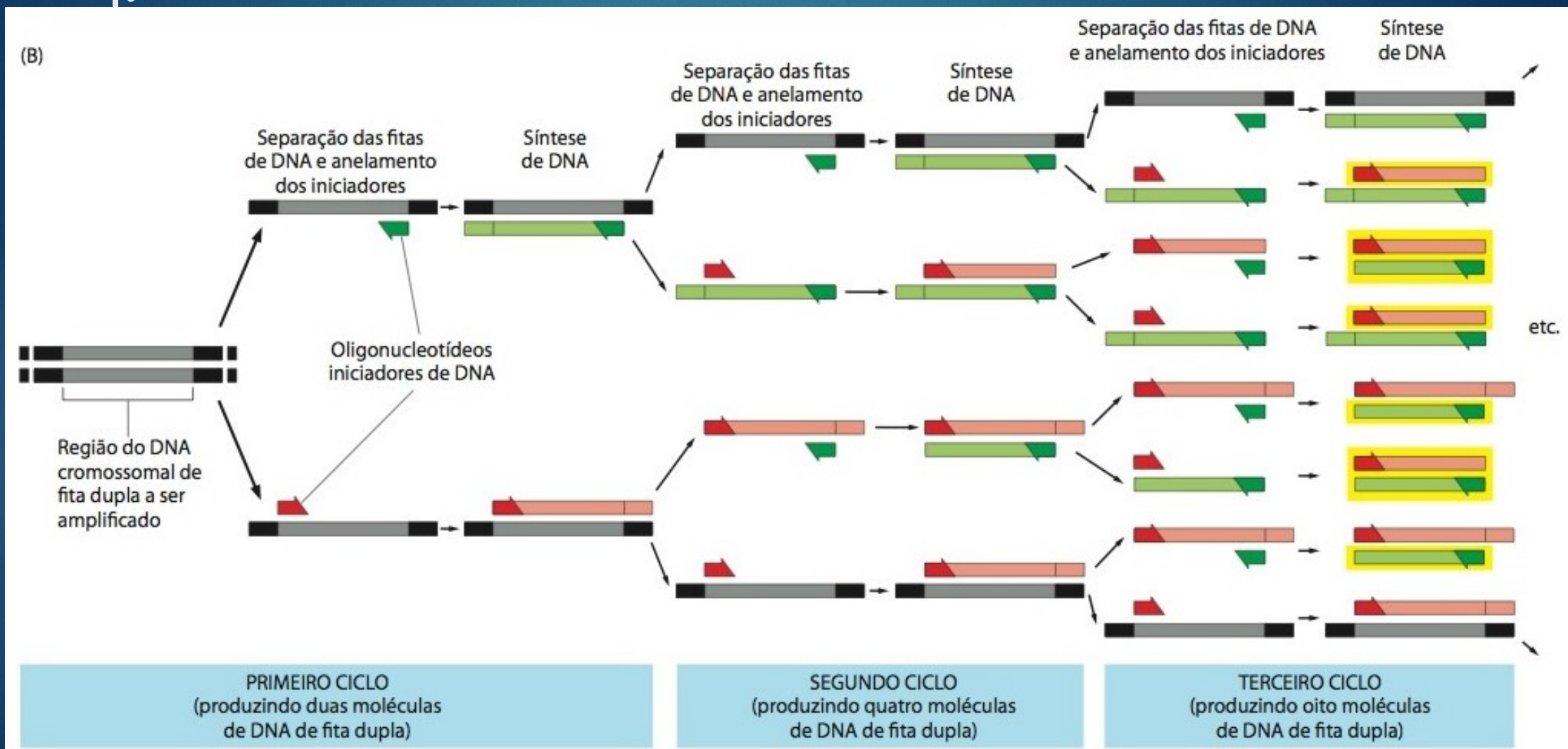
Comparativos dos sistemas de expressão em microorganismos

Parâmetro	Bactéria (<i>E.coli</i>)	Levedura (<i>Pichia pastoris</i>)
Tempo de expressão	Horas	Dias
Vetor insere-se no DNA genômico	Não – plasmídeo	Sim
Transformação da célula competente	Choque térmico – química. Eletroporação	Choque térmico – química. Eletroporação
Indução da expressão	IPTG – NaCl – Temperatura	Metanol
Proteínas ou peptídeos de fusão	Sim	Sim

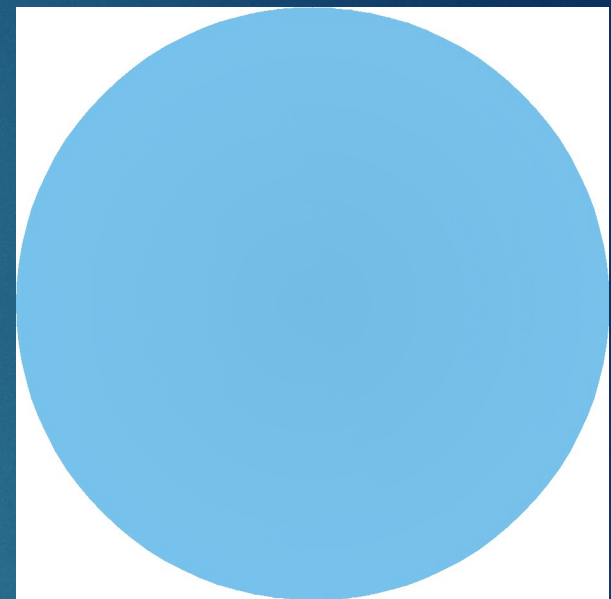
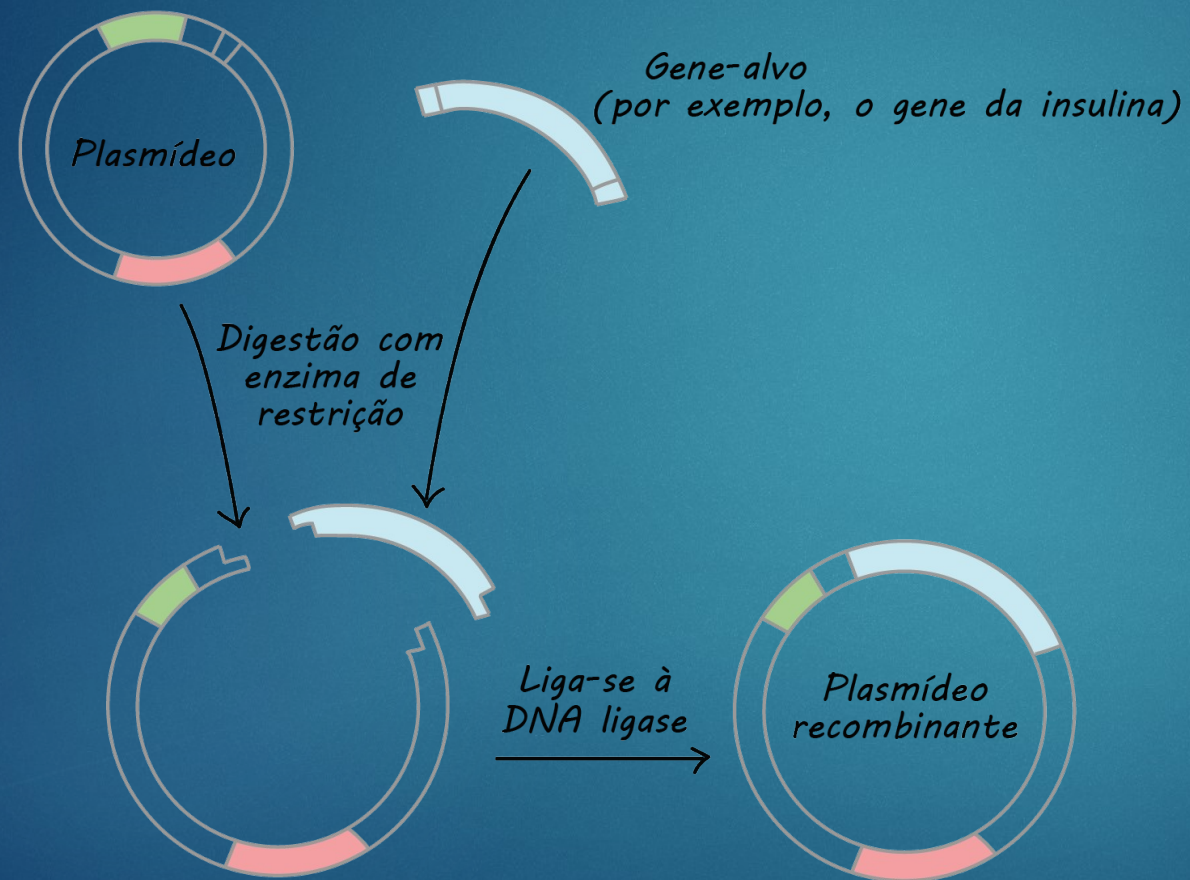
PCR – Reação em cadeia da polimerase



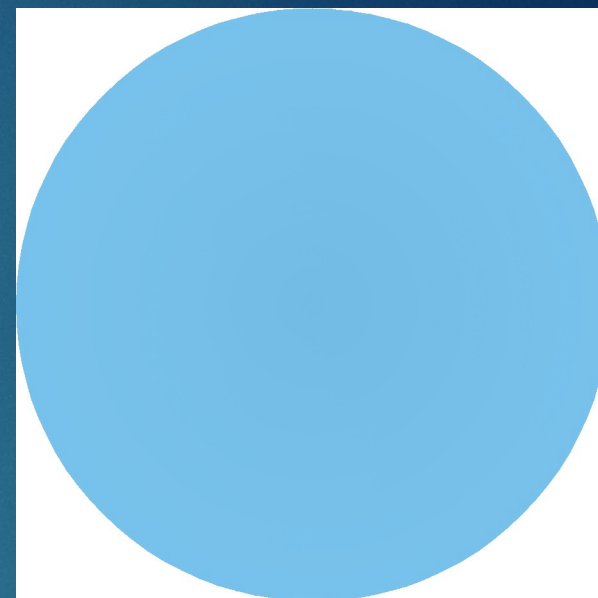
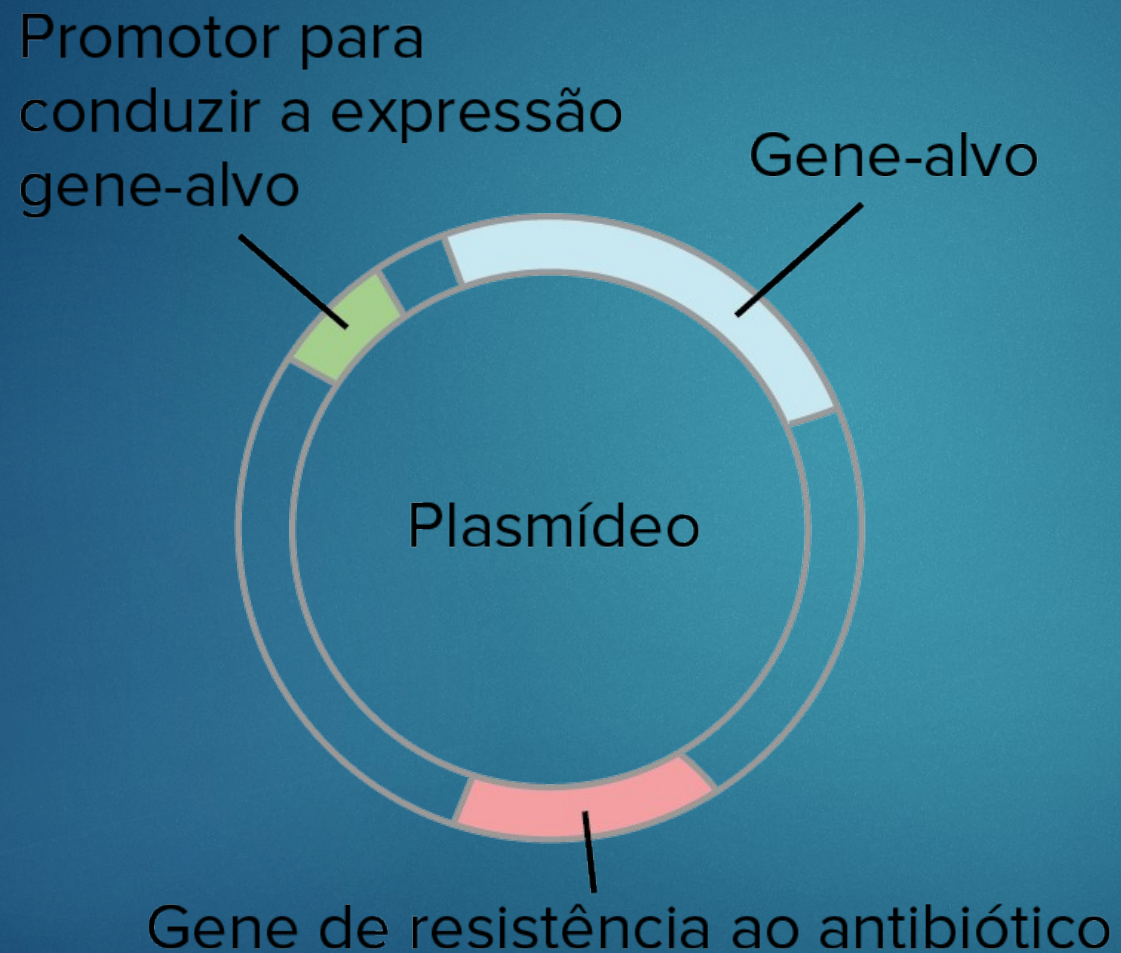
PCR – Reação em cadeia da



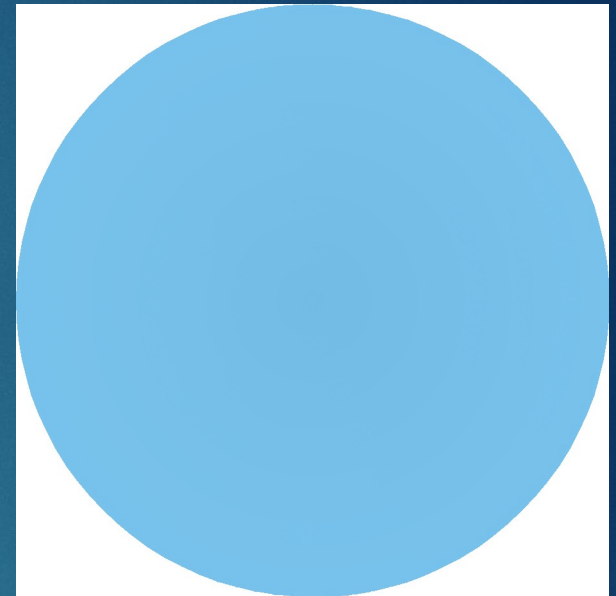
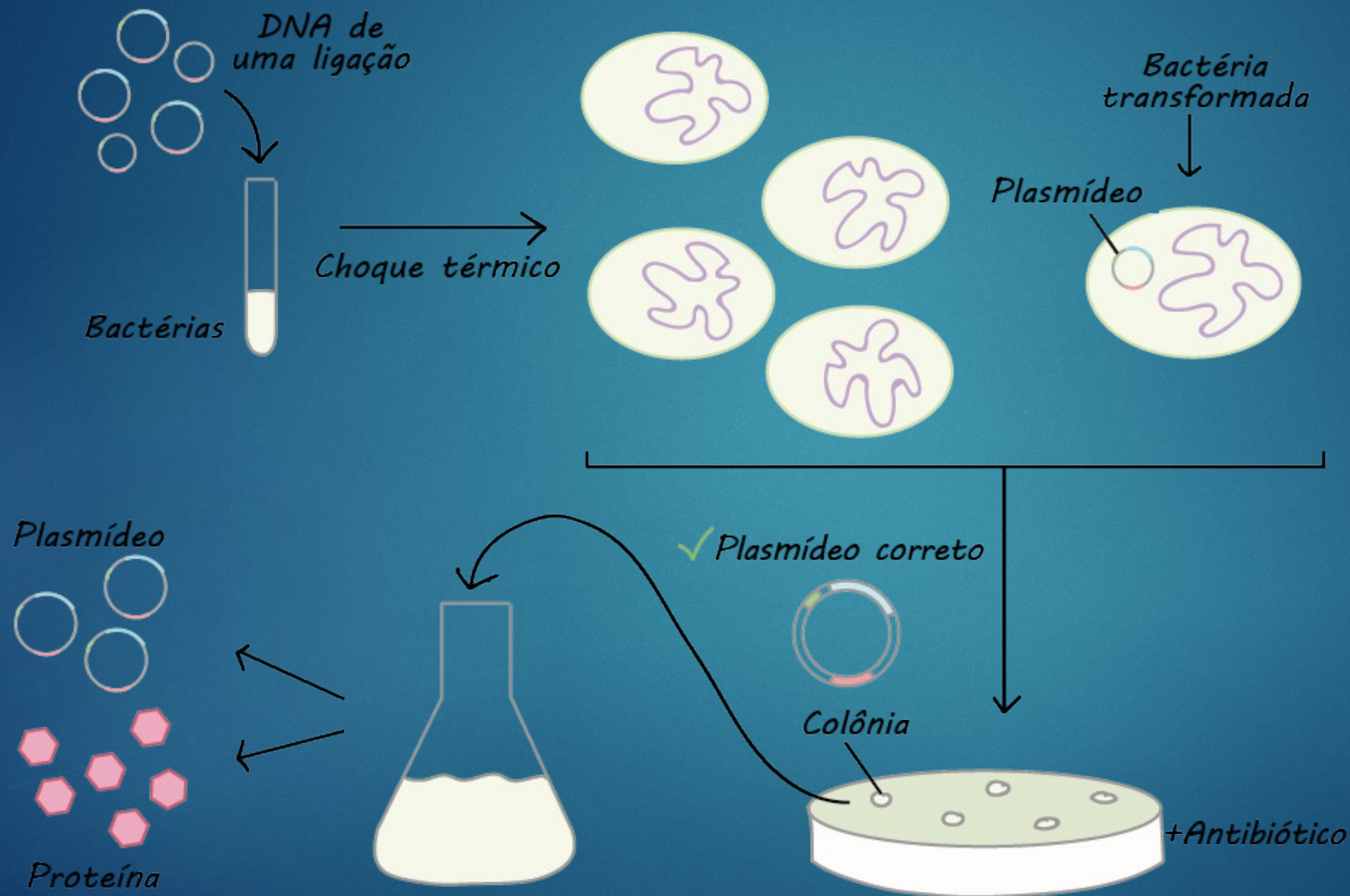
Inserção do fragmento amplificado no vetor



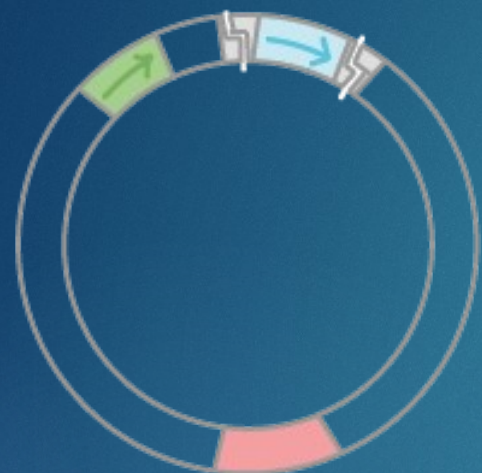
Vetor e inserto



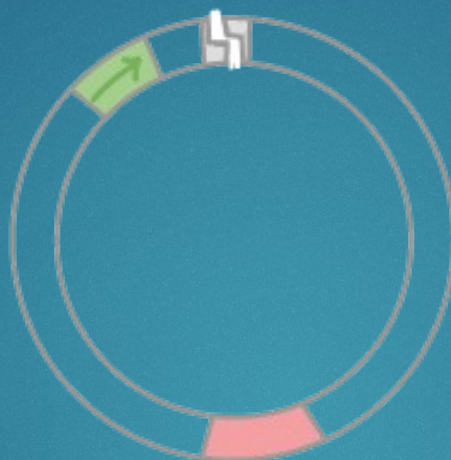
Multiplicação do constructo



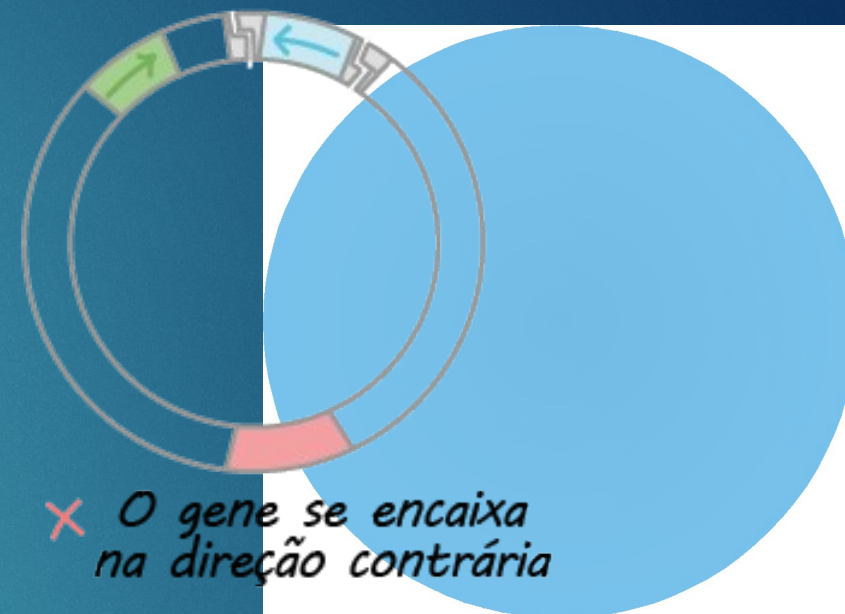
Verificar a clonagem



✓ O gene se encaixa na direção correta



✗ O plasmídeo se fecha



✗ O gene se encaixa na direção contrária

Expressão da proteína

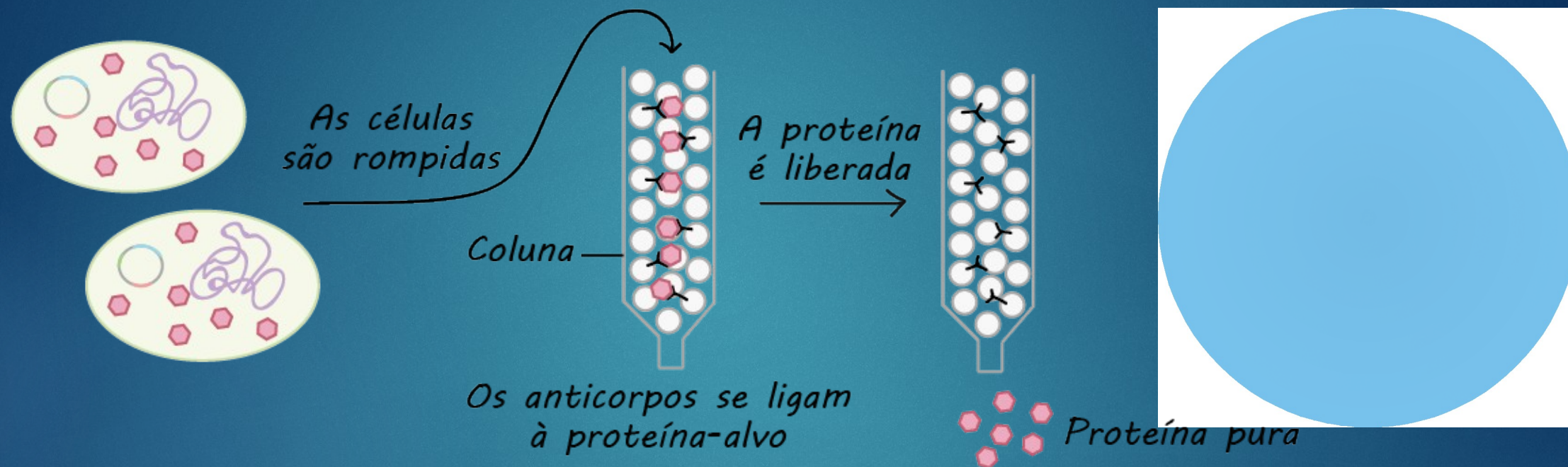


A colônia é desenvolvida para se tornar uma grande cultura

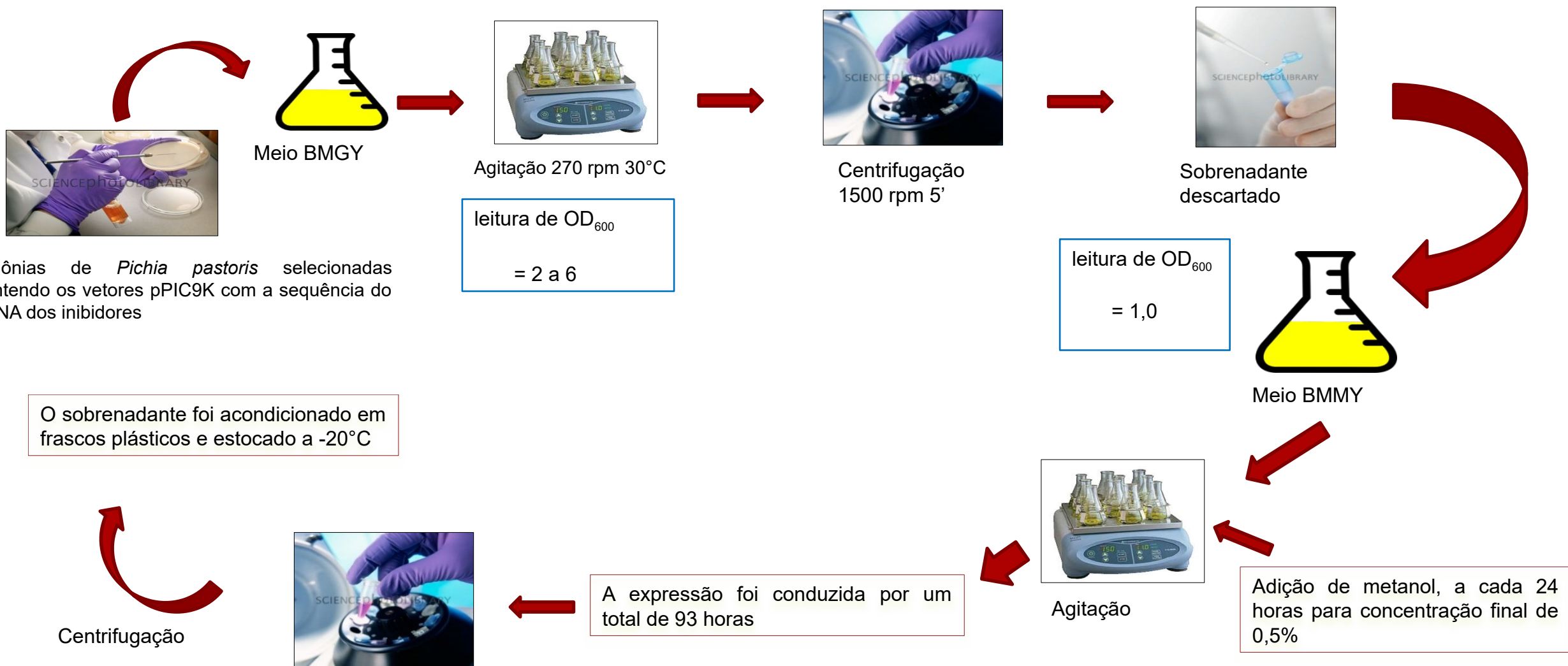
As bactérias são induzidas a expressar o gene



Purificação da proteína



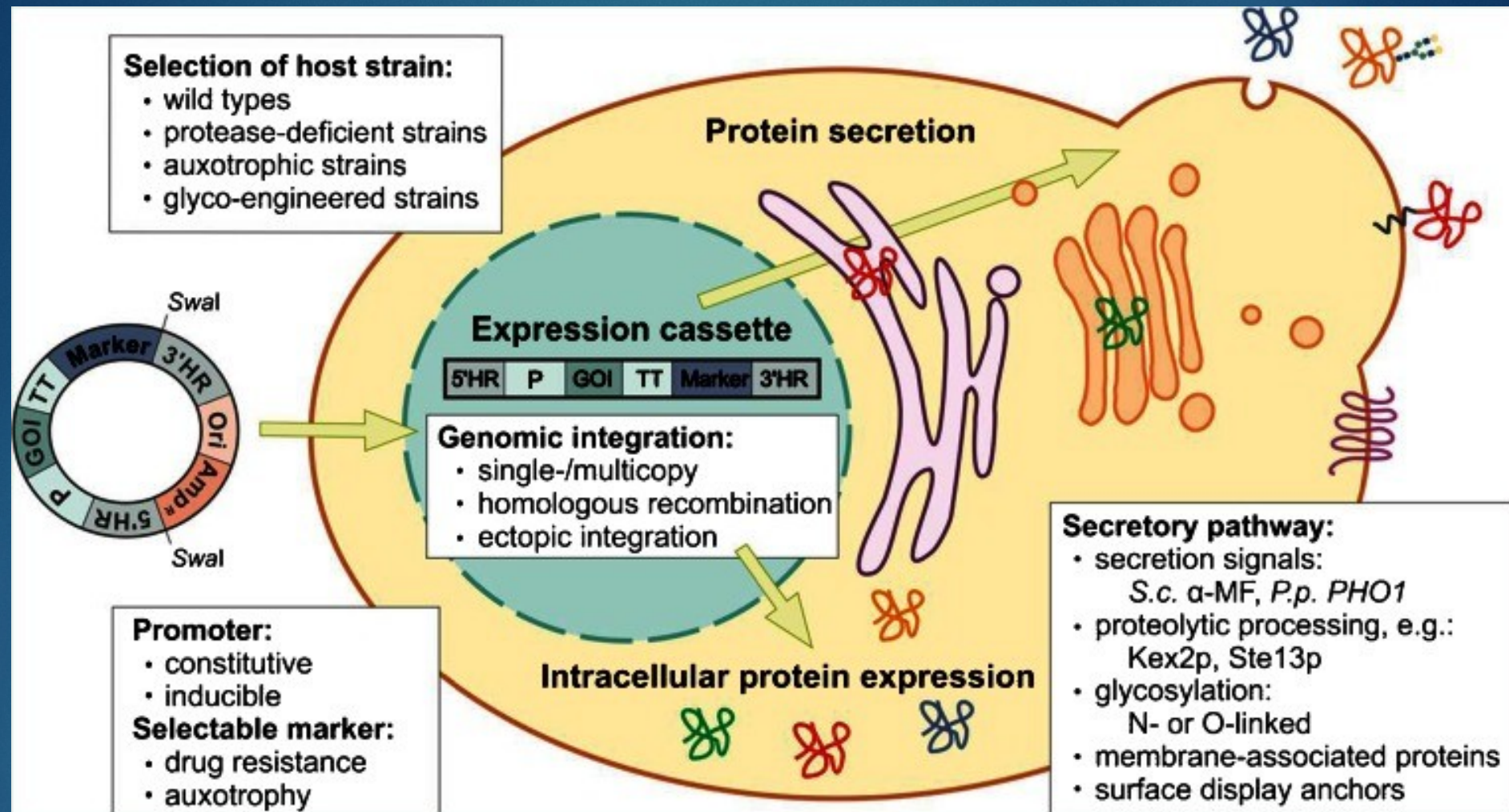
Expressão em Leveduras



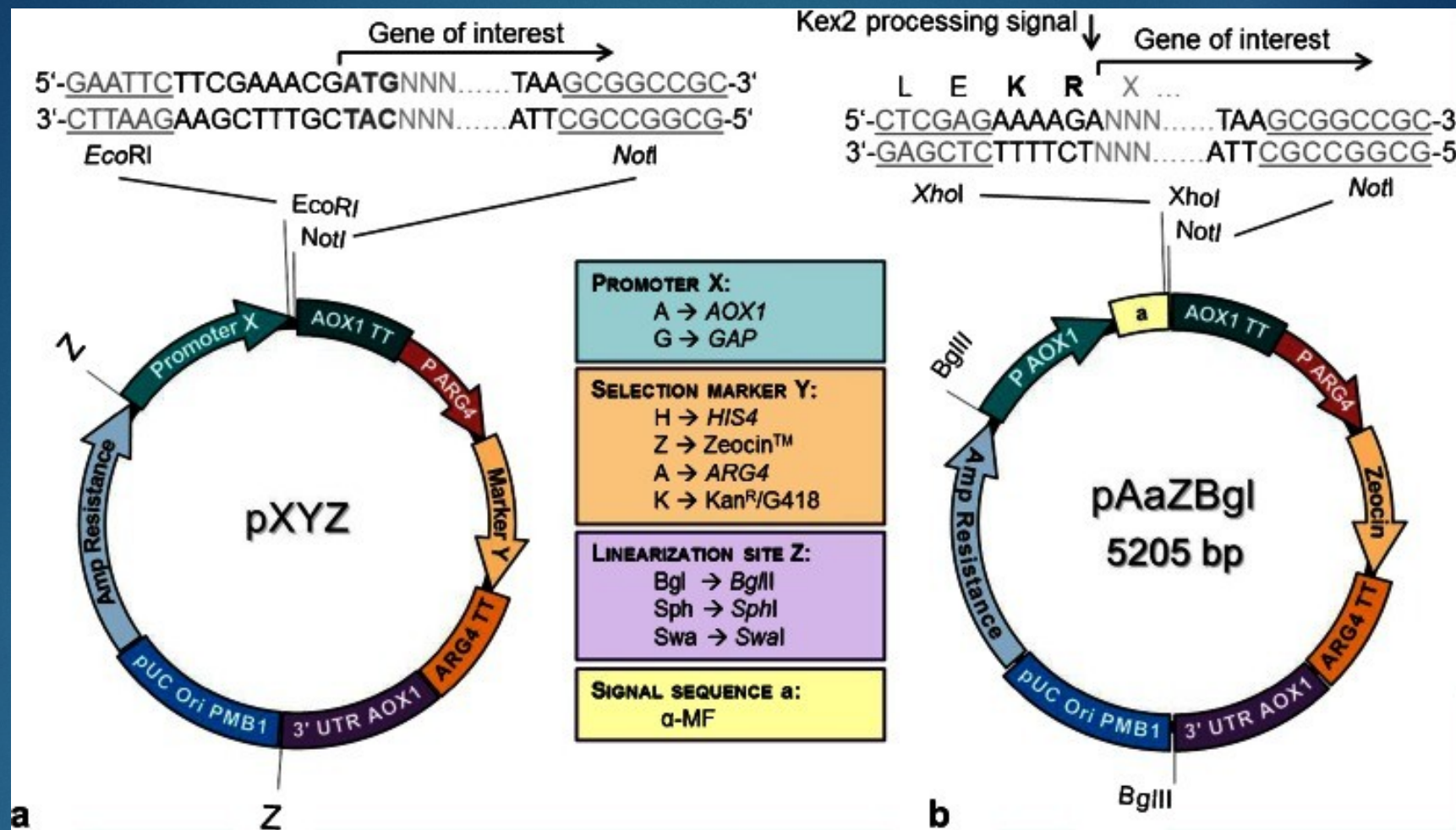
EXPRESSÃO PROTÉICA EM *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é um sistema de grande sucesso para a produção de uma ampla variedade de proteínas recombinantes. Vários fatores contribuíram para sua rápida aceitação, dos quais os mais importantes incluem:

- (1) um promotor derivado do gene álcool oxidase I (AOX1) de *P. pastoris* que é especialmente adequado para a expressão controlada de genes heterólogos;
- (2) a semelhança das técnicas necessárias para a manipulação genética molecular de *P. pastoris* às de *Saccharomyces cerevisiae*;
- (3) a forte preferência de *P. pastoris* pelo crescimento aeróbico, característica fisiológica que facilita muito sua cultura em altas densidades celulares em relação a leveduras fermentativas;



General considerations for heterologous gene expression in *P. pastoris*. Expression plasmids harbouring the gene(s) of interest (*GOI*) are linearized prior to transformation. Selectable markers (e.g., Amp^R) and origin of replication (*Ori*) are required for plasmid propagation in *E. coli*. The expression level of the protein of interest may depend on (i) the chromosomal integration locus, which is targeted by the 5' and 3' homologous regions (5'HR and 3'HR), and (ii) on the gene copy number. A representative promoter (*P*) and transcription terminator (*TT*) pair are shown. Proper signal sequences will guide recombinant protein for intracellular or secretory expression, and will govern membrane integration or membrane anchoring



Novel 'Pichia Pool' plasmid sets for intracellular and secretory expression. **a** General features of pXYZ vector for intracellular expression. Letters refer to the choice of promoters (X), selection markers (Y), and restriction enzymes (Z) for linearization. Available elements are shown in boxes. The vector backbone harbours an ampicillin resistance marker and origin of replication for maintenance of the plasmid in *E. coli*. The GOI is *EcoRI*–*NotI* cloned directly after the promoter of choice. The Kozak consensus sequence for yeast (i.e., CGAAACG), should be restored between the *EcoRI* cloning site and the start codon of the GOI in order to achieve optimal translation. In addition, sequence variation within this region will allow fine-tuning translation initiation efficiency. Expression in *P. pastoris* is driven either by the methanol inducible *AOX1* or the constitutive *GAP* promoter. Positive clones can be selected for by antibiotic resistance (i.e., to ZeocinTM or geneticin sulphate) or by selection for His or Arg prototrophy. Selection marker expression is uniformly driven by the *ARG4* promoter–terminator pair. **b** Plasmid pAaZBgl from 'Pichia Pool' is shown as an example of a vector made for secretory expression encoding *S. cerevisiae* α -MF signal sequence in front of the GOI cloning site. The Kex2 processing site AAAAGA should be restored between the *XhoI* cloning site and the fusion point of the GOI