

Posteriormente, para el medio de cultivo de cada cepa se evaluó la producción de HGhr de la siguiente manera:

$$\mu\text{g/ml HGhr} = (\text{PT}) \times (\% \text{ R } 22 \text{ kDa})$$

Donde:

PT: Proteínas totales ($\mu\text{g/ml}$) obtenidas mediante Bradford.

% R 22 kDa: Porcentaje relativo de la banda de 22 kDa correspondiente a HGhr respecto al resto de las proteínas presentes para cada medio de cultivo, analizado en cada carril del gel mediante el sistema Gel Doc de Bio Rad.

Además para conocer la sobreproducción de HGh respecto a la cepa unicopia, se tomó el valor de HGh de la cepa unicopia como un 100 %, y a partir de éste se determinó el porcentaje de sobreproducción (TABLA 5).

Se presenta un gel SDS-PAGE de los medios de cultivo de las cepas unicopia, 1, 19 y 76 (Figura 19) dializados y concentrados 10 veces, así como un perfil típico de pureza obtenido mediante el sistema Gel Doc de Bio Rad (Figura 20).

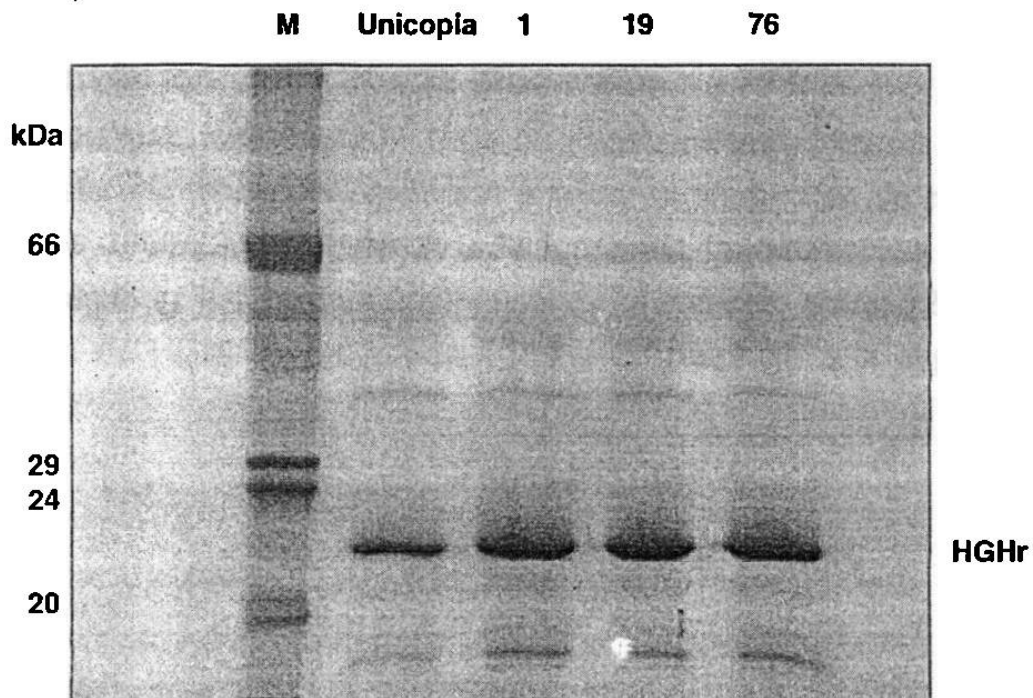


Figura 19. Gel SDS-PAGE de los medios de cultivo dializados y concentrados al vacío provenientes de las cepas unicopia, 1, 19 y 76. M: marcador de peso molecular. El contenido de cada carril equivale a 200 μl de medio de cultivo. La banda de 22 kDa corresponde a la HGhr.

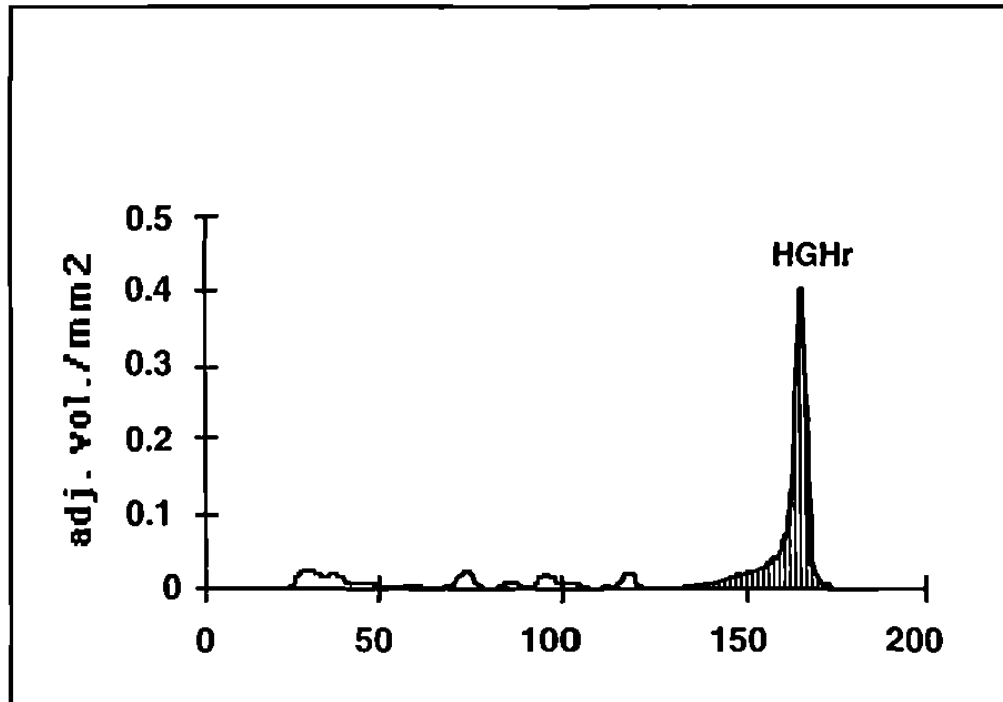


Figura 20. Densitograma del perfil de pureza de HGhr correspondiente a la cepa GS115hGH22KG418-1, en el que HGhr tiene un 79 % de pureza de acuerdo al análisis en el Gel Doc de Bio Rad.

3.3.4 Correlación del PCR y la producción de HGhr

Existe una tendencia positiva al analizar la producción de HGhr contra el cociente 1060/2200 (Figura 21). Si tomamos la producción de la cepa unicopia como un 100 %, podremos observar el aumento de un 22-44 % de la producción de HGhr de las cepas 1, 19 y 76 respecto a la cepa unicopia (Figura 22).

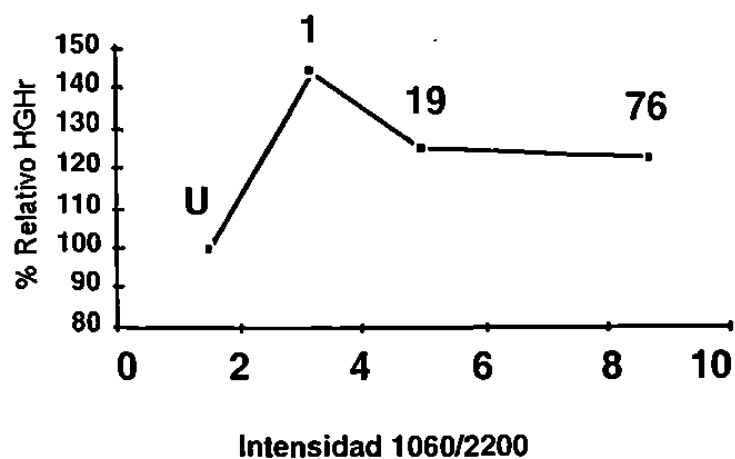


Figura 21. Gráfica del incremento en la producción de HGhr vs el cociente de las intensidades de las bandas 1060/2200 del PCR, al comparar la cepa unicopia (U) con las cepas construidas (1, 19 y 76).

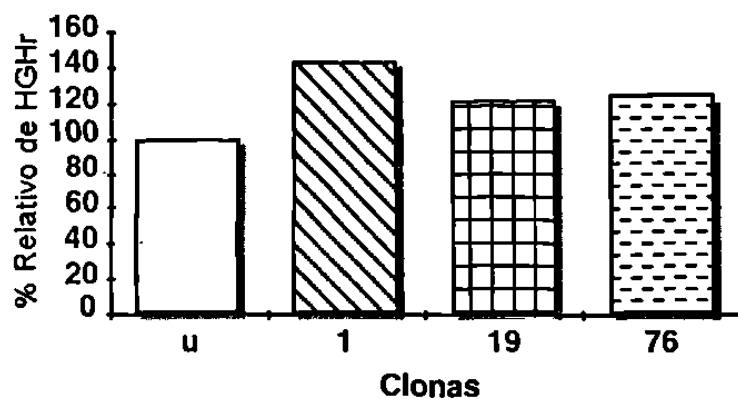


Figura 22. Gráfica del porcentaje relativo de HGhr de las cepas construidas (1, 19 y 76) respecto a la cepa unicopia (u). Se observa un aumento de hasta un 44 %.

3.4 Sistemas de purificación

3.4.1 Precipitación con sulfato de amonio

Para el análisis en gel SDS-PAGE del precipitado y el sobrenadante se efectuó la estimación cuantitativa de las intensidades de las bandas correspondientes a HGhr, así como la evaluación de sus purezas, considerando las cantidades colocadas en cada carril. Los resultados se presentan en la TABLA 6, y en la Figuras 23 y 24.

TABLA 6

RESULTADOS DE LA PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO.

	Volumen total ml	Volumen al gel μ l	Cuentas totales D.O.*mm ²	% de recuperación	% de HGhr (pureza)
Sobrenadante	300	100	8232	68	67
Precipitado	100	5	3863	32	84

Los cálculos se efectuaron de la siguiente manera:

$$\left(\text{Vol. total ml} \times \text{cuentas D.O.} \times \text{mm}^2 \right) \times 1000 / \text{Vol al gel } \mu\text{l}$$

Se encontró que un 68 % de la HGhr permanece en el sobrenadante, mientras que un 32 % en el precipitado. Esto nos indica que al menos en las condiciones ensayadas, la precipitación con sulfato de amonio es ineficiente para separar la HGhr del resto de las proteínas.

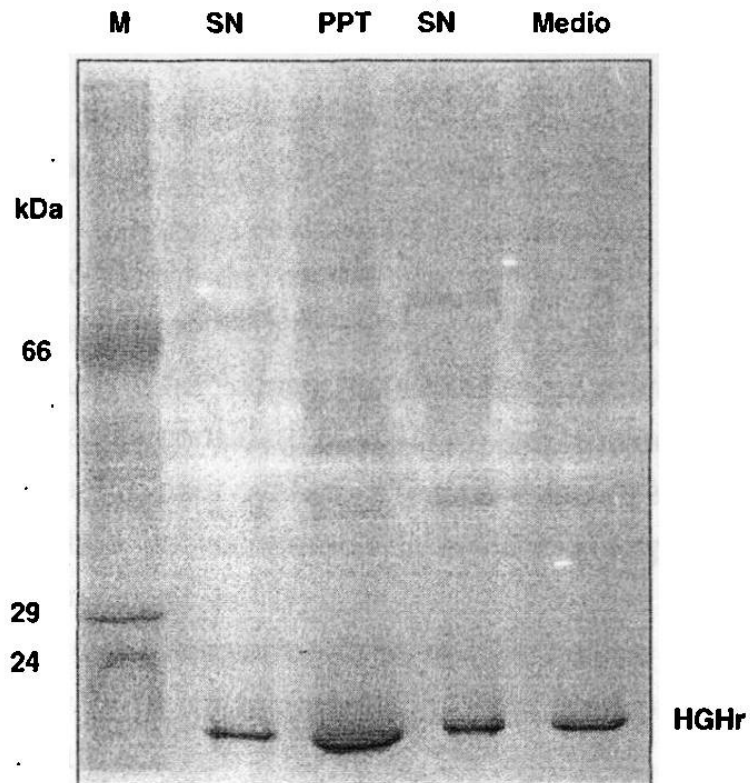


Figura 23. Gel SDS-PAGE en el que se evaluó la precipitación con sulfato de amonio. En los carriles se muestra el marcador de peso molecular (M), sobrenadante (SN), precipitado (PPT) y medio completo. La banda de 22 kDa corresponde a HGHR.

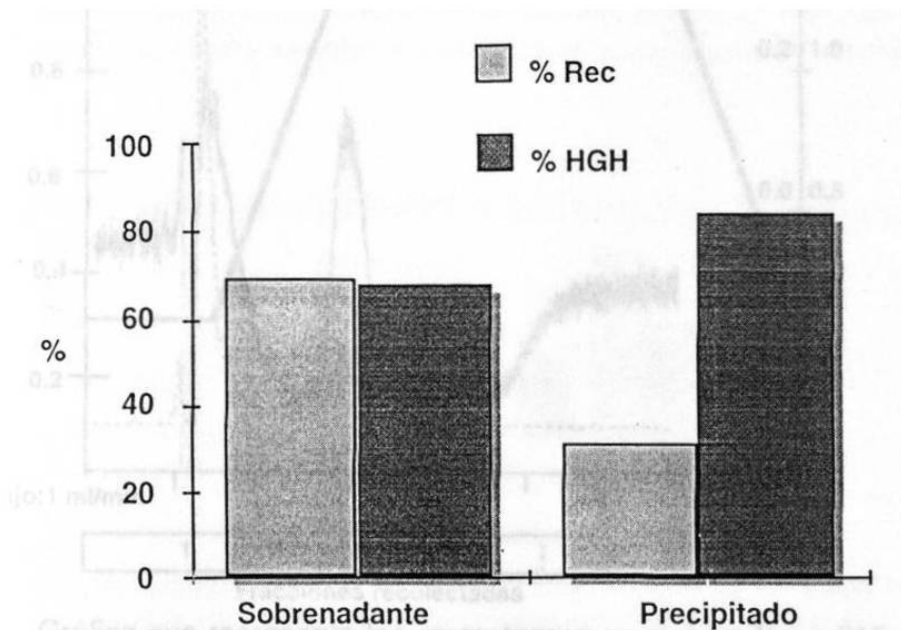


Figura 24. Gráfica de los resultados de la evaluación de la precipitación con sulfato de amonio por SDS-PAGE. Se observa que la mayor parte permanece en el sobrenadante.

3.4.2 Cromatografía de intercambio iónico

3.4.2.1 Ensayo A

Se empezó 1 ml de medio de cultivo producido por la cepa GS115hGH22K-unicopia en una fermentación a nivel fermentador ajustado a pH 8 y dializado. Las 5 fracciones recolectadas se representan en la Figura 25. De cada fracción se consideró el volumen recolectado y aplicado en el gel SDS-PAGE (Figura 26), para evaluar la recuperación de HGhr. Finalmente, se calculó el porcentaje de recuperación, así como el porcentaje de HGhr presente en cada fracción.

Se calculó que la mayor parte de la HGhr eluye en la fracción 4, que corresponde a un 65 % de recuperación. Esta fracción contiene la mayor pureza de HGhr que equivale a un 40 %. Un porcentaje importante se pierde en la fracción 2 (34 %), en la que la pureza de HGhr es menor (20 %) (Figuras 27 y 28).

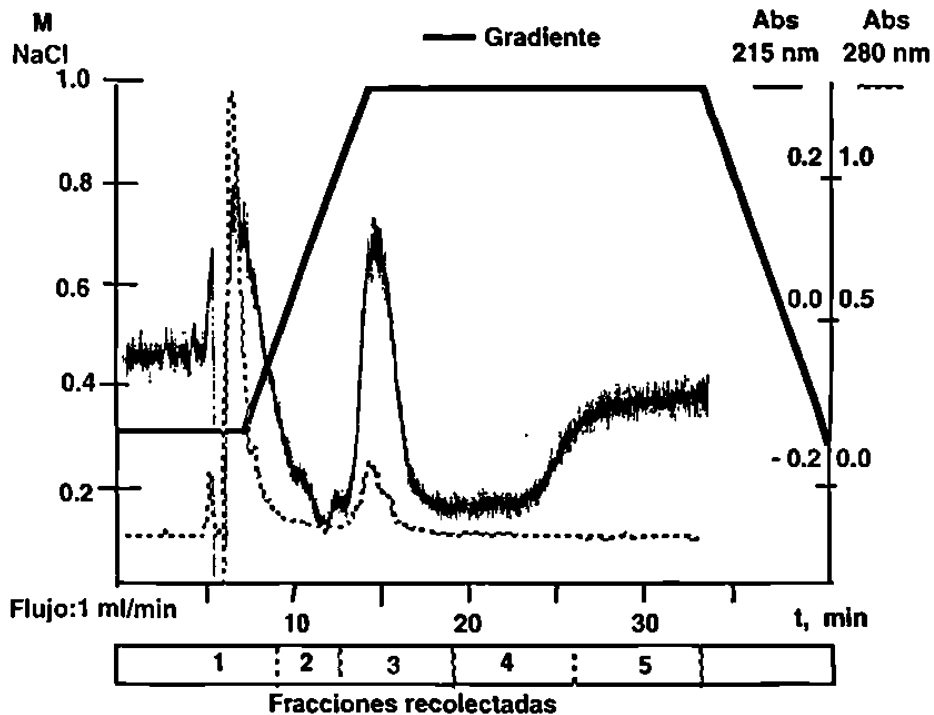


Figura 25. Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico A, así como las fracciones recolectadas.

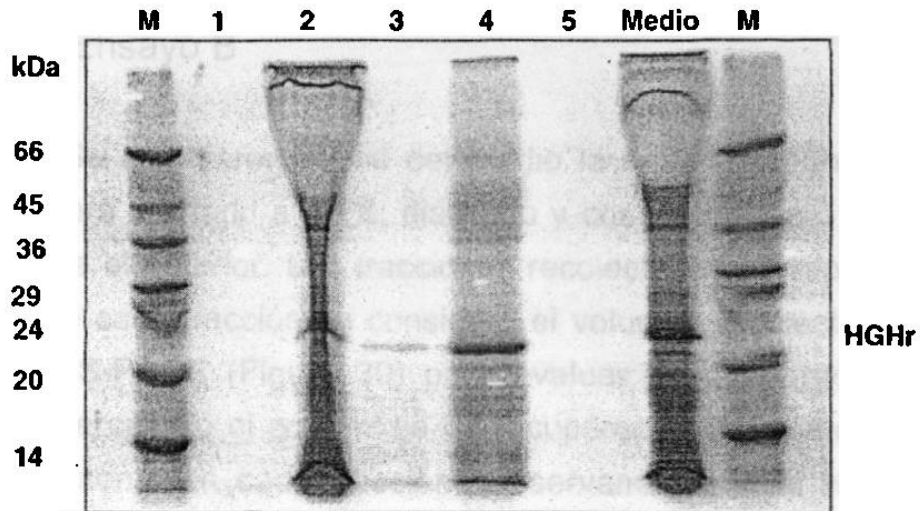


Figura 26. Gel SDS-PAGE de las 5 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico A. La banda de 22 kDa representa la HGHR.

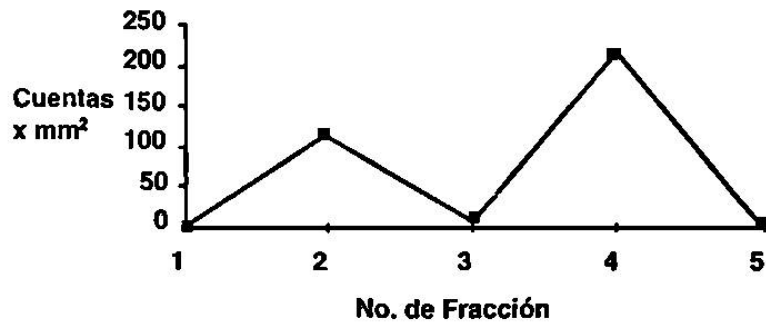


Figura 27. Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm² para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico A.

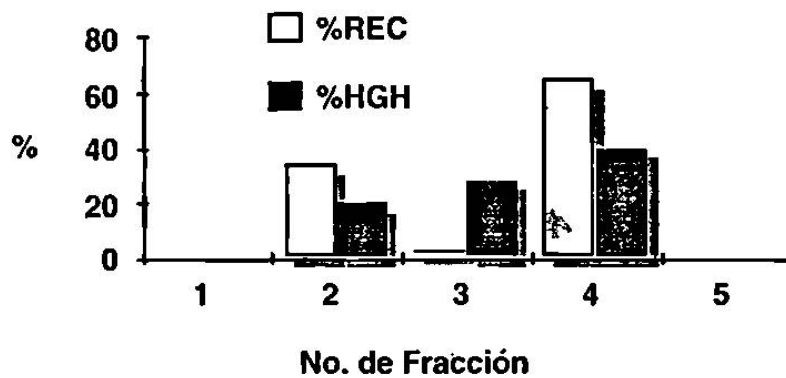


Figura 28. Representación del porcentaje de HGHR presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico A.

3.4.2.2 Ensayo B

Se emplearon 10 ml del medio la cepa GS115hGH22KG418-1 sobreproductora ajustado a pH 8, dializado y concentrado a 1 ml. El sistema de elución fue el anterior. Las fracciones recolectadas se representan en la Figura 29. De cada fracción se consideró el volumen recolectado y aplicado en el gel SDS-PAGE (Figura 30) para evaluar la recuperación de HGhr. Finalmente, se calculó el porcentaje de recuperación así como el porcentaje de HGhr presente en cada fracción. Observamos que la HGhr no eluye mayoritariamente en una fracción, sino que se reparte en las fracciones 2 a la 8. Se observa que la mayor parte de la HGhr eluye en la fracción 3, que corresponde a un 42 % de recuperación, aunque con una pureza muy pobre (46 %). De acuerdo a lo observado en el ensayo A, se esperaba que la fracción mayoritaria fuera la 5, sin embargo esta corresponde a tan sólo un 16 % de HGhr, con una pureza de 76 % (Figuras 31 y 32).

Se eligió efectuar un cambio en el método cromatográfico con el fin de mejorar la recuperación de HGhr, que corresponde al ensayo C.

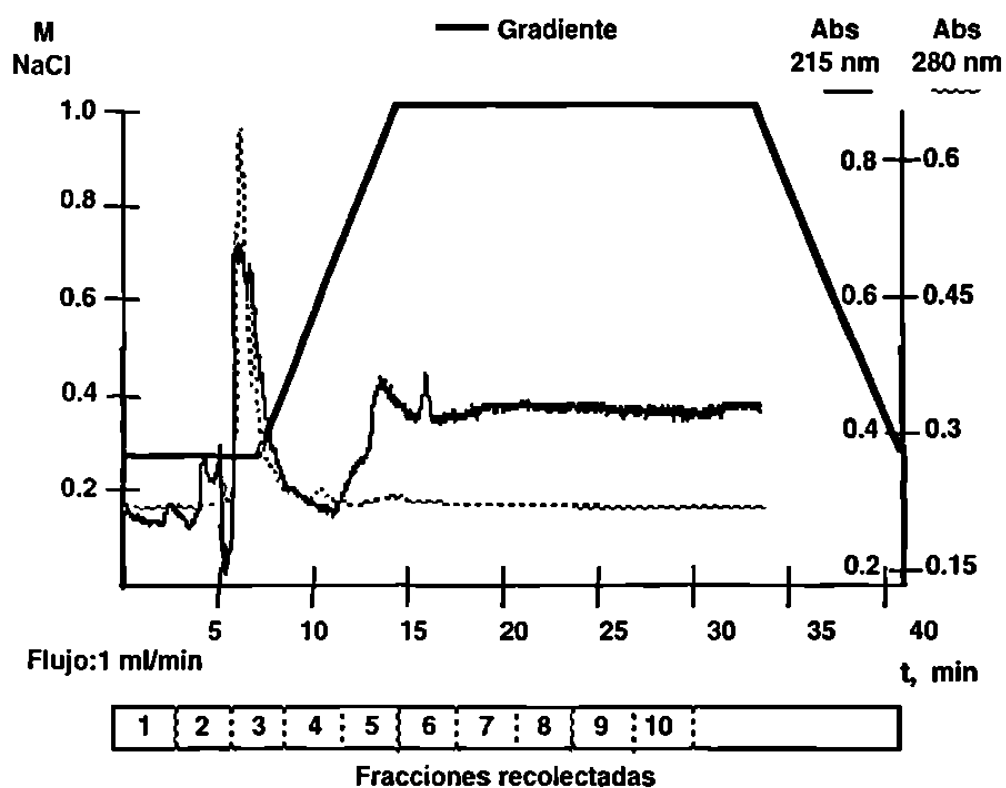


Figura 29. Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico B, así como las fracciones recolectadas.

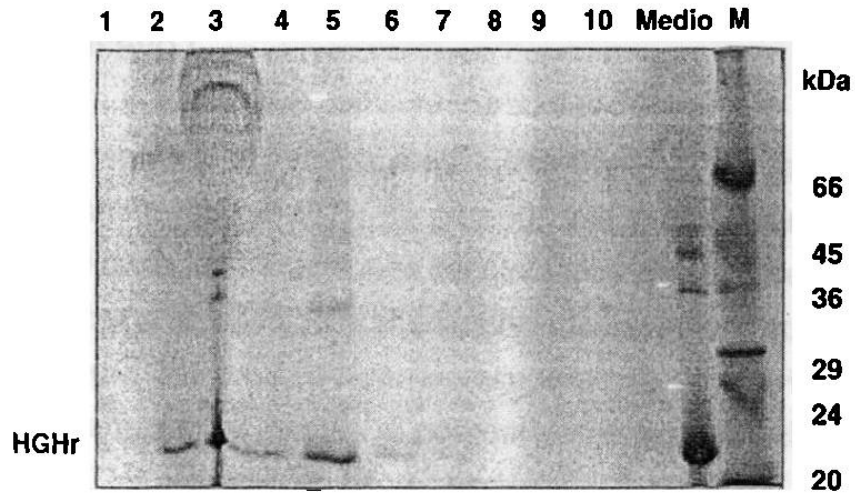


Figura 30. Gel SDS-PAGE de las 10 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico B. la banda de 22 kDa corresponde a HGhr.

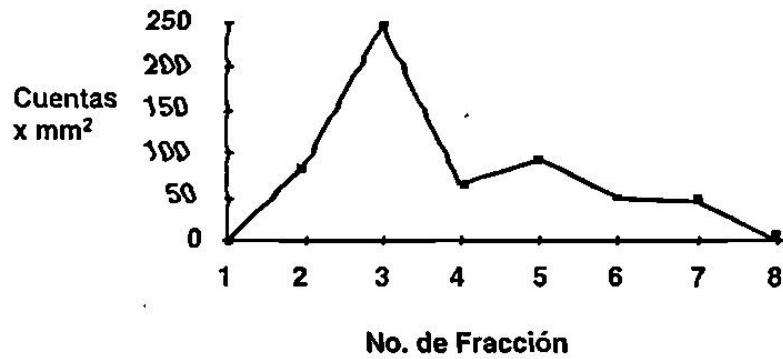
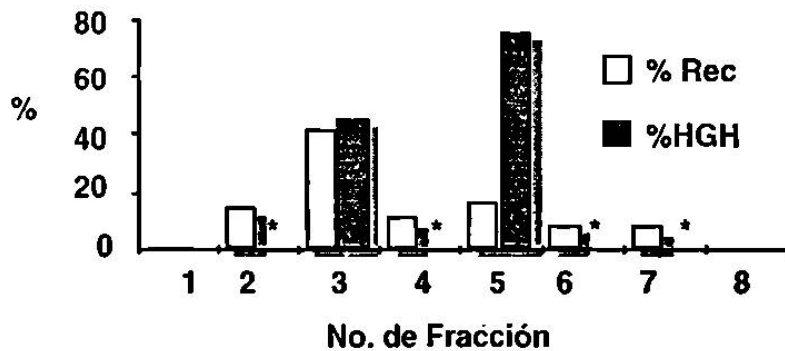


Figura 31. Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm² para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico B, en las que se detecta HGhr mediante SDS-PAGE.



* No determinado

Figura 32. Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico B.

3.4.2.3 Ensayo C

Se empleó el mismo medio del Ensayo B y la velocidad del gradiente se disminuyó con el fin de permitir una mejor interacción entre la muestra y la columna. Las fracciones recolectadas se representan en Figura 33. De cada fracción se consideró el volumen recolectado y aplicado en el gel SDS-PAGE (Figura 34) para evaluar la recuperación de HGhr. Igual que en los ensayos anteriores, se calculó el porcentaje de recuperación así como el porcentaje de HGhr presente en cada fracción.

Observamos resultados similares al ensayo B. La HGhr no eluye mayoritariamente en una fracción, sino que como en el segundo ensayo se reparte en diversas fracciones (2 a la 7). Se observa que la mayor parte de la HGhr eluye en la fracción 3, que corresponde a un 48 % de recuperación, y con una pureza muy pobre (46 %). La fracción 6 corresponde a un 15 % de HGhr, con una pureza del 81 % (Figuras 35 y 36).

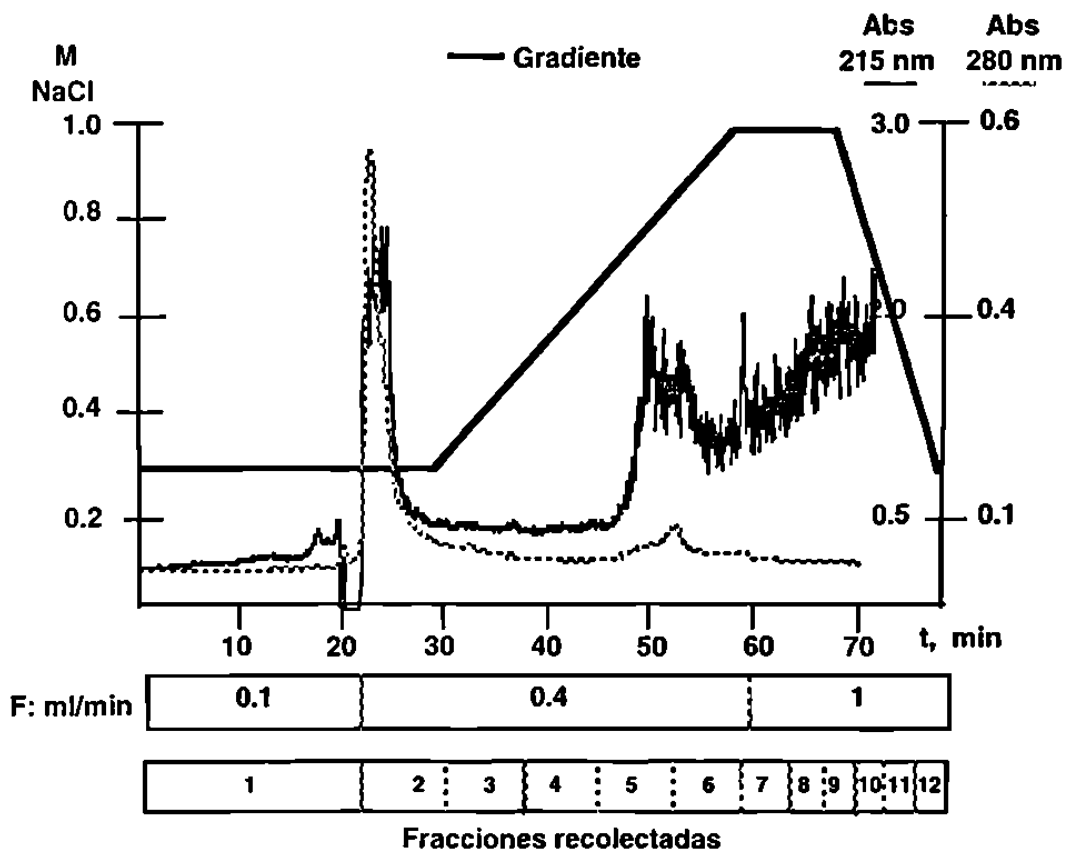


Figura 33. Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico C, la velocidad del flujo de fase móvil, así como las fracciones recolectadas.

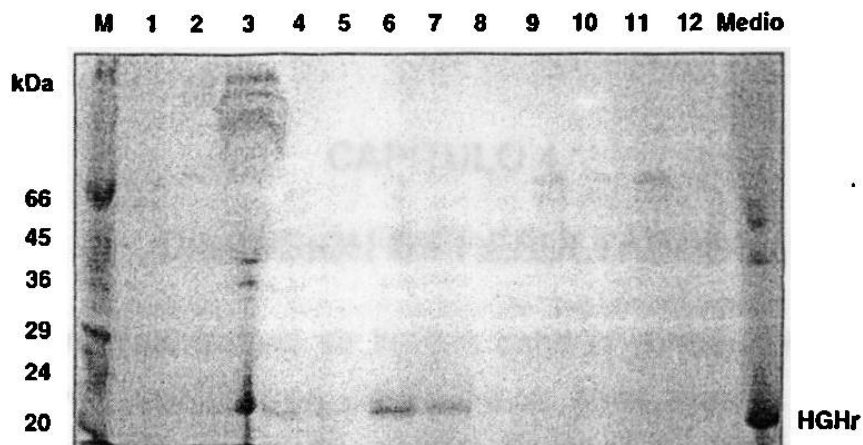


Figura 34. Gel SDS-PAGE de las 12 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico C. La banda de 22 kDa representa la HGhr.

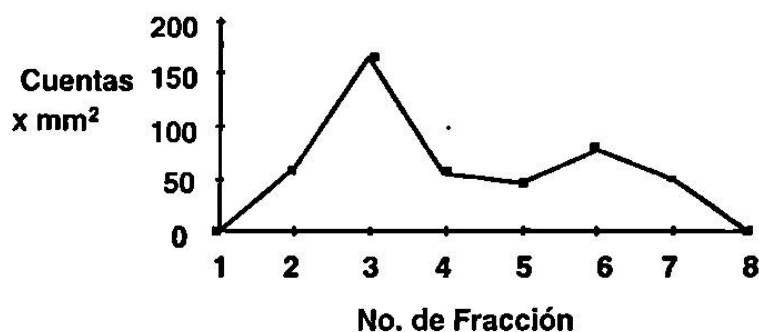
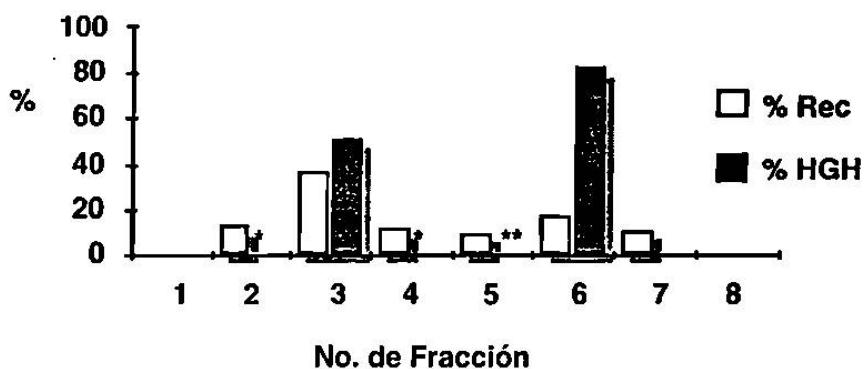


Figura 35. Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm² para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico C, en las que se detecta HGhr mediante SDS-PAGE.



* No determinado

Figura 36. Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico C.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se llevó a cabo la construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de HGhr a nivel matraz. Se logró una sobreproducción de HGhr de un 44 % respecto a la cepa unicopia previamente construida (33). Se evaluaron esquemas de purificación para HGhr mediante precipitación con sulfato de amonio e intercambio aniónico. Sin embargo, con las condiciones de trabajo empleadas no se obtuvieron buenos resultados, por lo que se sugiere evaluar más exhaustivamente las variables empleadas.

Construcción del vector pPIC9KhGH22K

Para construir el vector pPIC9KhGH22K existían dos posibilidades: la ligación del fragmento de ADNc de HGH con el vector pPIC9hGH22K para obtener el vector recombinante pPIC9KhGH22K, y la religación de fragmentos del vector pPIC9K. La proporción 1:4 vector:inserto nos permitió asegurar el primero sin necesidad de purificar todos los fragmentos de interés, simplificando el proceso de clonación. La transformación de la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue con 75 ng de la reacción de ligación generó 1009 colonias, de las cuales se seleccionaron 36 colonias al azar. El DNA plasmídico de 20 de las clonas presentó un patrón de movilidad electroforético menor que pPIC9K y por tanto sugestivo de poseer el inserto adecuado. La caracterización enzimática de los ADNs con *Bgl II* confirmó su identidad (56 % de las clonas seleccionadas).

Se seleccionó la clona 34 y su identidad fué confirmada más exhaustivamente con las enzimas *Sac I-Not I*, *Pvu II* y *Pst I*, presentando los patrones de digestión esperados de acuerdo al programa DNA Strider.

Construcción de la cepa recombinante de *Pichia pastoris*

La transformación esferoplastos con 10 μg del vector pPIC9KhGH22K linearizado con *Sac I* produjo un total de 80 cepas de *Pichia pastoris*. Esto representa una eficiencia muy baja (8 clonas por μg de ADN) respecto a lo reportado por el fabricante del estuche (10^3 a 10^4 transformantes por μg de ADN) (64). Esto puede deberse a las condiciones experimentales (pureza del ADN, control adecuado en la cinética de esferoplastos) ya que fue la primera vez que se empleó ésta técnica de transformación en nuestro laboratorio.

Para corroborar la integración del cassette de expresión se seleccionaron algunas cepas de *Pichia pastoris* al azar y se empleó la enzima liticosa para obtener un extracto crudo a partir del cual se realizó directamente el PCR, sin necesidad de purificar el ADN genómico de *Pichia pastoris* por las técnicas convencionales. Esto permitió analizar rápidamente un gran número de cepas de *Pichia pastoris* invirtiendo un tiempo mínimo en el proceso. El análisis del producto de PCR en gel de agarosa al 1 % confirmó la presencia de las bandas de 2200 y 1060 pb en las levaduras transformadas, lo cual indica que la integración del cassette de expresión al genoma de *Pichia pastoris* fue por inserción, ya que si hubiera reemplazamiento se obtiene sólo la banda de 1060 pb.

Selección de la cepa sobreproductora

El tamizaje con G418 permitió seleccionar posibles cepas multicopia, ya que de las 80 cepas, seis (1, 10, 19, 34, 66 y 76) crecieron a concentraciones mayores de G418, que corresponde a un 7.5%. Está reportado que de un 1 a un 10 % de las mutantes His⁺ pueden tener más de un inserto (62), y al emplear ADN linearizado con *Sac I*, el número de copias puede ser de hasta 10 (77). En uno de los primeros reportes de tamizaje con G418, la transformación de esferoplastos con el vector pPIC3K-ENV produjo 1000 transformantes, 26 transformantes crecieron a 1.5 mg/ml y 7 transformantes a 2 mg/ml (30). Además, analizaron el número de copias mediante Southern blot y encontraron una relación entre el número de copias y el nivel de resistencia a G418 (APÉNDICE C).

Comparando los antecedentes del tamizaje con G418 con los resultados obtenidos se encontraron diversos puntos críticos en la técnica. Si las densidades celulares no son las adecuadas ni son comparables, las cepas pueden crecer a concentraciones altas de G418 sin ser multicopias, conduciendo a resultados erróneos. En la siembra de las placas con G418, se tuvieron que inocular volúmenes menores que lo especificado en el protocolo para evitar contaminaciones de las cepas adyacentes, y resuspender continuamente para inocular densidades celulares similares de cada cepa en las placas de G418.

Producción de HGHR

Ensayos preliminares de fermentación en los cuales se comparó el nivel de producción de la cepa unicopia con las cepas multicopias, permitieron seleccionar 3 cepas (1, 19 y 76) con los niveles más altos de proteínas y HGHR.

La posibilidad de la integración de más de un cassette de expresión fue confirmada mediante la relación de las intensidades de las bandas del PCR, ya que el cociente 1060/2200 resultó mayor en las cepas 1, 19 y 76 (3.2, 8.7 y 5.0, respectivamente) que en la cepa unicopia previamente construida (1.5). Sin embargo, no se logró determinar el número de copias del cassette de expresión en relación al cociente 1060/2200, debido a que se requiere hacer más ensayos comparativos por PCR y determinar el número aproximado de copias. Se recomienda para este fin el análisis mediante Southern Blot para estimar el número de copias (37, 39) y optimar las condiciones para un PCR cuantitativo..

Se realizaron fermentaciones por triplicado de las cepas 1, 19, 76 y unicopia. La evaluación de las proteínas totales mediante Bradford, y el % de HGHR calculado a partir del gel SDS-PAGE mostraron que las cepas de *Pichia pastoris* 1, 19 y 76 resultaron ser sobreproductoras de HGHR, con una sobreproducción hasta de un 44 % mayor que la cepa unicopia previamente construida, cumpliendo con el objetivo de obtener una cepa sobreproductora de HGHR.

Al analizar el cociente 1060/2200 respecto a la producción de HGHR, existe un incremento en la producción de las cepas construidas respecto a la cepa unicopia. Sin embargo este incremento no es lineal, siendo necesario

obtener un mayor número de cepas multicopia para efectuar un análisis más exhaustivo de la relación entre el número de copias vs. producción.

Sistemas de purificación

No se obtuvo precipitación selectiva ni buena recuperación de HGHR al emplear sulfato de amonio al 20 % de saturación en las condiciones trabajadas, ya que un 68 % de la HGHR permanece en el sobrenadante. Es necesario efectuar más ensayos considerando como variables el porcentaje de saturación de sulfato de amonio, el tiempo de la adición, el pH del medio y la velocidad y el tiempo de centrifugación.

Un medio de cultivo obtenido a nivel fermentador permitió ensayar esquemas de purificación mediante intercambio aniónico. En el ensayo A no se logró obtener la HGHR en una sola fracción, pero en la fracción mayoritaria se logra mejorar la pureza de HGHR, de un 28 % a un 40 %. Este medio contenía concentraciones muy altas de HGHR y una mayor complejidad que a nivel matraz, a juzgar por el análisis de proteínas por SDS-PAGE.

El ensayo B realizado con el medio producido a nivel matraz con la cepa sobreproductora No. 1 mostró que la HGHR no se eluye en una fracción mayoritaria, sino que se reparte en diversas fracciones. A pesar de concentrar el medio, la cantidad de HGHR que se observa en el gel es mucho menor. El tercer ensayo, en el cual se efectuó un cambio disminuyendo la velocidad del gradiente con el fin de mejorar la interacción con la fase estacionaria, no mejoró los resultados. El primer ensayo sugiere debe explorarse más variables respecto a la muestra (pH, contenido de sales, cantidad de inyección, complejidad) y al sistema cromatográfico (composición y pH de la fase móvil, gradiente, etc.).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró la construcción del vector pPIC9KhGH22K a partir de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K.

Se implementó la técnica de transformación de esferoplastos, sin embargo es necesario optimarla para lograr alcanzar la eficiencia reportada en la literatura.

Mediante la transformación de esferoplastos de la cepa GS115 de *Pichia pastoris* con el vector pPIC9KhGH22K linearizado con *Sac I*, se logró obtener 80 transformantes His⁺.

Se verificó la integración del ADNc de HGH en el genoma de *Pichia pastoris* mediante PCR, empleando extractos crudos de las cepas obtenidas con liticasa. Así mismo, se verificó su fenotipo por la producción y secreción de una proteína de 22 kDa.

El tamizaje con G418 de las 80 cepas analizadas mostró que seis de ellas (1, 19, 34, 66 y 76) fueron capaces de crecer a concentraciones iguales o mayores a 0.75 mg/ml.

El empleo del vector pPIC9K y la implementación del tamizaje con G418 permitirá el análisis futuro de un gran número de cepas, y facilitar la selección de posibles multicopia.

Se demostró que las cepas 1, 19 y 76 son sobreproductoras de HGHr con una sobreproducción del 22 al 44 % respecto a la cepa unicopia previamente construida.

El PCR semicuantitativo de las cepas 1, 19 y 76, mostró que el cociente de las intensidades de las bandas de 1060/2200 es mayor en las cepas construidas

que en la cepa unicopia, sugiriendo la presencia de más de una copia integrada del cassette de expresión.

La cepa que presentó la mayor producción de HGhr fue la cepa 1 (44 % de sobreproducción respecto a la cepa unicopia), aunque no fue la que obtuvo el mayor cociente 1060/2200.

Por los resultados anteriores, se requiere evaluar la producción de HGhr y la relación de intensidades de las bandas de 1060/2200, así como realizar análisis de Southern Blot, con un mayor número de cepas para describir el comportamiento de la producción de HGhr vs. el número de copias.

No se obtuvo precipitación selectiva con sulfato de amonio al 20 % de saturación ni buena recuperación en las condiciones trabajadas. Es necesario evaluar las variables involucradas en el proceso (porcentaje y velocidad de saturación con sulfato de amonio, pH, velocidad de saturación, velocidad y tiempo de centrifugación, etc.)

Aunque no se lograron obtener buenos resultados con la cromatografía de intercambio aniónico, el ensayo A sugiere que puede ser una buena opción para purificar HGhr, sin embargo se requiere optimar las condiciones de pH, composición de fase móvil, gradiente, etc.

El uso del moderno sistema Gel Doc de Bio Rad, permitió efectuar un análisis cuantitativo exacto de los geles de agarosa y SDS-PAGE, mismos que anteriormente se efectuaban en un densitómetro convencional.

CAPÍTULO 6

REFERENCIAS

- 1 Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell V W (1997). Bioquímica de Harper. 10 ed. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México. Cap. 45. 609-629.
- 2 Voerman BJ, Strack van Schijndel RJ, de Boer H, Groeneveld AB, Nauta JP, van der Veen EA, Thijs LG (1994). Effects of human growth hormone on fuel utilization and mineral balance in critically ill patients on full intravenous nutritional support. *J Crit Care* 9(3): 143-150.
- 3 Wolf SE, Barrow RE, Herndon DN (1996). Growth hormone and IGF-I therapy in the hypercatabolic patient. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10(3): 447-463.
- 4 Watson AR (1991). Safety of growth hormone. *Science* 337.
- 5 Butenandt O (1996). Growth hormone therapy in childhood. Growth hormone therapy in small children without growth hormone deficiency. *Fortschr Med* 114(16): 201-204.
- 6 Reusz GS, Miltenyi G, Stubnya G, Szabo A, Horvath C, Byrd DJ, Peter F y Tulassay (1997). X-linked hypophosphatemia: effects of treatment with recombinant human growth hormone. *T Pediatr Nephrol* 11(5): 573-577.
- 7 Mehls O, Tonshoff B, Haffner D, Wuhl E y Schaefer FJ (1994). The use of recombinant human growth hormone in short children with chronic renal failure. *Pediatr Endocrinol* 7(2): 107-113.
- 8 Davies UM, Jones J, Reeve J, Camacho-Hubner C, Charlett A, Ansell BM, Preece MA y Woo PM (1997). Juvenile rheumatoid arthritis. Effects of disease activity and recombinant human growth hormone on insulin-like

- growth factor 1, insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3, and osteocalcin. *Arthritis Rheum* 40(2): 332-340.
- 9 Antoniazzi F, Bertoldo F, Mottes M, Valli M, Sirpresi S, Zamboni G, Valentini R y Tato L (1996). Growth hormone treatment in osteogenesis imperfecta with quantitative defect of type I collagen synthesis. *J Pediatr* 129(3): 432-439.
 - 10 Merchav S, Graif Z y Skottner A (1993). In-vitro response of erythroid progenitors from children with thalassaemia major to human growth hormone and insulin-like growth factor I. *Clin Endocrinol (Oxf)* 39(2): 207-211.
 - 11 Kappel M, Hansen MB, Diamant M, Jorgensen JO, Gyhrs A y Pedersen BK (1993). Effects of an acute bolus growth hormone infusion on the human immune system. *Horm Metab Res* 25(11): 579-585.
 - 12 Mustafa A, Nyberg F, Mustafa M, Bakhiet M, Mustafa E, Winblad B y Adem A (1997). Growth hormone stimulates production of interferon-gamma by human peripheral mononuclear cells. *Horm Res* 48(1): 11-15.
 - 13 Antoniazzi F, Bertoldo F, Mottes M, Valli M, Sirpresi S, Zamboni G, Valentini R y Tato L (1996). Growth hormone treatment in osteogenesis imperfecta with quantitative defect of type I collagen synthesis. *J Pediatr* 129(3): 432-439.
 - 14 Carli F, Webster JD, Halliday D (1997). Growth hormone modulates amino acid oxidation in the surgical patient: leucine kinetics during the fasted and fed state using moderate nitrogenous and caloric diet and recombinant human growth hormone. *Metabolism* 46(1): 23-28.
 - 15 Bowes SB, Umpleby M, Cummings MH, Jackson NC, Carroll PV, Lowy C, Sonksen PH y Russell-Jones DL (1997). The effect of recombinant human growth hormone on glucose and leucine metabolism in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82(1): 243-246.

- 16 Jeevanandam M, Holaday NJ y Petersen SR (1996). Adjuvant recombinant human growth hormone does not augment endogenous glucose production in total parenteral nutrition-fed multiple trauma patients. *Metabolism* 45(4): 450-456.
- 17 Bringer J, Lhoret RR, Hedon B y Lefebvre P (1993). The use of growth hormone (hGH) in ovulation induction in women. *Contracept Fertil Sex* 21(9): 678-682.
- 18 Lanzone A, Fortini A, Fulghesu AM, Soranna L, Caruso A y Mancuso S (1996). Growth hormone enhances estradiol production follicle-stimulating hormone-induced in the early stage of the follicular maturation. *Fertil Steril* 66(6): 948-953.
- 19 Piaditis GP, Hatzioanidis AH, Trovas GP, Misichronis GS, Kounadi TG, Devetzaki OA, Andronis CK, Rangou DB y Chlouverakis CS (1996). The effect of sequential administration of octreotide alone and octreotide/growth hormone simultaneously on buserelin stimulated ovarian steroid secretion in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 45(5): 595-604.
- 20 Gunn AJ, Gunn TR, Rabone DL, Breier BH, Blum WF y Gluckman PD (1996). Growth hormone increases breast milk volumes in mothers of preterm infants. *Pediatrics* 98: 279-282.
- 21 Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, Pardo F, Biondi B y Sacca L (1996). A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 334(13): 809-814.
- 22 Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itajura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozarri G, Crea R y Seeburg P (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a ADN sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281(5732): 544-548.
- 23 Gray GL, Baldrige JS, McKeown KS, Heyneker HL y Chang CN (1985). Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in

Escherichia coli: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene* 39: 247-254.

- 24 Kato C, Kobayashi T, Kudo T, Furusato T, Murakami Y, Tanaka T, Baba H, Oishi T, Ohtsukaa E, Ikeharaa M, Yanagida T, Kato H, Moriyama S y Horikoshi K (1987). Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. *Gene* 54:197-202.
- 25 Hsiung HM, Cantarell A, Luirink J, Oudega B, Veros AJ y Becker GW (1989). Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Biotechnology* 7: 267-271.
- 26 Becker GW y Hsiung HM (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 204, 145, 150.
- 27 Chang CN, Rey M, Bocchner B y Gray G. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene* 55: 189-196.
- 28 Martínez-Torres A. (1994). Expresión en *Escherichia coli* de las hormonas del crecimiento humano y bovino en fusión con la proteína de unión a la maltosa. Tesis de Maestría. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.
- 29 Franchi E, Maisano F, Testori SA, Galli G, Toma S, Parente L, Ferra FD y Grandi G (1991). A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnology* 18: 41-54.
- 30 Tokunaga T, Iwai S, Gomi H, Kodama K, Ohtsuka E, Ikehara M, Chisaka O y Matsubara K (1985). Expression of synthetic human growth hormone gene in yeast. *Yeast* 39: 117-120.
- 31 Ortiz-López R (1992). Obtención de líneas celulares productoras de las isoformas de 20 y 22 kDa de la hormona del crecimiento humano. Tesis de Maestría. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética,

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L.
Monterrey, N.L., México.

- 32 Pavlakis GN, Hizukaa N, Gorden P, Seburg PH y Hamer DH (1981). Expression of two human growth hormone genes in monkey cell infected by simian virus 40 recombinants. *Proc Natl Acad Sci* 78: 7398-7402.
- 33 Escamilla-Treviño LL (1996). Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHR) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestría. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.
- 34 Sudbery PE (1996). The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr op in biotech* 7: 517-524.
- 35 Cregg JM, Vedvick TS y Raschke WC (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio-Technology* 11: 430-433.
- 36 Faber KN, Harder W; Ab G y Veenhuis M (1995). Methylotrophic yeasts as a factories for the production of foreign proteins. *Yeast* 11: 1331-1344.
- 37 Wegner GH (1983). Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. *US patent* 4: 329, 414.
- 38 Sreekrishna K y Kropp KE (1996). Nonconventional Yeast in biotechnology. A Handbook. Springer. Wolf (Ed.) Berlin. Chapter 6. *Pichia pastoris*. 203-253.
- 39 Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz R, Madden KR, Kellaris PA, Davis G, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G y Thill GP (1987). High-level expression and efficient assembly of Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BiolTechnology* 5: 479-485.

- 40 Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig W y Grinna L (1987). High Level Secretion of Glycosilated Invertase in the Metylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 1305-1308.
- 41 Sreekrishna K, McCombie WR, Potenz R, Parker KA, Mazzaferro PK, Maine GM, Lopez JL, Divelbiss DK, Holden KA, Barr RD y Fuke M (1988). Clonal variation in the expression of human tumor necrosis factor (TNF) in the methylootrophic yeast *Pichia pastoris*. Presented at the fifth annual Biotech USA industry conference and exhibition, San Francisco, Calif.
- 42 Digan ME, Lair SV, Brierley RA, Siegel RS, Williams ME, Ellis SB, Kellaris PA, Provow SA, Craig WS, Velicelebi G y Harpold MM (1989). Continous production of a novel lysozime via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 7: 160-164.
- 43 Clare JJ, Rayment FB, Sreekrishna K y Romanos MA (1991). High Level Expression of Tetanus Toxin. Fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology* 9: 455-460.
44. Scorer CA, Buckholz, Clare JJ y Romanos MA. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope prottein in the methylootrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136:111-119.
- 45 Despreaux CW y Manning RF (1993). The dacA gene of *Bacillus stearothermophilus* for D-alanine carboxipertidase: cloning, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Gene* 131: 35-41.
- 46 Laroche Y, Storme V, de Meutter J, Messens J y Lauwereys M (1994). High-level Secretion and Very Efficient Isotopic Labeling of Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Expressed in the Methylootrophic Yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 12: 1119-1124.

- 47 Fryxell B, O'Donoghue K, Graeff RM, Lee HC y Branton WD (1995). Functional expression of Soluble Forms of Human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Prot Express and Purif* 6: 229-336.
- 48 Zhu A, Monahan C, Zhang Z, Hurst R, Leng L y Goldstein J (1995). High-Level Expression and Purification of Coffe Bean α -Galactosidase Produced in the Yeast *Pichia pastoris*. *Arch of Biochem and biophys* 324: 65-70.
- 49 Ridder R, Schmitz R, Legay F, Gram H (1995). Generation of Rabbit Monoclonal Antibody Fragments from a Combinatorial Phage Display Library and Their Production in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 13: 255-260.
- 50 Guo W, González-Candelas L y Kolattukudy PE (1995). Cloning of a new Pectate Lyase Gene *pe/C* from *Fusarium solani* f. sp. pisi (Nectria haematococca, Mating Type VI) and Characterization of the Gene Product Expressed in *Pichia pastoris*. *Arch of Biochem and biophys* 323: 352-360.
51. Mohanraj D. Olson T y Ramakrishnan. (1995). Expression of Biologically Active Human Vascular Endothelial Growth Factor in Yeast. *Growth Factors* 12: 17-27.
- 52 Brankamp RG, Sreekrishna K, Smith PL, Blankenship DT y Cardin AD. (1995). Expression of a Synthetic Gene Encoding the Anticoagulant-Antimetastatic Protein Ghilanten by the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Prot Express and Purif* 6: 813-820.
- 53 Steinlein LM, Graf TN e Ikeda RA (1995). Production and Purification of N-Terminal Half-Transferrin in *Pichia pastoris*. *Prot Express and Purif* 6: 619-624.
- 54 Payne WE, Gannon PM y Kaiser CA (1995). An inducible acid phosphatase from the yeast *Pichia pastoris*: characterization of the gene and its product. *Gene* 163: 19-26.

- 55 Vozza LA, Wittwer L, Higgins DR, Purcell TJ, Bergseid M, Collins-Racie LA, LaValle ER y Hoeffler JP (1996). Production of a Recombinant Bovine Enterokinase catalytic Subunit in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 14: 77-81.
- 56 Payne MS, Petrillo KL, Gayagan JE, DiCosimo R, Wagner W y Anton DL (1997). Engineering *Pichia pastoris* for biocatalysis: co-production of two active enzymes. *Gene* 194: 179-182.
- 57 Lam LPY y Berger SA (1997). Intracellular Expression and Purification of the *c-kit* Receptor Kinase Domain in *Pichia pastoris*. *BioTechniques* 23:82-86.
- 58 Lai SK, Tulasiram P y Jameel S (1997). Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. *Gene* 190:63-67.
- 59 Wuebbens MW, Roush ED, Decastro CM y Fierke CA (1997). Cloning, Sequencing and Recombinant expression of the Porcine inhibitor of Carbonic Anhydrase: A Novel Member of the Transferrin Family. *Biochemistry* 36: 4327-4336.
- 60 McGrew JT, Leiske D, Dell B, Klinke R, Krasts D, Wee SF, Abbot N, Armitage R y Harrington K (1997). Expression of trimeric ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expression transformants. *Gene* 187: 193-300.
- 61 Hansen OC y Stougaard P (1997). Hexose Oxidase from the Red Alga *Chondrus crispus*. Purification, Molecular Cloning, and Expression in *Pichia pastoris*. *The J of Biol Chem* 272:11581-11587.
- 62 Mistry AR, Falciola L, Monaco L, Tagliabue R, Acerbis G, Knight A, Harbottle RP, Soria M, Bianchi ME, Coutelle C y Hart SL (1997). Recombinant HMG1 Protein Produced in *Pichia pastoris*: A Nonviral Gene delivery Agent. *Biotechniques* 22: 718-729.

- 63 Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM y Gingeras TR (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cel Biol* 5: 1111-1121.
- 64 Invitrogen (1994). *Pichia* Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Version 3.0.
- 65 Barr KA, Hopkins SA y Sreekrishna K (1992). Protocol for Efficient Secretion of HSA Developed from *Pichia pastoris* . *Pharm Eng* 12(2): 48-51.
- 66 Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY y Madden KR (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cel Biol* 5: 3376-3385.
- 67 Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K y Henwood CA (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105, 05-212.
- 68 Scorer C.A., Clare J.J., McCombie W.R., Romanos M.A. y Sreekrishna K. (1994). Rapid Selection Using G418 of High Copy Number transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. *Biotechnology* 4, 181-184.
- 69 Sreekrishna K y Hopkins SA. Unpublished data.
- 70 Sreekrishna K y Parker KA. Unpublished data.
- 71 Romanos MA, Clare Beeseley KM, Rayment FB, Ballantine SP, Makoff AJ, Dougan G, Fairweather NF y Charles IG (1991). Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high level production and immunological properties. *Vaccine* 9:901-906.

- 72 Vedvick T, Buckholz RG, Engel M, Urcan M, Kinney J, Provow S, Siegal RS y Thill GP (1991). High-Level Secretion of Biologically Active Aprotinin from the Yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology*. 1, 197-202.
- 73 Cregg JM y Madden KR. (1988). Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host for the production of foreign proteins. *Dev Ind Microbiol* 29: 33-41.
- 74 Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.U.S.A.
- 75 Morelle G. (1989). A plasmid extraction Procedure on a Miniprep Scale. *Focus*, 1: 7.
- 76 Linder S, Schliwa M y Kube-Granderath E (1996). Direct PCR Screening of *Pichia pastoris* Clones. *Biotechniques* 2: 980-982.
- 77 Romanos M (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Op in Biotech* 6: 5527-533.
- 78 Gallardo-Blanco HL (1998). Construcción de cepas de *pichia pastoris* sobreproductoras de hormona recombinante del crecimiento bovino. Tesis de Maestría. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.
- 79 Invitrogen (1996). pPIC9K: A *Pichia* Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression; Instruction Manual Version B.

APÉNDICE A

REACTIVOS

EDTA 500 mM pH 8.

Agregar 186.1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8 con NaOH 10 N y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min.

NaOH 10 N

Disolver 40 g de NaOH y aforar a 100 mL con agua destilada estéril.

Tris-HCl 2 M pH 8

Disolver 242.2 g de Trisma en 700 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min.

TE 100X pH 8 (EDTA 100 mM, Tris-HCl 1 M)

Para preparar 100 mL mezclar 50 mL de Tris-HCl 2 M pH 8 y 20 mL de EDTA 500 mM pH 8. Aforar a 100 mL con agua destilada. Autoclavear 20 min.

Para preparar una solución de trabajo efectúe una dilución 1:100.

Solución I

50 mM glucosa

25 mM Tris-HCl (pH 8)

10 mM EDTA

4 mg/mL de lisozima

Para 100 mL disolver 0.9 g de glucosa, añadir 1.25 mL de Tris-HCl 2M y 2 mL de EDTA 500 mM. Autoclavear 20 min.

Solución II

0.2 N NaOH

1 % SDS.

Para 100 mL, agregar 2 mL de NaOH 10 N y 10 mL de SDS 10 %. Aforar a 100 mL con agua destilada. Esta solución se emplea recién preparada.

Solución III

7.5 M Acetato de amonio pH 7.8

Pesar 57.8 g de acetato de amonio y disolver en 100 mL de agua destilada estéril.

Medio LB (Luria-Bertani)

1 % Triptona, 0.5 % Extracto de levadura, 1 % NaCl, pH 7.0

Para 1 L disolver: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl en 950 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min. enfriar a 55°C y añadir los antibióticos deseados. Almacenar a temperatura ambiente o a 4°C.

10X YNB (13.45 % de base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos)

Disolver 134 g de base nitrogenada de levadura (YNB) con sulfato de amonio sin aminoácidos en 1 L de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

500X B (0,02 % biotina)

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

100XH (0.4 % histidina)

Disolver 400 mg de L-histidina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

10X D (20 % dextrosa)

Disolver 200 g de D-glucosa en 1 L de agua destilada, autoclavar por 15 min o esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

10X GY (10 % glicerol)

Mezclar 100 mL de glicerol con 900 mL de agua. Esterilizar por filtración o autoclave. guardar a temperatura ambiente. La vida media de esta solución es mayor de un año.

100X AA (0.5 % de cada aminoácido)

Disolver 500 mg de cada aminoácido: ácido L-glutámico, L-metionina, l-lisina, L-leucina y L-isoleucina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

Amortiguador de fosfato de potasio 1 M pH 6.0.

Combinar 132 mL de 1 M K_2HPO_4 y 868 mL de 1 M KH_2PO_4 . Confirmar el pH (si es necesario ajustar con ácido fosfórico o KOH). Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente. La vida media de esta solución es mayor de un año.

YPD (Medio de extracto de levadura peptona y dextrosa)

1 % extracto de levadura

2 % peptona

2 % Dextrosa

20 g/L de agar

Para preparar 1 L, agregar 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona a 900 mL de agua destilada. Si se van a preparar placas, incluir 20 g de agar. Autoclavear 20 min en ciclo líquido. Agregar 100 mL de 10XD. El medio líquido se almacena a temperatura ambiente. las placas se guardan a 4°C. Duran varios meses.

Placas de YPD con G418

1 % extracto de levadura

2 % peptona

2 % Dextrosa

1.5 % de agar

La solución stock de G418 se prepara a una concentración de 100 mg/mL de G418 en agua destilada estéril, se esteriliza por filtración y se almacena a -20°C.

Preparar YPD-agar y mantener a 55-60°C y añadir el volumen apropiado de la solución de G418. Mezclar cuidadosamente, para evitar la formación de burbujas. Almacenar a 4°C hasta por 6 meses.

Solución Stock de G418 requerida para preparar placas YPD-agar a diferentes concentraciones de G418.

Final [G418] (mg/mL)	mL de solución stock/250 mL de YPD-agar
0.25	0.625
0.5	1.250
0.75	1.875
1.00	2.500
1.50	3.750
1.75	4.375
2.00	5.000

Reactivos para esferoplastos y transformación

a) Proporcionados en el estuche:

- SE: 1 M sorbitol, 25 mM EDTA, pH 8.0
 DTT: 1 M DTT en agua
 SCE: 1 M sorbitol, 1 mM EDTA y 10 mM de amortiguador citrato de sodio, pH 5.8
 CaS: 1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂.
 Zymoliasa: 3 mg/mL en agua
 40 % PEG: 40 % (p/v) PEG 3350 (Grado de reactivo) en agua
 CaT: 20 mM Tris, pH 7.5 y 20 mM CaCl₂
 SOS: 1 M sorbitol, 0.3X YPD, 10 mM CaCl₂
 Sorbitol 1 M

b) Preparados en fresco para cada transformación:

- SED: 19 mL de SE y 1 mL de 1 M DTT
 PEG/CaT: 1:1 mezcla de 40 PEG y CaT

RDB (Medio de Regeneración-Dextrosa)

1 M Sorbitol

1 % Dextrosa

1.345 YNB

4 X 10⁻⁵ % Biotina

0.005 % Aminoácidos

Disolver 186 g de sorbitol en 700 mL de agua. Para preparar placas añadir 20 g de agar. Autoclavear 20 min en un ciclo líquido. Enfriar y mantener a 45°C.

Preparar una solución precalentada a 45°C de una mezcla de las siguientes soluciones stock:

100 mL de 10X D

100 mL de 10 X YNB

2 mL de 500X B

10 mL de 100X AA

88 mL de agua destilada estéril

Añadir a la solución de sorbitol.

Para preparar RDBH añadir además 10 mL de 100X H a la mezcla precalentada.

Para preparar top agarosa añadir 10 g de agarosa con el sorbitol, mantener la solución autoclaveada a 60°C en un baño de agua antes de la adición de la mezcla precalentada. Durante la transformación usar una solución fundida a 45°C.

BMG (Medio mínimo amortiguado con Glicerol)

100 mM de Amortiguador de potasio, pH 6.0

1.34 % de YNB

4 X 10⁻⁵ % de Biotina

1 % de glicerol

Mezclar 700 mL de agua destilada, 100 mL de Amortiguador de fosfatos pH=6.0, y 100 mL de glicerol 10X. Esterilizar por autoclave y después agregar 100 mL de YNB 10X y 2 mL de biotina 500X. Almacenar a 4°C, la vida media es de un año.

BMM (Medio mínimo amortiguado con metanol)

100 mM de Fosfato de potasio, pH 6.0

1.34 % de YNB

4 X 10⁻⁵ % de Biotina

0.75 % de Metanol

Mezclar 792.5 mL de agua destilada y 100 mL de Amortiguador de fosfatos pH=6.0. Esterilizar por autoclave y después agregar 7.5 mL de metanol, 100 mL de YNB 10X y 2 mL de biotina 500X. Almacenar a 4°C, la vida media es de un año.

MD y MDH (Medio Minimo Dextrosa ± Histidina)

1.34 % de YNB

4 X 10⁻⁵ % de Biotina

1 % de Dextrosa

Autoclavear 800 mL de agua destilada y enfriar a 60°C. Agregar 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500X y 100 mL de Dextrosa 10X. Para preparar MDH añadir 10 mL de 100XH, mezclar y almacenar a 4°C. Para preparar placas agregar 15 g de Agar antes de esterilizar el agua.

Crecimiento de cepas de *Pichia*:

La temperatura de crecimiento de *Pichia pastoris* es 28-30°C en cultivos líquidos y placas. Crecer a 32°C durante la inducción puede ser perjudicial a la expresión de proteína, y puede provocar la muerte celular. Otros factores importantes son:

El tiempo de duplicación en fase log de Mut⁺ o Mut^S *Pichia* en YPD es ~ 2 horas.

Las cepas Mut⁺ y Mut^S no difieren en los intervalos de crecimiento en ausencia de metanol.

El tiempo de duplicación en la fase log de Mut⁺ *Pichia* en MM es 4-6 horas.

El tiempo de duplicación en la fase log de Mut^S *Pichia* en MM es 18 horas.

Una OD₆₀₀ ~ 5 x 10⁷ células/mL

Almacenamiento de cepas de *Pichia*:

Para almacenamiento de tiempo corto de células, usar medio YPD o punción en YPD agar.

Cultivar una colonia de GS115 o una transformante GS115 His⁺ en YPD.

Transferir a vial con YPD.

Las células pueden ser almacenadas en YPD por varias semanas a +4°C.

Para almacenamiento de mayor tiempo, las células son almacenadas en congelamiento a -80°C .

Cultivar una sola colonia de GS115 o una transformante GS115 His⁺ toda la noche en YPD.

Cosechar las células y resuspender en YPD conteniendo 15 % de glicerol a una OD600 final de 50-100 (aproximadamente $2.5-5.0 \times 10^9$ células/mL).

Las células son congeladas con nitrógeno líquido o en baño hielo/etanol y almacenadas a -70°C .

Nota:

Después de un tiempo prolongado de almacenamiento a 4°C o -80°C , es recomendado que las transformantes GS115 His⁺ sean revisadas para corroborar el genotipo y viabilidad por estría en placas MM, MD o MGY antes de usarse.

Reactivos para SDS-PAGE

Acrilamida-bisacrilamida

Pesar 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida y aforar a 100 mL con agua destilada.

1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Disolver 18.2 g de tris base en 80 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.8 con HCl. Aforar a 100 mL.

0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Disolver 6.1 g de tris base en 80 mL de agua destilada y ajustar el pH a 6.8 con HCl. Aforar a 100 mL.

SDS 10 %

Pesar 10 g de SDS aforar a 100 mL con agua destilada.

Amortiguador de muestra 2X:

Agua	4.8 mL
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.2 mL
SDS 10 %	2 mL
Glicerol	1 mL
Azul de bromofenol 0.5 %	0.5 mL

Antes de usarse añadir 50 mL de β -mercaptoetanol a 950 mL de la mezcla anterior.

Persulfato de amonio 10 %

Pesar 50 mg y disolver en 500 μ l de agua destilada.

Amortiguador de corrida 5X

	1 L
Tris	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g

Aforar a 1 L con agua destilada y verificar el pH (8.3 \pm 0.2). No ajustar.

Solución fijadora

Metanol 50 % y ácido acético 10 %.

500 mL de metanol + 100 mL de ácido acético y aforar a 1 L con agua destilada.

Solución colorante de Coomassie

Azul brillante de Coomassie G 0.05 %, Metanol 50 %, ácido acético 10 %.

Azul brillante de Coomassie G 0.25 g, Metanol 500 mL, ácido acético 100 mL.

Aforar a 1 L con agua destilada.

Solución decolorante:

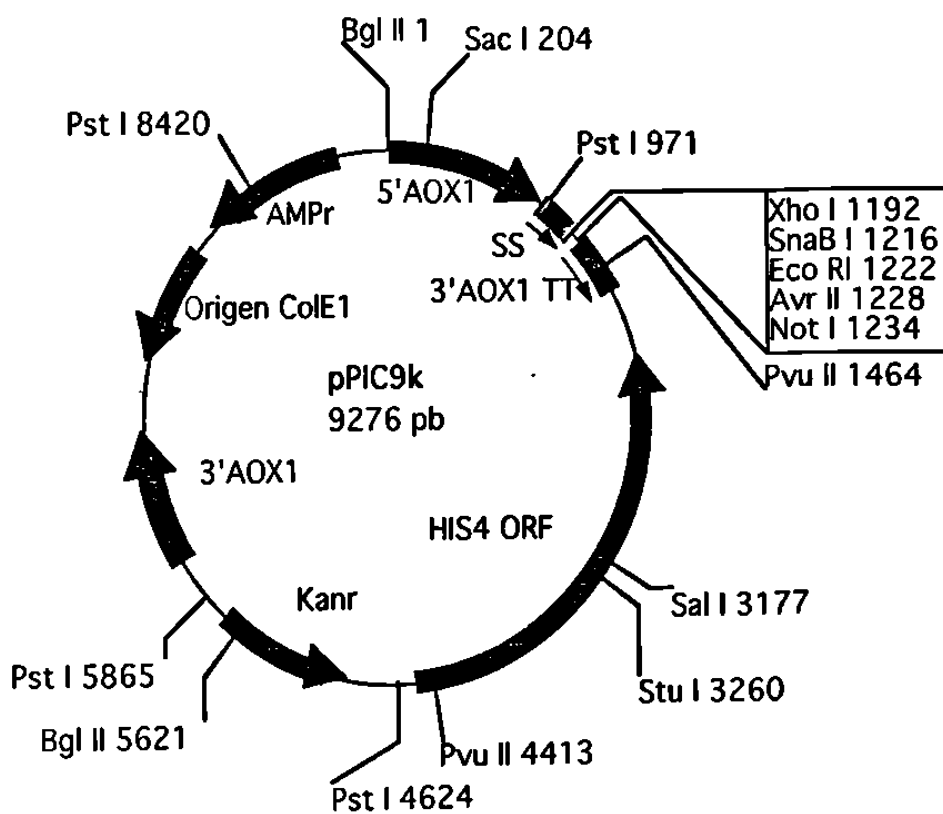
Metanol 5 %, ácido acético 7 %.

50 mL de metanol + 70 mL de ácido acético aforar a 1 L con agua destilada.

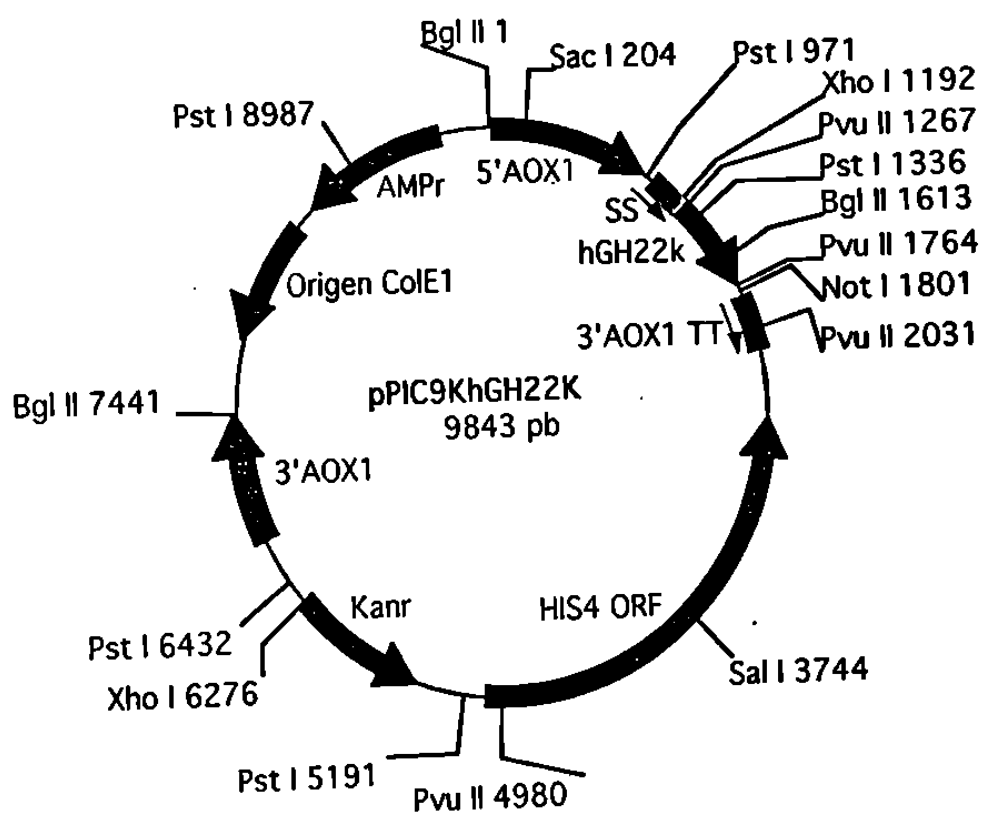
APÉNDICE B

GRÁFICAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

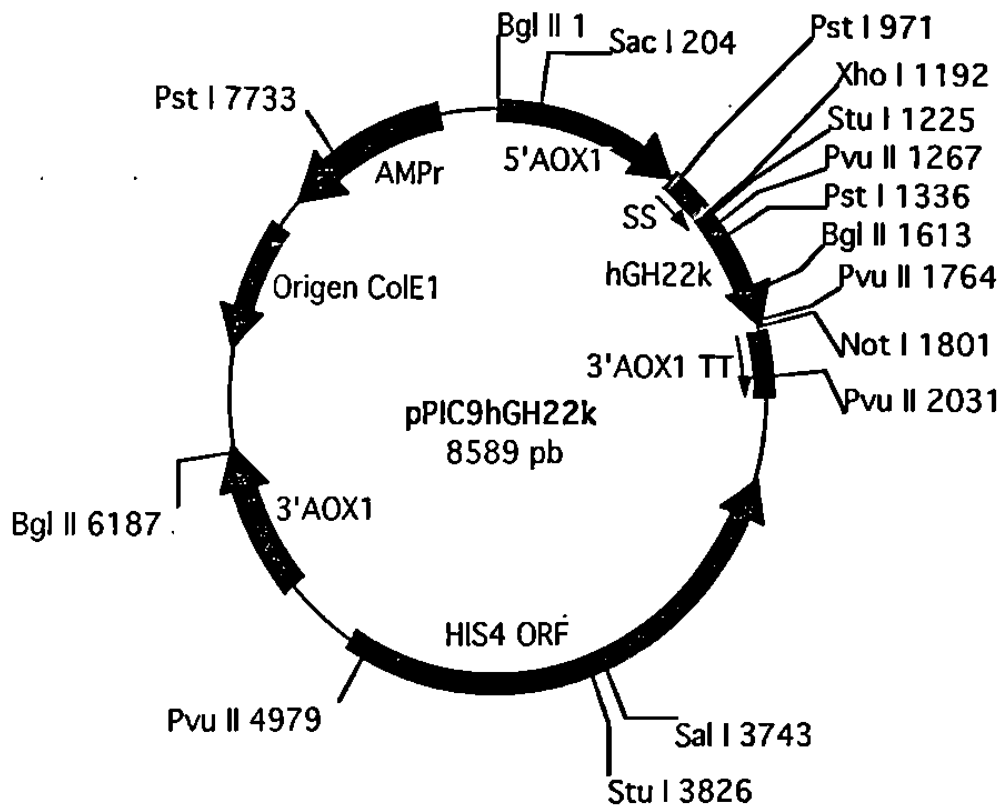
GRÁFICA DEL PLÁSMIDO pPIC9K QUE MUESTRA ALGUNOS SITIOS DE RESTRICCIÓN RELEVANTES



GRÁFICA DEL PLÁSMIDO pPIC9KhGH22K QUE MUESTRA ALGUNOS SITIOS DE RESTRICCIÓN RELEVANTES



GRÁFICA DEL PLÁSMIDO pPIC9hGH22K QUE MUESTRA ALGUNOS SITIOS DE RESTRICCIÓN RELEVANTES



APÉNDICE C

RESULTADOS DEL TAMIZAJE CON G418

Se representa con A: crecimiento pobre, B: crecimiento regular y C: crecimiento abundante. Se puede identificar que las clonas 1, 10, 19, 34, 66 y 76 crecen a concentraciones ≥ 0.75 mg/ml de G418.

Clona	Concentración de G418 (mg/ml de medio)									
	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	1.75	2.00	3.00	4.00
U	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GS115	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PPIC9K	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1	C	C	C	B	B	-	-	-	-	-
2	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
3	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
4	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
5	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
6	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
7	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
8	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
9	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
10	C	C	C	A	-	-	-	-	-	-
11	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
12	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
13	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
14	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
15	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
16	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
17	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
18	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
19	C	C	C	B	-	-	-	-	-	-
20	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
21	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
22	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
23	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
24	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
25	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
26	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
27	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
28	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
29	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
30	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
31	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
32	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
33	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
34	C	C	B	A	-	-	-	-	-	-
36	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-

Clona	Concentración de G418 (mg/ml de medio)									
	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	1.75	2.00	3.00	4.00
37	C	A	A	-	-	-	-	-	-	-
38	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
39	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
40	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
41	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
42	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
43	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
44	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
45	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
46	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
47	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
48	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
49	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
50	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
51	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
52	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
53	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
54	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
55	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
56	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
57	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
58	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
59	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
60	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
61	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
62	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
63	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
64	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
65	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
66	C	C	B	A	-	-	-	-	-	-
67	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
69	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
70	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
71	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
73	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
74	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
75	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
76	C	C	C	C	C	A	A	-	-	-
78	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
79	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
80	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
81	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
82	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
83	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
84	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-

APÉNDICE D

DATOS CROMATOGRÁFICOS

Porcentaje de HGhr presente en cada fracción y porcentaje de recuperación de HGhr del medio de cultivo de una fermentación a nivel fermentador en el ensayo A.

Fracción	% HGhr	% Recuperación
1	0	0
2	20	34
3	28	1
4	40	65
5	0	0

Porcentaje de HGhr presente en cada fracción y el % de recuperación de HGhr del medio de cultivo de una fermentación a nivel matraz con la clona GS115hGH22KG418-1 sobreproductora en el ensayo B.

Fracción	% HGhr	% Recuperación
1	0	0
2	42	15
3	46	42
4	67	11
5	76	16
6	45	8
7	31	8
8	0	0
9	0	0
10	0	0

Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción y el % de recuperación de HGhr del medio de cultivo de una fermentación a nivel matraz con la clona 1 sobreproductora en el ensayo C.

Fracción	% HGhr	% Recuperación
1	0	0
2	37	11
3	46	48
4	52	10
5	42	8
6	81	15
7	67	8
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

APÉNDICE E

SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

pPIC9hGH22K

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGGCCATCCGACATCCACAGGTCCATTTCTCACACATAAGTGCCAA
 ACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCCAAACGAGGACCTCCACTCCTCTCTCCTCAACACCCACTTTTTGCCA
 TCGAAAAACAGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACCCATGACTTTAT
 TAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTCAATGTTTATTTCGGAATGCAACAAGCTCCGATTACACCCGAACATCA
 CTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAAATGGCCAAAACCTGACAGTTTAAACGCTGTCTT
 GGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCAAAGATGAACTAAGTTTGGTTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAA
 GAACTTCCAAAAGTCGCCATACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCAATTAATGCTTAGCGC
 AGTCTCTCTATCGTTCTGAACCCCGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAAATGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTG
 TCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGTGGGAATCTGCTGATAGCTTAACGTTCAATGATCAAAAATTTAACTGTTCTAACCC
 CTACTTGAAGCAATATATAAACAAGAGGAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATATTAGCTTACTTTCAATA
 TTGGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGCAAACTTGAGAAGATCAAAAACAATAATTATCG
 AAGGATCCAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCACTTTTATTCCGAGCATCCTCCGCAATTAGCTGCTCCAGTCAACACT
 ACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCTCGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTT
 TGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATC
 TCTCGAGAAAAGATTCCCAACCAATTCCCTTATCTAGACTTTTGAACCGTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCC
 TTTGACACCTACCAGGAGTTGAAGAAGCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCGAGCTCCCTCT
 GTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCCTCCAACAGGAGGAACACAACAGAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCACTCTCCCTGCT
 GCTCATCCAGTCTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCCCTCAGGAGTGTCTCGCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAAC
 GTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAACCGTGTATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGACTGGGCGA
 TCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAATACGGGCTGCTCTACTGCTT
 CAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCTGTCACTGCGGCTCTGTGGAGGGCACTGTGGCTTCTAGCTGCC
 GTAGAATTCCTTAGGGCGCCGGAATTAATTCGCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCG
 GTCTGTAGATTCATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTGTT
 AACATATAGTATAGGATTTTTTTGTCATTTTGTCTCTGCTGATCAGAGCTGCTCTGATCAGCCTATCTGCGAGCTGATGA
 ATATCTGTGTAGGAGTTTGGGAAATCATTGAGTTTGTATTTTTCTGTTGTTTCCACTCTTCCAGATTTCCAGATCAGAAGAT
 TAAGTGAGAAGTTCGTTTGTGCAAGCTTATCGATAAGCTTAAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAAGTCAAGCA
 CCGTGTATGAAATCAACAATGCGCTCATCTGTCATCTCGGCACCGTCAACCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGG
 TACTGCCGGCCTCTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGTGCTAGCGCTATATGCGTTGAT
 GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCCGCCAGTCTGCTGCTGCTGCTACTTGGAGCC
 ACTATCGACTACCGCATGATGGCGACCACCCGCTCTGTGGATCTATCGAATCTAAATGTAAGTTAAAAATCTCTAAATAATTAA
 ATAAGTCCAGTTTCTCCATACGAACCTTAACAGCATTGCGGTGAGCATCTAGACCTTCAACAGCAGCCAGATCCATCACTGCTT
 GGCCAAATATGTTTCTAGTCCCTCAGGAGTTACGTCCTGTAAGTATGAACTTCTGGAAGGTTGCAAGTGTAACTCCGCTGTATG
 ACGGGCATATCCGTACGTTGGCAAAGTGTGGTGGTACCGGAGGAGTAACTCCACAACTCTCGAGAGTAGGCACCAACAAAC
 ACAGATCCAGCGTGTGTACTTGATCAACATAAGAAGAAGCATTCTCGATTTCAGGATCAAGTGTTCAGGAGCGTACTGATTGG
 ACATTTCCAAAGCCTGCTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGCAATACACTTGGCTACAATTTCAACCCCTTGGCAA
 CTGCACAGCTTGGTTGTGAACAGCATCTTCAATTCGGCAAGCTCCTTGTCTGTATATCGACAGCCAACAGAATCACCTGGGAA
 TCAATACCATGTTACGCTTGAGCAGAAGGCTGAGGCAACGAAATCTGGATCAGCGTATTTATCAGCAATAACTAGAATTCAGA
 AGGCCAGCAGGATGTCAATACTACACAGGCTGATGTGTCATTTGAACCATCATCTTGGCAGCAGTAACGAATGTTTCTT
 GGACCAATATTTTTGCACACTTAGGAACAGTTTCTGTTCCGTAAGCCATAGCAGCTACTGCCGCGCCTCTGCTAGCAGCA
 TACACTTAGCACAACCTTGTGGCAACGTAGATGACTTCTGGGGTAAGGTAACCATCCTTCTTAGGTGGAGATGCAAAAACAAT
 TTCTTTGCAACCAGCAACTTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGAAGGCAGAATTGCGGTTCCACCAGGAATATAGAGG
 CCAACTTTCTCAATAGGTCTTGCAAAACGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTCAACTTGCACGCTCTCCGTTAGTTGAGCTT
 CATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTTAAAGTTATCTGGCAATTGCATAAGTTCTCTTGGGAAAGG
 AGCTTCTAACACAGGTGTCTTCAAAGCGACTCCATCAAACCTTGGCAGTTAGTTCTAAAAGGGCTTTGTACCAATTTTGACGAACA
 TTGTCGACAATTTGTTGACTAATTCATAATCTGTTCCGTTTTCTGGATAGGACGACGAAGGGCATCTTCAAATTTCTGTGAGG
 AGGCTTAGAAACGTCATTTTGCACAAATCAATACGACCTTCAGAAGGACTTCTTTAGGTTTGGATTCTTCTTTAGGTTGTTT
 CTGGTGTATCCTGGCTTGGCATCTCCTTTCTTCTAGTGACCTTTAGGACTTCATATCCAGGTTTCTCTCCACCTCGTCCAAC
 GTCACACCGTACTTGGCAGATCTAACTAATGCAAAAATAAAATAGTCAAGCATTCACAGGCTATATCTTCTTGGATTTAGCTT
 CTGCAAGTTCATCAGCTTCTCCCTAATTTTAGCGTTCAAACAAAACCTTCTGCTGCTCAATAACCGTTTGGTATAAGAACCTTCTG
 GAGCATTTGCTCTTACGATCCCAAGGTTCTTCAATGGCTCTAAGACCTTTGATTGGCCAAAACAGGAAGTCCGTTCCAAGTGA
 CAGAAACCAACACCTGTTTGTCAACCACAAATTTCAAGCAGTCTCCATCAAACTCAATTCGATACCCAGCAACTTTTGAAGTTC
 GTCCAGATGTAGCACTTTATACCACAAACCGTGCAGCAGAGATTTGGTAGACTCCAGTTTGTGTCTTATAGCTCCGGAATAGA

CTTTTGGACGAGTACACCAGGCCAACGAGTAATTAGAAGAGTCAGCCACCAAAGTAGTGAATAGACCATCGGGGCGGTGAGTA
 GTCAAAGACGCCAACAAAATTTTACCTGACAGGGAACTTTTTGACATCTTCAGAAAAGTTTCGTATTCAGTAGTCAATTTGCCGAGCAT
 CAATAATGGGGATTATACCAGAAGCAACAGTGGAAAGTCACATCTACCAACTTTGCGGTCTCAGAAAAAGCATAAACAGTTCTACT
 ACCGCCATTAGTGAACCTTTTCAAATCGCCAGTGGAGAAGAAAAAGGCACAGCGATACTAGCATTAGCGGGCAAGGATGCAACT
 TTATCAACCAGGGTCTTATAGATAACCCTAGCGCTGGGATCATCTTTGGACAACTCTTTCTGCCAAATCTAGGTCCAAAATCA
 CTTCATTGATACCATTTATGTACAACCTGAGCAAGTTGTGCATCAGTCTCCTCAAATTTGGTCTCTGTAAACGGATGACTCAACTTG
 CACATTAACITGAAGCTCAGTCGATTGAGTGAACCTTGATCAGGTTGTGCAGCTGGTCAGCAGCATAGGGAAACACGGCTTTTCCT
 ACCAAACTCAAGGAATTAACAACCTGCAACACTTGCATGTCAGGTAGCAAGGGAAATGTCATACTTGAAGTCGGACAGTGAG
 TGTAGTCTTTGAGAAATTCGAAGCCGTATTTTTATTATCAGTGAGTCACTCAGGAGATCCTCTACGCCGACGCATCGTGGC
 CGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGG
 CTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCAT
 TCCTTGGCGCGGGTGTCAACGGCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTGCAGT
 ATCTATGATTGGAAGTATGGGAATGGTGATACCCGATTTCTCAGTGTCTTGAGGTCTCCTATCAGATTATGCCAACTAAAGCA
 ACCGGAGGAGGAGATTTTCATGGTAAATTTCTCTGACTTTTGGTTCATCAGTAGACTCGAAGTGTGAGACTATCTCGGTTATGACAG
 CAGAAATGCTCTTCTTGGAGACAGTAAATGAAGTCCACCAATAAAGAAATCTTGTATCAGGAACAAACTTCTTGTTCGAAAC
 TTTTTCGGTGCTTGAACATAAAAATGAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCGGGCAAAATGCTTACCTTCTGGACCTTCA
 AGAGGTATGTAGGGTTTGTAGATACTGATGCCAACTTCACTGACAACGTTGCTATTTTCGTTCAAACCATTCGGAATCCAGAGAAA
 TCAAAGTTGTTTGTCTACTATTGATCCAAGCCAGTGGGCTTGAACCTGACAATAGTGTGCTCGTGTTTTGGAGTCACTTTTGT
 ATGAATAAATCTAGTCTTTGATCTAAATAATCTTACAGGCAAGGCGATAAATACCCAAATCTAAAATCTTTTAAACGTTAA
 AAGGACAAGTATGTCTGCCTGTATTAACCCCAAATCAGCTCGTAGTCTGATCTCATCAACTTGGGGGCACTATCTTGTTTTA
 GAGAAATTTGGCGGAGATCGGATATCGAGAAAAAGGTACGGTATTTAAACGTGAAATTTATCTCAAGATCTCTGCCTCGCGGT
 TTCGGTGTAGCGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCGGGGACGAGAC
 AAGCCGTCAGGGCGCTCAGCGGTGTTGGCGGTGTCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACTAGCGATAGCGGAGTGTATAC
 TGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAAGAGAA
 AATACCGCATCAGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTGTTTCGGCTGCGGGGAGCGGTATCAGCTCA
 CTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGG
 AACCGTAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA
 GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCGACCCTGCG
 GCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG
 TAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTG
 AGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
 TACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
 TTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCGGCAACAAACACCAGCTGGTAGCGGTGGTTTPTTGTTTGCAAGCAGCAGATTA
 CGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGG
 GATTTTGGTCAAGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
 TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAAGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAFTTTCGTTCACTCCATAG
 TTGCTGACTCCCGCTGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGTTACCATTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCC
 ACGCTCACCGGCTCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCACTGCAACTTTATCCGCC
 TCCATCAGTCTATTAATGTTGCGGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTTGCTG
 CAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC
 CATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTT
 ATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCTGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCT
 GAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCTCAACACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT
 GCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT
 GCACCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTCTGGTGTAGCAAAAAACGGAAAGGCAAAATGCCGAAAAAAGG
 GAATAAGGGGACACGGAAATGTTGAATACTCACTCTTCTTTTCAATATTAATGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCAT
 GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC
 TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCGCTTCAAGAATTAATTTCTCATGT
 TTGACAGCTTATCATCGATAAGCTGACTCATGTTGGTATTTGAAATAGACGCAGATCGGGAACACTGAAAAATAACAGTTATTA
 TTCG

Mayúsculas negritas: Fragmento liberado mediante el corte con las enzimas
 de restricción *Sac I* y *Not I*.

pPIC9K

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTGGCCATCCGACATCCACAGGTCATTCTCACACATAAGTGCCAA
 ACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGAGGACCTCCACTCCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGCCA
 TCGAAAAACAGCCAGTATTGGGCTTGATGGAGCTCGCTCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACCCATGACTTTAT
 TAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTATGTTTATTTCCGAAATGCAACAAGCTCCGCATTACCCCGAACATCA
 CTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCACTTTCCCAAATGGCCCAAJAAGTACAGTTTAAACGCTGTCT
 GGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGTGAACCTAAGTTTGGTTTGGTTGAAATGCTAACCGCCAGTTGGTCAAAA
 GAAACTTCCAAAAGTCGCCATACCGTTTGTCTTGTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAACTTAGCGC
 AGTCTCTCATCGTCTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGAAACACCCGCTTTTGGATGATATGCAATG
 TCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCC
 CTACTTGACAGCAATATAAACAGAAGGAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCTATAA
 TTGGACTGGTTCCAAATGACAAGCTTTTGATTTTAAAGACTTTTAAACGCAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCG
 AAGGATCCAAACGATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTGCGAGCATCCTCCGCATPAGCTGCTCCAGTCAACACT
 ACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCACTCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTT
 TGCCATTTTCCAAACAGCAAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATC
 TCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCCTTAGGGGGCCGCGAATTAATTGCGCTTAGACATGACTGTTCCCTCAG
 TTCAAGTTGGGCATTTACGAGAAGACCGGTTCTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCGCTGAGAGATGCAG
 GCTTCATTTTGTACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTCAATTTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGT
 CCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTGGGAAAATCAATCGAGTTTGTATGTTTTTCTTGGTATT
 TCCCCTCCTTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGAAGTTCGTTTGTGCAAGCTTATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTTATC
 ACAGTTAAATGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCACTCCGACCCGTCACCCCTGGAT
 GCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCGGTACTGCCGGGCTCTTGGGGATATCGTCCATCCGACAGCATCCCGAGTCACTATG
 CGGTGCTGCTACGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCCGTTTGGCCGCCGCC
 AGTCTAGCTCGCTTCCGACTTGGAGCCATPCGACTGCGATGCGGACTGGGACCCACCCGCTGTGGATATPCGAACTTAA
 ATGTAAGTTAAATCTTAAATAATTAATAAGTCCAGTTTCTCCATACGAACCTTAAACAGCATTTGGCGGTAGCACTAGACCT
 TCAACAGCAGCCAGATCCATCAGCTTGGCCAATATGTTTCACTCCCTCAGGAGTTACGCTTGTGAAGTGTGAACCTCTGGA
 AGGTTGCAGTGTAACTCCGCTGTATTGACGGCATAATCCGTACGTTGGCAAAGTGTGGTTGGTACCAGGAGGTAATCTCCACA
 ACTCTCTGGAGAGTAGGCACCAACAACACAGATCCAGCGTGTGTACTTGATCAACATAAGAAGAAGCATTCTCGATTTGCAGG
 ATCAAGTGTTCAGGAGCGTACTGATTGGACATTTCCAAAGCCTGCTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGAATAC
 ACTTGGTACAATTTCAACCTTGGCAACTGCACAGCTTGGTTGTAACAGCATCTTCAATTTGCGAAGCTCCTTGTCTGTCAAT
 ATCGACAGCCAACAGAAATCACCTGGGAATCAATACCATGTTTCACTTGGAGACAGAAGGTTGAGGCAACGAAATCTGGATCAGCG
 TATTTATCAGCAATAACTAGAACTTCAGAAAGGCCAGCAGGCATGCAATACTACACAGGGCTGATGTGTCAATTTGAACCATCA
 TCTTGGCAGEAGTAACGAACCTGTTTCCGACCAAAATATTTGTCACACTTAGGAACAGTTTCTGTTCCGTAAGCCATAGCAGC
 TACTGCCCTGGGCGCTCCTGCTAGCAGATACACTTAGCACCAACCTTGTGGGCAACGTAGATGACTTCTGGGTAAGGGTACCA
 TCCTTCTTAGGTTGGAGATGCAAAAAAATTTCTTTGCAACCAGCAACTTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGAAGGCA
 GAATTGCGGTTCCACCAGGAATATAGAGGCCAATTTCTCAATAGGTTCTGCAAAACGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTC
 AACTTGCACAGTCTCCGTTAGTTGAGCTTCATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTTAAAGTTATCT
 GGCAATTCATAGTTCTCTGGGAAAGGAGCTTCTAACACAGGTGTCTTCAAAGCGACTCCATCAAACCTTGGCAGTTAGTTCTA
 AAAGGCTTTGTCAACATTTTGACGAACATGTGACAAATGGTTGACTAATTCATAATCTGTTCCGTTTCTGAGTAGGACG
 ACGAAGGCATCTTCAATTTCTGTGAGGAGCCCTTAGAAACTCAATTTTGCACAATTCAACTTCAGAAAGGACTCT
 TTAGGTTTGGATTTCTTTTAGGTTGTTCTTGGTGTACTCTGGCTTGGCATCTCCTTTCTTCTAGTGACCTTTAGGGACTTCA
 TATCCAGGTTTCTTCCACCTCGTCCAACCTCACACCGTACTTGGCACATCTAACTAATGCAAAAATAAATAAGTCAGCACATTC
 CCAGGCTATATCTTCTTGGATTGACTTCTGCAAGTTTATCAGCTTCTCCTCCATAATTTAGCGTTCAACAAAACCTTCTGCTGCA
 AATAACCGTTTGGTATAAGAACCCTTCTGGAGCATTGCTTACGATCCACAAGGTGGCTTCCATGGCTCTAAGACCCCTTGTATT
 GGCCAAAACAGGAAGTGCCTTCCAAGTGACAGAAACCAACCTGTTTGTCAACCACAAATTTCAAGCAGTCTCCATCACAAATC
 CAATTCGATACCCAGCAACTTTTGAAGTTGCTCCAGATGTAGCACCTTTATACCACAAACCGTACGACGAGATTTGGTAGACTCCA
 GTTTGTGTCCTTATAGCCTCCGGAATAGACTTTTGGACGAGTACACCAGGCCAACGAGTAATTAGAAGAGTCAGCCACCAAAG
 TAGTGAATAGACCATCGGGGCGTCAAGTGTCAAAGACGCCAACAAAATTTCACTGACAGGGAACTTTTTACATCTTCAGAAAG
 TTCTGATTCAGTAGCAATTTGCCGAGCATCAATAAGGGGATTATACCAGAAGCAACAGTGAAGTACATCTACCAACTTTGCG
 GTCTCAGAAAAAGCATAAACAGTTCTACTACCGCCATTAGTGAACCTTTCAAATCGCCAGTGGAGAAGAAAAAGGCACAGCGA
 TACTAGCATTAGCGGGCAAGGATGCAACTTTATCAACCAGGGTCTATAGATAACCCCTAGCGCTGGGATCATCTTTGGACAAC
 TCTTTCTGCCAAATCTAGGTTCAAAATCACTTCAATGATACCATTTGTTACAACCTTGGCAAGTTGTCGATCAGCTCCTCAAT
 TGGTCTCTGTAAACGATGACTCAACTTGCACATTAACCTTGAAGCTCAGTCGATTGAGTGAACCTTGTATCAGGTTGTGCAGCTGGT
 CAGCAGCATAGGGAACACCGCTTTTCTACCAACTCAAGGAATTAACAACCTTGCACACTTGGCTATGCAAGGTAGCAAGGG
 AAATCTCATACTTGAAGCTGGCAGTGAAGTGTAGCTTGAAGAAATCTGAAGCCGATTTTTTATTATCAGTGAAGTCACTCAG
 GAGATCTCTACGCCGACGATCGTGGCCGACCTGACGGGGGGGGGGGGCTGAGGTTCTGCTCGTGAAGAAGGTTGTTGCTG
 ACTCATACCAGGCCGAAATCGCCCATCAATCCAGCCAGAAAGTGAAGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTTGACCA
 GTTGGTATTGTTGAACTTTTGTCTTGGCCACGGAACCGTCTGCGTTGTCGGGAAAGATGCGTGTATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAA
 GTTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCTCCCGTCAAGTCAAGCTAAGTCTGCGAGTGTACAACCAATTAACCAATTTCTGATTA
 GAAAACTCATCGAGCATCAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTAACAATACCATTTTTTGAAGAAAGCCGTTCTGT
 AATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGCTGCGGATCCGACTCGTCCAAATCAA
 TACAACCTATTAATTTCCCTCTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCAACATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAAGTGG
 CAAAAGCTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAAAAATCACTCGCATCAACCAACCCG

TTATTCATTCTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACC
 GCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGG
 GATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAAATTCGGTCAGCCAG
 TTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTTGGCAACGCTACCTTTGGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCC
 CATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGA
 ATTTAATCGCGGCCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGT
 TTTATTGTTGATGATGATATATTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTTGGCTTTCCCCCCCCCCC
 TGCAGGTCCGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCGATGSGGAAGATCGGGCTCGCCA
 CTTCCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCAAT
 GCACCATTCCTTGGCGGCGCGGTGCTCAACGGCCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAAGGAGTGCATAAGGGAGAGC
 GTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGGAATGGTATACCCGCATCTTTCAGTGTCTTGAGGTCTCCTATCAGATTATGCCAAC
 TAAAGCAACCGGAGGAGGATTTTCATGGTAAATTTCTCTGACTTTTGGTCATCAGTAGACTCGAACTGTGAGACTATCTCGGTT
 ATGACAGCAGAAATGTCCTTCTTGGAGACAGTAAATGAAGTCCACCAATAAAGAAATCCTTGTATCAGGAAACAACTTCTTGT
 TTCGAACTTTTTCCGGTGCCTTGAACATAAAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCGGGCAATGCTTACCTTCTGG
 ACCTTCAAGAGGTATGTAGGGTTGTAGATACTGATGCCAATCTCAGTGACAACGTTGCTATTTTCGTTCAAACCATTCGGAATCC
 AGAGAAATCAAAGTTGTTGTCTACTATTGATCCAAGCCAGTGGCGTCTTGAAACTGACAATAGTGTGCTCGTGTTTTGAGGTCA
 TCTTTGTATGAAATAAATCTAGTCTTTGATCTAAAATAATCTTGACGAGCCAGGGCGATAAATACCCAAATCTAAAACCTTTTTAAA
 ACGTTAAAAGGACAAGTATGTCCTGCCGTATTAACCCCAATCAGCTCGTAGTCTGATCCCTCATCAACTTGAGGGGCACATCT
 TGTTTTAGAGAAATTTGCGGAGATGCGATATCGAGAAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCAAGATCTCTGCCT
 CGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGG
 AGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCAGTCACTGAGCGATAGCGGAG
 TGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTA
 AGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCAGTCTGCTCGCTCGGCTCGGCTGCGGTCGGGCGGCGGCTAT
 CAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGCGAGGAAGAATCTGTGAGCAAAAGGCCAATA
 GCGCAGGAACCGTAAAAGGCGCGTTCGTCGGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCA
 AGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAAGATAACAGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGA
 CCTGCGCTTACC GGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAG
 TTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTAT
 CGTCTTGAGTCCAAACCGTAAGACAGGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG
 GCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC
 AGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGTCTTGTATCCGGCAAACAAACACCGCTGGTAGCGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAG
 CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAC
 GTTAAGGGATTTTGGTCTAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTAAATCAATCTA
 AAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCA
 TCCATAGTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGC
 GAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTT
 ATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGCGGGGAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCC
 ATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTGACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT
 GATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCTTCCGCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAAGTTGGCGCAGTGTATCACT
 CATGGTTATGGCAGCAGTGCATAAATCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAG
 TCATCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT
 TAAAAGTGTCTATCATTGGAAAACGTTCTTCCGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTAACC
 CACTCGTGCACCCAACTGATCTTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGGAAAGGCAAAATGCCGCA
 AAAAAGGGAATAAGGGCGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTTATCAGGGTTATT
 GTCTCATGAGCGGATACATAATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTCCCGGCACATTTCCCCGAAAAGTGCACC
 TGACGTCTAAGAAACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGGTATCAGAGGCCCTTTCGCTTCAAGAAATTAAT
 CTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTGACTCATGTTGGTATTGTGAAATAGACCGAGTCCGGAACACTGAAAAATAACA
 GTTATTATTCC

Mayúsculas negritas: Fragmento liberado mediante el corte con las enzimas
 de restricción *Sac I* y *Not I*.

pPIC9KhGH22K

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAA
 ACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTTGCCA
 TCGAAAACCAGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCCTCTATTAGGCTACTAACACCCATGACTTTTAT
 TAGCCTGTCTATCTCGCCCCCTGGCGAGGTTCAATGTTGTTTATTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCA
 CTCAGATGAGGGCTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCAATGTTCCCAAAATGGCCAAAACGACAGTTTAAACGGCTGTCTT
 GGAACCTAATATGACAAAAGCGTATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAA
 GAAACTTCCAAAAGTCGCCATACCGTTTGTCTTGTGTTGGTATGATGACGAATGCTCAAAAAAATCTCATTAATGCTTAGCGC
 AGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTG
 TCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTATGATCAAAAATTAACCTGTTCTAACCC
 CTACTTGACAGCAATATATAAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTTATAA
 TTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGAATTTTAAACGACTTTTAAACGACAACCTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTTCG
 AAGGATCCAACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTGCGAGCATCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACT
 ACAACAGAAGATGAAACGGCACAATAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTT
 TGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATC
 TCTCGAGAAAAGATTCCCAACCATTCCTTATCTAGACTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCC
 TTTGACACCTACCAGGAGTTGAAGAAGCCTATATCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAAGAACCCCCAGACCTCCCTCT
 GTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCCTCAAACAGGAGGAACAACAAGAAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCT
 GCTCATCCAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGCAGCAAC
 GTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGACTGGGCAGA
 TCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAACTCACACAACGATGACGCCTACTCAAGAATACGGGCTGCTCTACTGCTT
 CAGGAAGGACATGGAACAAGGTCAGACATTCCTGCGCATCGTGCATCGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGAGTCC
 GTAGATTTCCTAGGGCCGCGCAATTAATTCGCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAGACCG
 GTCATTGCTAGATCTAATCAAGAGGATGTCAGAAAGCCATTTGCCCTGAGAGATGCAAGCTTCAATTTTTGATCTTTTTTATTG
 AACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTTGTCATTTGTTTCTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGA
 ATATCTTGTGGTAGGGGTTTTGGGAAAATCATTGAGTTTGTATGTTTTCTTGGTATTTCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGAT
 TAAGTGAGAAGTTCGTTTGTGCAAGCTTATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCAAGTTAAATGCTAACCGCAGTCAGGCA
 CCGTGTATGAAATCAACAATGCGCTCATCGTCTCCTCGGCACCGTCAACCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGG
 TACTGCCGGGCTCTTGGGGATATCGTCCATTCCGACAGCAICGCGAGTCACTATGGCGTCTGCTAGCGCTATATGCGTTGAT
 GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCTGCTGCTTCCGCTACTTGGAGCC
 ACTATCGACTACGGATCATGGGACCACACCCGCTCTGTGGATCTATGAAATCTAAATGTAAGTTAAAACTCTAAAATAATTAA
 ATAAGTCCCAGTTCTCCATACGAACCTTAAACAGCATTGCGGTGAGCATCTAGACCTTCAACAGCAGCCAGATCCATCACTGCTT
 GGCAATATGTTTACAGTCCCTCAGGAGTTACGCTCTGTGAAATGATGAACTTCTGGAAGGTTGCAAGTTAACTCCGCTGTATTG
 ACGGGCATATCCGTACGTTGGCAAAGTGTGGTTGGTACCGGAGGAGTAATCTCCCAACTCTCTGGAGAGTAGGCACCAACAAAC
 ACAGATCCAGCGTGTGTACTTGATCAACATAAGAAGAAGCATTTCTCGATTTGCAGGATCAAGTGTTCAGGAGCGTACTGATTGG
 ACATTTCCAAAGCCTGCTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGCAATACACTTGGCTACAAITTTCAACCCCTTGGCAA
 CTGCAAGCTTGGTTGTGAACAGCATCTTCAATCTGGCAAGCTCCTTGTCTGTCTATTCGACAGCCAACAGAATCACCTGGGAA
 TCAATACCATGTTTACAGTTGAGACAGAAGGCTGAGGCAACGAAATGGAATCAGCGTATTATCAGCAATAACTAGAACTTACAG
 AAGGCCACGAGCAGTCAATACTACACAGGCTGATGTGTCATTTTGAACCATCATCTTGGCAGCAGTAAACGAACTGTTTCC
 TGGACCAAAATTTTTGTACACTTAGGAACAGTTTCTGTTCTGTAAGCCATAGCAGCTACTGCTGGGCGCCTCCTGCTAGCAG
 ATACACTTAGCACAACCTTGTGGGCAACGTAGATGACTTCTGGGGTAAAGGTACCATCCTTCTTAGGTGGAGATGCAAAAAA
 TTTCTTGTCAACCAGCAACTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGAAGGCAGAATGCGGTTCCACCAGGAATATAGAG
 GCCAACTTTCTCAATAGGCTTGGCAAAACGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTCAACTTGCACAGCTCCGTTAGTTGAGCT
 TCATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTTAAAGTTATCTGGCAATGCAATAGTTTCTCTGGGAAAG
 GAGCTTCAACACAGGTGCTTCAAAGCGACTCCATCAAATTTGGCAGTTAGTTCTAAAAGGGCTTTGTCCACATTTTGACGAAC
 ATTTGTCGACAAATGGTTTGTACTAATCCATAATCTGTTCCGTTTTCTGGATAGGAGCAGCAAGGGCATCTTCAATTTCTTGTGAG
 GAGGCTTAGAAACGTCAATTTTGCACAATTAATACGACCTTCCAGAAGGGACTTCTTTAGGTTTGGATTCTTCTTTAGGTTGTT
 CCTGGTGTATCCTGGCTTGGCATCTCCTTCTTCTAGTGACCTTTAGGGACTTCATATCCAGGTTCTCTCCACCTCGTCCAA
 CGTCAACCGTACTTGGCAGATCTAACTAATGCAAAAATAAATAAGTACGACATTTCCAGGCTATATCTTCTTGGATTTAGCT
 TCTGCAAGTTTATCAGCTTCTCCCTTAATTTTAGCGTTCAACAAAACCTCGTCTCAAATAACCGTTTGGTATAAGAACCCTTCTG
 GAGCATTGCTCTTACGATCCCAAGGTGGCTTCCATGGCTTAAGACCCCTTGAATGGCCAAAACAGGAAGTGGTTCCAAGTG
 ACAGAAACCAACACCTGTTTGTTCACCAACAAATTTCAAGCAGTCTCCATCACAATCCAATTCGATACCCAGCAACTTTTGAAGTT
 GCTCCAGATGAGCAGCTTTATACCACAAACCGTGACGAGAGATGGTAGACTCCAGTTTGTGCTCTTATAGCCTCCGGAATAG
 ACTTTTGGACGAGTACACAGGCCAACGAGTAATTAGAAGAGTACGCCACCAAGTAGTGAATAGACCATCGGGCGGTGAGT
 AGTCAAAGCGCAACAAAATTTCACTGACAGGGAATTTTGCATCTCAGAAAAGTTGTTTCAAGTAGTCAATTTGCGGAGCA
 TCAATAATGGGCAATTATACAGAAGCAACAGTGGAAAGTCACTACCAACTTTGCGGTCTCAGAAAAGCAATAACAGTTCTTAC
 TACCGCCATTAGTGAACTTTTCAAATCGCCAGTGGAGAAGAAAAGGCACAGCGATACTAGCATTAGCGGGCAAGGATGCAAC
 TTTATCAACCAGGTTCTATAGATAACCTAGCGCTGGGATCATCTTTGGACAACCTTTCTTGCACAAATCTAGGTTCCAAAATC
 ACTTCATTGATAACATTATTGTACAACCTTGGCAAGTTGTGATCAGCTCCTCAAATTTGGTCTCTGTAACGGATGACTCAACTT
 GCACATTAACCTGAAGCTCAGTCGATTGAGTGAACCTGATCAGGTTGTGACAGCTGGTACGAGCATAGGGAAAACAGGCTTTTCC
 TACCAAACTCAAGGAATTATCAAACCTGCAACACTTGGCTATGCAAGGTAGCAAGGAAAATGCTACTTGAAGTCCGACAGTGA
 GTGTAGTCTTGAGAAATCTGAAGCCGTAATTTTATTATCAGTGAGTCACTCAGGAGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGG
 CCGACTGCAGGGGGGGGGGGGGCGTGGGCTGCTGTAAGAAGGTTGTTGCTGACTCATACCAGGCTGAATCGCCCATC

ATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAACTTTGGCTTTGCC
 ACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTTCGATTTATTCAACAAGCCGCCGTC
 CCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTACAAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAAAC
 TGCAATTTATTATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACACCGAGGCGAGT
 TCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCCATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAA
 AATAAGGTTATCAAGTGAGAAAACCCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACT
 GTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATAAAATCAGTCCGATCAACCAACCGTTATTTCATTCGTGATTGGCCCTGAGCGGA
 GAUGAAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACATGCCAGCGCATCAAC
 AATATTTTCACTGAATCAGGATATTCTTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCA
 TCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTGTAGTGGTGGAAAGAGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACAT
 CATGGCAACCGTACCTTTGCCATGTTTCAGAAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTGCGACCTGA
 TTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTATACCCATATAAAATCAGCATCCATGTTGGAAATTAATCGCGGCCCTCGAGCAAGACGTT
 TCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTAT
 CTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCCCTGCAGGTGGGCATCACCGGCGCCACAGG
 TGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGC
 GTGGGTATGTTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGGCGGCGGGTGTCTCA
 ACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTGCATAAAGGAGAGCGTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGG
 AATGGTGATACCCGCAATCTTCAGTGTCTTGAAGTCTCCTATCAGATTAATGCCAACTAAAGCAACCGGAGGAGGAGATTTTCATG
 GTAAATTTCTCTGACTTTTGGTTCATCAGTAGACTCGAACTGTGAGACTATCTCGGTTATGACAGCAGAAAATGTCCTTCTGGAGA
 CAGTAAATGAAGTCCACCAATAAAGAAAATCCTTGTATCAGGAACAACTTCTTGTTCGAACTTTTTCGGTGCCTTGAACATAT
 AAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCGGGCAAATGCTTACCTTCTGGACCTTCAAGAGGTATGTAGGTTTGTAG
 ATACTGATGCCAACTTCAGTGACAACGTTGCTATTTCTGTTCAAACCAATTCGGAATCCAGAGAAATCAAAGTTGTTTGTCTACTAT
 TGATCCAAGCCAGTGGCTTGAACCTGACAATAGTGTCTCGTGTTTGAGGTCATCTTGTATGAATAAATCTAGTCTTTGA
 TCTAAATAATCTTGACGAGCAAGCGATAAAATACCCAAATCTAAAACCTTTTTAAAACGTTAAAAGGACAAGTATGCTGCTG
 TATTAACCCCAAATCAGTCTGATCTGATCTCATCAACTTGAAGGGCAGTACTTGTGTTAGAGAAAATTTGGGAGATGCGA
 TATCGAGAAAAGGTACCTGATTTTAAACGTAATAATTAATCTCAAGATCTCTGCTCGCGCTTTCGGTGTGACGGTGAATAAC
 CTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAG
 CGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTACGTCAGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCA
 GAGCAGATGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTT
 CCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGCTCGGCTCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT
 ATCCACAGAAATCAGGGGATAACCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCCGGTTG
 CTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
 TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGC
 CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCGTTCCGCTCCAAGCTG
 GGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAAGACACG
 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG
 GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGC
 TCTTGATCCGGCAAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTGTTTTCGCAAGCAGCAGATTACCGCGAGAAAAAAGGATCTC
 AAGAAGAPCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACACGTTAAGGGAATTTGGTCAATGAGATTATC
 AAAAAGGATCTTACCTAGATCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGCTTGAC
 AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGCTATTTTCGTTTACCATCAGTATGGCCCTGACCCCGCTGCTGT
 AGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCACGCTCACCGGCTCCAGATTT
 ATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATGTT
 TGCCGGGAAGCTAGAGTAAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACCGCT
 CGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT
 TAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATPCT
 CTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGGCGGAC
 CGAGTTGCTCTTCCCGCGCTCAACACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTTGAAAACGTTT
 TTCGGGGGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCA
 TCTTTTACTTTACCAGGCTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT
 GTTGAATACTCATACTCTCTTTTCAATATTAATGAAGCATTATCAGGGTTATTGTTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATG
 TATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGGCCACATTTCCCCGAAAAGTGCACCTGACGCTAAGAAAACCATTAATATCATG
 ACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTCTCAAGAAATTAATCTCATGTTTGCAGCTTATCATCGATAA
 GCTGACTCATGTTGGTATGTGAAATAGACGCAGATCGGGAACACTGAAAAATAACAGTTATTATTCG

Mayúsculas negritas: Secuencia que codifica para HGH madura.

APÉNDICE F**SECUENCIA AMINOACÍDICA DE HGH MADURA**

FPTIPLSRLFADNMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTP
SNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFNLSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQ
TLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCR
SVEGSCGF

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE Y EVALUACIÓN DE ESQUEMAS DE PURIFICACIÓN.

Campo de estudio: Biotecnología

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 10 de Enero de 1969, hija de Juan Manuel Sánchez Carrillo y Margarita Domínguez Vallejo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico-Clínico-Biólogo en 1990 con mención honorífica, tercer lugar de la generación.

Experiencia Profesional: Asistente de investigación en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina desde 1992.

