



Expresión de Proteínas en la levadura *Pichia pastoris*

Belén Infanzón
IICS-UNA



Universidad de Barcelona
Facultad de Biología
Departamento de
Microbiología



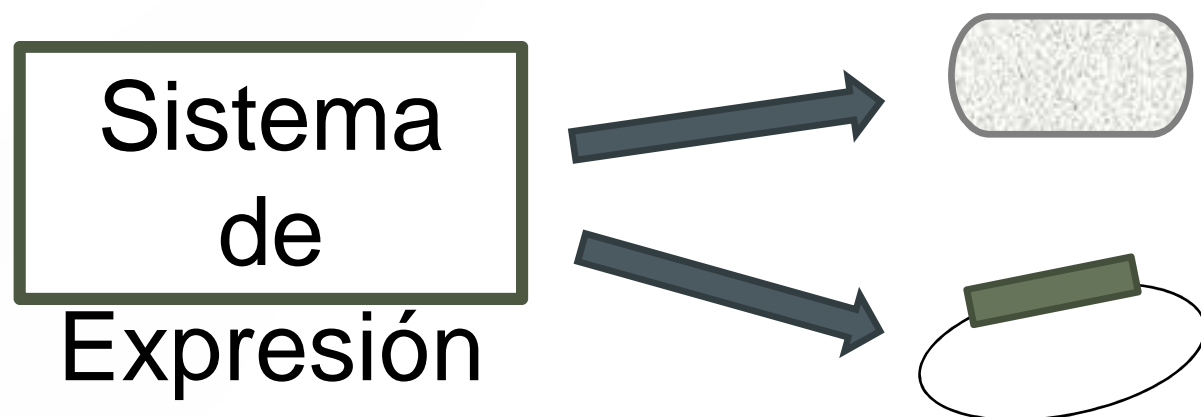
Universidad Autónoma de
Barcelona
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ing.
Química



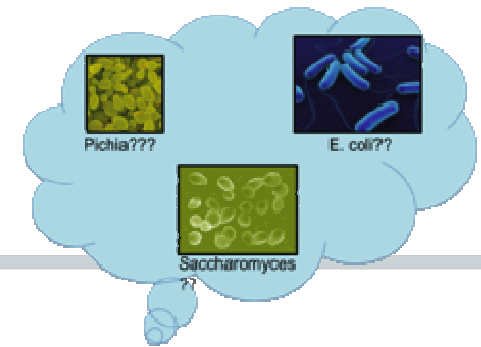
Marzo – Mayo 2016

Qué es una proteína recombinante?

Se considera una proteína recombinante o proteína heteróloga aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo.



Que sistema de expresión elegir?

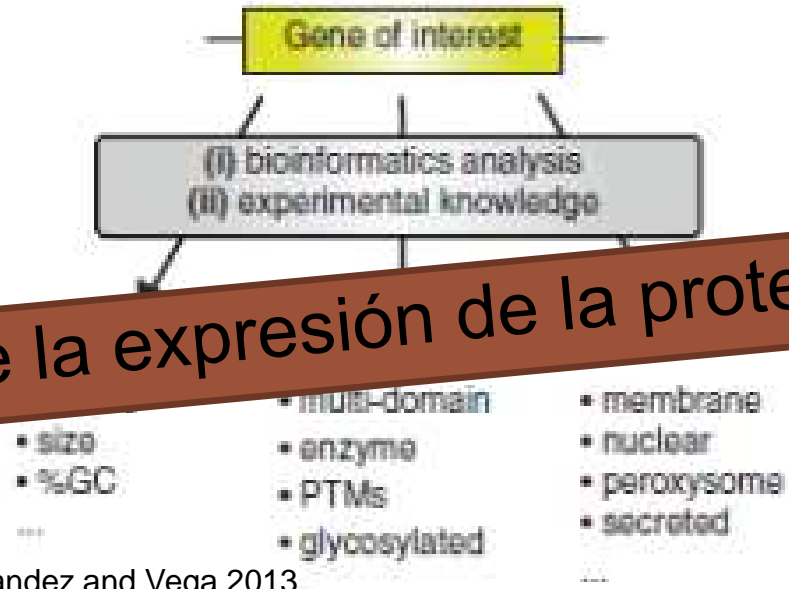


Origen biológico de la proteína

Propiedades químicas y biológicas de la proteína

Aplicación o biología

Conocimientos de la expresión de la proteína o función



Fernandez and Vega 2013

Escherichia coli



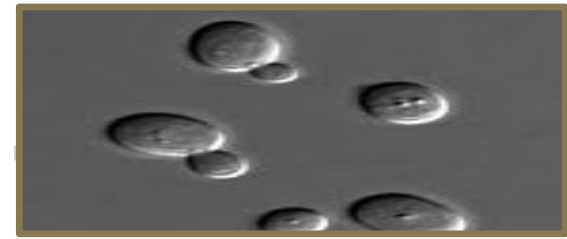
- Expresses >80 % of commercial microbial products
- Expresses simple to moderately complex proteins including Fabs
- Soluble expression simplifies recovery and downstream processing
- Produces aglycosylated proteins
- Ideal for plasmid DNA production

Bacillus subtilis



- Expresses simple monomeric proteins
- Soluble expression simplifies recovery and downstream processing
- Lacks endotoxin
- Produces aglycosylated protein

Sacharomyces cerevisiae



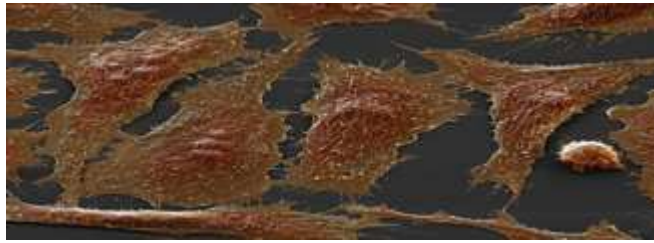
- Good expression levels
- Choice of secreted or cellular expression
- Low cost
- Simple culture conditions
- Scaleable
- Able to perform most eukaryotic post-translational modifications
- Efficient protein folding
- Endotoxin-free
- Likely lower expression than with *Pichia pastoris*
- Secretion likely lower than with *Pichia pastoris*
- Glycosylation still different to mammalian cells
- Tendency to hyperglycosylate proteins
- N-glycan structures considered allergenic

Pichia pastoris



- Expresses larger complex proteins and small polypeptides
- Solubility issues in *E. coli* may be solved with *Pichia*
- Secretes for easier recovery & downstream processing
- Lacks endotoxin

Células de mamíferos



Good expression levels

Moderately scaleable

Suspension-adapted cells facilitate scale-up

Efficient protein folding

Good for secreted proteins

All post-translational modifications

Endotoxin-free

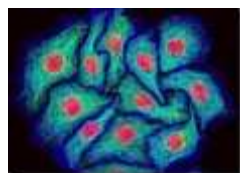
Expensive culture media

Complex growth requirements

LOW

HIGH

SPEED



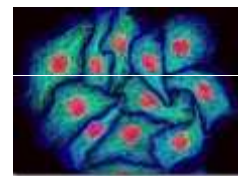
Yeast



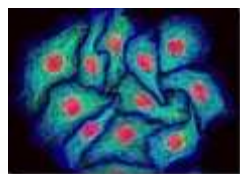
COST



Yeast



YIELD

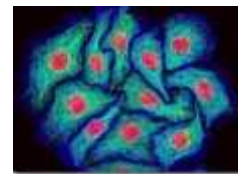


Yeast

**POST-
TRANSLATION
MODIFICATION**



Yeast



Pichia pastoris



- Es un sistema de gran éxito para la producción de una amplia variedad de proteínas recombinantes
- Como la levadura, *P. pastoris* es un microorganismo unicelular que es fácil de manipular y cultura. Sin embargo, también es un eucariota y capaz de muchas de las modificaciones post-traduccionales realizadas por células eucariotas superiores, tales como el procesamiento proteolítico, la formación de enlaces de sulfuro de plegado, di- y glicosilación. Por lo tanto, muchas proteínas que terminan como cuerpos de inclusión inactivos en sistemas bacterianos se producen como moléculas biológicamente activas en *P. pastoris*. El sistema de *P. pastoris* también se considera en general de ser más rápido, más fácil y menos costoso de usar que los sistemas de expresión derivados de eucariotas superiores, tales como sistemas de células de cultivo de tejidos de insectos y de mamíferos y por lo general da altos niveles de expresión.

En los ochenta fue desarrollada una cepa de *P. pastoris* que crece en altas densidades (Phillips Petroleum Co.)

Desde 1990 esta compañía ofrece esta tecnología sin ningún costo para la investigación y uso en universidades y organizaciones sin ánimo de lucro, a través de acuerdos de transferencia

2

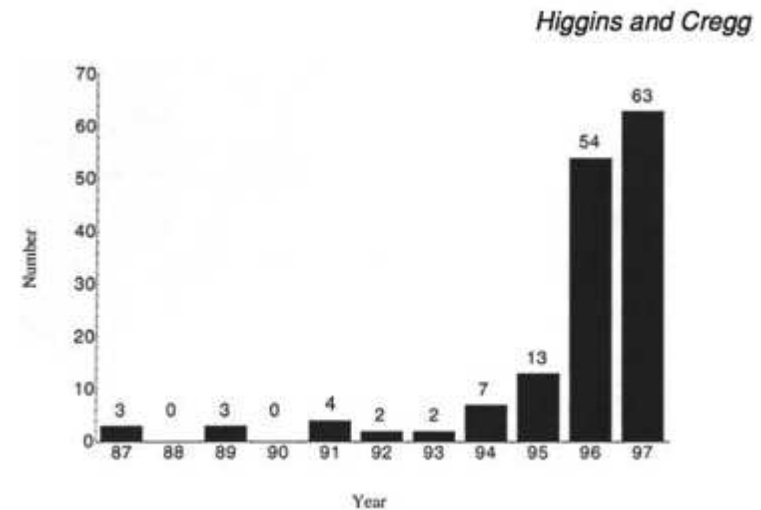


Fig. 1. Graph showing number of publications describing the expression of a foreign protein in *P. pastoris* each year from 1985 to 1997.

Ventajas

Alta

la densidad de células de la biomasa puede ser diez veces mayor que la de los cultivos de *S. cerevisiae*, incrementando la producción



S. cerevisiae *P. pastoris*

Ventajas

Alta

la densidad de células de la biomasa puede ser diez veces mayor que la de los cultivos de *S. cerevisiae*, incrementando la producción



S. cerevisiae *P. pastoris*

promotores fuertes

conducen a altos niveles de expresión

Ventajas

Alta

la densidad de células de la biomasa puede ser diez veces mayor que la de los cultivos de *S. cerevisiae*, incrementando la producción



S. cerevisiae *P. pastoris*

promotores fuertes

conducen a altos niveles de expresión

Secreción de la proteína

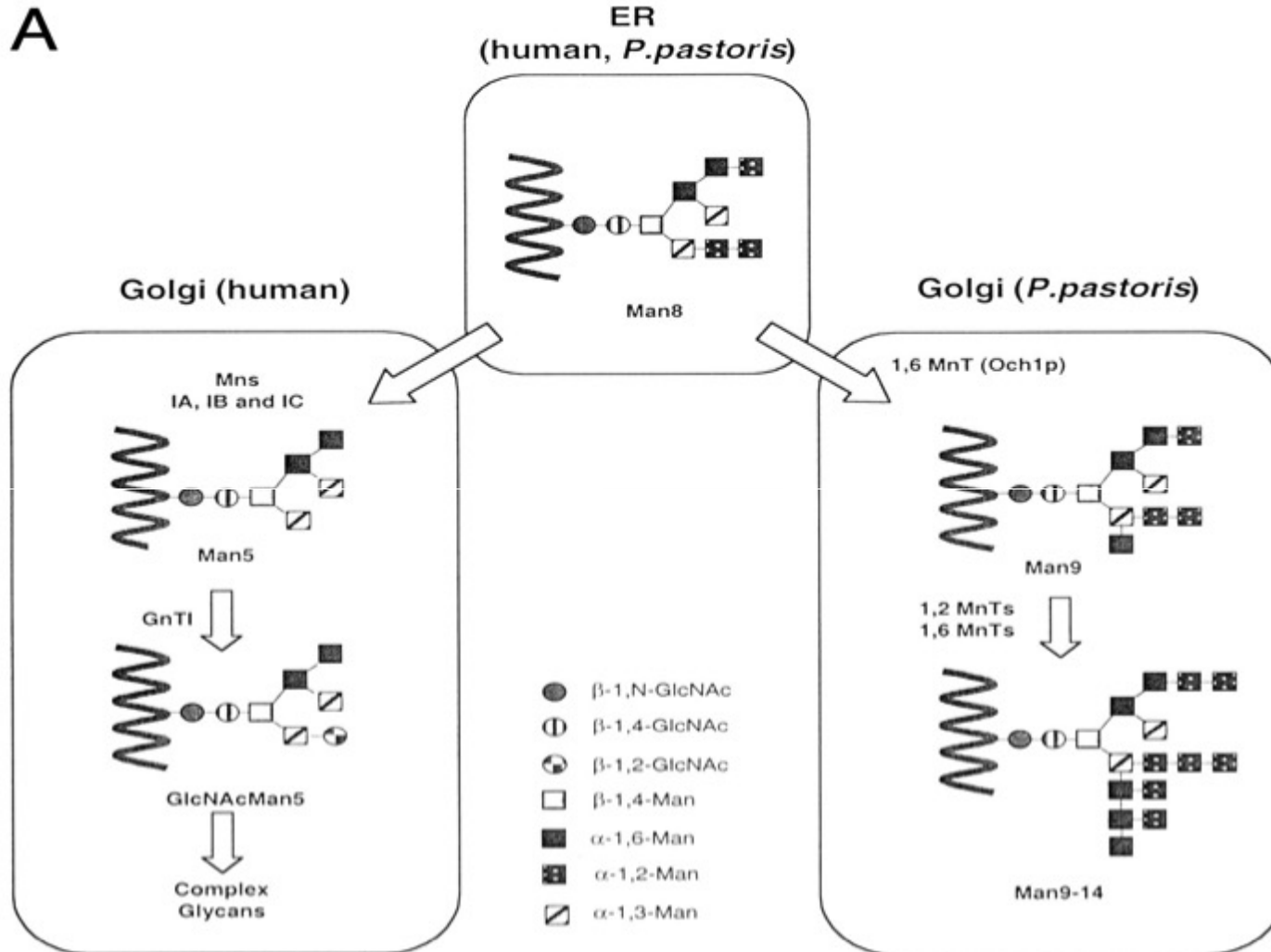
señales de secreción de proteínas eficientes y no secretan considerables cantidades de proteínas endógenas, simplificando la purificación

Pichia se ha utilizado para producir con éxito proteínas que incluyen enzimas, antígenos, fragmentos de anticuerpos. Beneficios de expresión en *Pichia* incluyen:

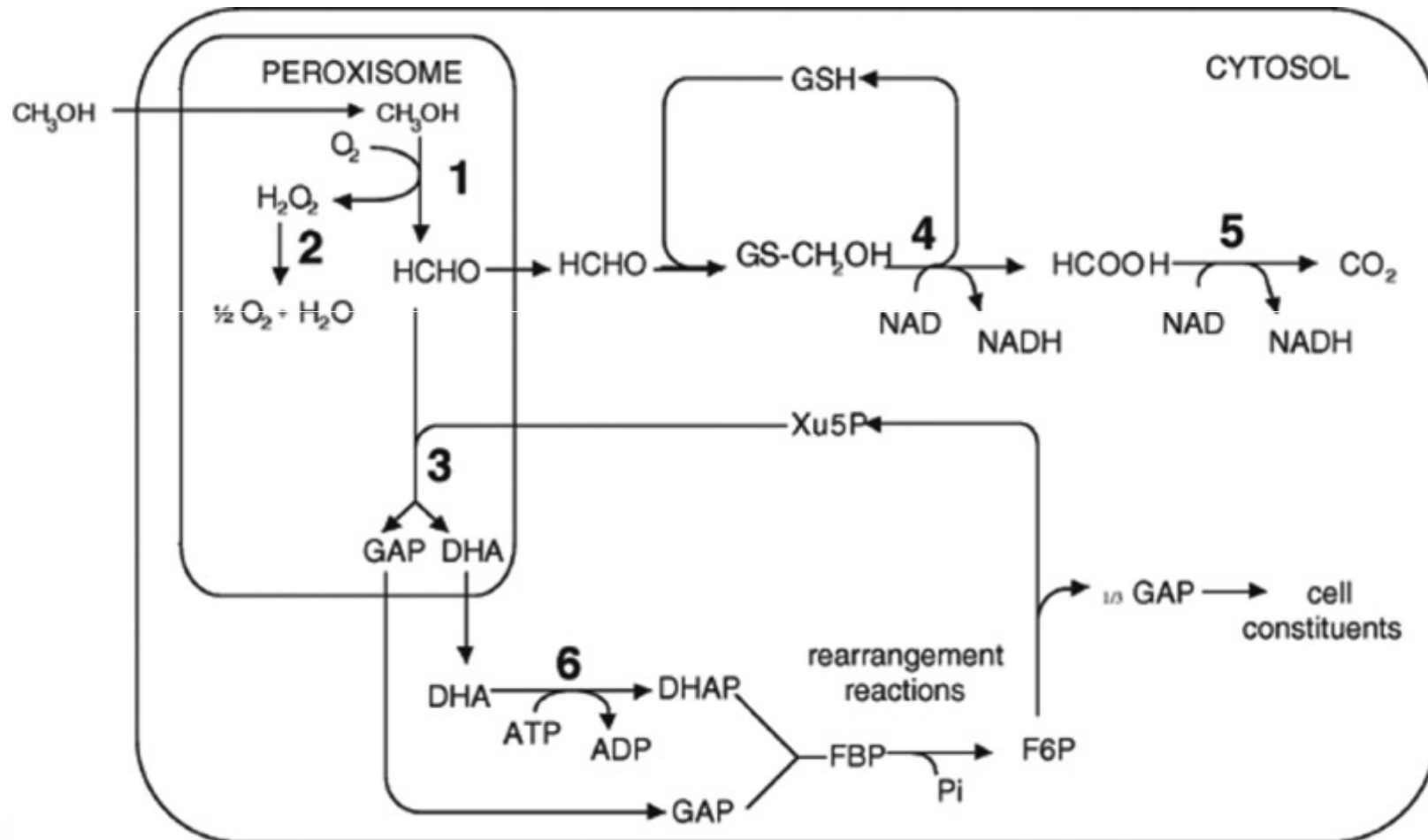
- Proteínas Solubles
- Alta densidad celular/alto rendimiento de proteína
- Proceso Controlable
- Purificación o Procesos *downstream* mínimos
- Productos similares a los producidos en sistemas de mamíferos

Altos rendimientos de proteína funcional en un huésped microbiano fácil de manejar y rentable

(A) N-linked glycosylation pathway in humans and *P. pastoris*.



Metabolismo del MetOH



Protein	Comments: mode, amount,
Bacteria	
<i>Bacillus licheniformis</i> α -amylase	S, 2.5 g l ⁻¹ , SUC2
<i>Bacillus stearothermophilus</i> D-alanine carboxypeptidase	S, 100 mg l ⁻¹ , native
<i>Bordetella pertussis</i> pertussis pertactin (P69)	I, 3 g l ⁻¹
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin (BoNT) serotype A and B	I, 78 mg l ⁻¹
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin heavy chain fragment, serotype B	I, 390 μ g g ⁻¹
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin serotype A binding domain	I, 2.4 mg total
<i>Clostridium tetani</i> tetanus toxin fragment C	I, 12 g l ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> acid phosphatase/phytase (appA2)	S, 28.9 U mg ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> β -galactosidase	I, 2.0 $\times 10^3$ U mg ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> β -lactamase	I
<i>Leishmania major</i> cathepsin B-like protease	S, α -MF
<i>Staphylococcus aureus</i> staphylokinase	S, 50 mg l ⁻¹ , α -MF
<i>Streptococcus equisimilis</i> streptokinase	I, 77 mg l ⁻¹
<i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor	S
<i>Streptomyces viridosporus</i> T7A peroxidase, endoglucanase	S, 2.47 g l ⁻¹ total protein, α -MF
<i>Toxoplasma gondii</i> SAG1 antigen	S, 12 mg l ⁻¹ , α -MF
<i>Vibrio cholerae</i> accessory cholera enterotoxin (Acc)	S, 7 mg l ⁻¹ , α -MF
Fungi	
<i>Alternaria</i> Alt 1 allergen	S, α -MF
<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase	S, 400 mg l ⁻¹ , native
<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase catalytic domain	S, 400 mg l ⁻¹ , PHO1
<i>Aspergillus fumigatus</i> catalase L	S, 2.3 g l ⁻¹ , PHO1
<i>Aspergillus fumigatus</i> dipeptidyl peptidase IV (DPP IV)	S, PHO1
<i>Aspergillus fumigatus</i> dipeptidyl peptidase V (DPP V)	S, 0.15 mg l ⁻¹ , PHO1
<i>Aspergillus giganteus</i> α -sarcin ribotoxin	S, 1 mg l ⁻¹ , synthetic native
<i>Aspergillus niger</i> phytase (phyA)	S, 65 U ml ⁻¹ , α -MF
<i>Candida guilliermondii</i> xylose reductase gene (xyII)	I, 0.65 U mg ⁻¹ ; S, 0.18 U
<i>Candida rugosa</i> lipase 1 (CRL)	S, 150 U ml ⁻¹ , α -MF
<i>Fusarium solani</i> pectate lyase (pelC)	S, 1 mg l ⁻¹ , PHO1
<i>Fusarium solani</i> pectate lyase (pelD)	S, native
<i>Geotrichum candidum</i> lipase isoenzymes	S, 60 mg l ⁻¹ , α -MF
<i>Phytophthora cryptogea</i> β -cryptogein	S, 45 mg l ⁻¹ , PHO1
<i>Rhizopus oryzae</i> lipase	S, 60 mg l ⁻¹ , α -MF
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> invertase	S, 2.5 g l ⁻¹ , native
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ktr1p	S, 400 mg l ⁻¹ , PHO1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (α -1,2-mannosyltransferase)	S, 40 mg l ⁻¹ , PHO1
<i>Schizophyllum commune</i> vitamin B2-aldehyde-forming enzyme	S, 120 mg l ⁻¹ , α -MF
<i>Trametes versicolor</i> (white rot fungus) laccase (locI)	S, native and α -MF
<i>Trichoderma harzianum</i> β -(1-6)-glucanase	S, 9.3 mg l ⁻¹

Protists

<i>Chondrus crispus</i> red alga hexose oxidase	I
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> red alga α -1,4-glucan lyase (GLq1)	I
<i>Plasmodium falciparum</i> merozoite surface protein 1 (MSP-1)	S, 24 mg l ⁻¹ , α -MF
<i>Plasmodium vivax</i> apical membrane antigen I (AMA-1)	S, 50 mg l ⁻¹ , PHO1
<i>Reticulomyxa filosa</i> (giant freshwater ameba) α 2, β 2 tubulin isoforms	I, 400 μ g g ⁻¹
<i>Trypanosoma cruzi</i> acid α -mannosidase	S, 11.5 μ g l ⁻¹ , native

Plants

<i>Allium sativum</i> (garlic) alliin lyase	I, 2.167 U g ⁻¹
<i>Arabidopsis thaliana</i> NADH:nitrate reductase	I, 18 μ g g ⁻¹
Barley (<i>Hordeum vulgare</i>) sucrose fructan 6-fructosyl transferase	S, α -MF
Barley α -amylase 1	S, 50 mg l ⁻¹ , native
Barley α -amylase 2	S, 1 mg l ⁻¹ , native
Barley aleurone tissue α -glucosidase	S, α -MF
Coffee bean α -galactosidase	S, 400 mg l ⁻¹ , α -MF
<i>Cynara cardunculus</i> (cardoon) cyprosin	S, 1 mg l ⁻¹ , native
<i>Cynodon dactylon</i> (Bermuda grass) Cyn d 1	S, 1.5 g l ⁻¹ , PHO1
<i>Galanthus nivalis</i> agglutinin	S, PHA-E
<i>Hevea brasiliensis</i> hydroxynitrile lyase	I, 22 g l ⁻¹
<i>Hevea brasiliensis</i> Hev b 7 patatin-like allergen	S, 10 mg l ⁻¹ , α -MF
Maize cytokinin oxidase	S, native
Oat phytochrome A, phA	I, 30 μ g g ⁻¹
Oat phytochrome A, phyA65 apoprotein	I, 20 μ g g ⁻¹

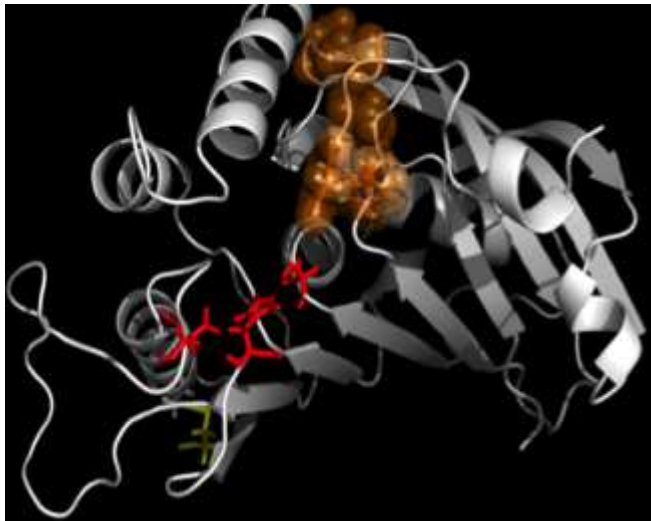
Humans

$\alpha(1,3/4)$ -Fucosyltransferase	S, 30 mg l ⁻¹ , α -MF
α -1,2-Mannosidase 1B w/o TM domain	S, α -MF
α -N-Acetylgalactosaminidase (α -NAGAL)	S, 11.6 mg l ⁻¹ , α -MF
α 1-Antitrypsin (α 1-AT)	S, inulinase signal sequence
β 2-Adrenergic receptor	S*, 25 nmol g ⁻¹ , α -MF
μ -Opioid receptor	S*, α -MF
ADAR1, ADAR2, ds-RNA-specific adenosine deaminases	I, 1 mg l ⁻¹
Alzheimer's disease amyloid precursor protein α , β , and γ -secretase products	S, PHO1
Alzheimer's disease amyloid precursor protein, 2 domains	S, 24 mg l ⁻¹ , 0.1 mg l ⁻¹ , α -MF
Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)	S, 40 mg l ⁻¹ , α -MF
Amyloid precursor protein (APP)	S, 24 mg l ⁻¹ , PHO1
Amyloid precursor proteins, τ APP695, τ APP770	S, 4.5+1 mg l ⁻¹ , native
Bile salt-stimulated lipase	S, 300 mg l ⁻¹ , native, INV
Bivalent diabody against carcinoembryonic antigen (CEA), T-cell coreceptor CD2	S, 1 mg l ⁻¹ , α -MF
c-Kit receptor kinase domain	I, 0.2 mg l ⁻¹
Carcinoembryonic antigen	S, 20 mg l ⁻¹ , α -MF
Caspase-3	I, 1 μ g g ⁻¹
Cathepsin K	S, 38 mg l ⁻¹ , α -MF
Cathepsin L propeptide	S, 10 mg l ⁻¹ , α -MF
Cathepsin V	S, α -MF
CD38	S, 455 mg l ⁻¹ , α -MF
CD40 ligand soluble form	S, 255 mg l ⁻¹
Chimeric B7-2 antibody fusion protein	S, 15 mg l ⁻¹ , α -MF

Pancreatic α -amylase	S, 20 mg l ⁻¹ , α -MF
Pancreatic triglyceride lipase	S, 75 ml l ⁻¹ , PHO1
Papain nitrile hydratase	S, 5 mg l ⁻¹ , α -MF
Placental alkaline phosphatase (PLAP)	S, 2 mg l ⁻¹ , PHO1
Placental protein-14 (PP-14)	S, α -MF
Plasminogen kringles 1-4	S, 17 mg l ⁻¹ , PHO1
Plasminogen kringles 1-4, angiostatin protein	S, 10% total protein, PHO1
Procarboxypeptidase A2	S, 180 mg l ⁻¹ , α -MF
Procathepsin B	S, 20 mg l ⁻¹ , α -MF
Procolipase	S, 30 mg l ⁻¹ , native
Protein kinase C interacting protein 1 (PKCI-1)	I, 0.25 mg l ⁻¹
Proteinase 3, Wegener's antigen	S, 670 mg l ⁻¹ , α -MF
Proteinase inhibitor 8	I, 15% total protein
scFv (against ovarian carcinoma)-biotin mimetic peptide	S
scFv (against squamous carcinoma)	S, 50 mg l ⁻¹ , α -MF
Serum albumin	S, 3 g l ⁻¹ , native
Serum transferrin N-lobe	S, 240 mg l ⁻¹ , α -MF
Sex steroid binding protein	S, 4 mg l ⁻¹ , α -MF
Single-chain urokinase-type plasminogen activator	S, 5 mg l ⁻¹ , pre <i>Mucor pusillus</i> rennin signal
Thrombomodulin	S
Tissue factor extracellular domain	S, 10 mg l ⁻¹ , PHO1
Tissue kallikrein	S, 30 mg l ⁻¹ , α -MF
Tissue-type plasminogen activator kringle 2 domain	S, 170 mg l ⁻¹ , α -MF
Transforming growth factor β receptor extracellular domain	S, 10 mg l ⁻¹ , α -MF
Tumor necrosis factor α (TNF)	I, 10 g l ⁻¹
Type I plasminogen activator inhibitor (PAI-1)	S, 3 mg l ⁻¹ , α -MF
Type III collagen (with prolyl 4-hydroxylase)	I, 15 mg l ⁻¹
Urokinase-type plasminogen activator-annexin V chimeras	S, 600 IU ml ⁻¹ , pre <i>Mucor pusillus</i> rennin signal
Vascular endothelial growth factor (VEGF165)	S, 40 mg l ⁻¹ , PHO1
Viruses	
A/VICTORIA/3/75 influenza virus neuraminidase head domain	S, 3 mg ml ⁻¹ , α -MF
Bovine herpes virus-1 glycoprotein D	S, 20 mg l ⁻¹ , α -MF
Dengue virus type 1 structural gene recombinant E protein	S, PHO1, prM virus signal sequence
Hepatitis B virus surface antigen	I, 400 mg l ⁻¹
Hepatitis B virus surface antigen-HIV gp41 epitope chimera	I
Hepatitis E virus ORF3	I
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120 (ENV)	S, 20 mg l ⁻¹ , α -MF
Polyomavirus large T antigen	I, 0.5 mg l ⁻¹
Reovirus lambda 1 core protein	I, 0.8 mg l ⁻¹
Reovirus sigma 1 protein	I
Vaccinia virus complement control protein	S, 3 mg l ⁻¹ , α -MF

Expresión de LipR en *Pichia pastoris*

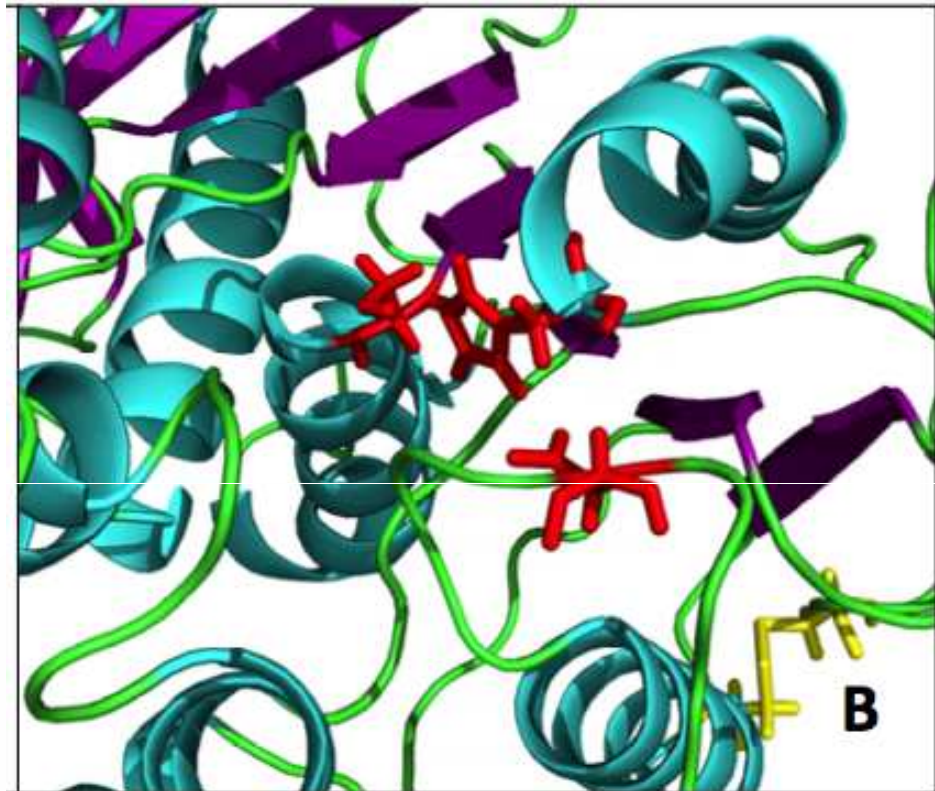
Utilizar como proteína modelo la lipasa del grampositivo *Rhodococcus* sp, para implementar con la producción de esta proteína heteróloga el sistema de expresión *Pichia pastoris*



LipR

Rhodococcus
Lipases

Expressed in
heterologous host :
E.coli Origami.
Intracellular.



- La expresión de una proteína foránea requiere la inserción del gen en un vector de expresión, para introducirlo en el genoma de una cepa de *P. pastoris* y finalmente, identificar por el marcador de selección la efectividad de la transformación, para así realizar un *screening* de expresión.

Clone gene of interest
into one of the six pPICZ
Pichia expression vectors.

Linearize construct with
Sac I, *Pme* I, or *Bst*X I.

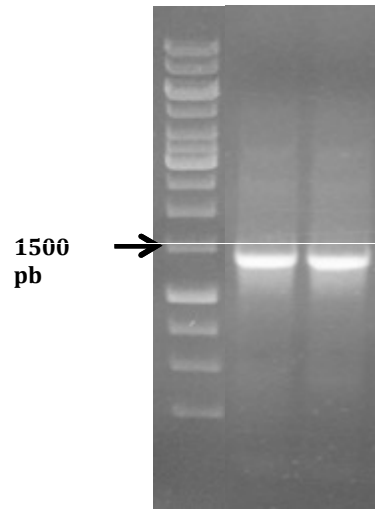
Transform appropriate *Pichia*
pastoris strain (X33 or GS115

small-scale expression.

Choose highest expressers for
large-scale expression in shake
flask or fermentor.

Amplificación y *Clonación en vectores de clonación*

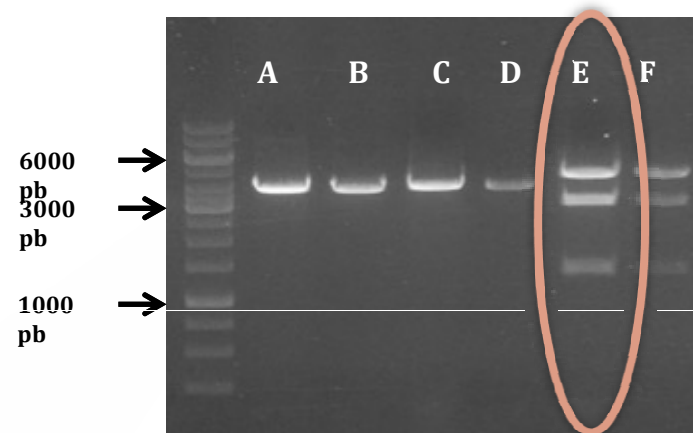
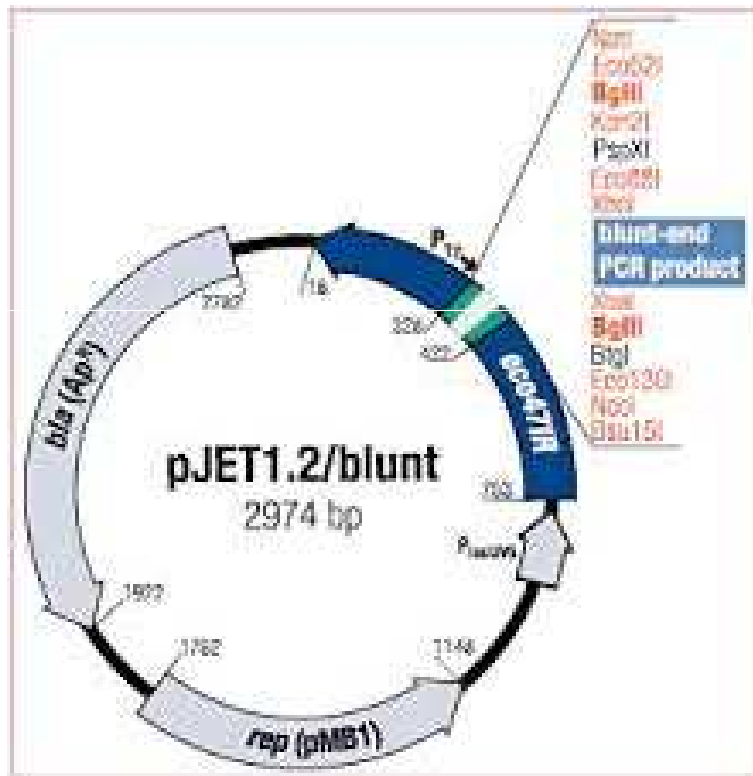
- Fw LipRsinATG E atta**GAATTC**GCATCAAAGATTCTCTTTC
- Rv LipRstop K ttt**GGTACCT**CAGCCCGCCGCGTG



Gel de agarosa al 0,8%
teñido con *sybr safe*

Amplificación y Clonación en vectores de clonación

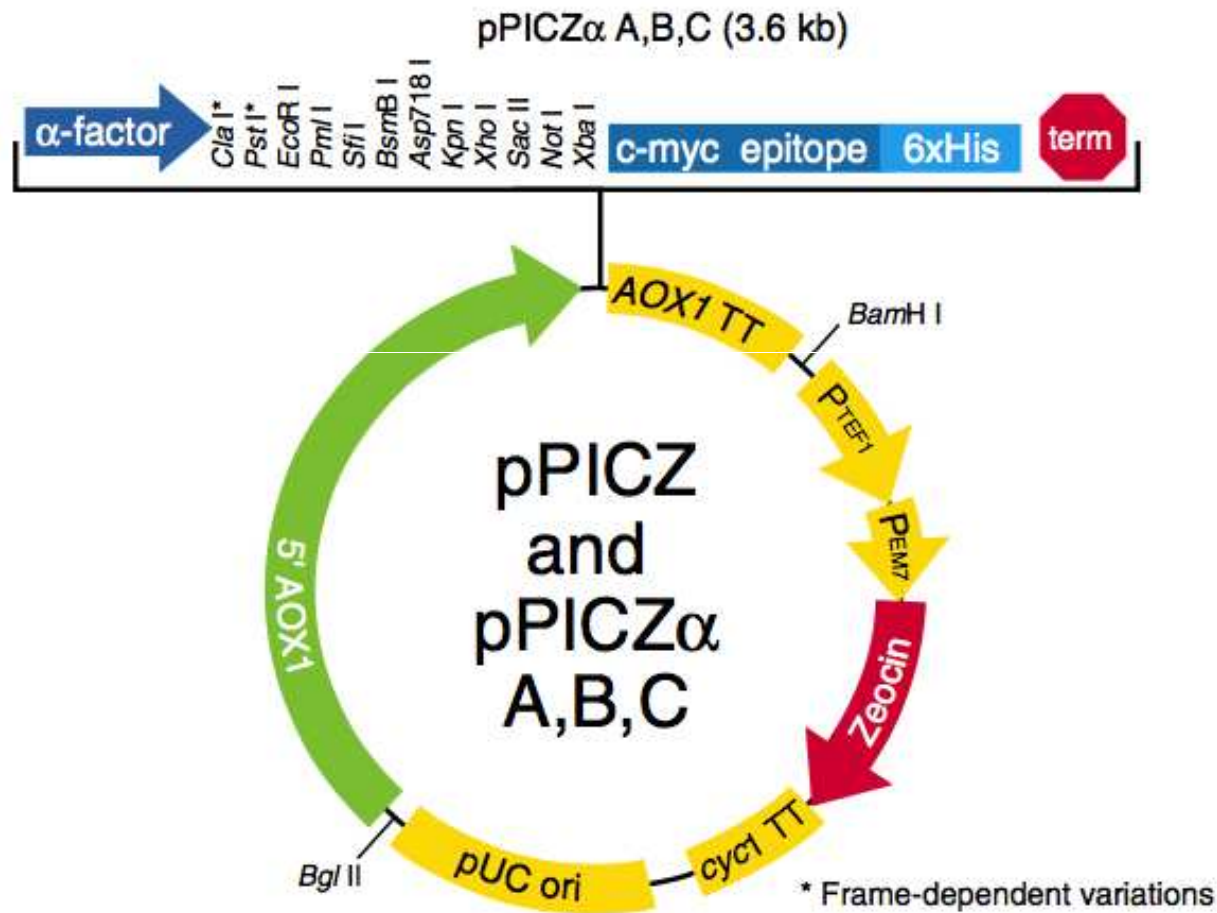
- Fw LipRsinATG E atta**GAATTC**GCATCAAAGATTCTCTTTC
- Rv LipRstop K ttt**GGTACCT**CAGCCCCGCCGCGTG

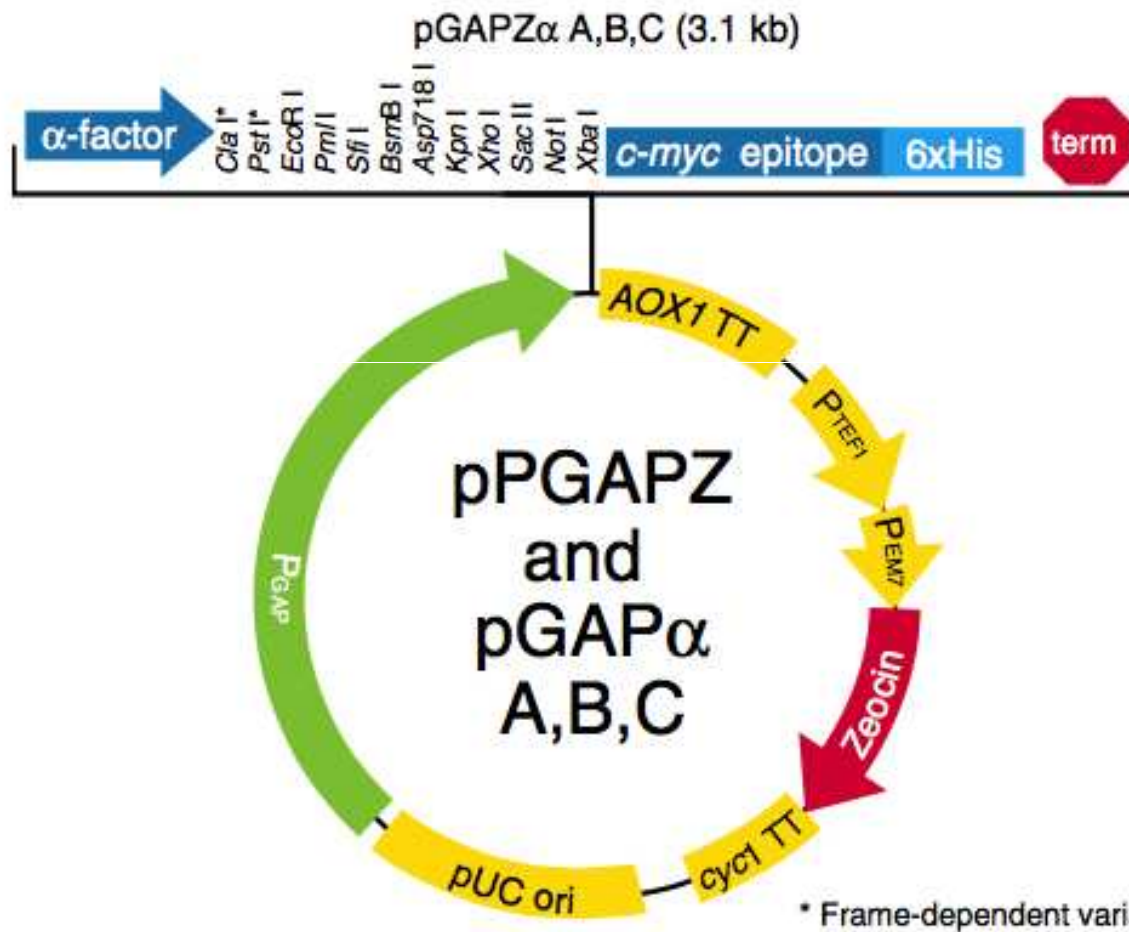


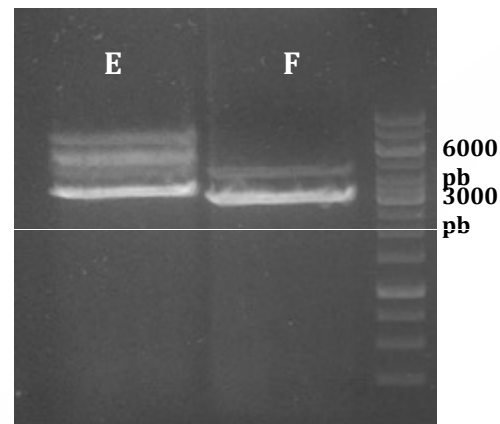
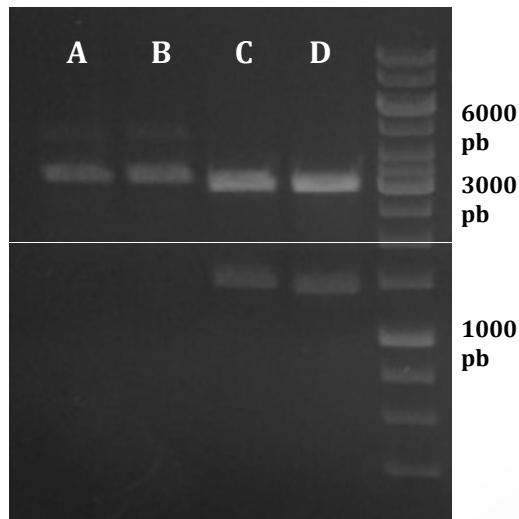
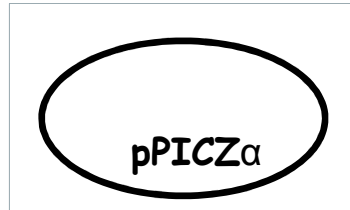
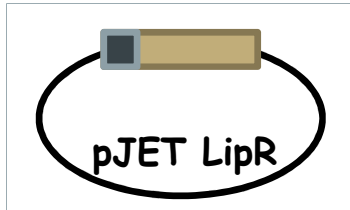
Gel de agarosa al 0,8%. Clon *E. coli* DH5α pJET-Lip 1/BglII EcoRI (A), clon *E. coli* DH5α pJET-Lip 1/EcoRI KpnI (B), clon *E. coli* DH5α pJET-Lip 2/BglII EcoRI (C), clon *E. coli* DH5α pJET-Lip 2/EcoRI KpnI (D), clon *E. coli* DH5α pJET-Lip 3/BglII EcoRI (E), clon *E. coli* DH5α pJET-Lip 3/EcoRI KpnI (F)

***E. coli* DH5α pJET-LipR**

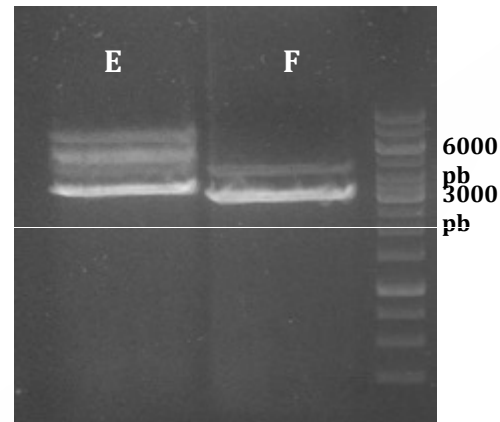
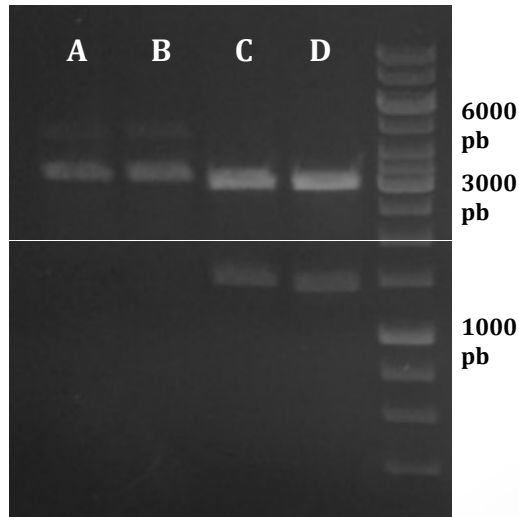
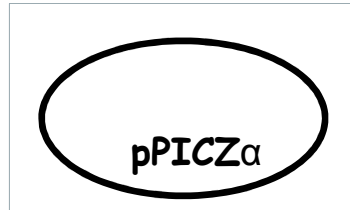
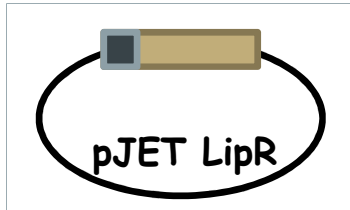
Clonación en los vectores de expresión pPICZ α y pGAPZ α , transformación a *E. coli*



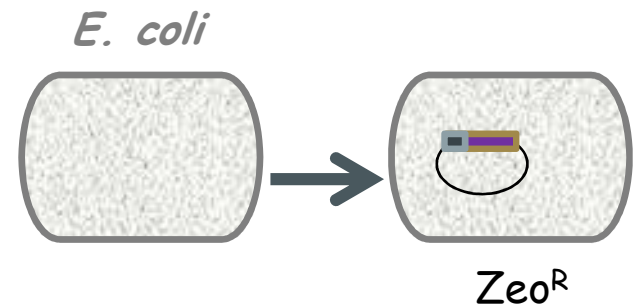


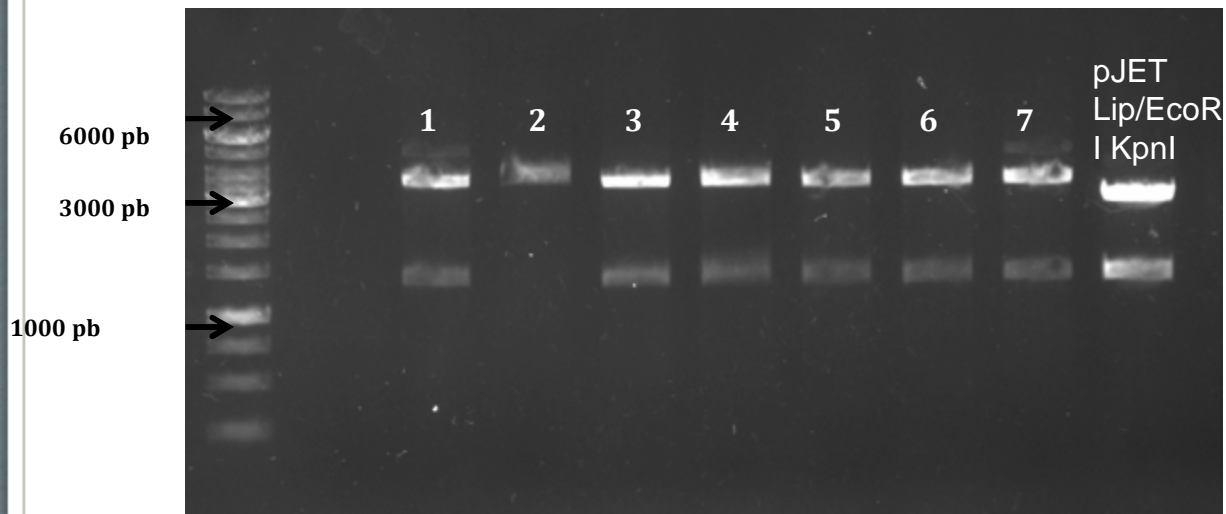


Gel de agarosa 0,8%. Digestiones *E. coli* DH5α
 pGAPZα/EcoRI KpnI (A,B), *E. coli* DH5α pJET Lip/EcoRI
 KpnI (C,D), *E. coli* DH5α pPICZα/EcoRI KpnI (E), *E. coli*
 DH5α pGAPZα/EcoRI KpnI (F)

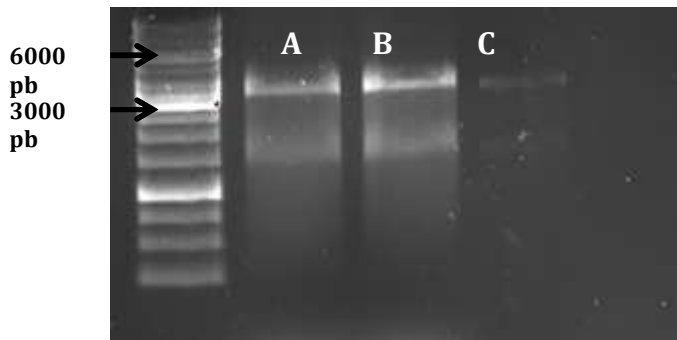


Gel de agarosa 0,8%. Digestiones *E. coli* DH5α pGAPZα/EcoRI KpnI (A,B), *E. coli* DH5α pJET Lip/EcoRI KpnI (C,D), *E. coli* DH5α pPICZα/EcoRI KpnI (E), *E. coli* DH5α pGAPZα/EcoRI KpnI (F)





Screening de clones transformantes en *E. coli*
DH5 α : pPICZ α -Lip/EcoRI KpnI

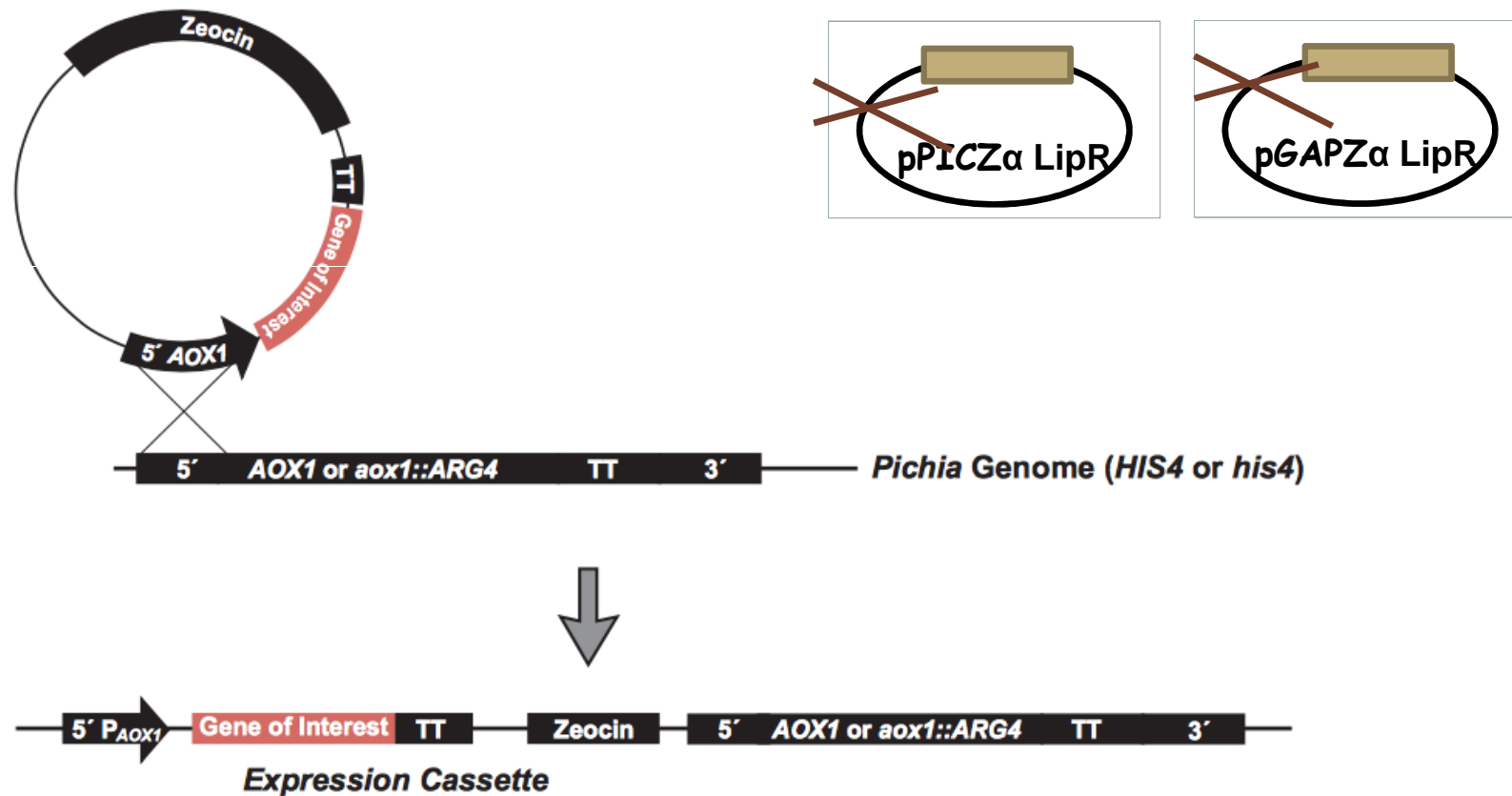


E. coli DH5 α pPICZ α -LipR

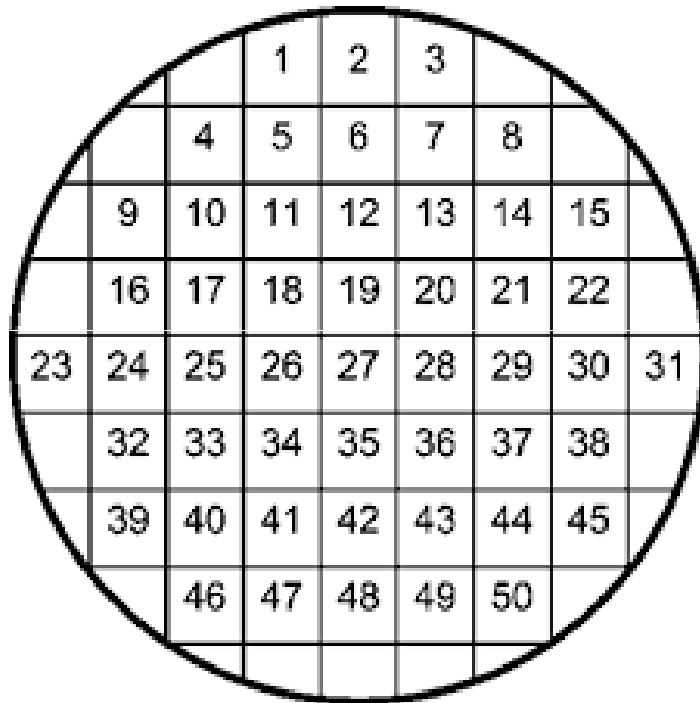
E. coli DH5 α pGAPZ α -LipR

Screening de clones transformantes en *E. coli*
DH5 α : pGAPZ α -Lip/EcoRI KpnI

Transformación de *pPICZα-LipR* y *pGAPZα-LipR* a *Pichia pastoris*



Selección con Zeo

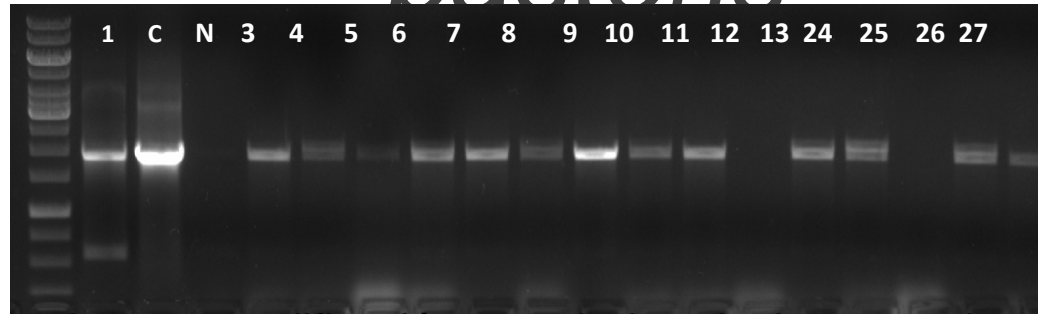


A circular grid containing numbers from 1 to 50. The grid is arranged in a roughly circular shape with 8 rows and 8 columns. The numbers are arranged in a standard grid pattern, with the first row containing numbers 1-3, the second row 4-8, the third row 9-15, the fourth row 16-22, the fifth row 23-31, the sixth row 32-38, the seventh row 39-45, and the eighth row 46-50. The numbers are arranged in a standard grid pattern, with the first row containing numbers 1-3, the second row 4-8, the third row 9-15, the fourth row 16-22, the fifth row 23-31, the sixth row 32-38, the seventh row 39-45, and the eighth row 46-50.

		1	2	3				
		4	5	6	7	8		
	9	10	11	12	13	14	15	
	16	17	18	19	20	21	22	
23	24	25	26	27	28	29	30	31
	32	33	34	35	36	37	38	
	39	40	41	42	43	44	45	
		46	47	48	49	50		

Zeocina 10

Transformación de *pPICZ α -LipR* y *pGAPZ α -LipR* a *Pichia pastoris*



Screening por amplificación a partir de colonias con *primers* AOX fw y AOX rv de clones transformantes de *P. pastoris* pPICZ α -LipR. Clones 1, 3-13 y 24-27. Control negativo (N). Control positivo (C).



Screening por amplificación a partir de colonias con *primers* α -factor fw y AOX rv de clones transformantes de *P. pastoris* pGAPZ α -LipR. Clones 1-17. Control positivo (C)

Expresión

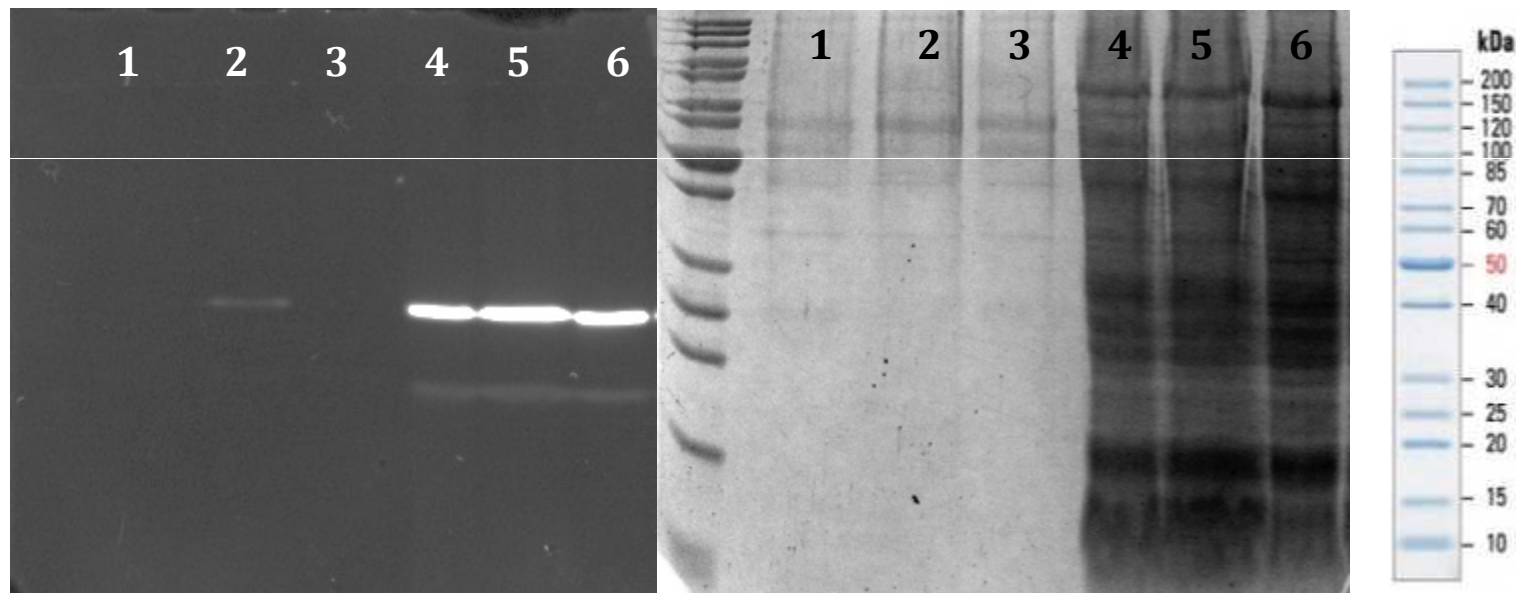
Los cultivos de alta densidad celular para producir proteínas recombinantes en *P. pastoris* son generalmente realizados como un bioproceso en varias etapas, incluyendo **3 fases** diferentes:

- **Fase de crecimiento en glicerol:** Para obtener un alto nivel de biomasa de forma rápida mientras se está reprimiendo la expresión del gen foráneo.
- **Fase de transición:** Para dereprimir el promotor AOX1
- **Fase de inducción con metanol:** Que también determina la tasa de crecimiento específico, un parámetro clave, ya que todas las reacciones biológicas para la producción de proteínas están asociados directa o indirectamente con el crecimiento celular



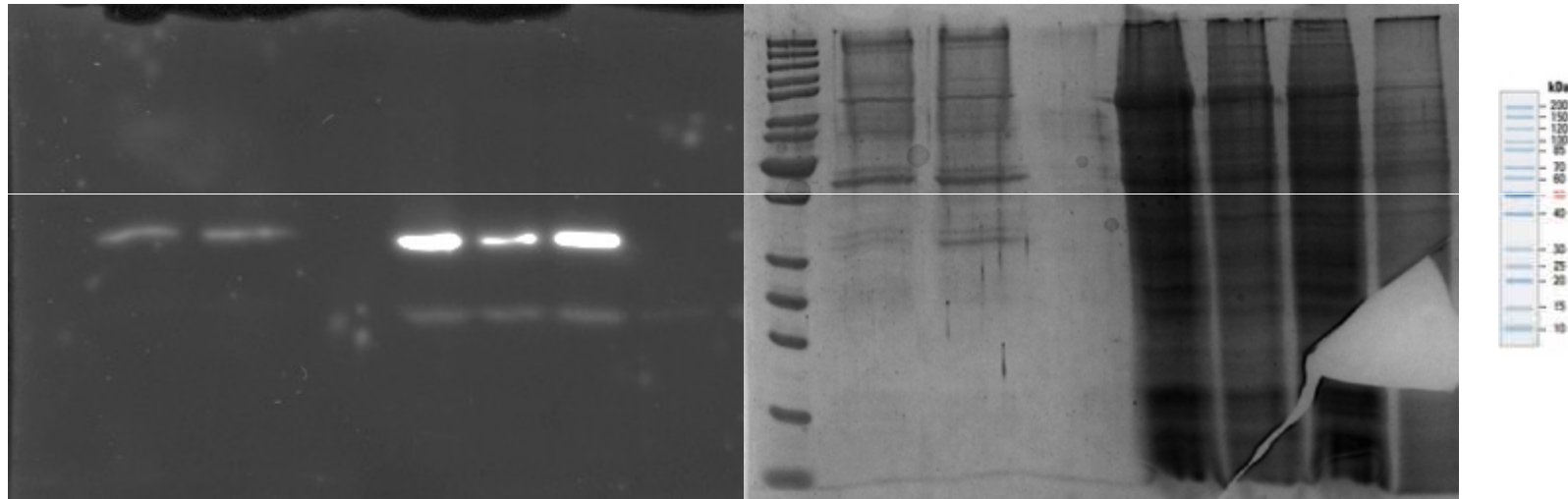
Expresión

Pichia pastoris pPICZ α –LipR clones 8, 9 y



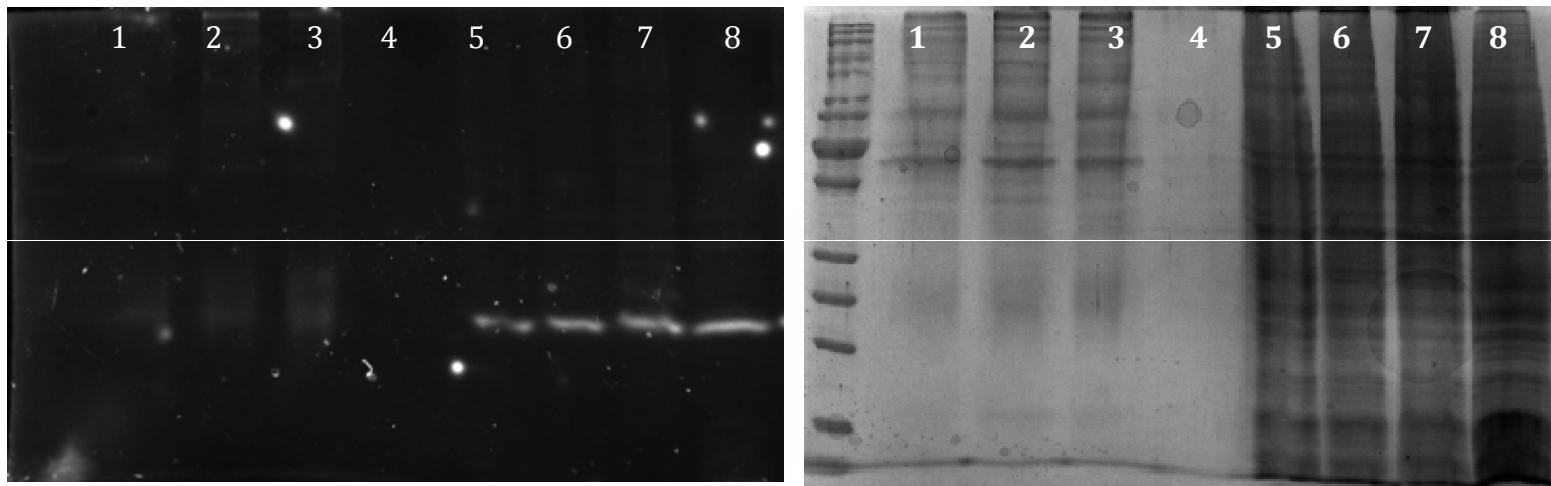
Gel SDS-PAGE expresión con el promotor AOX, Zimograma (A) y Coloración de Coomassie (B): sobrenadante de los clones 8, 9 y 15 de *Pichia X-33* pPIC α -LipR (1, 2, 3), células de los clones 8, 9 y 15 de *Pichia X-33* pPIC α -LipR

Pichia pastoris pPICZ α –LipR clones 9 y



Gel SDS-PAGE expresión con el promotor AOX, Zimograma (A) y Coloración de Coomassie (B): sobrenadante del clon 9 *Pichia* X-33 pPIC α -LipR (1), sobrenadante del clon 24 *Pichia* X-33 pPIC α -LipR (2), sobrenadante *Pichia* X-33 (3), fracción soluble del clon 9 *Pichia* X-33 pPIC α -LipR (4), fracción soluble del clon 24 *Pichia* X-33 pPIC α -LipR (5), fracción soluble del clon 9 *Pichia* X-33 pPIC α -LipR (6), fracción soluble de *Pichia* X-33 (7)

Pichia pastoris pGAPZ α –LipR clones 9 , 11 y



Gel SDS-PAGE expresión con el promotor GAP, Zimograma (A) y Coloración de Coomassie (B): sobrenadante del clon 9 *Pichia* X-33 pGAP α -LipR (1), sobrenadante del clon 11 *Pichia* X-33 pGAP α -LipR (2), sobrenadante del clon 12 *Pichia* X-33 pGAP α -LipR (3), sobrenadante *Pichia* X-33 (4), fracción soluble del clon 9 *Pichia* X-33 pGAP α -LipR (5), fracción soluble del clon 11 *Pichia* X-33 pGAP α -LipR (6), fracción soluble del clon 12 *Pichia* X-33 pGAP α -LipR (7), fracción soluble de *Pichia* X-33 (8)

Optimización de la Expresión

- Fermentación
- Optimización de codones

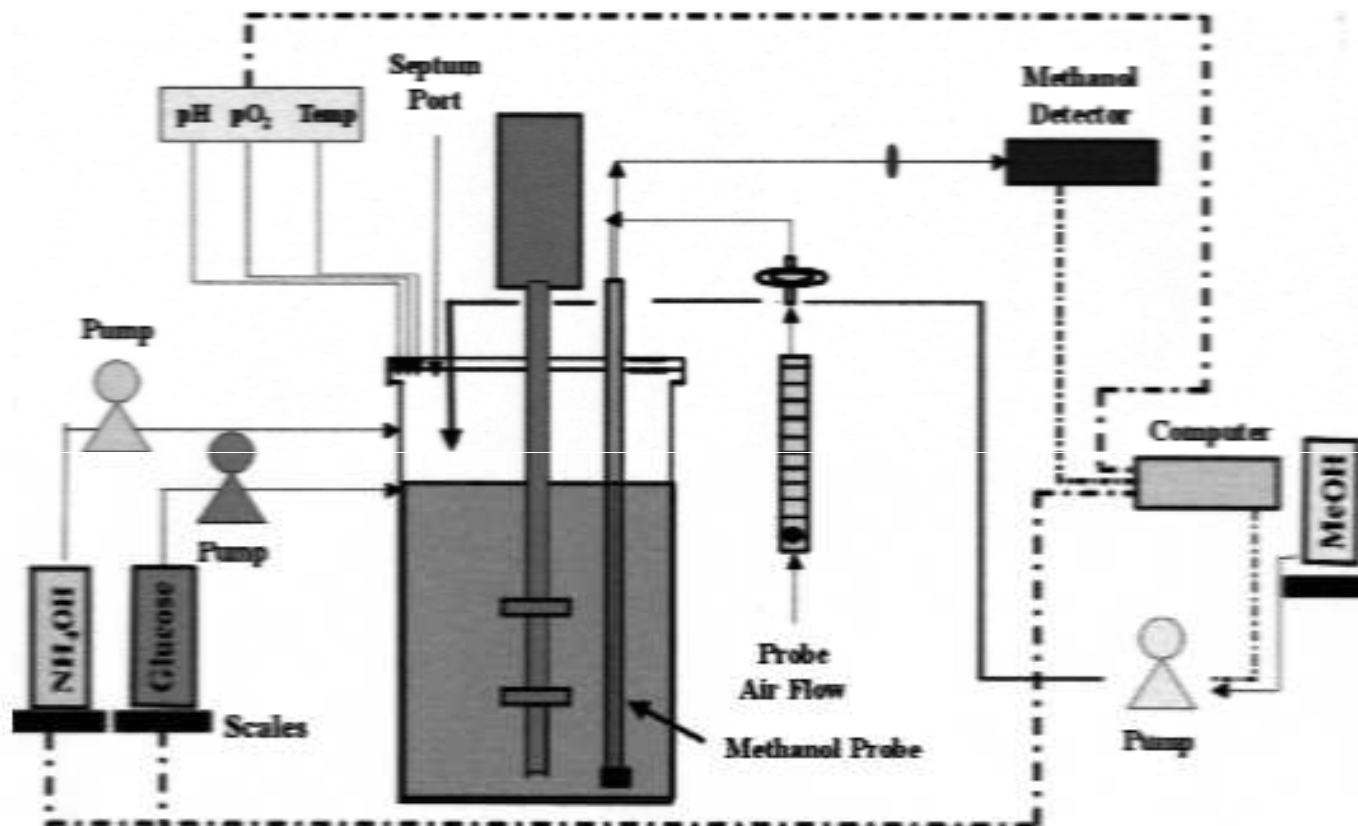
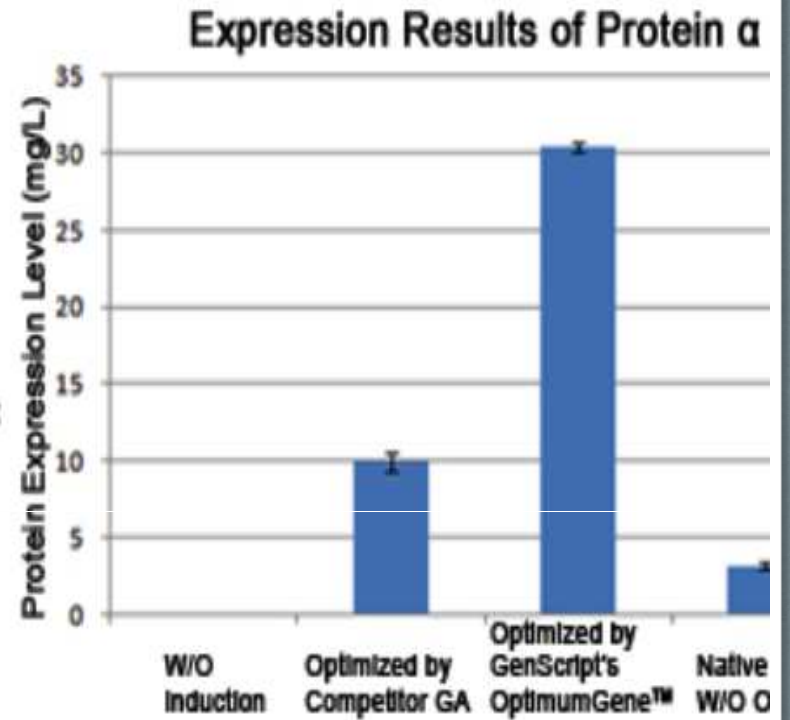
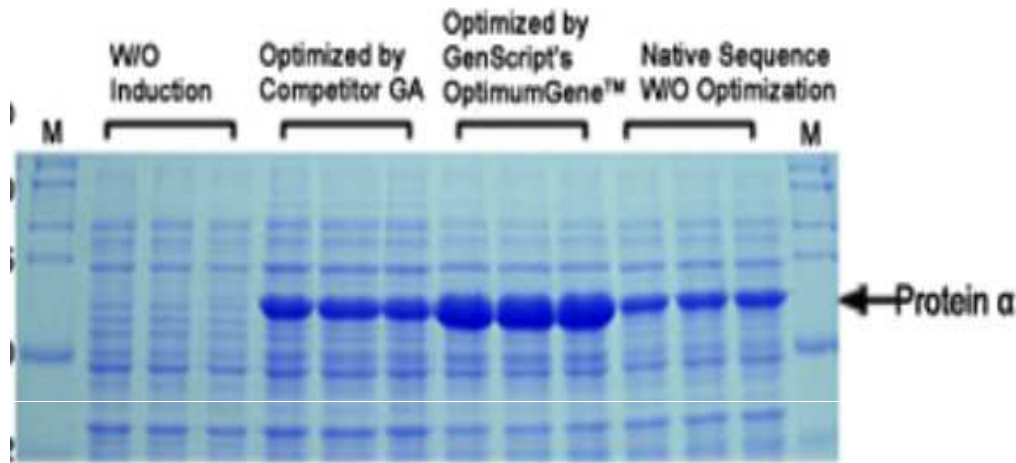


Figure 1. Schematic representation of 3-L fermentor set-up with on-line monitoring and control of methanol concentration. On-line measurement of pH, dissolved oxygen concentration, temperature, methanol concentration, and nutrient addition are interfaced with a computer data logging system.



- Optimización de codones



A Simple and Accurate Two-Step Long DNA Sequences Synthesis Strategy to Improve Heterologous Gene Expression in *Pichia*

Jiang-Ke Yang^{1*}, Fang-Yuan Chen¹, Xiang-Xiang Yan², Li-Hong Miao¹, Jiang-Hong Dai¹

¹School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, China, ²School of Life Science, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, China

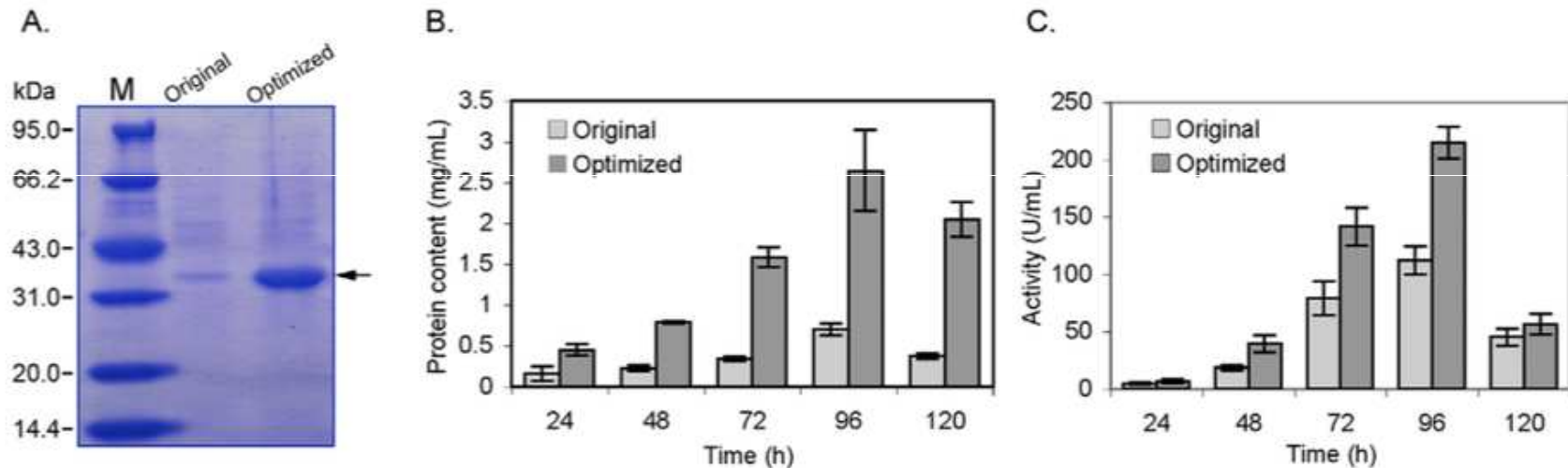


Figure 6. Expression profiles of yeast recombinants carrying original and codon optimized *ROL* gene (*ROL-syn*). (A) SDS-PAGE analysis of protein in fermentation broth after methanol induced for 48 h. About 20 μ L protein solution per sample was loaded into the gel stained by coomassie blue G-250 after running. Protein content (B) and lipase activity (C) of fermentation broth of yeast recombinants carrying original and codon optimized *ROL* genes.

doi:10.1371/journal.pone.0036607.g006

Agradecimientos

