



PIBITI/CNPq/UFCG-2012

## EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DO TIPO *PR-5* EM *Pichia pastoris* E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA CONTRA FUNGOS DE INTERESSE AGRÔNOMICO

Cristianne Costa A. de Souza<sup>1</sup>, Magnólia de Araújo Campos<sup>2</sup>

### RESUMO

A expressão de proteínas em sistemas heterólogos representa uma poderosa ferramenta para a produção em grande escala de proteínas de interesse, visando demonstrar sua atividade ou aplicações biotecnológicas. Em nosso laboratório foi isolado um gene do tipo *PR-5* de *Physalis angulata* que codifica uma proteína antifúngica, denominada PaOLP. Neste trabalho foi realizada a subclonagem do gene *PaOLP* do vetor de clonagem pGEM-T-Easy para o vetor de expressão em *Pichia pastoris* pPICZ $\alpha$ -A. O gene *PaOLP* foi mutado por PCR, para deletar as regiões codificadoras dos peptídeos sinal e carboxi-terminal, e foi clonado em células de *Escherichia coli* cepa XL-1 Blue, as quais foram resistentes a zeocina e positivas para PCR de colônia usando os primers universais SP6 e T7 e para digestão do DNA plasmidial com enzimas apropriadas. A estratégia de subclonagem utilizada deve levar a expressão de uma proteína *PaOLP* recombinante madura, com direcionamento para o meio extracelular de células de leveduras *Pichia pastoris* e com uma calda de histidina apropriada para a purificação por cromatografia de afinidade por metais imobilizados. A introdução do vetor pPICZ $\alpha$ -A conduzindo o gene *PaOLP* mutado em células competentes de *Pichia pastoris*, e posterior expressão gênica para a produção da proteína PaOLP madura de fusão em larga escala, são os assuntos atuais desta pesquisa.

**Palavras-chave:** proteína antimicrobiana, genes *PR-5*, proteína recombinante.

### ABSTRACT

The protein expression in heterologous systems represents a power tool in order to produce in large scale important proteins, aiming to demonstrate their activity or biotechnological applications. In our laboratory it was isolated a PR5-like gene from *Physalis angulata* that encodes an antifungal protein, denominated PaOLP. In this work it was performed the subcloning of the *PaOLP* gene, from pGEM-T Easy cloning vector to the pPICZ $\alpha$ -A *Pichia pastoris* expression vector. The *PaOLP* gene was mutated by PCR to delete regions encoding the signal and carboxi-termini peptides, and cloned into *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  cells, which were zeocin selected and positives for colony PCR using universal SP6 and T7 primers and for digestion using appropriated enzymes. The used sub-cloning approach may lead to expression of a mature recombinante PaOLP protein, with sorting to the extracellular medium of *Pichia pastoris* yeast cells and possessing an appropriated His-tag to purification on immobilized metal affinity chromatography. The introduction of the pPICZ $\alpha$ -A vector leading the mutated *PaOLP* gene into the *Pichia pastoris* competent cells, and posterior gene expression to in large scale production of the fusion mature PaOLP protein, are the current subjects of this research.

**Keywords:** antimicrobial protein, *PR-5* genes, recombinant protein.

<sup>1</sup> Aluna do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Unidade Acadêmica de Saúde, UFCG, Cuité, PB, E-mail: cris\_cas18@hotmail.com

<sup>2</sup> Biologia Molecular, Professor. Doutor, Unidade Acadêmica de Educação, UFCG, Cuité, PB, E-mail: magnoliaacp@ufcg.edu.br