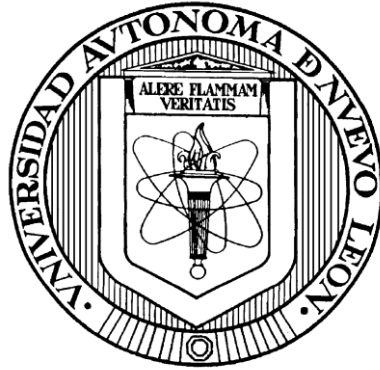


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES, BASADO EN ETIQUETAS DE HISTIDINA, PRODUCIDAS
EN *Pichia pastoris***

Por

Q.F.B. ALAN ROBERTO MÁRQUEZ IPIÑA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

Enero, 2011

**"ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES, BASADO EN ETIQUETAS DE HISTIDINA,
PRODUCIDAS EN *Pichia pastoris*"**

Aprobación de la Tesis:



DR. JORGE ÁNGEL ISIDRO ASCACIO MARTÍNEZ

Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA

Co-Director de Tesis



DRA. MARÍA DE LOURDES GARZA RODRÍGUEZ

Co-Director de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

**“PORQUE TU ME SACASTE DEL PELIGRO Y NO LES DISTE MOTIVO A MIS
ENEMIGOS DE ALEGRARSE CON MI DESGRACIA...¡¡¡TE ALABARÉ!!!”**

SALMO 30:1

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS:

Todo el honor y gloria siempre serán para mi Dios, quien me saca de las pruebas y me libra en las batallas, principalmente a Él dedico este trabajo, pues no lo hice solo, siempre tuve su compañía.

A mis padres Roberto y Yolanda por todo el apoyo a través de 24 años que llevo vivo, gracias a ustedes, a su enseñanza y a su ánimo esto se hizo posible.

A mis hermanos Iván (el Don) y Montse (Moze-K), gracias por ser tan latosos y molestables, los quiero.

A mis tíos, abuelos y primos, ya sea en Monterrey o en San Luis, siempre me han apoyado y tenido paciencia, les agradezco por todo.

A mi comisión de tesis, Dr. Ascacio, Dr. Barrera y Dra. Rodriguez, gracias por su paciencia y enseñanza todo lo que aquí se plasma lo he aprendido de ustedes, gracias por la revisión turbo del manuscrito y sus comentario.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, son tantos y todos merecen mi agradecimiento.

A mis compañeros del posgrado, por aguantarme, aunque creo que no fui latoso. Los aprecio en gran manera.

A cada persona que intervino en la realización de esta tesis mi eterno agradecimiento, y declaro la bendición de Dios sobre sus vidas.

INDICE

	Página.
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.	
1.1 Biotecnología.	1
1.2 Proteínas Recombinantes.	2
1.3 Sistemas de expresión.	3
1.4 Hospederos.	4
1.4.1 <i>Escherichia coli</i> .	4
1.4.2 Cultivos celulares de células de insecto y de mamífero.	5
1.4.3 <i>Pichia pastoris</i> .	6
1.4.3.1 Antecedentes.	7
1.4.3.2 Regulación de la expresión de proteínas heterólogas en <i>Pichia pastoris</i> .	8
1.3.3.3 Vector de expresión pPIC9.	8
1.4 Purificación de proteínas recombinantes.	10
1.4.1 IMAC y la etiqueta de histidinas.	12
1.5 Antecedentes del laboratorio de Biotecnología.	14
1.5.1 La HGH.	14
1.5.2 Purificación mediante intercambio iónico.	14
1.6 Justificación.	16
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General.	17
2.2 Objetivos específicos.	17
CAPÍTULO III: ESTRATEGIA GENERAL	18
CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1 MATERIAL.	20
4.1.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.	20
4.1.2 Biológicos.	21
4.1.3 Infraestructura.	22
4.2 MÉTODOS.	24
4.2.1 Extracción de ADN genómico de levadura.	24
4.2.2 Amplificación de la secuencia codificante de la HGH.	24
4.2.2.1 Diseño de oligonucleótidos.	24
4.2.2.1.1 Oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante.	24

4.2.2.1.2 PCR para la amplificación de la secuencia codificante de HGH.	25
4.2.3 Adición de la secuencia de la etiqueta y sitios de restricción.	26
4.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos.	26
4.2.3.1.1 Oligonucleótidos para la adición de la secuencia de la etiqueta y sitios de restricción.	26
4.2.3.1.2 PCR para la adición de la secuencia para 6His.	27
4.2.4 Clonación en el plásmido pCR 2.1-TOPO.	27
4.2.4.1 Transformación de células electrocompetentes.	28
4.2.4.2 Análisis de la clonación en TOPO.	28
4.2.4.3 Extracción del ADN plasmídico.	29
4.2.5 Subclonación de la secuencia de HGH-6His en pPIC9 (construcción pPIC9-HGH-6His).	30
4.2.5.1.1 Liberación del fragmento a partir de TOPO.	31
4.2.5.1.2 Doble digestión de pPIC9.	31
4.2.5.1.3 Purificación del ADN a partir de gel de agarosa al 1%.	32
4.2.5.2 Ligación de los fragmentos purificados.	32
4.2.5.3 Transformación de células electrocompetentes.	33
4.2.5.4 Análisis de las clonas obtenidas	34
4.2.5.5 Extracción de ADN plasmídico de pPIC9-HGH-6His.	35
4.2.6 Caracterización del plásmido pPIC9-HGH-6His	35
4.2.7 Transformación de la levadura.	36
4.2.7.1 Linearización con <i>SacI</i> .	36
4.2.7.2 Electroporación de <i>Pichia pastoris</i> .	37
4.2.7.3 Análisis de integración al genoma de <i>Pichia pastoris</i> .	37
4.2.8 Expresión de la HGH-6His.	38
4.2.8.1 Ensayos de expresión en tubo cónico de 50mL.	38
4.2.8.2 Análisis de la expresión en mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	39
4.2.8.2.1 Precipitación de proteínas en la muestra.	39
4.2.8.2.2 Preparación de la muestra para SDS-PAGE.	40
4.2.8.2.3 Electroforesis de las muestras.	40
4.2.8.2.4 Densitometría	40
4.2.9 Ensayos de purificación.	41
4.2.9.1 Purificación a pequeña escala.	41
4.2.9.2 Precipitación de proteínas en la muestra.	42
4.2.9.3 Preparación de la muestra para SDS-PAGE.	42
4.2.9.4 Electroforesis de las muestras.	42
4.2.9.5 Densitometría.	43

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5.1 Extracción de ADN genómico de levadura.	44
---	----

5.2 Amplificación de la secuencia codificante de la HGH.	45
5.2.1 Diseño de los oligonucleótidos empleados.	45
5.2.2 PCR para amplificación de la secuencia codificante.	46
5.3 Adición de la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas (6His)	47
5.3.1 Diseño de oligonucleótidos para adicionar la secuencia 6His y sitios de restricción.	47
5.3.2 PCR para adicionar la secuencia 6His	48
5.4 Clonación en TOPO de la secuencia codificante con las modificaciones realizadas.	48
5.4.1 Análisis de la clonación en TOPO.	49
5.4.2 Extracción de plásmido TOPO-HGH-6His.	50
5.5 Subclonación de la secuencia HGH-6His en el vector de expresión pPIC9 (generación del vector pPIC9-HGH-6His).	51
5.5.1 Liberación del fragmento hgh-6His y preparación de pPIC9.	51
5.5.2 Ligación de los fragmentos purificados.	52
5.5.4 Transformación de bacterias electrocompetentes.	53
5.5.5 Análisis de las clonas obtenidas.	53
5.5.6 Extracción del plásmido pPIC9-HGH-6His	54
5.6 Caracterización del plásmido pPIC9-HGH-6His	55
5.7 Construcción de la cepa productora de la HGH-6HIS	57
5.7.1 Linearización del plásmido pPIC9-HGH-6His con <i>Sac I</i> y transformación de la levadura.	58
5.7.2 Análisis de integración al genoma de <i>Pichia pastoris</i> .	
5.8 Producción de la HGH-6HIS.	60
5.8.1 Fermentación y análisis de la producción en el sobrenadante mediante SDS-PAGE.	60
5.9 Ensayo de purificación mediante IMAC.	64
5.10 Intento por mostrar la versatilidad del método de purificación.	67
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN	69
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO VIII: PERSPECTIVAS	76
CAPÍTULO IX: BIBLIOGRAFÍA	77
CAPÍTULO X: ANEXOS	85

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de sistemas de expresión.	4
Cuadro 2. Producción y pureza de GHs	15
Cuadro 3. Iniciadores para amplificar la secuencia codificante de HGH	25
Cuadro 4. Condiciones de la PCR para amplificar HGH.	25
Cuadro 5. Programa de PCR para HGH.	25
Cuadro 6. Iniciadores para la adición de la secuencia de 6His	26
Cuadro 7. Condiciones de la PCR para adicionar la secuencia 6His	27
Cuadro 8. Programa de PCR para adicionar la secuencia 6His.	27
Cuadro 9. Condiciones de la PCR de colonia para verificar clonación en TOPO.	29
Cuadro 10. Programa de PCR de colonia para verificar clonación en TOPO.	29
Cuadro 11. Condiciones para la doble digestión.	32
Cuadro 12. Condiciones para la ligación del fgto HGH-6His y el vector pPIC9.	33
Cuadro 13. Condiciones de la PCR de colonia para verificar clonación en pPIC9.	34
Cuadro 14. Programa de PCR de colonia para verificar clonación en pPIC9.	34
Cuadro 15. Condiciones para la digestión con <i>SacI</i> .	36
Cuadro 16. Condiciones de la PCR para verificar la inserción de pPIC9-HGH-6His.	38
Cuadro 17. Programa de PCR para verificar la inserción de pPIC9-HGH-6His.	38
Cuadro 18. Cuantificación de proteínas totales.	63
Cuadro 19. Pureza y rendimiento para HGH-6His mediante IMAC.	65
Cuadro 20. Resumen de los alcances del proyecto.	68

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Vector de expresión pPIC9 para <i>Pichia pastoris</i> .	9
Figura 2. Tipos de cromatografías comúnmente empleadas en la purificación de proteínas.	11
Figura 3. Modelo de la interacción entre la etiqueta de histidinas y el Ni ²⁺ .	13
Figura 4. Estrategia general para la producción de HGH-6His y su purificación.	19
Figura 5. Esquema de la construcción del vector de expresión pPIC9.	31
Figura 6. ADN de <i>Pichia pastoris</i> productora de HGH recombinante.	44
Figura 7. Iniciadores empleados para la amplificación de la hGH.	46
Figura 8. Amplificación de hGH empleando los iniciadores específicos	46
Figura 9. Iniciadores empleados para la adición de la secuencia 6His.	47
Figura 10. Amplificación de hGH y adición de la secuencia para 6His.	48
Figura 11. Análisis por PCR de la clonación de hGH-6His en TOPO.	50
Figura 12. Extracción de los plásmidos TOPO-hGH-6His.	51
Figura 13. Doble digestión de pPIC9 y TOPO-hGH-6His.	52
Figura 14. Construcción del vector pPIC-hGH-6His.	53
Figura 15. Análisis por PCR de la clonación de hGH-6His en pPIC9.	54
Figura 16. Extracción de los plásmidos pPIC9-hGH-6His.	55
Figura 17. Análisis mediante enzimas de restricción del plásmido pPIC9-hGH-6His.	56
Figura 18. Alineamiento de secuencias proteicas.	57
Figura 19. Linearización de pPIC9-hGH-6His con <i>SacI</i> .	58
Figura 20. <i>Pichia pastoris</i> transformada.	58
Figura 21. Análisis de la integración al genoma de <i>Pichia pastoris</i> , así como el fenotipo obtenido.	59
Figura 22. Análisis de la producción de proteínas secretadas al medio de cultivo por la cepa de <i>Pichia pastoris</i> construida.	61

Figura 23. Curva de calibración.	62
Figura 24. Densitogramas de la producción.	64
Figura 25. Densitograma para el análisis de pureza mediante IMAC.	65
Figura 26. Purificación de la HGH-6His mediante IMAC.	66
Figura 27. Análisis de la integración de pPIC9-E2-6His al genoma de <i>P. pastoris</i> .	67
Figura 28. Análisis de la integración de pPIC9-TODa-6His al genoma de <i>P. pastoris</i> .	68

ABREVIATURAS

6His	Etiqueta de 6 histidinas.
aa	Residuos aminoacídicos.
ADN	Acido Desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario al ARNm.
aox1	Gen de la alcohol oxidasa 1.
AOX1	Alcohol oxidasa 1.
<i>AOX1</i>	Promotor del gen aox1.
ARN	Acido Ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
dNTP's	Desoxirribonucleósidos Trifosfato.
DO ₆₀₀	Densidad Óptica a 600nm.
e.g.	<i>exempli gratia</i> ; por ejemplo.
EDTA	Ácido Etilen-diamino-tetra-acético.
EK	Enterocinasa.
<i>et al.</i>	<i>Et álii</i> ; y otros.
Fgto.	Fragmento.
h	Horas.
hGH	Secuencia codificante para la HGH madura (no incluye al péptido señal).
HGH	Hormona del Crecimiento Humana (proteína).
hGH-6His	hGH + secuencia codificante para la etiqueta 6His.
HGH-6His	HGH con la etiqueta de 6 histidinas (proteína).
IMAC	Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados.
kV	Kilo volts.
M	Concentración molar.
mg	Miligramos.
min	Minutos.
mL	Mililitro

mM	Concentración milimolar.
ng	Nanogramos.
nt	Nucleótidos.
NTA	Acido Nitrilotriacético.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction).
pH	Potencial de iones hidrógeno.
pPIC9-hGH-6His	Vector de expresión pPIC9, portador de la secuencia de hGH con la adición de la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas.
rpm	Revoluciones por minuto.
SN	Sobrenadante.
TOPO-hGH-6His	Vector pCR 2.1-TOPO portador de la secuencia de hGH con la adición de la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas.
Taq	Polimerasa de ADN de <i>Thermophilus aquaticus</i> .
TE	Solución amortiguadora de Tris-EDTA.
UV	Ultravioleta.
V	Volts.
μ F	Micro faradios.
Ω	Ohms.

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Q.F.B. Alan Roberto Márquez Ipiña

Candidato al grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Número de páginas: 96

Título del estudio: Establecimiento de un método de purificación de proteínas recombinantes, basado en etiquetas de histidina, producidas en *Pichia pastoris*.

Dentro de la biotecnología la producción de proteínas recombinantes toma relevancia dados los avances recientes en el campo de la genómica y proteómica. Siendo de especial importancia dos enfoques principales, la producción de proteínas heterólogas y la purificación de las mismas a partir de microorganismos modificados por Ingeniería Genética. Resaltando a *Pichia pastoris*, una levadura metilotrófica utilizada como hospedero biotecnológico en la producción de proteínas recombinantes, dadas sus cualidades, dentro de las cuales resalta una alta tasa de crecimiento y el uso de promotores fuertes y finamente regulados para la expresión de las proteínas heterólogas. En cuanto a la purificación se refiere, una metodología que ha tomado importancia es la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), empleando una etiqueta de histidinas, fusionada a la proteína de interés a purificar, como el ligando de afinidad, cuyo sistema ha mostrando buen resultado.

En este trabajo se describe la construcción de un sistema de expresión de la Hormona del Crecimiento Humana (HGH) fusionada a un oligopéptido de seis histidinas, que fue empleado para su purificación mediante IMAC. Se construyó el plásmido expresor para la HGH etiquetada, el cual tiene cualidades que le permiten intercambiar el casete de expresión por otro de interés. Se produjo la HGH etiquetada obteniendo 53 µg/mL y una pureza superior al 90%. Queda abierta la posibilidad de emplear el plásmido construido para la producción y purificación de otras proteínas de interés académico y/o industrial.

Dr. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez

Director

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Biotecnología.

En un sentido estricto la biotecnología está definida como la aplicación encaminada de procesos y productos biológicos a la producción industrial, médica y agrícola, tal como la alteración de enzimas, la clonación de ADN recombinante y la obtención de sus productos traducidos (e.g. insulina humana producida en bacterias recombinantes), reemplazo de genes defectuosos mediante recombinación sitio específica, limpieza de contaminantes medioambientales por microorganismos modificados, etc. (Rédei, 2008). Un gran impulso recibido por la biotecnología ha sido el perfeccionamiento de las técnicas de manipulación de ácidos nucleicos (llamada tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética) desarrolladas a partir de la década de 1970 (Ascacio-Martínez, 2004). Uno de los objetivos principales de la biotecnología moderna es lograr que una célula produzca biológicos o metabolitos de alto valor en forma predecible y controlable. Aunque muchos metabolitos se obtienen a partir de organismos sin modificaciones genéticas, la incorporación de la tecnología del ADN recombinante y de biotecnológicos. Por un lado fue posible modificar en control permitió optimizar la eficiencia del proceso de producción y calidad del producto. Por

INTRODUCCIÓN

un lado fue posible modificar el control de vías metabólicas, por ejemplo la sobreproducción de algún metabolito, y por otro, permitió “fabricar” proteínas bajo la forma de proteínas recombinantes (ArgenBio, 2005).

1.2 Proteínas Recombinantes.

Al entrar de lleno en la era genómica, la atención se está desplazando de los amplios análisis de secuencias de genomas hacia estudios funcionales y estructurales de las proteínas en estos codificadas. Sin embargo, las proteínas son mucho más diversas química y estructuralmente que los ácidos nucleicos, haciéndolas no aptas para metodologías genéricas (Waugh, 2005). Las respuestas a preguntas biológicas y médicas sobre la función proteica en esta era de la biología de sistemas y genómica funcional, requiere la aplicación de enfoques de alto desempeño para la producción en paralelo de diversas proteínas de un mismo organismo. La cristalografía de proteínas, generación de anticuerpos u otro reactivo de afinidad hacia proteínas de interés, así como mapeo *in vitro* de interacciones proteína-proteína son tecnologías que no solo requieren un gran número de proteínas purificadas, sino también suficiente cantidad de ellas (Lin *et al.*, 2006).

La biotecnología de proteínas está implicada en la producción y aislamiento de proteínas específicas no solo a partir de diversas fuentes naturales como plantas, animales o microorganismos, sino como ya se ha dicho, gracias a la ingeniería genética se ha posibilitado la producción industrial de grandes cantidades de proteínas, de las

INTRODUCCIÓN

cuales su disponibilidad era muy. Actualmente se ofrecen en el mercado una variedad de proteínas de origen recombinante con una cantidad importante de aplicaciones. La lista se incrementa día a día, lo cual impulsa el mercado biotecnológico e implica un interés comercial en la investigación en este campo (Guerrero-Olazarán, 2004).

1.3 Sistemas de expresión.

Dada la robusta capacidad actual para clonar y expresar cualquier gen foráneo en un hospedero heterólogo, es producir casi cualquier proteína en cantidades abundantes. Para ello los hospederos procariontes y eucariotes son las dos categorías generales de los sistemas de expresión. Los sistemas procariontes son generalmente más sencillos de manipular y satisfactorios para la mayoría de los procesos. No obstante, hay serias limitaciones al emplear células procariontes en la producción de proteínas eucariotas pues muchas de ellas requieren para ser biológicamente activas de una variedad de modificaciones postraduccionales, tales como un correcto plegamiento, glicosilación, fosforilación, formación de puentes disulfuro, etc. (Rai y Padh, 2001). En la Cuadro 1 se muestra un resumen de los sistemas de expresión (Invitrogen, 2010) y en la sección siguiente su descripción.

Cuad

ro 1. Descripción de sistemas de expresión.

Cuadro 1. Descripción de sistemas de expresión.

Cuadro 1. Descripción de sistemas de expresión.

Cuadro 1. Descripción de sistemas de expresión.

INTRODUCCIÓN

Cuadro 1. Descripción de sistemas de expresión.

Organismo hospedero	Aplicaciones mas comunes	Ventajas	Retos potenciales
Células libres	<ul style="list-style-type: none">-Detección rápida de expresión.-Proteínas toxicas.-Incorporación de etiquetas o aa no naturales.-Ensayos funcionales.-Interacciones proteicas.	<ul style="list-style-type: none">-Expresión rápida y directa de plásmido.-Fácil adición de componentes para aumentar solubilidad o funcionalidad.-Escalable.	<ul style="list-style-type: none">-Expresión mayor a 3mg.
Bacterias	<ul style="list-style-type: none">-Análisis estructural.-Generación de anticuerpos.-Ensayos funcionales.-Interacciones proteicas.	<ul style="list-style-type: none">-Escalable.-Bajo costo.-Condiciones de cultivo simples.	<ul style="list-style-type: none">-Proteínas solubles.-Modificaciones postraduccionales.-Expresión de proteínas funcionales de mamíferos.
Levaduras	<ul style="list-style-type: none">-Análisis estructural.-Generación de anticuerpos.-Ensayos funcionales.-Interacciones proteicas.	<ul style="list-style-type: none">-Procesamiento eucariota de proteínas.-Escalable (g/L).-Medios simples.	<ul style="list-style-type: none">-Fermentaciones requeridas para altos rendimientos.-El crecimiento requiere optimización.
Insectos	<ul style="list-style-type: none">-Análisis estructural.-Generación de anticuerpos.-Ensayos funcionales.	<ul style="list-style-type: none">-Modificaciones postraduccionales similares a mamíferos.-Mayor rendimiento que sistemas mamíferos.	<ul style="list-style-type: none">-Condiciones de cultivo exigentes.
Mamíferos	<ul style="list-style-type: none">-Generación de anticuerpos.-Ensayos funcionales.-Interacciones proteicas.	<ul style="list-style-type: none">-Alto nivel de modificaciones postraduccionales correctas.- Proteínas completamente funcionales.	<ul style="list-style-type: none">-Rendimiento de mg/L solo en cultivos en suspensión.-Condiciones de cultivo exigentes.

1.4 Hospederos

1.4.1 *Escherichia coli*.

En las pasadas tres décadas, *E. coli* ha sido extensamente empleada como hospedero celular para la expresión de proteínas heterólogas. Sin embargo, aplicar este sistema a la producción de proteínas complejas derivadas de genomas eucariotas, que requieren modificaciones postraduccionales, ha sido problemático, dado que este microorganismo carece de la maquinaria intracelular que le permita realizar dichos procesos. De tal manera que la expresión exitosa en *E. coli* depende de las características tanto de estructura terciaria y requerimientos de modificaciones

INTRODUCCIÓN

postraduccionales de la proteína de interés. Como *E. coli* es un procarionta, su capacidad limitada de plegar correctamente en su citosol proteínas heterólogas y realizar otras modificaciones postraduccionales, limita el tipo de proteínas que pueden ser expresadas y que sean funcionales, por lo cual generalmente no es adecuada para su aplicación en la producción de proteínas que contienen enlaces disulfuro, o que requieren glicosilación, isomerización cis/trans de prolina, isomerización disulfuro, lipidación, sulfatación o fosforilación. Una variedad de proteínas que no han sido expresadas con una correcta maduración postraduccional en *E. coli*, lo han sido posteriormente en otros sistemas de expresión, tal es el caso de *Pichia pastoris* (Daly y Hearn, 2005). Algunos reportes indican que únicamente del 15 al 20% de los ADNcs humanos expresados en *E. coli* producen proteínas solubles y biológicamente activas (Guzzo y Yang, 2007).

1.4.2 Cultivos celulares de células de insecto y de mamífero.

Los cultivos de células animales son los sistemas con la más alta similitud a las células humanas, respecto a los patrones y capacidad de las modificaciones postraduccionales que realizan. Sin embargo, su cultivo es más complicado, costoso y usualmente la producción alcanza títulos bajos. Por otro lado, las células de insecto transformadas con vectores de baculovirus han alcanzado popularidad dado que se consideran más resistentes al estrés, fáciles de manipular y más productivas en comparación con los sistemas de mamíferos. Algunas deficiencias presentes en las células de insecto son a)

INTRODUCCIÓN

un procesamiento ineficiente y deterioro de la capacidad de plegamiento y secreción debido a la infección con el baculovirus, b) actividad de proteasas codificadas por el virus, c) nivel bajo de expresión y d) desviaciones en los patrones de modificaciones postraduccionales, lo cual actúa de manera inmunogénica (Schmidt, 2004).

1.4.3 *Pichia pastoris*.

La levadura metilotrófica (capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono) *Pichia pastoris* ha venido siendo cada día más empleada en la producción de proteínas recombinantes. Dentro de sus ventajas crece a altas densidades celulares, provee una expresión del transgen finamente controlada e inducible por metanol y secreta las proteínas heterólogas de manera eficiente (Balamurugan *et al.*, 2007; De Scutter *et al.*, 2009).

La producción de proteínas recombinantes en la levadura tiene ventajas sobre otros sistemas de expresión, tanto eucariotas como procariotas:

- 1.- Rápido crecimiento acoplado a un crecimiento a altas densidades celulares.
- 2.- Altos niveles de productividad en medios casi libres de proteínas.
- 3.- Eliminación de endotoxinas y contaminación con bacteriófagos.
- 4.- Fácil manipulación genética y disponibilidad de vectores de expresión bien caracterizados.

5.- Ausencia de patógenos humanos.

6.- Diversidad de modificaciones postraduccionales que incluyen plegamiento, glicosilación, metilación, acilación y señalización subcelular.

7.- La posibilidad de diseñar proteínas que sean secretadas y que puedan ser purificadas del medio de crecimiento, sin necesidad de cosechar a las mismas células (Li *et al.*, 2007; Demian y Adrio, 2008).

1.4.3.1 Antecedentes.

Phillips Petroleum Co., fue la primera en desarrollar los medios y protocolos para cultivar *P. pastoris* en metanol a altas densidades celulares. En la década de 1970 esta levadura fue evaluada como una fuente potencial de proteína unicelular, dada su capacidad de utilizar el metanol como única fuente de carbono. Desafortunadamente la crisis del petróleo de finales de esa década causó un incremento dramático en el precio del metano (fuente del metanol), de manera simultánea, el precio de la soya (principal alternativa para alimento animal) cayó, por lo cual la fuente proteica a partir de metanol dejó de ser rentable. No obstante, en la siguiente década Phillips Petroleum Co., junto con el Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc. (SIBIA) estudiaron a *Pichia pastoris* como sistema para la producción de proteínas heterólogas. SIBIA aisló el gen y el promotor de la Alcohol Oxidasa, además generó vectores, cepas y protocolos para la manipulación de la levadura. Así, lo que comenzó

INTRODUCCIÓN

20 años atrás en un programa para convertir metanol en una fuente de proteínas para limentación animal, se habría de convertir en lo que hoy es una importante herramienta biológica para la producción de proteínas recombinantes (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Cos *et al.*, 2006).

1.4.3.2 Regulación de la expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*.

El metabolismo del metanol en las levaduras metilotróficas requiere de la expresión de un grupo de enzimas, de las cuales la Alcohol Oxidasa I (AOX I) es indetectable en células cultivadas en medios con fuentes de carbono como glucosa. No obstante, esta enzima puede llegar a representar el 30% del total de las proteínas solubles de la levadura crecida en metanol. Estos hallazgos permitieron anticipar que la síntesis de la AOX I se podría regular a nivel transcripcional y que el promotor para el gen *aox1* podría ser útil para controlar la expresión de genes heterólogos. De manera tal que bajo el promotor AOX los genes foráneos se mantienen en un modo apagado-encendido: apagado en fuentes de carbono diferentes al metanol y encendido en medios de cultivo con metanol (Poutou, 2005).

1.4.3.3 Vector de expresión pPIC9.

Dado el desarrollo tecnológico en torno al sistema de expresión de *Pichia pastoris*, se cuenta con vectores para la expresión de proteínas heterólogas en la levadura, los

INTRODUCCIÓN

cuales presentan características en común. Dentro de la familia pPIC, el casete para la expresión del gen foráneo está compuesto por secuencias de ADN que contienen el promotor *AOX1*, seguido por sitios de restricción para la clonación del gen y a continuación una secuencia de terminación de la transcripción del gen *aox1* (la cual propicia un procesamiento eficiente de la región 3' y la poliadenilación del ARNm). Estos vectores también incluyen al gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) como marcador de selección, además de las secuencias requeridas para la replicación y mantenimiento en bacterias (*ColE1*, origen de replicación y *Amp^r*, gen de resistencia a ampicilina). Para la secreción de la proteína a producir, se han construido vectores que contienen una secuencia de ADN enfrente del promotor *AOX1* que codifica para una secuencia señal, que para el caso específico de pPIC9 es el factor de apareamiento α (α -MF) para secreción en *S. cerevisiae* (Cereghino y Cregg, 2000). En la Figura 1 se muestran las características del vector de expresión pPIC9 con un tamaño de 8023pb.



Figura 1. Vector de expresión pPIC9 para *Pichia pastoris*. Para la expresión de proteínas recombinantes, incluye sitios únicos *XhoI*, *SnaBI*, *EcoRI*, *AvrII*, *NotI*. Incluye una señal de secreción y el gen *HIS4* como marcador de selección.

1.4 Purificación de proteínas recombinantes.

Otra ventaja importante del sistema de expresión *Pichia pastoris*, al emplear el vector de expresión pPIC9, es la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo. De manera tal que con niveles bajos de proteína endógena secretada al medio por parte de la levadura y sin proteínas adicionales añadidas al mismo, la proteína heteróloga constituye una parte mayoritaria del total de proteínas en el medio de cultivo, lo cual facilita su purificación (Weidner *et al.*, 2010).

Dado que cada proteína es diferente, no hay una estrategia de purificación que pueda considerarse genérica o los conocimientos *a priori* de todas las problemáticas involucradas con tan grande cantidad de proteínas y la manera de resolverlas, siendo menester desarrollar protocolos y estrategias para cada proteína individual teniendo siempre en cuenta cuál será su aplicación final (Gräslund *et al.*, 2008).

La purificación de proteínas generalmente requiere varios pasos de cromatografía en columna, que típicamente incluyen separación mediante: Intercambio Iónico, Interacciones Hidrofóbicas y Filtración en Gel (Wu *et al.*, 2009). En la Figura 2 se muestran las principales cromatografías empleadas en los procesos típicos de purificación (Lebediker, 2006).

INTRODUCCIÓN

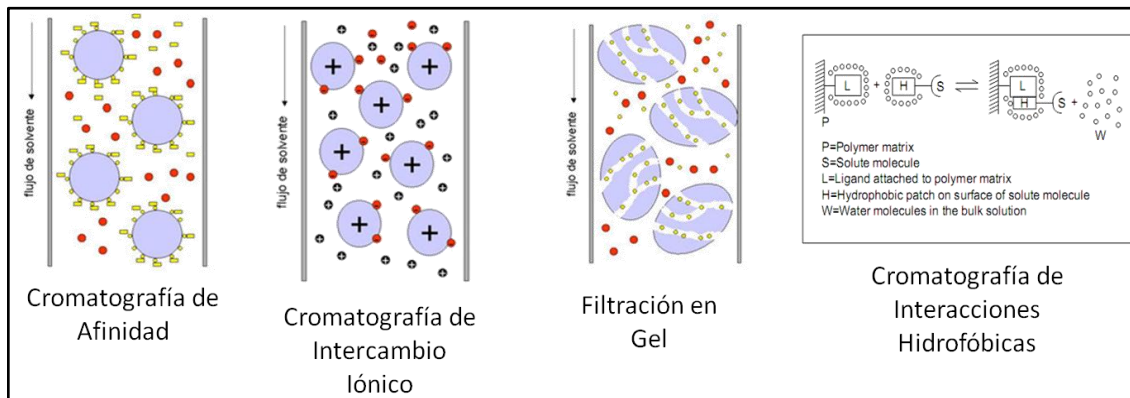


Figura 2. Tipos de cromatografías comúnmente empleadas en la purificación de proteínas.

Dado los avances y metodología aplicadas en la genómica, proteómica y bioinformática el número de proteínas candidatas para ser producidas por técnicas recombinantes se ha visto incrementado exponencialmente, como también se han hecho esfuerzos para desarrollo métodos de alto rendimiento para la identificación rápida de proteínas con potenciales aplicaciones terapéuticas, diagnósticas o industriales. La producción de numerosas proteínas heterólogas no sería factible si además fuera necesario el desarrollo de sendos procedimientos de purificación, específicos para cada una de ellas (Arнау *et al.*, 2006). Las etiquetas de afinidad son herramientas importantes para la purificación de proteínas recombinantes, pues permiten purificarlas considerablemente a partir extractos crudos, incluso sin pasos previos para la remoción de algún material. Además permiten que diversas proteínas puedan ser purificadas empleando protocolos generalizados, lo cual contrasta con los procesos individualizados asociados a las cromatografías convencionales (Lichty *et al.*, 2005). Gracias al uso de las etiquetas de afinidad, la purificación de proteínas recombinantes se ha simplificado, requiriendo que sean clonadas en fase con la proteína blanco en construcción de y selectivamente interactuar con un ligando que se ha inmovilizado en

INTRODUCCIÓN

un soporte sólido. La forma más común de etiquetas de afinidad es la etiqueta de polihistidina, consistente típicamente en seis residuos de histidinas (6His) que selectivamente se unen a metales de transición, tales como Ni^{2+} y Co^{2+} , en un proceso denominado Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados o IMAC por sus siglas en inglés (Immobilized Metal Affinity Chromatography) (MaCluskey *et al.*, 2007).

1.4.1 IMAC y la etiqueta de histidinas.

El concepto de IMAC fue ideado y demostrada su aplicabilidad por Porath *et al.* en 1975. Se basó en afinidad de metales de transición como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} por la histidina y cisteína en soluciones acuosas. la idea pronto se extendió al uso de iones metálicos fuertemente unidos a un soporte, para el fraccionamiento de soluciones proteicas. Lo que inicialmente se ideó como una técnica de fraccionamiento de suero, pronto se convertiría en la cromatografía de afinidad más ampliamente usada. El desarrollo se aceleró gracias a los avances en la biología molecular a partir de la década de 1970, así como a la utilización del ácido nitrilotriacético (NTA) en los 80's. El NTA forma cuatro enlaces coordinados con el Ni^{2+} , restando dos valencias libres al metal para la interacción con las cadenas laterales de los residuos de histidina (anillos imidazol) (Block *et al.* 2009). En la Figura 3 se presenta el modelo de la interacción entre las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos de la etiqueta y el Ni^{2+} inmovilizado por el NTA.

INTRODUCCIÓN

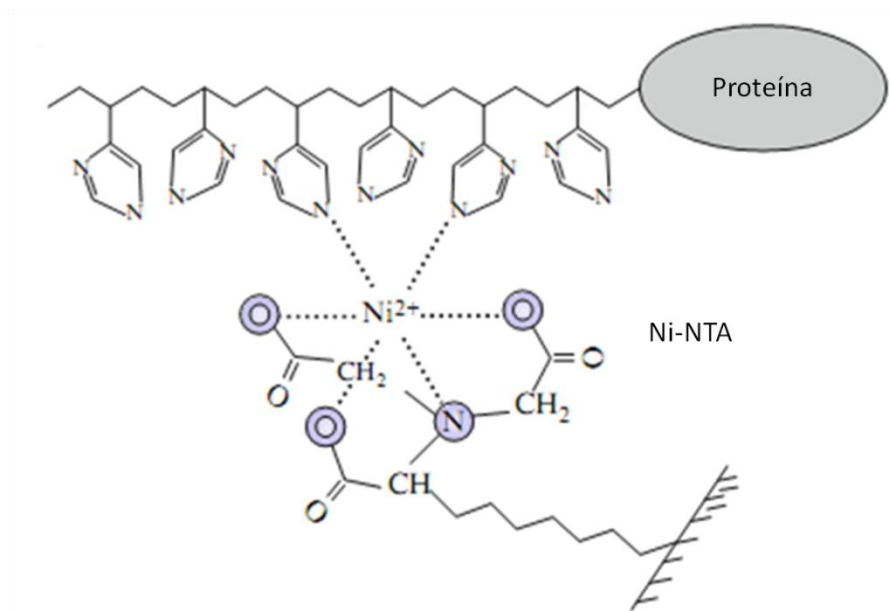


Figura 3. Modelo de la interacción entre la etiqueta de histidinas y el Ni^{2+} . Se forman cuatro enlaces coordinados entre el Ni-NTA, dejando dos valencias libres para la interacción Ni-6His

Así pues, la aplicación más importante de IMAC es la purificación de proteínas recombinantes que se expresan fusionadas a un epítipo que contiene residuos consecutivos de histidina (la etiqueta). Dada la rareza de encontrar segmentos de oligohistidinas expresados de manera natural en una proteína, 5 a 6 residuos garantizan alta selectividad. La etiqueta de hexahistidinas ha sido identificada como el oligopéptido con la longitud adecuada para la mayoría de las aplicaciones y es por mucho la más ampliamente empleada (Knecht *et al.*, 2009; Hemdan *et al.*, 1989).

1.5 Antecedentes del laboratorio de biotecnología.

1.5.1 La HGH.

En el laboratorio de biotecnología se cuenta con más de una docena de cepas de *P. pastoris* productoras de hormonas del crecimiento de diversas especies. Entre ellas la hormona del crecimiento humano madura hipofisiaria (HGH).

La HGH es una proteína de 191 residuos aminoacídicos, con un peso molecular de 22kDa, sintetizada de manera natural en la glándula pituitaria y cuya versión recombinante se emplea exitosamente en el tratamiento del enanismo pituitario, así como para tratar niños con deficiencia de la hormona. En niñas con síndrome de Turner ha mostrado tener beneficios considerables (Escamilla-Treviño *et al.*, 2000). Principalmente muestra un papel anabólico. Parcialmente estimula el crecimiento de células óseas, musculares y cartilaginosas. Incrementa el crecimiento corporal, estimula la síntesis proteica en tejidos, moviliza depósitos lípidos de los tejidos adiposos, eleva el nivel de glucosa en sangre, aumenta el almacenaje de glucógeno en músculo, estimula el crecimiento renal y mejora su función, eleva la producción de reticulocitos en médula ósea (Walsh, 2003).

1.5.2 Purificación de HGH por intercambio iónico.

En el laboratorio de biotecnología se ha aplicado la cromatografía de intercambio iónico para la purificación de diversas proteínas, obteniendo resultados de regulares a

INTRODUCCIÓN

buenos (Cuadro 2). Resalta la importancia de la HGH, de la cual se han obtenido hasta 80mg/mL y se ha logrado una pureza del 75% (Ascacio-Martínez, 2004).

Cuadro 2. Producción y pureza de GHs

HORMONA (GH)	PRODUCCIÓN (mg/mL)	PUREZA (%)**	FENOTIPO (Mut)
Perro	170	50	S
Caballo	100	63	+
Bovino	150	56	+
Gato	90	70	+
Humano*	80	75	+

*HGH, **Obtenida por intercambio iónico.

1.6 Justificación.

Dado que la purificación de proteínas recombinantes producidas en *Pichia pastoris* mediante técnicas cromatográficas clásicas ha implicado diversidad de metodologías, es necesario el desarrollo de un método general que facilite el proceso de obtención de dichas proteínas.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

2.1 Objetivo General.

Implementar un método general basado en IMAC para la purificación de proteínas recombinantes producidas en *Pichia pastoris*.

2.2 Objetivos específicos.

2.2.1 Construir el vector para la expresión de la proteína recombinante (HGH) con etiqueta de histidinas.

2.2.2 Producir en *Pichia pastoris* la proteína recombinante.

2.2.3 Desarrollar el proceso de purificación por IMAC.

CAPÍTULO III: ESTRATEGIA GENERAL

Para la estrategia general se plantearon tres etapas, la primera de ellas fue la síntesis y amplificación del ADNc al ARNm de la HGH y modificación para su clonación en pPIC9, incluida su caracterizado por patrones de restricción y secuenciado. Una vez construido el vector pPIC9-hGH-6His, la segunda etapa consistió en la transformación con el nuevo vector recombinante de la levadura, incluida la producción por fermentación e inducción de la HGH etiquetada (HGH-6His). Una vez generada la proteína de interés, se prosiguió a la tercera etapa, en la cual se realizó la purificación mediante IMAC. Una descripción gráfica de esta estrategia general con sus etapas se muestra en la Figura 4

ESTRATEGIA GENERAL

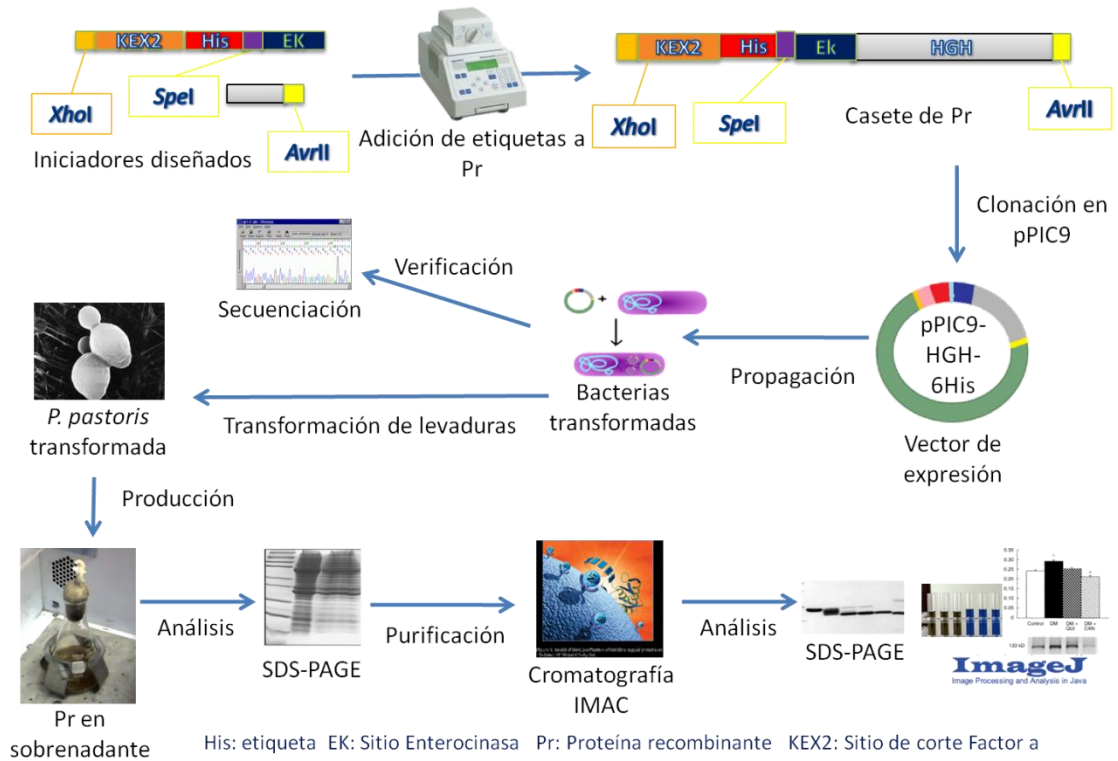


Figura 4. Estrategia general para la producción de HGH-6His y su purificación. La imagen muestra la descripción gráfica de la estrategia empleada a fin de producir la HGH-6His y su subsecuente purificación.

CAPITULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL.

4.1.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.

Los iniciadores necesarios para llevar a cabo la amplificación específica de la secuencia codificante de la HGH se mandaron sintetizar a la compañía Invitrogen (La Jolla CA, EUA).

Los reactivos utilizados para elaborar las soluciones (amortiguadores, soluciones salinas, medios de cultivo, geles etc.) se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Sigma Chemical Company, Inc (ST. Louis, MO. EUA); Merck (Monterrey, México), Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI. EUA) y Difco (Detroit, MI. EUA).

Las enzimas de restricción y de modificación de ácidos nucleicos que se utilizaron se obtuvieron de la casa comercial: New England Biolabs, Inc. (NEB, Beverly, MA. EUA), la Taq polimerasa de ADN se obtuvo de Perkin Elmer-Cetus (Alameda, CA. EUA), así como de Roche y los desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) de Promega Co. (Madison, WI. EUA). La purificación de los productos amplificados de interés y separados por

MATERIAL Y MÉTODOS

electroforesis en gel de agarosa, se realizó con el Kit Wizard^R SV Gel and PCR Clean-UP System de Promega.

El vector de clonación pCR 2.1-TOPO, así como el vector de expresión pPIC9 empleados fueron de Invitrogen.

El estuche de purificación empleado fue His-Bind Resin y His-Bind buffer Kit, ambos de Novagen (EMD Bioscience, Inc., Darmstadt, Germany).

4.1.2 Biológicos.

La cepa de *Escherichia coli* DH-5 α utilizada para la transformación y construcción del vector de expresión, así como la cepa de levadura GS115 de *Pichia pastoris* utilizada en la transformación con el “casete” de expresión de HGH-6His, se obtuvieron del cepario de la ULIEG resguardado a -80°C.

El estuche de *Pichia pastoris* que se utilizó para la construcción de los sistemas de expresión se adquirió de la compañía Invitrogen Co. (Gaithersburg, MD. EUA).

La fuente de ADNc maduro, codificante para la HGH fue obtenido a partir de una cepa de *Pichia pastoris* previamente construida en el laboratorio de biotecnología y que expresa la proteína de manera recombinante.

4.1.3 Infraestructura.

Se emplearon los siguientes equipos y aparatos: Horno de microondas GoldStar modelo MA-875M, Ultracongelador So-Low de Environmental Equipament (Cincinnati, Ohio, EUA) termocicladores Eppendorf Mastercycler gradient (Barkhausenweg, Hamburgo, Alemania) bomba peristáltica dynamax, modelo RP-1 de Rainin (EUA), ultracentrífuga Beckman-Coulter modelo J2-M (Fullerton, CA. EUA) y ultracentrífugas de la marca Eppendorf y LabNet, sistemas de esterilización por calor húmedo Market Forge (Sterilmatic), autoclave de 30X30X30 in. (Guanajuato, Gto. Mx.), incubadoras Shel Lab SL (Sheldon Manufacturing Inc.) modelos: 1535 y 1330GX y agitador orbital (ORBIT) de Lab Line. La secuenciación se realizó en un secuenciador 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems.

También, se usó un sistema de digitalización y análisis de imagen UVP Mini Darkroom de Bioimaging Systems e ImageJ versión 1.30P (USA), espectrofotómetro de la marca Eppendorf modelo biophotometer, balanzas de la marca OHAUS modelos *Analytical Plus* y *Precision Standard*, potenciómetro digital de la marca ORION modelo 420 A, unidad ultraconcentradora de 100mL (Spectrum) (EUA), concentrador al vacío CENTRIVAP de la marca LABCONCO (Kansas, City, MO. EUA), fuentes de poder para electroforesis de la marca Gibco-BRL-Life Technologies Inc. (Carisbad, CA. EUA) modelo 500, cámaras de electroforesis horizontal Thermo EasyCast, campana de extracción y gabinete de bioseguridad de la marca LABCONCO (Kansas City, MO. EUA), El pulso eléctrico para la transformación de bacterias y levaduras se hizo en un electroporador

MATERIAL Y MÉTODOS

modelo Gene Pulser II y celdas de 0.2mm de la marca BIO-RAD (Hercules, CA, EUA). La electroforesis de proteínas se realizó en cámaras de electroforesis vertical Mini-Protean II de BIO-RAD y fuente de poder Labnet. Para la microscopia se empleo un microscopio Leca modelo CME.

El trabajo de cómputo se realizó en un ordenador Gateway T-Series con sistema operativo Windows Vista Home Premium 64-BIT w/SP1. Los programas requeridos para el análisis y manipulación de secuencias nucleotídicas fueron: Amplify versión 2.53 (Bill Engels, ©1992, Madison, WI. EUA), DNA Strider™ versión 1.3 (© Ch. Marck & C.E.A. Service de Biochimie Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), Oligo versión 4.0 (1992 Wojciech Rychlik, National Bioscience, Inc., Plymouth, MN. EUA).

Los programas utilizados vía internet fueron BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), NebCutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), la suite de herramientas disponibles en Swiss-Prot (<http://expasy.org/sprot/>).

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 Extracción de ADN genómico de levadura.

A partir de una cepa previamente construida para la expresión de HGH recombinante, la cual contenía la secuencia codificante de la HGH madura se extrajo ADN genómico mediante la técnica de TSNT (Anexo 1 /Protocolo 1), a partir del cual se amplificó la secuencia correspondiente a la HGH.

4.2.2 Amplificación de la secuencia codificante de la HGH.

4.2.2.1 Diseño de oligonucleótidos.

4.2.2.1.1 Oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante.

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizaron los programas Oligo versión 4.0 y Amplify versión 3.0, empleando como referencia la secuencia reportada para la HGH madura, con número de acceso J03071.1. Se realizó una revisión adicional con el programa <http://www.idtdna.com/olympic/olympic/oligoanalyzer/> e línea <http://www.idtdna.com/olympic/olympic/oligoanalyzer/> OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/olympic/olympic/oligoanalyzer/>). Se diseñaron dos juegos de iniciadores, de los cuales el oligonucleótido reverso fue común a los dos juegos. El primer juego se diseñó para la amplificación específica de la HGH siendo que la hibridación se da a los extremos de la secuencia codificante de la proteína madura y se les incorporaron sitios de restricción *SpeI* y *AvrII*, además de una secuencia codificante para un epítipo reconocido por la enzima Enterocinasa (EK) (Cuadro 3).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuadro 3. Iniciadores para amplificar la secuencia codificante de HGH

Nombre	Secuencia	Descripción
FF HGH	CAT ACT AGT GAC GAT GAC GAT AAA GCC TTC CCA ACC ATTCC	Hibrida al extremo 5' de la secuencia codificante. Añade <i>Spe</i> I y epítopo para EK
RW HGH	AGAC CCTAGG CTAGAAGCCACAGCT	Hibrida al extremo 3' de la secuencia codificante. Añade <i>Avr</i> II

4.2.2.1.2 PCR para la amplificación de la secuencia codificante de HGH.

Con los iniciadores previamente diseñados y la muestra de ADN genómico obtenida mediante la técnica de TSNT se amplificó mediante PCR la secuencia codificante de la HGH madura. Las condiciones específicas para la mezcla de reactivos se indican en el Cuadro 4, en tanto que el programa para el termociclador se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 4. Condiciones de la PCR para amplificar HGH.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
ADN	0.5	100ng
FF HGH	0.6	0.2μM
RW HGH	0.6	0.2μM
MgCl ₂	0.6	1.0mM
dNTP's	0.3	0.2mM
Amortiguador 10X	1.5	1X
AmpliTaQ Gold	0.2	1U
Agua MQ	10.7	-
Vol. final	15	-

Cuadro 5. Programa de PCR para HGH.

Paso	Temperatura (°C)	tiempo
1	95	5 min
2	95	1 min
3	72	45 seg
4	Repetir 2 y 3 por 35 veces	
5	72	7 min
6	4	-

El producto obtenido se visualiza en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz UV.

4.2.3 Adición de la secuencia de la etiqueta y sitios de restricción.

4.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos.

4.2.3.1.1 Oligonucleótidos para la adición de la secuencia de la etiqueta y sitios de restricción.

Empleando los programas mencionados en el punto **4.2.2.1.1**, se diseñó un tercer iniciador, que en combinación con el oligonucleótido RW HGH completan el segundo juego de iniciadores, el cual se utilizó para adicionar la secuencia que codifica para la etiqueta mediante PCR, así como el sitio *Xho*I y la recreación de KEX2, para la eliminación del factor α -MF. (Cuadro 6)

Cuadro 6. Iniciadores para la adición de la secuencia de 6His

Nombre	Secuencia	Descripción
GralHis	TTA CTC GAG AAG AGA CAT CAC CAT CAC CAT CAT ACT AGT GAC GAT GAC GAT AAA	Hibrida en la región de EK, añade la secuencia para 6His y el sitio <i>Xho</i> I
RW HGH	AGACCTAGG CTAGAAGCCACAGCT	Hibrida al extremo 3' de la secuencia codificante. Añade <i>Avr</i> II

MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.3.1.2 PCR para la adición de la secuencia para 6His. Con el segundo juego de iniciadores diseñados y la muestra obtenida en la PCR para amplificar la secuencia codificante se realizó la PCR en la que se adiciona la secuencia que codifica para 6His. Las condiciones específicas para la mezcla de reactivos se indican en el Cuadro 7, en tanto que el programa para el termociclador se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 7. Condiciones de la PCR para Adicionar la secuencia 6His

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
ADN	0.5	100ng
FF HGH	0.6	0.2 μM
RW HGH	0.6	0.2 μM
MgCl ₂	0.45	0.75mM
dNTP's	0.3	0.2mM
Amortiguador 10X	1.5	1X
AmpliTaq Gold	0.2	1U
Agua MQ	10.85	-
Vol. final	15	-

Cuadro 8. Programa de PCR para adicionar la secuencia 6His

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	tiempo
1	95	5 min
2	95	1 min
3	70	45 seg
4	Repetir 2 y 3 por 35 veces	
5	72	7 min
6	4	-

El producto obtenido se visualiza en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz U.V.

4.2.4 Clonación en el plásmido pCR 2.1-TOPO.

El producto obtenido y que cuenta con la secuencia para 6His (obtenido en el punto **4.2.3.1.2**) se clonó en el vector comercial pCR 2.1-TOPO de acuerdo a las indicaciones del fabricante TOPO TA Cloning Kit de Invitrogen. (Invitrogen, 2006).

El empleo de la Taq ADN polimerasa provee las condiciones necesaria para que el producto sea clonado en el vector TOPO. (Shuman, 1994).

4.2.4.1 Transformación de células electrocompetentes.

La transformación de bacterias DH5 α se realizó mediante electroporación empleando 2 μ L del producto obtenido de la clonación en TOPO, los cuales fueron llevados a un volumen final de 20 μ L. Los parámetros de electroporación para la transformación de las bacterias fueron: 200 Ω , 25 μ F y 2.5kV. Después del pulso se añadieron 500 μ L de medio LB, se transfirieron a un tubo de 1.5mL y se incubaron a 37°C con agitación (500rpm) durante una hora. Posteriormente se centrifugó 3min a 4000rpm se decantó y resuspendió la pastilla en el medio remanente. Dicha suspensión fue sembrada en placa de LB suplementada con kanamicina (50mg/mL) y se incubó a 37°C por 16 horas.

4.2.4.2 Análisis de la clonación en TOPO.

Para evaluar la clonación en el plásmido pCR 2.1-TOPO se recurrió a dos métodos el primero de ellos y más directo fue PCR de colonia, empleando los iniciadores M13 5' y M13 3', en donde dependiendo del tamaño del producto obtenido se corrobora la clonación del inserto de interés (HGH-6His). Para este procedimiento se levantaron las colonias obtenidas a las 14-16h de la transformación y fueron resuspendidas en 20 μ L de agua estéril, de los cuales 10 μ L corresponderían al análisis mediante PCR y el

MATERIAL Y MÉTODOS

volumen restante se inoculó en medio LB líquido suplementado con kanamicina (50mg/mL). (Invitrogen, 2006). Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en el Cuadro 9, en tanto que el programa para el termociclador se presenta en la Cuadro 10.

Cuadro 9. Condiciones de la PCR de colonia para verificar clonación en TOPO.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
ADN (Colonia)	10	-
M13 5'	0.6	0.2μM
M13 3'	0.6	0.2μM
MgCl ₂	0.9	1.5mM
dNTP's	0.3	0.2mM
Amortiguador 10X	1.5	1X
Taq polimerasa	0.3	1U
Agua MQ	0.8	-
Vol. final	15	-

Cuadro 10. Programa de PCR de colonia para verificar clonación en TOPO .

Paso	Temperatura (°C)	tiempo
1	94	5 min
2	94	1 min
3	55	45 seg
4	72	45 seg
5	Repetir 2-4 por 35 veces	
6	72	7 min
7	4	-

El segundo método y que además daba identidad respecto a los sitios de restricción que incluía fue cortar el plásmido obtenido posterior a la extracción por lisis alcalina.

4.2.4.3 Extracción del ADN plasmídico.

Se centrifugaron 3mL del cultivo bacteriano, crecido por 14-16h, durante 5min a 5000rpm y se removió el sobrenadante por aspiración, manteniendo el tubo en hielo. El ADN plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.* 2001). Las

MATERIAL Y MÉTODOS

células se resuspendieron en 100 μ L de solución I (glucosa 50mM, Tris.HCL 25mM y EDTA 10mM a pH=8) empleando el vórtex. Se agregaron 200 μ L de solución II (preparada al instante mezclando 1:1 NaOH 0.4M y SDS 2%) mezclando inmediatamente por inversión e incubando en hielo por 5min. Pasado este tiempo se agregaron 150 μ L de solución III (acetato de amonio 7.5M), se mezcló de inmediato por inversión y se incubó por 5min en hielo. Pasado el tiempo se centrifugó por 5min a 14000rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se le hizo una extracción feno/SEVAG (1/2 volumen de fenol y ½ volumen de SEVAG. Se centrifugó por 2min a 14000 y el sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo nuevo donde el ADN plasmídico se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol al 100% frío y mezclando por inversión. Después se centrifuga por 5min a 14000rpm y la pastilla obtenida se lavó dos veces con 1mL de etanol al 70% frío y se dejó secar a temperatura ambiente durante máximo 30min. Finalmente se resuspendió en 50 μ L de TE1X (pH=8) conteniendo ARNasa (20 μ g/mL).

4.2.5 Subclonación de la secuencia de HGH-6His en pPIC9 (construcción pPIC9-HGH-6His).

A fin de expresar la HGH-6His, la secuencia correspondiente, previamente clonada en TOPO, se subclonó en el vector de expresión pPIC9, útil para la expresión en levadura. El esquema de su construcción se muestra en la Figura 5.

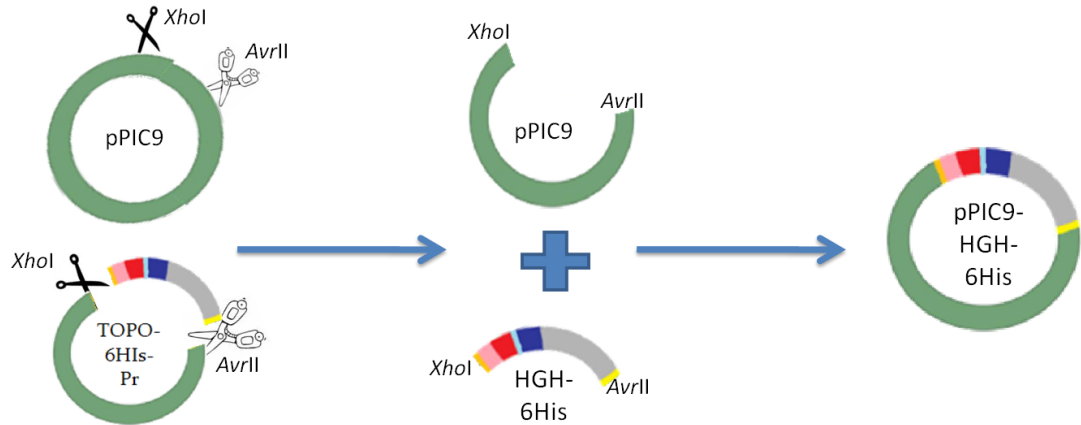


Figura 5. Esquema de la construcción del vector de expresión pPIC9. A partir de la secuencia clonada en TOPO con el uso de enzimas de restricción para liberar el inserto codificante para HGH etiquetada.

4.2.5.1.1 Liberación del fragmento a partir de TOPO.

El plásmido TOPO se sometió a una doble digestión con *XhoI* y *AvrII* para así liberar la secuencia correspondiente a HGH-6His, empleando dos de los sitios adicionales mediante la segunda PCR. Las condiciones para la doble digestión se presentan en el Cuadro 11.

4.2.5.1.2 Doble digestión de pPIC9.

De igual manera el vector de expresión pPIC9 se sometió a doble digestión con *XhoI* y *AvrII* liberando un fragmento correspondiente al sitio múltiple de clonación y esponiendo los sitios para la ligación del fragmento HGH-6His. En el Cuadro 11 se presentan las condiciones para la doble digestión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cuadro 11. Condiciones para la doble digestión.

	TOPO-HGH-6His (μ L)	pPIC9 (μ L)
ADN plasmídico	40	33
BSA	6	5
Amortiguador 2	6	5
Enzima 1 (<i>Xho</i> I)	5.75	5.12
Enzima 2 (<i>Avr</i> II)	1.5	1.25
Agua	0.75	0.63
V. final	60	50

4.2.5.1.3 Purificación del ADN a partir de gel de agarosa al 1%.

El producto de la doble digestión fue corrido en gel de agarosa al 1% a fin de separar los fragmentos de interés (HGH-6His) y vector (pPIC9) de los contaminantes residuales de la digestión. Las bandas correspondientes a los productos de interés fueron cortadas y procesadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante para el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System, obteniendo a final del proceso los productos de interés resuspendidos en agua libre de nucleasas.

4.2.5.2 Ligación de los fragmentos purificados.

Los fragmentos previamente purificados fueron sometidos a ligación, bajo las condiciones mostradas en el Cuadro 12. Incubando a 16°C por 14-16h. Es importante resaltar la proporción que debe mantenerse entre la cantidad de inserto (fragmento

MATERIAL Y MÉTODOS

HGH-6His) y vector (pPIC9), debiendo mantenerse por lo menos 3:1 y los productos empleados provenientes de la purificación, deben ser apreciables en un gel de agarosa al 1%.

Cuadro 12. Condiciones para la ligación del fgto. HGH-6His y el vector pPIC9.

	Volumen (μL)
Fgto. HGH-6His	10.5
Fgto. pPIC9	3.5
Amortiguador ligasa 10X	2
ATP 10X	2
Ligasa	2
V. final	20

Pasado el tiempo de incubación de la ligación, una alícuota (5-10 μL) se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar el éxito de la reacción, siendo que debe apreciarse un aumento en el tamaño del producto obtenido, respecto a los empleados como reactivos o bien observando un patrón de escalera.

4.2.5.3 Transformación de células electrocompetentes.

Con el fragmento HGH-6His clonado en pPIC9 como resultado de la ligación (construcción pPIC9-HGH-6His) se procedió a la transformación de células electrocompetentes de acuerdo a lo establecido en el punto **4.2.4.1**, pero en esta ocasión el volumen empleado para la transformación fue 5 μL de la ligación previamente realizada y el presión de selección se empleo ampicilina (50mg/mL).

4.2.5.4 Análisis de las clonas obtenidas.

Para el análisis de las clonas obtenidas, las colonias presentes a las 14-16h posteriores a la siembra en placa se levantaron para su evaluación mediante PCR de colonia, de igual manera, según se describe en el punto **4.2.4.2** para esta ocasión se emplearon los iniciadores AOX1, los cuales flanquean la región en la cual se inserta el fragmento clonado dentro del sitio múltiple de clonación del vector pPIC9. Las condiciones de la reacción se muestran en el Cuadro 13, y el programa empleado en termociclador en el Cuadro 14.

Cuadro 13. Condiciones de la PCR de colonia

Para verificar clonación en pPIC9.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
ADN (Colonia)	10	-
AOX 5'	0.6	0.2μM
AOX 3'	0.6	0.2μM
MgCl ₂	0.9	1.5mM
dNTP's	0.3	0.2mM
Amortiguador 10X	1.5	1X
Taq polimerasa	0.3	1U
Agua MQ	0.8	-
Vol. final	15	-

Cuadro 14. Programa de PCR de colonia para verificar clonación en pPIC9.

Paso	Temperatura (°C)	tiempo
1	94	5 min
2	94	1 min
3	55	1min
4	72	1min
5	Repetir 2-4 por 35 veces	
6	72	7 min
7	4	-

El producto obtenido fue corrido en un gel de agarosa al 1% para estimar su tamaño y determinar las clonas positivas. El volumen restante (no empleado para PCR) se inoculó en medio LB líquido conteniendo ampicilina (50mg/mL) para la posterior extracción del plásmido.

4.2.5.5 Extracción de ADN plasmídico de pPIC9-HGH-6His.

A partir del medio de cultivo inoculado con las colonias levantadas y previamente analizadas por PCR de colonia, se realizó extracción plasmídica por el método de lisis alcalina, descrito en el punto **4.2.4.3** (Sambrook *et al.*, 2001).

4.2.6 Caracterización del plásmido pPIC9-HGH-6His

Para confirmar la identidad de la secuencia clonada en el vector de expresión pPIC9 y la correcta construcción del plásmido expresor de HGH-6His (pPIC9-HGH-6His) se realizó por dos vías, la primera de ellas consistió en el corte con enzimas de restricción (*Bgl*II, *Pst*I y *Pvu*II), los patrones obtenidos fueron comparados con los esperados por los análisis *in silico* por predicción con base en sus secuencias.

La segunda vía de identificación empleada fue la secuenciación nucleotídica, para lo cual la muestra fue preparada por extracción plasmídica empleando el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2001), obteniendo una relación de absorbancia 260/280 > 1.8 y ajustando su concentración a 100ng/μL. La secuenciación fue realizada en un secuenciador 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems. Las secuencias obtenidas fueron revisadas para eliminar la contaminación por vector empleando el programa VecScreen y posteriormente ensambladas con el programa CAP3 (Huangh y Madan, 1999). La secuencia consenso obtenida mediante el ensamble fue comparada en el BLAST (Altschul *et al.*, 1990) con las secuencias disponibles en las bases de datos del

MATERIAL Y MÉTODOS

Gen Bank, a fin de determinar su identidad. Finalmente se realizo la traducción de la secuencia empleando la herramienta “translate tool” disponible en la página del Swiss Institute of Bioinformatics y comparada con la secuencia proteica reportada para la HGH de referencia.

4.2.7 Transformación de la levadura.

4.2.7.1 Linearización con *SacI*.

El vector de expresión pPIC9-HGH-6His fue linearizado con *SacI*, a fin de proceder a la transformación de las levaduras. En el Cuadro 15 se presentan las condiciones de la reacción de restricción.

Cuadro 15. Condiciones para la digestión con *SacI*.

	pPIC9-HGH-6His (μ L)
ADN plasmídico	10
BSA	2
Amortiguador 2	2
Enzima 2 (<i>SacI</i>)	0.5
Agua	5.5
V. final	20

El resultado de la restricción fue analizado en un gel de agarosa al 1%

4.2.7.2 Electroporación de *Pichia pastoris*.

La eficiencia de transformación alcanzada mediante electroporación es superior a la obtenida con el uso de esferoplastos, sin la necesidad de la generación y mantenimiento de estos (Scorer *et al.*, 1994). Se prepararon levaduras electrocompetentes de acuerdo a lo indicado en el Protocolo 4 (Anexo 1). Para la transformación se mezclaron 80 μ L de las células previamente preparadas con 5-20 μ g de ADN linearizado en un volumen de 5 a 10 μ L de agua libre de nucleasas y se transfirieron a la celda de electroporación. Se incuban durante 5 min en hielo y posteriormente se dio el pulso con los siguientes parámetros: 400 Ω , 25 μ F y 1.5kV. Posterior al pulso se añadieron 600 μ L de sorbitol 1M a la celda y el contenido se transfirió a un tubo para microcentrífuga estéril. Se extendieron 200-600 μ L en placa de MD. Las cuales se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias (3-4 días).

Después de este tiempo se levantaron colonias y se inocularon en medio YPG para su crecimiento a 30°C por 24-48h.

4.2.7.3 Análisis de integración al genoma de *Pichia pastoris*.

A fin de verificar la presencia del vector de expresión en el genoma de la levadura, dado que por recombinación homóloga este es integrado, se extrajo ADN genómico de las clonas obtenidas posterior a la transformación mediante la técnica TSNT según se indica en el Protocolo 1 (Anexo 1). Con el ADN obtenido se realizó una PCR empleando

MATERIAL Y MÉTODOS

los iniciadores AOX1, que flanquean la región en donde se inserta dentro del vector de expresión. Además, dada la presencia del gen *aox1* de manera natural en la levadura y debido a los eventos de recombinación posibles, la información arrojada con esta PCR incluye el fenotipo presente (mut^+ o mut^s). Las condiciones de la reacción, así como el programa empleado en el termociclador se presentan en los cuadros 16 y 17 respectivamente.

Cuadro 16. Condiciones de la PCR para verificar la inserción de pPIC9-HGH-6His.

Reactivo	Volumen (μ L)	Concentración
ADN	1	100ng
AOX 5'	0.6	0.2 μ M
AOX 3'	0.6	0.2 μ M
MgCl ₂	0.9	1.5mM
dNTP's	0.3	0.2mM
Amortiguador 10X	1.5	1X
Taq polimerasa	0.3	1U
Agua MQ	9.8	-
Vol. final	15	-

Cuadro 17. Programa de PCR para verificar la inserción de pPIC9-HGH-6His.

Paso	Temperatura ($^{\circ}$ C)	tiempo
1	94	5 min
2	94	1 min
3	55	1min
4	72	1min
5	Repetir 2-4 por 30 veces	
6	72	7 min
7	4	-

4.2.8 Expresión de la HGH-6His.

4.2.8.1 Ensayos de expresión en tubo cónico de 50mL.

A fin de verificar la funcionalidad del sistema construido y consecuente producción de la HGH-6His una colonia fue inoculada en 15mL de medio YPG en tubos cónicos de 50mL. Se dejaron crecer a 30 $^{\circ}$ C en agitación constante a 250rpm hasta alcanzar una $DO_{600} = 5$. El medio con estas condiciones fue centrifugado a 4400rpm por 5min. El

sobrenadante fue decantado y a fin de eliminar cantidades residuales de glicerol, la pastilla fue resuspendida en amortiguador de fosfatos 0.1M pH=6 y nuevamente centrifugado a 4400rpm por 5min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en medio inductor BMMY (Buffered Methanol-complex Medium), conteniendo metanol a una concentración final de 0.5% y se incubó a 30°C durante 96h, con una adición de metanol cada 24h para una concentración final de 1%, manteniendo así la inducción activa. Una vez terminado el tiempo de inducción, se centrifugó a 4400rpm por 5min a 4°C (a partir de este momento se trabajó en frío) y el sobrenadante fue dializado contra amortiguador Tris-HCl 20mM pH=8.4.

4.2.8.2 Análisis de la expresión en mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

4.2.8.2.1 Precipitación de proteínas en la muestra.

Se tomaron 500µL de muestra previamente dializada y se colocan en un tubo para micro centrífuga de 1.5mL, se añadieron 600µL de metanol y se mezclaron suavemente, posteriormente se añadieron 450µL de cloroformo, mezclando suavemente por inversión durante 1min, al terminar se centrifugó 5min a 14000rpm. Se descartó la fase acuosa superior, teniendo cuidado de no dañar la interface, pues ahí se encuentran las proteínas. Se añadieron 450µL de metanol, se mezcló suavemente por inversión durante 1min y se centrifuga 5min a 14000rpm, se descartó el sobrenadante con una

pipeta sin tocar la pastilla. Se secó en el Savant (temperatura baja y vacío) durante 10min.

4.2.8.2.2 Preparación de la muestra para SDS-PAGE.

La muestra obtenida en la precipitación se resuspendió en 15 μ L de amortiguador de carga reductor para proteínas, posteriormente se calentó a 94°C por 5min

4.2.8.2.3 Electroforesis de las muestras.

Se empleó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizante al 12.5%, previamente corrido únicamente con amortiguador de corrida 1X durante 20min. Las muestras cargadas se corrieron a 80V hasta su ingreso al gel separador una vez ahí se incrementó el voltaje a 120V. Al término de la electroforesis el gel fue teñido con azul de Coomassie G250 por un mínimo de 2h, al término de la tinción se procedió a desteñir empleando solución decolorante hasta que las bandas proteicas fueran visibles.

4.2.8.2.4 Densitometría

Las imágenes de los geles obtenidas fueron analizadas por densitometria empleando el programa ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004) para calcular el rendimiento de la producción.

4.2.9 Ensayos de purificación.

4.2.9.1 Purificación a pequeña escala.

Para la purificación se aplicó el protocolo recomendado por la Novagen, para la resina His-Bind empleando el His-Bind Buffer kit.

Protocolo para la purificación a pequeña escala, realizado en micro tubo de 1.5mL.

Se transfirieron 100-400 μ L de la resina en suspensión a un micro tubo de 1.5mL (tomar en cuenta que el volumen final de resina corresponderá al 50% del volumen empleado de la suspensión). Se lavó y equilibró la resina añadiendo el amortiguador indicado, agitando varias veces por inversión y centrifugando 1000xg por 1min:

- a) Se lavó 2 veces con 2 volúmenes de agua desionizada estéril.
- b) Se enjuagó 3 veces 2 volúmenes de amortiguador de carga.
- c) Se lavó 2 veces con 2 volúmenes de amortiguador de unión.
- d) Se añadió el extracto crudo al tubo conteniendo la resina, se mezcló gentilmente por inversión varias veces e incubó por 30min, posteriormente se centrifugó 1000xg por 1min. Se descartó el sobrenadante.
- e) Se enjuagó 3 veces con 3 volúmenes de amortiguador de unión.
- f) Se lavó 2 veces con 3 volúmenes de amortiguador de lavado.
- g) Se eluyó en 2 ocasiones con 3 volúmenes de amortiguador de elución.

h) La resina fue regenerada con un lavado empleando amortiguador de quelación conteniendo EDTA.

Las fracciones obtenidas a partir del punto d) se almacenaron para su análisis mediante SDS-PAGE.

4.2.9.2 Precipitación de proteínas en la muestra.

Las muestras obtenidas en cada etapa del proceso de purificación en pequeña escala se precipitaron por la técnica de metanol-cloroformo descrita en el punto **4.2.8.2.1**.

4.2.9.3 Preparación de la muestra para SDS-PAGE.

La muestra obtenida en la precipitación se resuspendió en 15 μ L de amortiguador de carga reductor para proteínas, posteriormente calentado a 94°C por 5min.

4.2.9.4 Electroforesis de las muestras.

Se realizó el análisis, de las muestras obtenidas durante la purificación, de acuerdo a lo descrito en el apartado **4.2.8.2.3**.

4.2.9.5 Densitometría.

Las imágenes de los geles obtenidas fueron analizadas por densitometría empleando el programa ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004), para calcular la pureza, así como la recuperación de la HGH-6His.

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5.1 Extracción de ADN genómico de levadura.

La fuente empleada para la obtención de la secuencia codificante fue una cepa de *Pichia pastoris* productora de hGH previamente construida en el laboratorio (Escamilla-Treviño, 2000).

La muestra del ADN obtenido y que se muestra en la Figura 6, se ajustó a una concentración de 100 ng/ μ L para su posterior empleo.

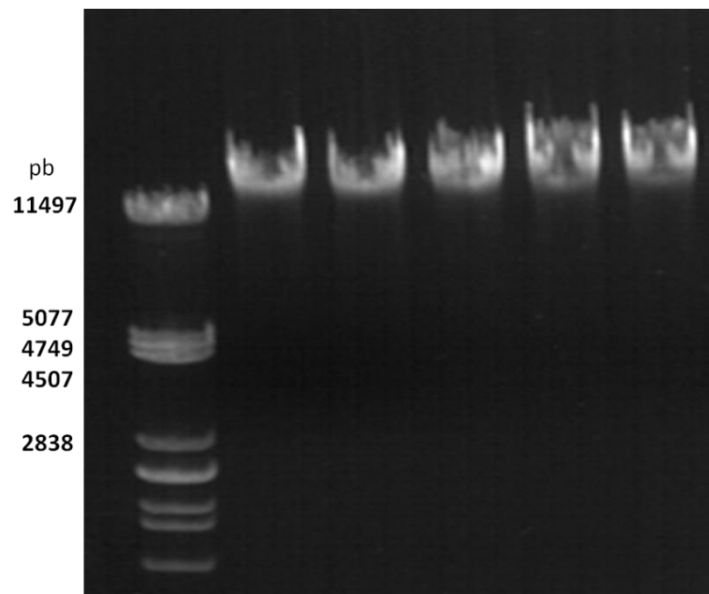


Figura 6. ADN de *Pichia pastoris* productora de hGH recombinante. Se muestra la extracción de ADN genómico del cual se amplificó la hGH. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.2 Amplificación de la secuencia codificante de la HGH.

5.2.1 Diseño de los oligonucleótidos empleados.

En la Figura 7 se muestran los iniciadores empleados para la amplificación específica de la secuencia codificante de la HGH. Estos fueron diseñados basados en la secuencia reportada con número de acceso J03071.1 en el GenBank. Su hibridación se planeó en su extremo 5' 78 nucleótidos después del ATG inicial, para evitar los 26 residuos de amino ácidos correspondientes al péptido señal de la hormona. Para fines de esta construcción se optó por el péptido señal propio del vector de expresión, correspondiente al del factor de apareamiento α *Saccharomyces cerevisiae* para la secreción de la hormona al medio de cultivo. Se adicionó una secuencia que codifica para un epítipo reconocido por la enzima Enterocinasa (reconoce la secuencia aminoacídica DDDK) que puede ser empleada para eliminar la etiqueta de histidinas fusionada a la HGH, además se incluyó el sitio de restricción para la enzima *SpeI* con el cual es posible, en combinación con *AvrII*, el intercambio del casete de expresión conservando la secuencia codificante para la etiqueta en el vector construido.

En el caso del 3' de la secuencia, el iniciador correspondió a la secuencia complementaria, 15 nucleótidos río arriba del codón de terminación de la traducción. Se incluyó además el sitio de restricción para *AvrII*.

RESULTADOS

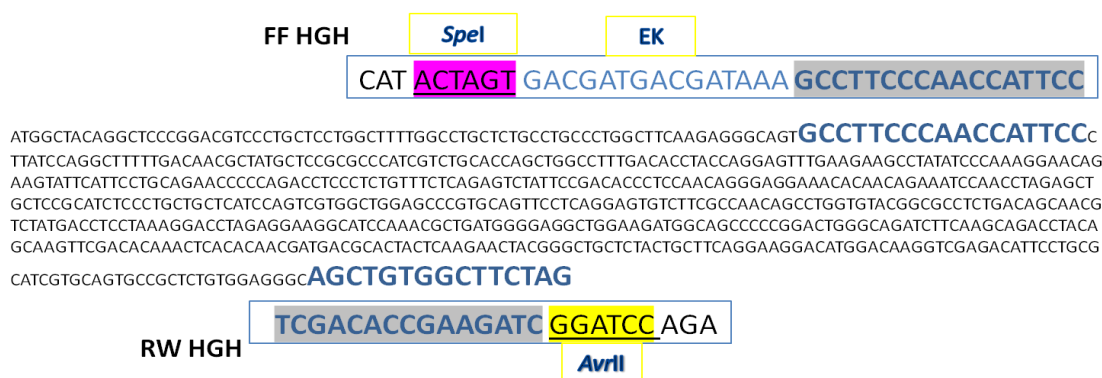


Figura 7. Iniciadores empleados para la amplificación de la hGH. Se muestra la secuencia codificante de la hGH, resaltando la región donde hibridan los iniciadores, las secuencias subrayadas corresponden a sitios de restricción.

5.2.2 PCR para amplificación de la secuencia codificante.

La secuencia codificante de la hGH se amplificó mediante PCR, empleando los iniciadores previamente diseñados y sintetizados. Las condiciones utilizadas fueron las indicadas en la sección 4.2.2.1.2 de Materiales y Métodos. Se obtuvo una banda única de 612 pb correspondiente a la secuencia de hGH (Figura 8).

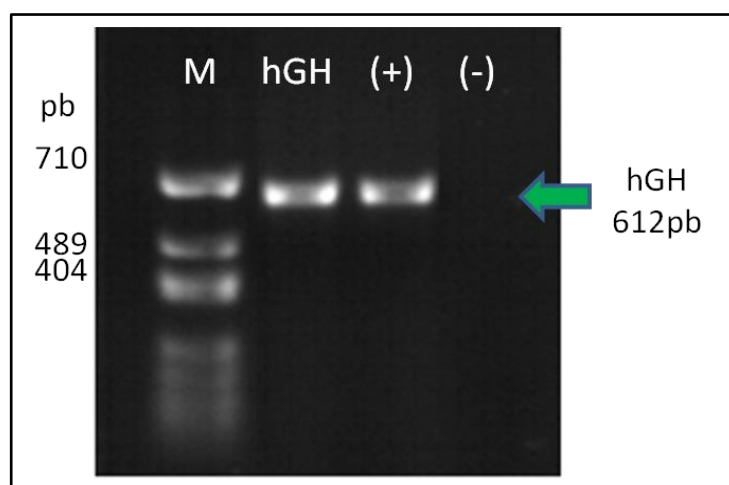


Figura 8. Amplificación de hGH empleando los iniciadores específicos. Se observa una banda única de 612 pb. M) marcador, hGH) amplicón de la hGH, (+) Positivo de amplificación, (-) negativo de amplificación. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio

RESULTADOS

5.3 Adición de la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas (6His).

5.3.1 Diseño de oligonucleótidos para adicionar la secuencia 6His y sitios de restricción.

Se diseñó un tercer iniciador con el cual se adicionó la secuencia codificante para la etiqueta (6His), el cual hibridó en la secuencia codificante para EK (adicionada con el primer par de iniciadores). Además recreó una secuencia denominada KEX2, la cual es reconocida por el producto del gen *kex2* para eliminar péptido señal del factor α -MF (Brake *et al.*, 1984), también se incorporó el sitio de restricción *Xho*I. Este iniciador se usó en conjunto con el RW HGH, conformando de esta manera el segundo juego de iniciadores. Como templado se empleó el producto obtenido mediante la PCR para la amplificación del ADNc de la GH (mostrado en la Figura 7). En la Figura 9 se muestra la región en la que hibridan los iniciadores, así como las secuencias que se adicionan.

Para el diseño de este iniciador, así como para el primer juego, se tomó en cuenta el uso preferencial de codones en la levadura *Pichia pastoris* (De Schutter *et al.*, 2009)

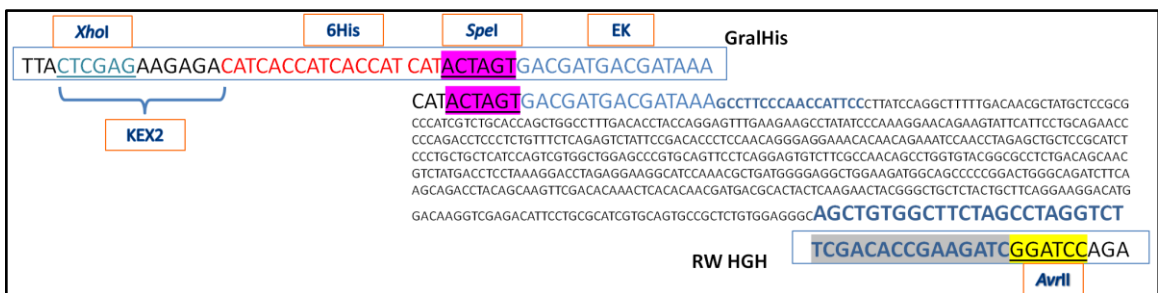


Figura 9. Iniciadores empleados para la adición de la secuencia 6His. Se muestra la secuencia del producto obtenido con el primer juego. Se resalta la región donde hibridan los iniciadores, las secuencias subrayadas corresponden a sitios de restricción. Se indica también la secuencia correspondiente a la etiqueta (6His) así como el sitio recreado KEX2.

RESULTADOS

5.3.2 PCR para adicionar la secuencia 6His.

La PCR para la adición de la secuencia para la etiqueta empleando el segundo par de iniciadores previamente diseñados se realizó bajo las condiciones de reacción indicadas en la sección 4.2.3.1.2 de la sección Materiales y Métodos. Se obtuvo una banda de 642 pb correspondiente al hADNc de la HGH ya conteniendo los codones de histidina, yal y como se aprecia en la Figura 10.

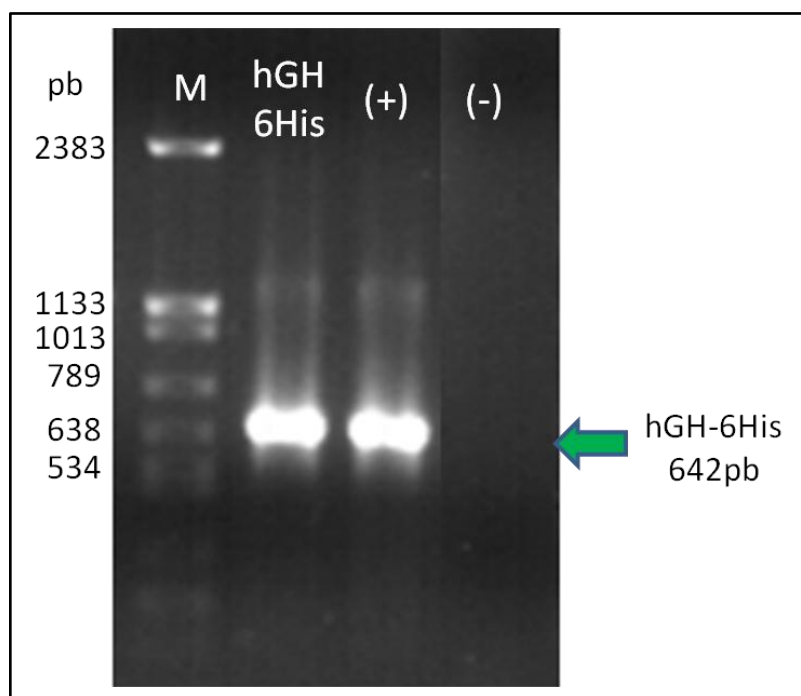


Figura 10. Amplificación de hGH y adición de la secuencia para 6His. Se observa una banda de 642 pb correspondiente al producto de interés. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

5.4 Clonación en TOPO de la secuencia codificante con las modificaciones realizadas.

A fin de tener cantidad suficiente y una manera directa de evaluar los cortes mediante enzimas de restricción para liberar los extremos con las enzimas diseñadas para la

RESULTADOS

Subclonación del inserto codificante para la HGH-6His en pPIC9, se decidió clonar el producto de la PCR del ADNc de la HGH con la etiqueta de histidinas en el vector pCR 2.1-TOPO. La cepa empleada para la transformación y propagación fue *E. coli* DH5 α previamente preparada para su empleo en esta metodología.

5.4.1 Análisis de la clonación en TOPO.

Posterior al seguimiento del protocolo de clonación indicado por el fabricante del kit TOPO TA Cloning (Invitrogen), se obtuvieron colonias, que fueron analizadas mediante PCR, empleando iniciadores M13, los cuales hibridan en una región flanqueante al sitio donde se insertó el producto de la PCR en cuestión. Las condiciones empleadas para la PCR se indican en el apartado **4.2.4.2** de la sección de Materiales y Metodos. En las colonias analizadas se obtuvo una banda de 844pb, correspondiente al ADNc de la HGH-6His (642pb) y la región flanqueante (202pb) al sitio donde se insertó el producto. En la Figura 11 se muestra el análisis de algunas colonias obtenidas.

RESULTADOS

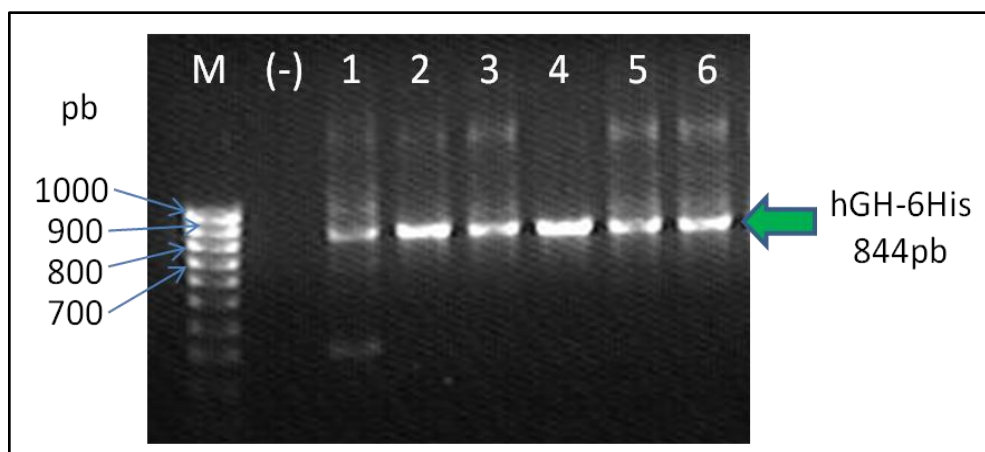


Figura 11. Análisis por PCR de la clonación de hGH-6His en TOPO. Se observa una banda de 844 pb correspondiente al producto de interés. M) Marcador, (-) control negativo de amplificación, 1-6) hGH-6His. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

5.4.2 Extracción de plásmido TOPO-hGH-6His.

Se realizó extracción de ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2001) descrito en el punto 4.2.4.3, a partir de las muestras inoculadas en LB que posterior su análisis mediante PCR se identificaron como colonias portadoras del plásmido pCR 2.1-TOPO-hGH-6His. En la Figura 12 se muestra el producto de la extracción realizada, donde por el patrón de migración electroforética se confirmó el éxito de la clonación el carril marcado (-) corresponde a un vector pCR 2.1-TOPO vacío, el cual presenta un retraso menor al presentado por aquellos que tienen inserto (1-6).

RESULTADOS

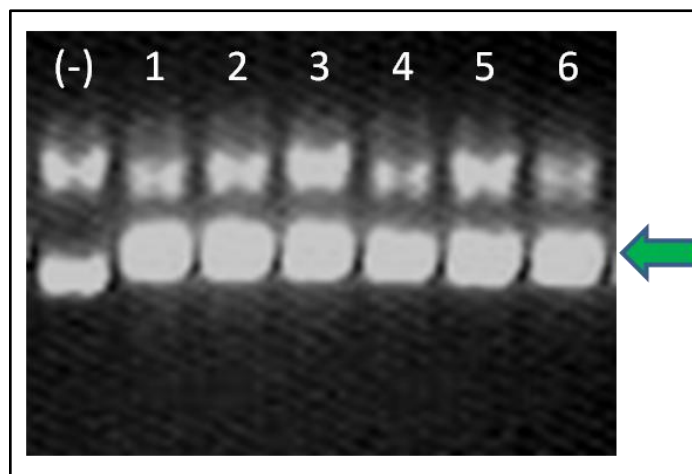


Figura 12. Extracción de los plásmidos TOPO-hGH-6His. Se aprecia la integridad de los plásmidos extraídos. (-) Corresponde a un vector pCR 2.1-TOPO vacío, el cual presenta una mayor migración a la presentada por aquellos que tienen inserto (1-6). Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

5.5 Subclonación de la secuencia HGH-6His en el vector de expresión pPIC9 (generación del vector pPIC9-hGH-6His).

A fin de producir la proteína HGH-6His, su secuencia correspondiente previamente clonada en TOPO, se subclonó en el vector de expresión en levadura pPIC9.

5.5.1 Liberación del fragmento hGH-6His y preparación de pPIC9.

A partir del plásmido TOPO-hGH-6His, se liberó el fragmento de interés, correspondiente al ADNc de la HGH-6His, con el empleo de enzimas de restricción (*XhoI* y *AvrII*). De igual manera se hizo para el plásmido pPIC9. Las condiciones de la reacción de restricción se describen en el apartado **4.2.5.1.1.** de la sección Material e Métodos. En la Figura 13 se muestra el resultado obtenido del corte realizado. Los fragmentos

RESULTADOS

obtenidos a partir de la doble digestión fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, posterior a su visualización fue cortada la banda de interés y purificada siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega) para el estuche Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

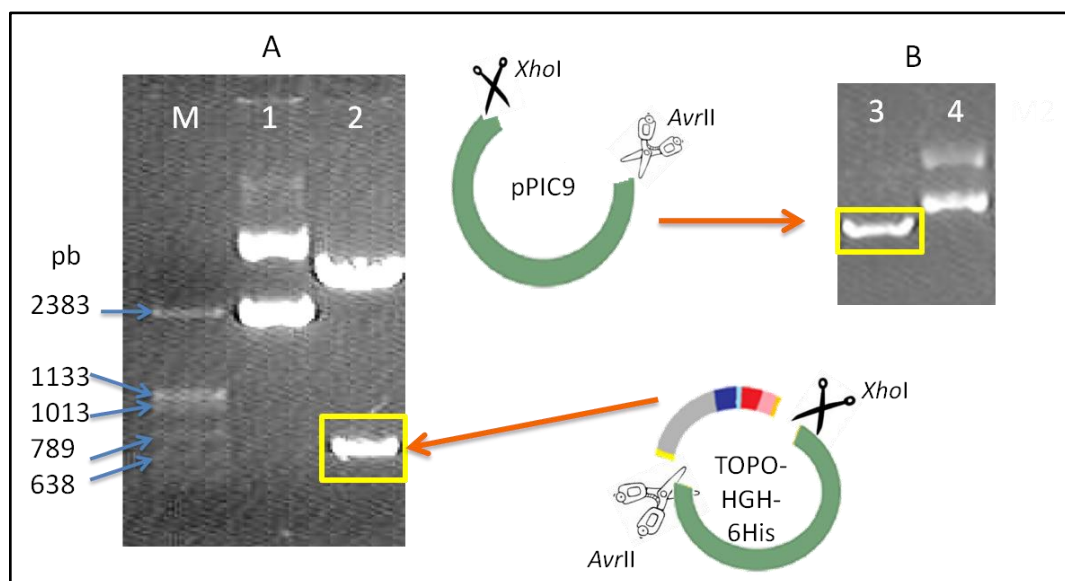


Figura 13. Doble digestión de pPIC9 y TOPO-hGH-6His. Se obtuvieron el fragmento de interés y el vector de expresión para su posterior ligación. M) Marcadores, 1) TOPO-hGH-6His sin cortar, 2) TOPO-hGH-6His cortado, 3) pPIC9 cortado, 4) pPIC9 sin cortar. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

5.5.2 Ligación de los fragmentos purificados.

Con los productos purificados y las condiciones mencionadas en el apartado 4.2.5.2 de Materiales y Métodos, se realizó la ligación empleando ADN ligasa T4. El resultado se muestra en la Figura 14, en el carril 4 se aprecia la banda correspondiente al plásmido construido para la producción de la HGH con la etiqueta de histidinas (pPIC9-hGH-6His).

RESULTADOS

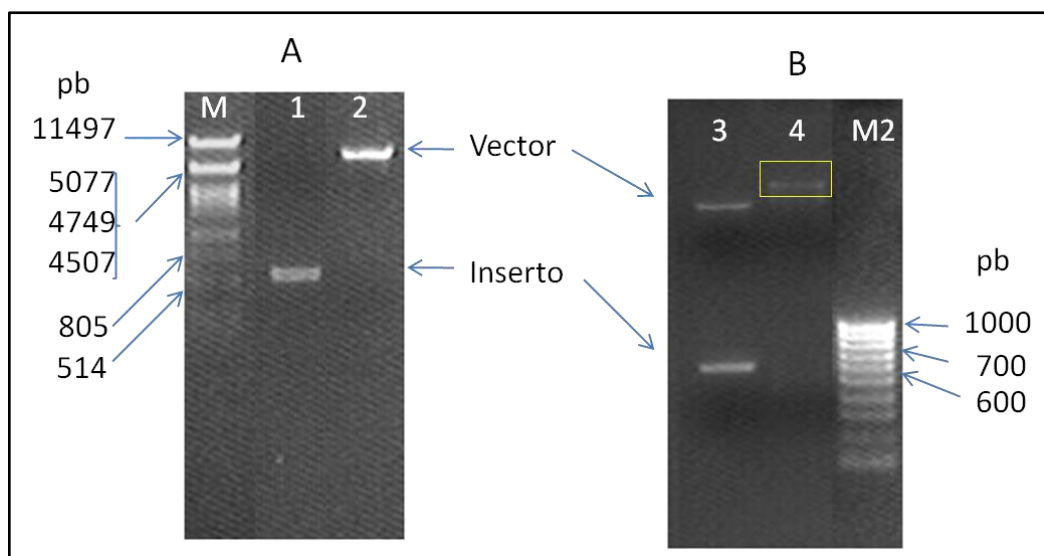


Figura 14. Construcción del vector pPIC-hGH-6His. A) Fragmentos purificados correspondientes a hGH-6His y pPIC9 digeridos con *Xho*I y *Avr*II. B) Ligación. M y M2) marcadores, 1) Fgto. hGH-6His cortado con *Xho*I y *Avr*II 2) Vector pPIC9 cortado con *Xho*I y *Avr*II . 3) Mezcla de ligación sin ligasa. 4) Producto de la ligación (pPIC9-hGH-6His). Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

5.5.4 Transformación de bacterias electrocompetentes.

El plásmido pPIC9-hGH-6His previamente construido se empleó para transformar bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5 α , a fin de propagarlo.

5.5.5 Análisis de las clonas obtenidas.

Las colonias obtenidas posteriores a la transformación fueron analizadas mediante PCR de colonia empleando los iniciadores AOX1, los cuales flanquean la región en el vector donde se inserta el fragmento de interés (hGH-6His), aportando 492pb al producto obtenido, resultando en un amplicón de 1134pb. En la Figura 15 se muestra el

RESULTADOS

resultado obtenido por el análisis. Las colonias positivas se inocularon en medio LB con ampicilina (50mg/mL), para su preservación y extracción del plásmido.

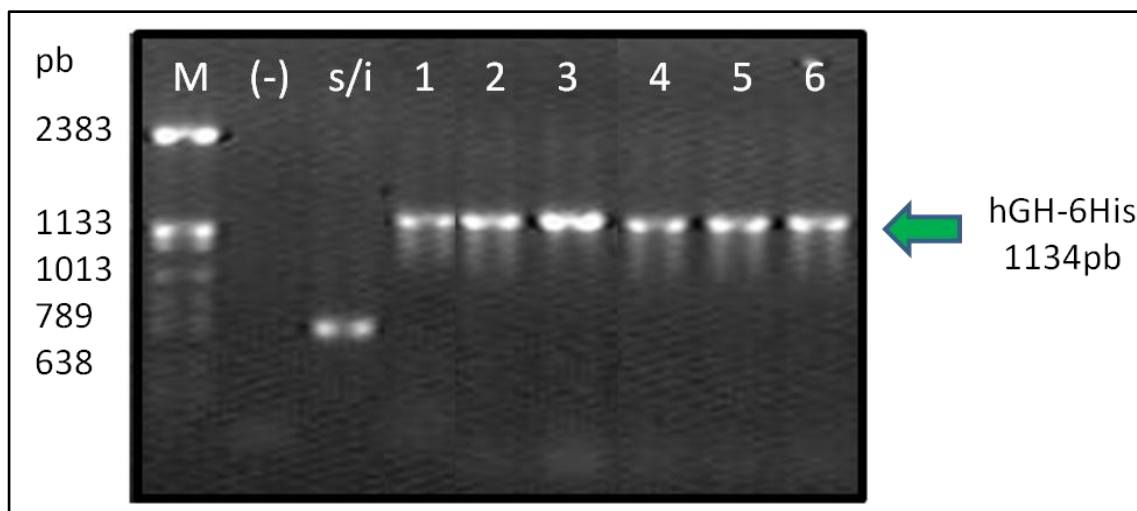


Figura 15. Análisis por PCR de la clonación de hGH-6His en pPIC9. M) Marcador, (-) Control negativo de amplificación, s/i) Amplificación de pPIC9 sin inserto, 1-6) Productos amplificados de hGH-6His. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

5.5.6 Extracción del plásmido pPIC9-hGH-6His.

A partir de las colonias crecidas en medio LB-ampicilina (50 mg/mL), se glicerizó una alícuota, a fin de convertirlas en fuente renovable del plásmido de interés, mezclando 850 μ L del medio de cultivo y 150 μ L de glicerol anhidro estéril y congelando a -80°C . Además se realizó extracción plasmídica por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2001) según se indica en el punto **4.2.4.3**. El producto obtenido se muestra en la Figura 16, en la cual se puede apreciar la integridad de los plásmidos obtenidos.

RESULTADOS

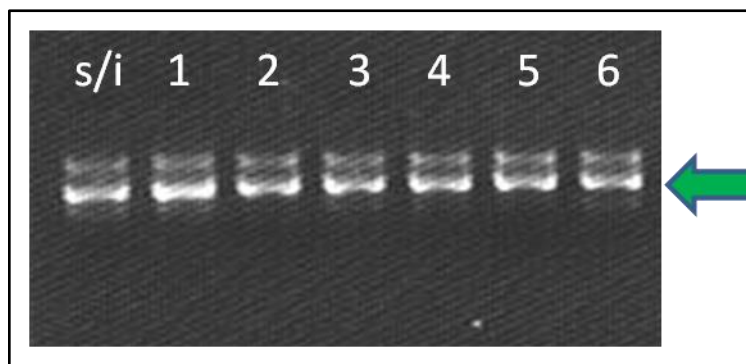


Figura 16. Extracción de los plásmidos pPIC9-hGH-6His. Se aprecia la integridad de los plásmidos extraídos. s/i) pPIC9 sin inserto, 1-6) pPIC9-hGH-6His. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

5.6 Caracterización del plásmido pPIC9-hGH-6His.

A fin de determinar la correcta construcción del plásmido pPIC9-hGH-6His, se realizó una caracterización mediante enzimas de restricción, empleando *BglII*, *PstI*, y *PvuII*, buscando que tuvieran sitios dentro del vector así como en la secuencia insertada. De esta manera se determinó la presencia del inserto de interés (hGH-6His) dentro del vector pPIC9, obteniendo en el laboratorio los patrones de restricción predichos “in silico”, empleando el programa en línea Ncb cutter V. 2.0 de New England Biolabs (Vincze *et al.*, 2003); el resultado se muestra en la Figura 17, donde los asteriscos indican la obtención de la banda esperada al cortar con la enzima que se indica.

RESULTADOS

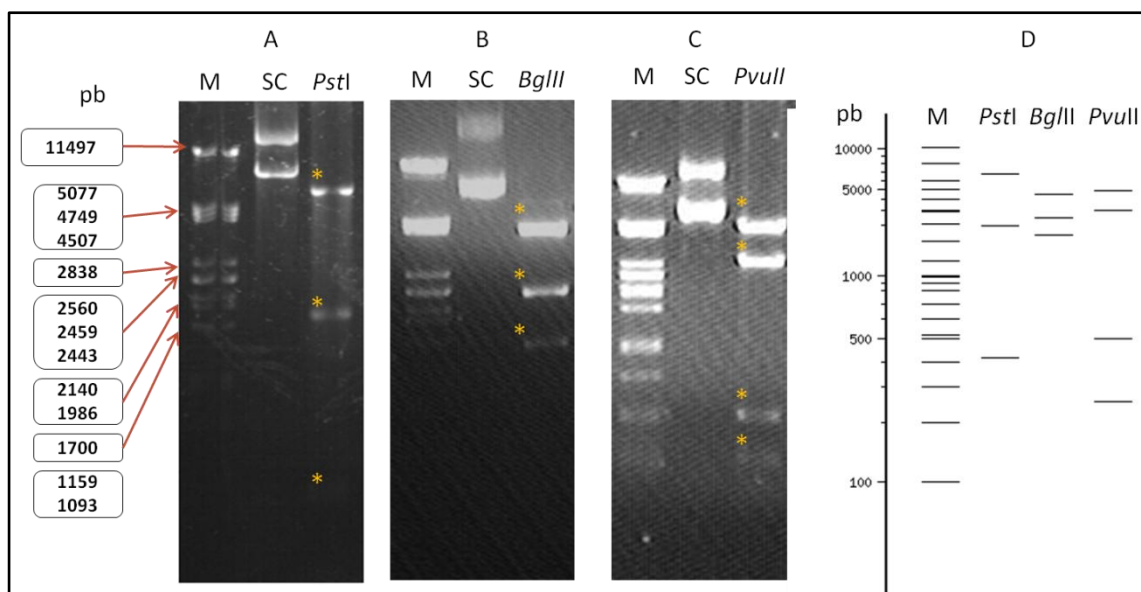


Figura 17. Análisis mediante enzimas de restricción del plásmido pPIC9-hGH-6His. A la derecha (D) se muestran los patrones predichos para la secuencia del plásmido, a la izquierda la confirmación experimental de los patrones (A, B y C), los asteriscos indican las bandas esperadas. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Además de la caracterización con enzimas de restricción, la construcción fue secuenciada, a fin de corroborar la integridad de la secuencia insertada, incluido su marco de lectura abierto. Se emplearon cuatro iniciadores para la secuenciación, dos de ellos en el extremo 5', los cuales se encontraban a 170 nt de distancia y otros dos en el extremo 3', con una distancia de 143 nt entre ellos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa VecScreen a fin de eliminar la contaminación con secuencias traza del vector. Una vez eliminadas las secuencias del vector, fueron ensambladas empleando el programa CAP3 (Huang y Madan, 1999). La secuencia fue comparada con la base de datos de GenBank empleando la herramienta BLAST, con lo cual se obtuvo una similitud de 99% respecto a la referencia con base a la cual se

RESULTADOS

realizó la construcción (numero de acceso J03071.1), habiendo una diferencia en un solo nucleótido. La secuencia nucleotídica obtenida fue traducida a su correspondiente secuencia proteica empleando la herramienta “Translate” del programa ExpASy Proteomics Server y la secuencia aminoacídica obtenida fue comparada su correspondiente reportada para HGH (número de acceso AAA52549.1) obteniendo una similitud del 100% y confirmando así la correcta construcción, identidad e integridad del casete de expresión en el vector de expresión para HGH-6His (Figura 18).



Figura 18. Alineamiento de secuencias proteicas. La comparación muestra una similitud del 100% entre la HGH reportada (AAA52549.1) y la producida en este trabajo (Contig-CAP3). Se resalta la secuencia correspondiente a la etiqueta 6His, así como para enterocinasa.

5.7 Construcción de la cepa productora de la HGH-6HIS.

Una vez corroborada la correcta construcción del vector de expresión pPIC9-hGH-6His, se procedió a su incorporación al genoma de *Pichia pastoris*. Para ello se empleo la

RESULTADOS

enzima *SacI* a fin de propiciar sitios tales que mediante recombinación homóloga el vector fuera insertado en la región 3' del gen *aox1* (Invitrogen 2010).

5.7.1 Linearización del plásmido pPIC9-hGH-6His con *SacI* y transformación de la levadura.

El plásmido pPIC9-hGH-6His fue linearizado con la enzima *SacI*, como se indica en el punto 4.2.7.1. La Figura 19 muestra el corte realizado, apreciando una banda de alrededor de los 8600 pb. El producto lineal que se obtuvo se empleó para transformar la levadura *Pichia pastoris*, según lo indicado en el punto 4.2.7.2. Las colonias obtenidas se muestran en la Figura 20 (agar MD), en la que también se aprecia la morfología microscópica característica de la levadura una vez que fue crecida en medio YPG líquido.

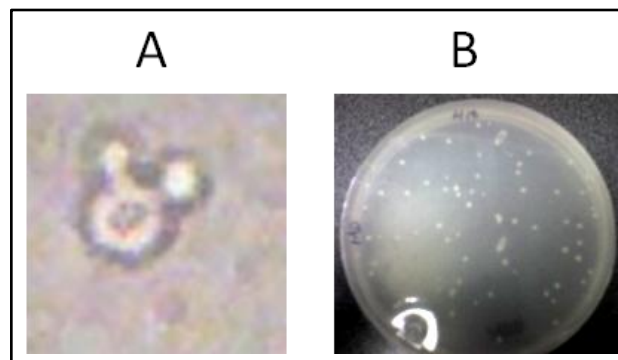
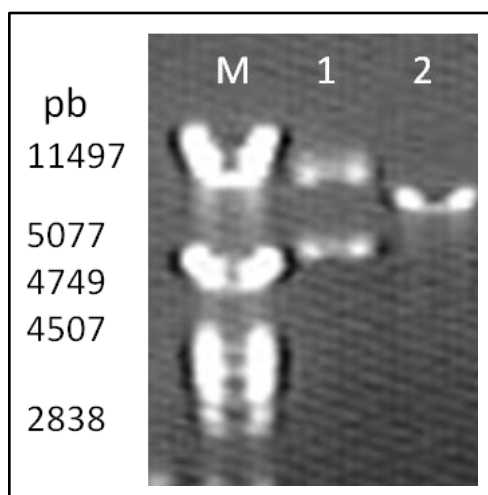


Figura 19. Linearización de pPIC9-hGH-6His con *SacI*. M) Marcador, 1) Plásmido sin cortar, 2) Plásmido lineal. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio

Figura 20. *Pichia pastoris* transformada. A) Morfología microscópica de *Pichia pastoris* transformada con el plásmido pPIC9-HGH-6His

RESULTADOS

5.7.2 Análisis de integración al genoma de *Pichia pastoris*.

Para determinar si el vector fue integrado al genoma de la levadura se extrajo ADN genómico (mediante la técnica TSNT según se indica en el Protocolo 1, Anexo 1) y se realizó una PCR empleando los iniciadores AOX, con lo cual además de proporcionar información sobre la integración al genoma, es posible determinar el fenotipo presente (mut^+ o mut^s) mediante la amplificación del gen *aox1* para (mut^+) o la ausencia del amplicón correspondiente (mut^s). Se observa la amplificación de 1134 pb correspondiente al casete hGH-6His, además de la amplificación débil del gen *aox1* con un tamaño aproximado de 2200pb indicando un fenotipo mut^+ para las clonas obtenidas. (Figura 21)

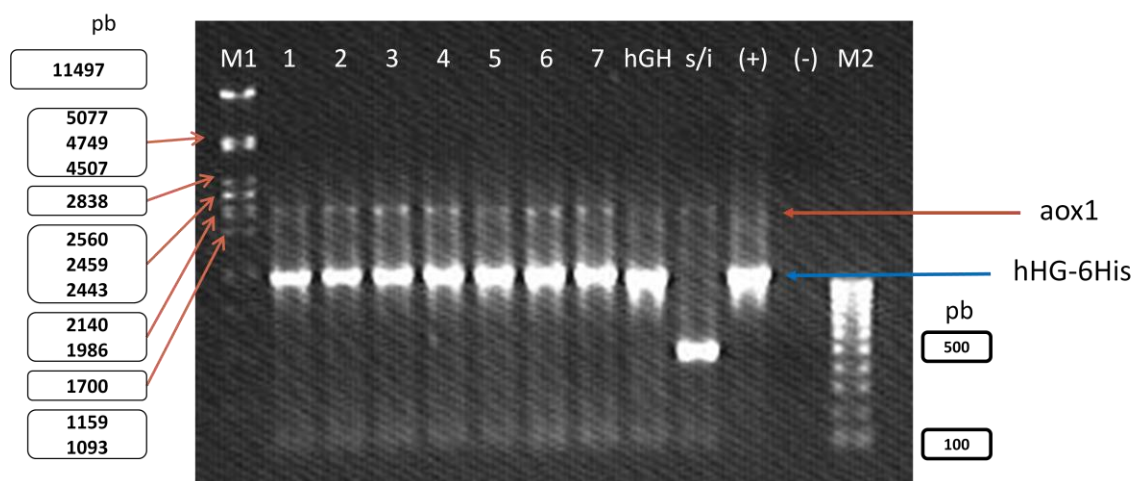


Figura 21. Análisis de la integración al genoma de *Pichia pastoris*, así como el fenotipo obtenido. Se observa la banda correspondiente al producto amplificado de hGH-6His, así como la amplificación más débil para *aox1*. M1, M2) Marcadores, 1-7) Clonas de *P. pastoris* productoras de HGH-6His, hGH) *P. pastoris* productora de HGH, s/i) *P. pastoris* transformada con pPIC9, (+) Control de amplificación, (-) Control negativo de amplificación. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

5.8 Producción de la HGH-6His.

La prueba que corroboraría la funcionalidad del vector de expresión construido fue la verificación de su capacidad para secretar al medio de cultivo a la HGH-6His.

5.8.1 Fermentación y análisis de la producción en el sobrenadante mediante SDS-PAGE.

Se realizó la producción en tubos cónicos de 50mL, para lo cual la colonia seleccionada en base a los ensayos antes descritos se inoculó en medio YPG para su crecimiento hasta una $DO_{600} = 5$, punto en el cual se realizó un cambio a un medio inductor, BMMY. Se siguió la producción por 94h, adicionando metanol a una concentración final de 1% cada 24h, para compensar la pérdida por evaporación y consumo durante el cultivo de las levaduras.

Posterior al tiempo de inducción, el medio de cultivo fue centrifugado por 5min a 4400rpm (a 4°C para minimizar la degradación proteica) y dado que en la construcción realizada se contaba con el péptido señal del factor α -MF, que guía la secreción extracelular de la proteína fusionada, ésta se buscó en el sobrenadante, el cual fue dializado contra amortiguador Tris-HCl 20mM pH=8 frío, haciendo 4 recambios cada 4h a fin de eliminar sales. Las membranas empleadas para la diálisis presentaban un corte de peso molecular entre 10-14kDa.

Para verificar la presencia de la proteína de interés, se precipitó 1 mL del sobrenadante por la técnica de metanol-cloroformo y corrió en gel de poliacrilamida en condiciones

RESULTADOS

desnaturalizantes. En la Figura 22 se aprecia el análisis electroforético de la proteína en el medio de cultivo de las levaduras portadoras del casete de expresión hGH-6His, inducidas con metanol. Para los sobrenadantes producidos por las cepas 1 a 7, se aprecia una banda sobresaliente por debajo de los 26kDa y ligeramente superior al estándar de 22kDa y que no se presenta en el sobrenadante analizado para una levadura transformada con un vector vacío (carril pPIC9) que sirvió de control negativo y en el cual se aprecian las proteínas propias de la levadura que son secretadas al medio de cultivo. Dicha proteína, que además representa una proporción mayoritaria del total de proteínas, corresponde a la HGH-6His.

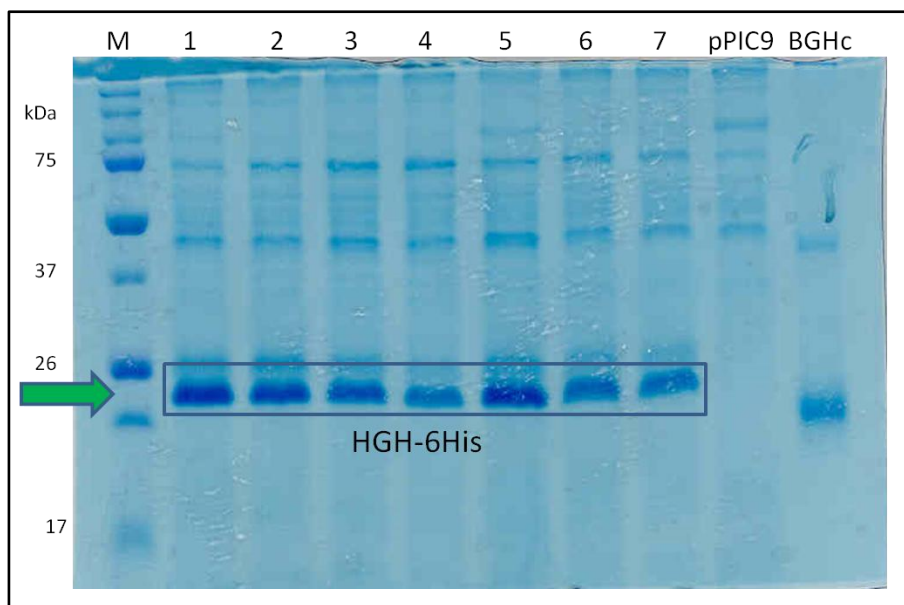


Figura 22. Análisis de la producción de proteínas secretadas al medio de cultivo por la cepa de *Pichia pastoris* construida. En el recuadro se indica la banda proteica correspondiente a la HGH-6His. M) Marcador de peso molecular, 1-7) Producción al medio de cultivo de distintas cepas, pPIC9) Producción al medio de cultivo de una cepa transformada con pPIC9 vacío, BGHc) Estándar de 22kDa. Gel de poliacrilamida al 12.5%, teñido con azul de Coomassie.

RESULTADOS

Se realizó una cuantificación de las proteínas totales presentes en el sobrenadante mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976), para lo cual se construyó una curva de calibración empleando BSA como referencia. Se obtuvo una correlación lineal $r=0.995$ y la ecuación de la recta obtenida fue $y = 0.0025x + 0.2732$, donde “x” corresponde a la concentración de proteínas y “y” a la absorbancia a 594nm, que es la longitud de onda a la cual se lee el ensayo de Bradford. La curva construida se muestra en la Figura 23.

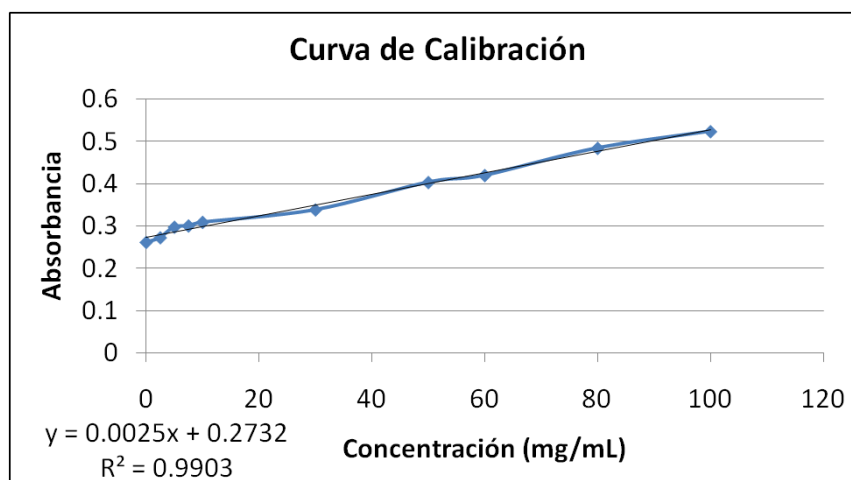


Figura 23. Curva de calibración. Construida para la cuantificación de proteínas totales en el SN de las cepas de *Pichia pastoris* productoras de HGH-6His

Empleando la curva construida, se cuantificó la producción de proteínas totales secretadas al medio de cultivo, determinando que la mejor productora fue la clona H1, con una producción de proteínas totales secretadas al medio de cultivo de 76 μ g/mL, de los cuales el 70% corresponde a HGH-6His, dando como resultado 53.9 μ g de HGH-6His por mL de medio de cultivo. La proporción correspondiente a HGH-6His se determinó

RESULTADOS

mediante densitometría, empleando el programa ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). El resultado de todas las clonas se muestra en el cuadro 18.

Cuadro 18. Cuantificación de proteínas totales.

Cepa	prot. Tot.* ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HGH-6His (%)	HGH-6His total* ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
H1	76.28	70.69	53.92
H2	71.48	71.70	51.25
H3	69.63	60.41	42.07
H4	28.72	66.80	19.18
H5	80.55	64.53	51.98
H6	44.70	70.90	31.69
H7	47.47	65.05	30.88

*Total de proteínas secretadas al medio de cultivo.

Los densitogramas obtenidos para los sobrenadantes analizados (Figura 22) se muestran en la Figura 24. Es contrastante la presencia de un pico mayoritario en los sobrenadantes de una cepa productora respecto a su ausencia en el sobrenadante de una cepa transformada con un vector vacío.

RESULTADOS

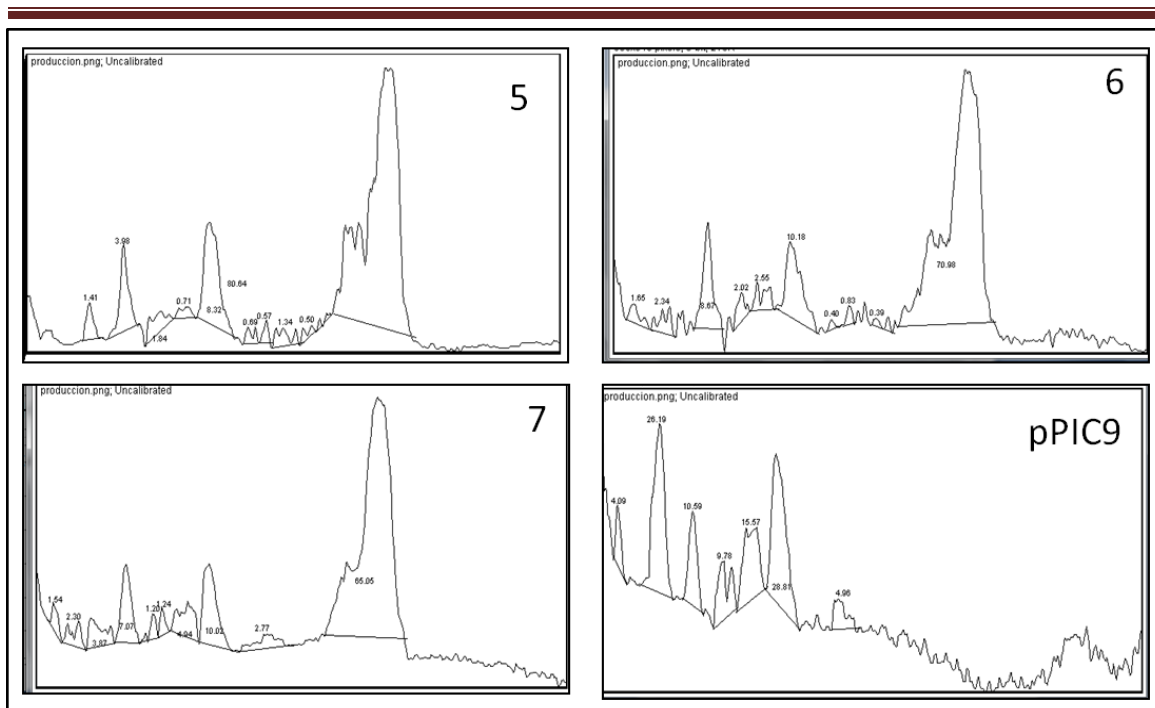


Figura 24. Densitogramas de la producción. Obtenidos a partir de la imagen digital del análisis de los sobrenadantes por SDS-PAGE. 5-7) Sobrenadantes de una cepa productora de HGH-6His, pPIC9) Sobrenadante de una cepa transformada con un vector vacío. Análisis realizado con el programa ImageJ

5.9 Ensayo de purificación mediante IMAC.

Se aplicó la Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados (IMAC) para la purificación de la HGH-6His producida, apoyándose en la etiqueta de histidinas adicionada en su extremo amino terminal. La metodología empleada se describe en el punto **4.2.9.1**.

La HGH-6His fue eluída a concentraciones bajas de imidazol, siendo recuperada desde concentraciones de 5mM y hasta llegar a 1M. Por otro lado, no toda la proteína cargada se unió a la resina, encontrando una cantidad importante en la fracción correspondiente a las proteínas que no se unen. A fin de determinar la pureza y

RESULTADOS

rendimiento del proceso, se realizó un análisis densitométrico (Figura 25), obteniendo valores superiores al 90% para pureza y del 28% para rendimiento (Cuadro 17).

Cuadro 19. Pureza y rendimiento para HGH-6His mediante IMAC

	Producción	Pureza*	Rendimiento**
HGH-6His	53 µg/mL	90%	28%
		IMAC	

*Calculada para la elución 1M de imidazol

**corresponde a las eluciones 5, 60 y 1000mM de imidazol

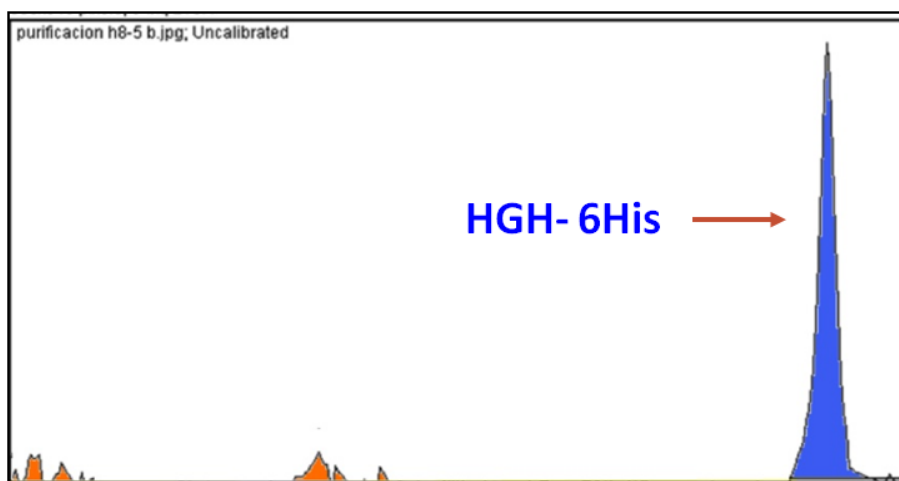


Figura 25. Densitograma para el análisis de pureza mediante IMAC. Obtenidos a partir de la imagen digital de SDS-PAGE de la purificación. El pico señalado corresponde a la HGH-6His en la elución 1M de imidazol.

RESULTADOS

En la Figura 26 se muestra el análisis electroforético del procedimiento de purificación mediante IMAC de la HGH-6His a partir del sobrenadante. Como puede percatarse, se aprecia que la preteína de interés es eluida a partir de la aplicación de 5mM de imidazol.

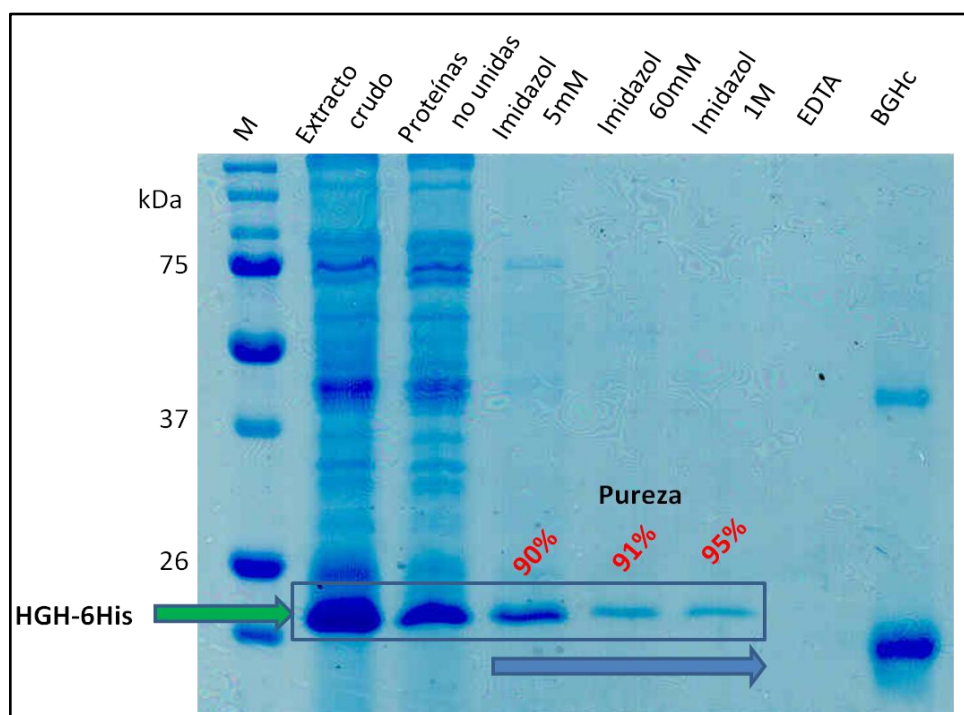


Figura 26. Purificación de la HGH-6His mediante IMAC. Se recupera la proteína en las eluciones con imidazol de 5 a 1000mM, el extracto crudo corresponde a la muestra bajo las mismas condiciones, pero sin procesar, proteínas no unidas muestra las proteínas no retenidas por la resina, EDTA corresponde a la regeneración de la columna, BGHc se empleó como estándar de 22kDa. Gel de poliacrilamida al 12.5%, teñido con azul de Coomassie.

RESULTADOS

5.10 Intento por mostrar la versatilidad del método de purificación.

Además de la cepa productora de HGH-6His construida, se trabajó a la par en la construcción de cepas productoras de E2 de VPH y TODa de *Pseudomonas putida*. Para estas dos proteínas se ha logrado ya la construcción de las cepas de *Pichia pastoris*. En las figuras 27 y 28 se muestran los análisis mediante PCR con iniciadores AOX de la inserción al genoma de la levadura de los casetes para expresar E2-6His y TODa-6His respectivamente.

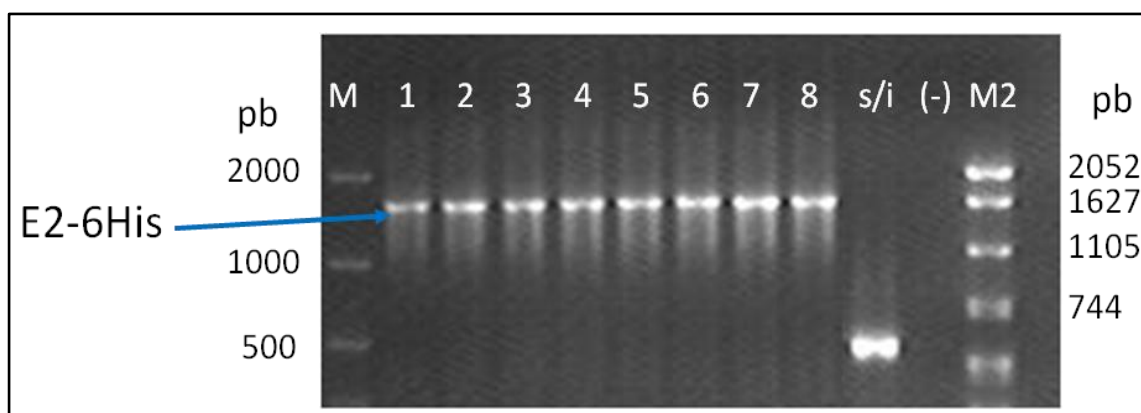


Figura 27. Análisis de la integración de pPIC9-E2-6His al genoma de *P. pastoris*. Se aprecia la banda correspondiente a E2-6His amplificada con AOX y mostrando un tamaño de 1661 pb. M1, M2) Marcadores, 1-8) Clonas de *P. pastoris* transformadas para la producción de E2-6His, s/i) *P. pastoris* transformada con pPIC9, (-) negativo de amplificación. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

RESULTADOS

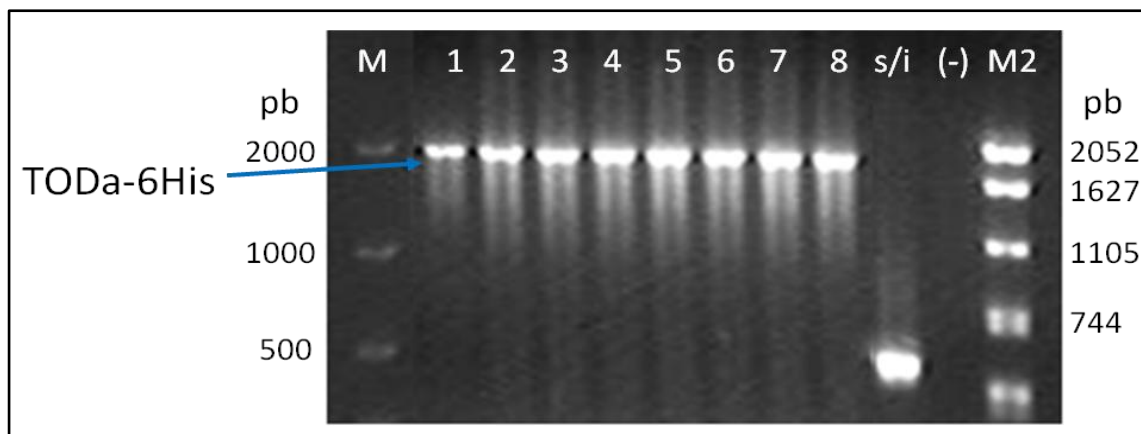


Figura 28. Análisis de la integración de pPIC9-TODa-6His al genoma de *P. pastoris*. Se aprecia la banda correspondiente a TODa-6His amplificada con AOX y mostrando un tamaño de 1800 pb. M1, M2) Marcadores, 1-8) Clonas de *P. pastoris* transformadas para la producción de TODa-6His, s/i) *P. pastoris* transformada con pPIC9, (-) negativo de amplificación. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

En el Cuadro 20 se muestra, a manera de resumen, los alcances logrados en el proyecto para la expresión de la HGH-6His y su purificación, además de la construcción de los sistemas de expresión para E2-6His y TODa-6His, a fin de mostrar la versatilidad de este método de purificación.

Cuadro 20. Resumen de los alcances del proyecto.

	HGH	E2	TODa
Diseño y síntesis de iniciadores	✓	✓	✓
Amplificación de la secuencia codificante	✓	✓	✓
Clonación en TOPO	✓	✓	✓
Subclonación en pPIC9	✓	✓	✓
Secuenciación y análisis de identidad	✓	✓	✓
Construcción del sistema expresor (<i>Pichia pastoris</i>)	✓	✓	✓
Producción de la Proteína recombinante	✓	●	●
Purificación por IMAC	✓	⊖	⊖

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

La proteómica y genómica estructural exigen la purificación de una gran cantidad de proteínas, preferencialmente de una manera generalizada. Por ello el uso de purificación basada en afinidad ha tomado importancia, siendo que la etiqueta de histidina se ha vuelto la más comúnmente empleada. Dentro de sus características se ha notado que no altera de manera significativa la solubilidad ni producción de la proteína a la cual es fusionada (Woestenek *et al.* 2004). Por tanto se decidió emplear una etiqueta de histidinas para la purificación de la HGH, la cual siendo parte de la línea de investigación se producía en el laboratorio previamente en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. La HGH es una proteína estrella dentro de la biotecnología, pues tiene implicaciones importantes dentro del metabolismo, síntesis proteica y proliferación celular, además de presentar variadas aplicaciones terapéuticas (Shin *et al.* 1998).

La fidelidad nucleotídica es un requisito indispensable para propósitos de clonación, dado que la presencia de mutaciones acarrearía problemas tanto con el posible cambio en la naturaleza de algún codón o incluso en la de lectura de los codones, con el consecuente cambio en la estructura primaria de la proteína de interés o incluso

DISCUSIÓN

también en la aparición de un codón de terminación prematuro, abortando la síntesis y provocando la presencia de proteínas truncas de tamaño menor al esperado. Por tal motivo se empleó una polimerasa de alta fidelidad (AmpliTaq Gold de ROCHE-Applied Biosystems). Además para la realización de las PCR involucradas en la amplificación de la secuencia codificante y adición de las secuencias deseadas (6His, EK y sitios de restricción) se emplearon condiciones de alta exigencia de hibridación, tal y como la concentración más baja de Mg^{2+} y la mayor temperatura de alineamiento/extensión, aplicando PCR de dos tiempos, según lo indicado en el programa Oligo 6.0.

Aunque dentro de la metodología para la clonación en pPIC9 era posible cortar directamente el producto de la PCR con las enzimas *XhoI* y *AvrII*, en nuestro caso se optó por la clonación en el vector TOPO, para facilitar la producción de cantidad suficiente de material, así como para tener la certeza sobre la eficacia de la restricción, pues al liberarse el fragmento de interés se corroboraba el corte con ambas enzimas, dando con ello pie a continuar con la metodología. En contraste, teniendo el amplicón sin clonar, los cortes liberarían regiones muy pequeñas de los extremos, difíciles de rastrear y por ende de juzgar la eficiencia del proceso de digestión.

Otro punto importante a considerar es la secuenciación nucleotídica, indispensable para corroborar la correcta construcción. En nuestro caso fue considerada y practicada como la evidencia final de toda verificación de identidad e identidad de las moléculas manipuladas.

DISCUSIÓN

El plásmido construido (pPIC9-hGH-6His) cuenta con características que le permite ser útil en la expresión de otras proteínas, teniendo la facilidad de poder enfatizarlas con el factor α -MF de *S. cerevisiae*, lo cual guía a la expresión extracelular, obteniendo así la proteína de interés en el medio de cultivo. Esto funciona como un paso inicial en la purificación pues *P. pastoris* secreta una baja cantidad de proteínas nativas al medio de cultivo, el cual además es un medio mínimo (Balamurugan *et al.*, 2007). Otra ventaja es que incorpora una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino terminal. Habiéndose reportado que el uso de una etiqueta de este tipo puede disminuir la solubilidad de la proteína a purificar, su colocación en el extremo amino ha mostrado un buen desempeño (Woesteneker *et al.*, 2004) y en el caso de la HGH producida con la etiqueta en el extremo amino, no se observó una disminución en su obtención en el medio de cultivo lo cual permite suponer que el empleo de esta etiqueta en la posición mencionada no altera la producción ni solubilidad de la proteína de interés. También se incluye un sitio *SpeI* río abajo de la secuencia codificante de la etiqueta, el cual es útil para subclonar alguna otra secuencia que se desee; para ello, dentro del diseño para su amplificación debe tomarse en cuenta cómo se hará la adaptación. Para cuando la presencia de una etiqueta de afinidad, como lo es la de histidinas aquí descrita, pueda resultar perjudicial, como en los casos de experimentos en los cuales se utilizarán metales o su administración *in vivo*, aun cuando se puede dejar sin problema alguno en muchos casos (Shahravan *et al.* 2008), en nuestra construcción se adicionó una secuencia codificante para un epítopo que es reconocido por la enzima enterocinasa,

DISCUSIÓN

con la cual se elimina el extremo amino terminal y se obtiene la proteína madura, libre de la referida etiqueta.

El análisis de la secuenciación realizada para evaluar la construcción del vector de expresión mostró un cambio en un nucleótido, teniendo así una correspondencia de 99% a nivel de nucleótidos con la secuencia reportada. No obstante, el cambio en cuestión es una A por una G en la posición 24, cambiando el codón de AGG por AGA. Ello no tiene repercusión a nivel de proteína, pues ambos codones codifican para el mismo aminoácido (son sinónimos), arginina, siendo que incluso de acuerdo al uso preferencial de codones por *P. pastoris*, se ve favorecido el nuevo codón AGA (45%) en el aspecto de eficiencia de traducción (De Schutter *et al.*, 2009).

En las levaduras metilotrófica, como en el caso de *Pichia pastoris*, para metabolizar el metanol se requiere la expresión de un grupo de enzimas, de las cuales la AOX1 puede llegar a representar más de 30% del total de proteínas solubles en presencia del metanol. En tanto que en cultivo con fuentes de carbono como glucosa o glicerol, la enzima se vuelve casi indetectable. Esto da una idea clara de la fuerza en condiciones metanólicas del promotor aquí empleado para inducir la producción de las proteínas con el vector pPIC9 (Poutou *et al.* 2005). En el caso de la HGH-6His producida, la expresión alcanzó a representar el 70% del total de las proteínas secretadas al medio de cultivo, alcanzando una producción de hasta 53µg/mL de HGH-6His en el medio de cultivo,

DISCUSIÓN

No obstante, esta producción es factible de ser mejorada, pues corresponde a producción en tubo o matraz, siendo que dentro de nuestro laboratorio se ha reportado un aumento considerable en la producción de proteínas mediante su escalamiento para la producción en biorreactor (Ascacio-Martínez 2004).

El metanol es parte importante durante el proceso de inducción, pues a concentraciones bajas (<0.5%) la inducción será pobre o nula. Por el contrario, concentraciones altas resultarán tóxicas, especialmente para fenotipos mut^s o mut^- , los cuales metabolizan de manera más lenta el alcohol por lo cual es importante tomar en cuenta el fenotipo de la cepa con la que se trabaja (Ascacio-Martínez 2004).

La pureza obtenida para la HGH-6His purificada por IMAC fue superior al 90%, que está por arriba de lo reportado para la pureza obtenida por intercambio iónico, una metodología que había presentado buenos resultados pero es mas tediosa (Ascacio-Martínez 2004), Ello establece como una mejor opción para la purificación de la HGH a la Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados. El rendimiento obtenido es comparable para ambos métodos, siendo 28% en los dos casos, siendo un punto que aun requiere optimización para elevar la cantidad obtenida, cumpliendo así los ideales de un proceso de purificación, alta pureza y recuperación.

El método de purificación IMAC resultó más rápido y sencillo respecto al intercambio ionico, sin embargo, la HGH-6His se libera en su mayoría a baja concentración de imidazol, encontrándola en gran cantidad a partir de 5mM, esto puede deberse a una débil unión por parte de la proteína etiquetada (Gräslund, *et al.* 2008). Otra posibilidad

DISCUSIÓN

es que la asociación con proteínas en el medio de cultivo propicie un impedimento estérico alrededor de la etiqueta de histidinas, disminuyendo así la capacidad de unión hacia la resina (Lin, *et al.* 2006).

El proceso de purificación puede ser realizado a pequeña escala con fines de exploración, a fin de optimizar las condiciones para el proceso y luego escalarse a mayor volumen.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

1. La etiqueta de histidinas colocada en el extremo amino terminal no afectó la expresión de HGH-6His en *Pichia pastoris*, empleando el vector de expresión pPIC9.
2. Se purificó la proteína recombinante mediante IMAC, alcanzando una pureza superior al 90%, contrastando con el 75% obtenido por intercambio iónico; en tanto que el rendimiento obtenido fue del 28%.
3. IMAC es un método de purificación más sencillo y rápido en comparación con la cromatografía de intercambio iónico.
4. El plásmido expresor pPIC9-HGH-6His sirvió como comodín para la construcción de los otros dos sistemas de proteínas: E2 y TODa.

CAPÍTULO VIII: PERSPECTIVAS

1. El ensayo de la actividad biológica.
2. El escalamiento a biorreactor de la producción.
3. El escalamiento de la purificación.
4. La optimización de las condiciones de purificación.
5. La aplicación de este método de purificación al resto de las proteínas recombinantes de nuestro laboratorio.

CAPÍTULO IX: BIBLIOGRAFÍA

Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11(7):36-42.

Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification*. 48: 1-13.

ArgenBio (2005) Consejo argentino para la Información y el desarrollo de la biotecnología. Recurso en línea. <http://www.argenbio.org/h/biotecnologia/index.php>. Consulta Enero 2011.

Ascacio-Martínez, J. A. I. (2004). Producción en biorreactor, purificación y bioensayo de hormonas recombinantes del crecimiento. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, UANL, México.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-410.

BIBLIOGRAFÍA

Balamurugan, V., Reddy, G.R., Suryanarayana, V.V.S. (2007). *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins-Vaccines. Indian Journal of Biotechnology. 6:175-186.

Block, H., Maertens, B., Sproestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., Schäfer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. Methods Enzymol. 463:439-743.

Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72:248-254.

Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P., Barr, P.J. (1984). Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 81(15):4642-4646.

Cereghino, J.L., Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews. 24:45-66.

Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L., Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. Microbial Cell Factories. 5:17.

BIBLIOGRAFÍA

Daly, R., Hearn, M.T.W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*. 18:119-138.

De Schutter, K., Lin, Y.C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*. 27(6):561-566.

Demian, A.L., Adrio, J.L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*. 38:41-55.

Escamilla-Treviño, L.L., Viader-Salvadó, J.M., Barrera-Saldaña, H.A., Guerrero-Olazarán, M. (2000). Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letter*. 22:109-114.

Gerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E. Galán-Wong, L.J., Viader-Salvadó, J.M. (2004) *Biocología de proteínas para la aplicación en acuicultura*. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B.M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H.W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S.H., Rao, Z., Shi, Y., Terwillige, T.C., Kim, C.Y., Hung, L.W., Waldo, G.S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J.L., Stevens, R.C., Lesley, S.A., Wilson, I.A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M.I., Eschenfeldt, W.H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M.,

BIBLIOGRAFÍA

Burley, S.K., Emtage, J.S., Sauder, J.M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S.C., Bonanno, J.B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F.W., Chance, M.R., Sali, A., Acton, T.B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L.C., Hunt, J.F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C.K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G.T., Stuart, D.I., Owens, R.J., Daenke, S., Schütz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Büsow, K., Gunsalus, K.C. (2008). Protein production and purification. *Natural Methods*. 5(2):135-145.

Guzzo, C.M., Yang, D.C.H. (2007). Systematic analysis of fusion and affinity tags using human aspartyl-tRNA synthetase expressed in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 54: 166-175.

Hemdan, E.S., Zhao, Y.J., Sulkowski, E., Porath, J. (1989). Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:1811-1815.

Huangh, X., Madan, A., (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*. 9:868-877.

Invitrogen. (2006). TOPO TA Cloning. Five minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products. Version U.

Invitrogen. (2010). *Pichia* Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. User manual.

BIBLIOGRAFÍA

Invitrogen. (2010). Overview of protein expression system hosts.

[http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/PEIA-Misc/Expression-Hosts-and-Their-Applications.html)

[Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/PEIA-Misc/Expression-Hosts-and-](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/PEIA-Misc/Expression-Hosts-and-Their-Applications.html)

[Their-Applications.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/PEIA-Misc/Expression-Hosts-and-Their-Applications.html) Consulta Enero 2011.

Knecht, S., Ricklin, D., Eberle, A. N., Ernst, B. (2009). Ologohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. *Journal of Molecular Recognition*. 22:270-279.

Lebendiker, M. (2006). The Hebrew University of Jerusalem. The protein purification facility. <http://wolfson.huji.ac.il/purification/>. Consultado Julio 2010.

Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, VV., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 142(2):105-124.

Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J., Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* 41:98-105.

Lin, C.T., Moore, P.A., Auberry, D.L., Landorf, E.V., Peppler, T., Victry, K.D., Collart, F.R., Kery, V. (2006). Automated purification of recombinant proteins: combining high-throughput with high yield. *Protein Expression and Purification*. 47(1): 16-24.

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 22:242-270.

BIBLIOGRAFÍA

McCluskey, A.J., Poon, G.M.K., Gariépy, J. (2007). A rapid and universal tandem-purification strategy for recombinant proteins. *Protein Science*. 16:2726-2732.

Poutou, R.A., Quevedo, B.E., Córdoba, H.A., Sáenz, H., Barrera, L.A. (2005.) Influencia de la fuente de carbón sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA*. 3(3):75-87.

Rai, M., Padh, H. (2001.) Expression systems for the production of heterologous proteins. *Current Science*. 80(9) Mayo.

Rasband, W.S. (1997-2009). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Consultado Enero 2011.

Rédei, G.P. (2008.) *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. 3rd Edition. Springer science. USA.

Resendez Pérez, D. (1991). *Expresión y disección funcional in vitro de las hormonas lactogénica placentaria y del crecimiento humano*. Tesis doctoral. Facultad de medicina, UANL. México.

Sambrook, J., R.W.D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schmidt, F.R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65:363-372.

BIBLIOGRAFÍA

Scorer, C.A., Clare, J.J., McCombie, W.R., Romanos, M.A., Sreekrishna, K. (1994). Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology*. 12:181-184.

Shahravan, S.H., Qu, X., Chan, I.S., Shin, J.A. (2008). Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Protein Expression and Purification*. 59(2):314-314.

Shin, N.K., Kim, D.Y., Shin, C.S., Hong, M.S., Lee, J., Shin, H.C. (1998) High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process. *Journal of Biotechnology*. 62(2):143-51.

Shuman, S. (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*. 269:32678-32684.

Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. 31:3688-3691.

Walsh, G. (2003.) *Biopharmaceuticals, biochemistry and biotechnology*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 324-327.

Waugh, D. S. (2005.) Making the most of affinity tags. *TRENDS in Biotechnology*. 23(6):316-320.

Weidner M., Taupp M., Hallam S.J. (2010). Expression of Recombinant Proteins in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *JoVE*. 36. Consultado Enero 2011.

BIBLIOGRAFÍA

<http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1862>, doi: 10.3791/1862

Woestenenk, E.A., Hammarström, M., van den Berg, S., Härd, T., Berglund, H. (2004). His tag effect on solubility of human proteins in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *Journal of Structural and Functional Genomics*. 5:217-229.

Wu, Y.J., Fan, C.Y., Li, Y.K. (2009). Protein purification involving a unique auto-cleavage feature of repeated KAAAK peptide. *Journal of Chromatography* 877(31):4015-21.

ANEXOS

ANEXO 1: PROTOCOLOS

Protocolo 1. Extracción de ADN genómico de levadura por TSNT

- 1.- Agregar 2mL de muestra (biomasa) 1.8mL
- 2.- Centrifugar 1min a 12krpm, eliminar sobrenadante
- 3.- Agregar otros 2mL de muestra (biomasa) 1.6mL
- 4.- centrifugar 1min a 12krpm, eliminar sobrenadante
- 5.- Agregar 200mcl de TSNT, (vortexear 30seg)
- 6.- Agregar 200mcl de fenol, (vortexear 30seg), + 200mcl de SEVAG, (vortexear 5min)
- 7.- Agregar 300mcl de TE 1X (vortexear 30seg)
- 8.- Centrifugar 7min a 13krpm
- 9.- Transferir el sobrenadante a un tubo de 2mL (la fase acuosa, superior)
- 10.- Agregar 2.5 volúmenes de etanol 100%
- 11.- Centrifugar 10min a 13krpm y decantar
- 12.- Agregar 500 a 1000mcl de etanol 70%
- 13.- Centrifugar 10min a 13krpm y decantar
- 14.- Secar en el savant
- 15.- Agregar 30mcl de TE 1X, (puede ser con RNAsa)

mcl = microlitros

krpm= kilorevoluciones por minuto

seg = segundos

TE

EDTA	100mM
Tris-HCl	1M

SEVAG

Cloroformo - alcohol isoamilico 24:1 (V/V)

TSNT

Triton X-100	2%
SDS	1%
NaCl	100mM
Tris-HCl pH 8	10mM
EDTA pH 8	1mM

Protocolo 2. Preparación de bacterias electrocompetentes

- 1.- Inocular una colonia de E. coli en 5mL de . Crecer de 5 horas a toda la noche @ 37°C con agitación.
- 2.- Inocular 2.5mL de cultivo previo en 500mL de LB en un matraz de 2L. Crecer a 37°C, agitando a 300rpm, hasta alcanzar una DO de 0.5 a 0.7 (NOTA: los mejores resultados se obtienen con DO entre 0.5 a 0.6)
- 3.- Enfriar las células en un baño con hielo de 10 a 15min y transferir a un bote de centrifuga frio.
- 4.-Centrifugar por 20min a 4200rpm a 2°C (Beckman J-6M)
- 5.- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5mL de agua fría. Añadir 500mL de agua fría y mezclar bien. Centrifugar 20min a 4200rpm a 2°C.
- 6.- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet agitando gentilmente en el líquido remanente.
- 7.-Añadir otros 500mL de agua fría, mezclar bien y centrifugar 20min 4200rpm a 2°C.
- 8.-Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en el liquido remanente.
- 9.-Añadir 40mL de glicerol 10% frio y mezclar bien. Centrifugar 10min a 4200rpm a 2°C.
- 10.- Estimar el volumen del pellet y añadir un volumen igual de glicerol 10% frio para resuspender las células.
- 11.- Alicuotar en tubos de microcentrífuga preenfriados 100µL.

medio LB

0.5% Extracto de levadura

1% Triptona

1% NaCl

Protocolo 3. Transformación de bacterias electrocompetentes.

- 1.-Ajustar el aparato a 2.5kV, 25µF y 200 a 400 ohms
- 2.-Añadir de 5pg a 0.5µg de DNA plasmídico en 1µL al tubo que contiene las células frescas o recién descongeladas. Mezclar con unos golpecitos o agitando gentilmente con la pipeta.
- 3.-Transferir el DNA y las células a una cubeta preenfriada 5min en hielo, agitar gentilmente para llevar las células al fondo, limpiar el hielo y agua de la cubeta. NOTA: el volumen del DNA añadido debe mantenerse pequeño, añadir un decimo del volumen de las células disminuye la eficiencia.
- 4.-Colocar la cubeta en la cámara de descarga.
- 5.-Aplicar el pulso.
- 6.-Quitar la cubeta. Anotar la duración del pulso. Inmediatamente añadir 1mL de LB y transferir a un tubo estéril. Incubar 30 a 60min con agitación moderada a 37°C.
7. Centrifugar 3min a 4000rpm, decantar es sobrenadante y resuspender en el líquido remanente.
- 7.-Plaquear alícuotas de la transformación en placas de LB con antibiótico apropiado.

Protocolo 4. Preparación de levaduras electrocompetentes.

1. Crecer 5 mL de *Pichia pastoris* en YPD en un tubo cónico de 50mL, crecer toda la noche a 30°C
2. Inoculas 500mL de medio YPD contenido en un matraz de 2L, con 0.1-0.5mL del cultivo crecido previamente.
3. Centrifugar las células 1500 xg por 5 min a 4°C, resuspender la pastilla en 500mL de agua destilada fría.
4. Centrifugar las células como en el paso 3, y resuspender posteriormente en 250 mL de agua fría.
5. centrifugar como en el paso 3 y después resuspender en 20 mL de sorbitol 1M frío.
6. Centrifugar las células como en el paso 3, y finalmente resuspender en 1 mL de sorbitol 1 M frío.

NOTA: las células pueden almacenarse a -80°C para su uso posterior.

Protocolo 5. Transformación de *Pichia pastoris* por electroporación

1. Mezclar 80 µL de células electrocompetentes (recién preparadas o congeladas) con 5 a 20 µg del ADN linearizado, en un volumen de 5 a 10 µL de agua desionizada.
2. Transferir la mezcla a la celda de electroporación e incubar en hielo 5 min.
3. Aplicar el pulso (1.5kV, 25µF y 200Ω).
4. Posterior al pulso añadir 0.5mL de sorbitol 1 M frío directo a la celda, luego transferir el contenido a un tubo para microcentrifuga estéril.
5. Plaquear alícuotas en medio selectivo (MD, si se trabaja con pPIC9 o pPIC9K).
6. Incubar las placas a 30°C hasta la aparición de las colonias.

ANEXOS

ANEXO 2: MEDIOS DE CULTIVO

YPG (Yeast Peptone Glicerol)

Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glicerol	2%

YPD (Yeast Peptone Dextrose)

Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Dextrosa (glucosa)	2%

BMMY

Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Fosfato de potasio pH=6	100mM
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1.34%
Biotina	$4 \times 10^{-5}\%$
Methanol	0.5%

MD

YNB (Yeast Nitrogen Base)	1.34%
Biotina	$4 \times 10^{-5}\%$
Dextrosa (glucosa)	2%
Agar	1.5%

ANEXOS

LB (Luria-Bertani) liquido

Triptona	1%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	1%

NOTA: ajustar a pH=7 con NaOH

LB (Luria-Bertani) placas

Triptona	1%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	1%
Agar	1.5%

NOTA: ajustar a pH=7 con NaOH

ANEXOS

ANEXO 3: SECUENCIA DEL PLÁSMIDO pPIC9-HGH-6His

Sitios de restricción *Xho*I, *Spe*I, *Avr*II.

Secuencia codificante para la etiqueta de histidinas.

Secuencia codificante para epítopo reconocido por EK.

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCCATTCTCAC
ACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTC
CTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCAT
TCCAATTCCTTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTCC
ATGTTTGTATTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACCCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGA
GTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCAAAACGACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACCTA
ATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTC
AAAAAGAACTTCCAAAAGTCGCCATACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAAT
CTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGG
AAACACCCGCTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGC
TGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAAATTAAGTCTAACCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGG
AAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTG
ACAAGCTTTTGAATTTAACGACTTTTAAACGACAACCTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATCGAAGGAT
CCAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCA
ACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGG
GATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTG
CCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCT

CTC GAGAAG AGA **CAT CAC CAT CAC CAT CAT** ACT AGT **GAC GAT GAC GAT AAA** GCC TTC CCA ACC
ATTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCT
ACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCTGCAGAACCCCCAGACCTCCC
TCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGC
TCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACA
GCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACG
CTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCCG
ACACAACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATG
GACAAGGTCGAGACATTCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGC TGT GGC TTC TAG
CCTAGG

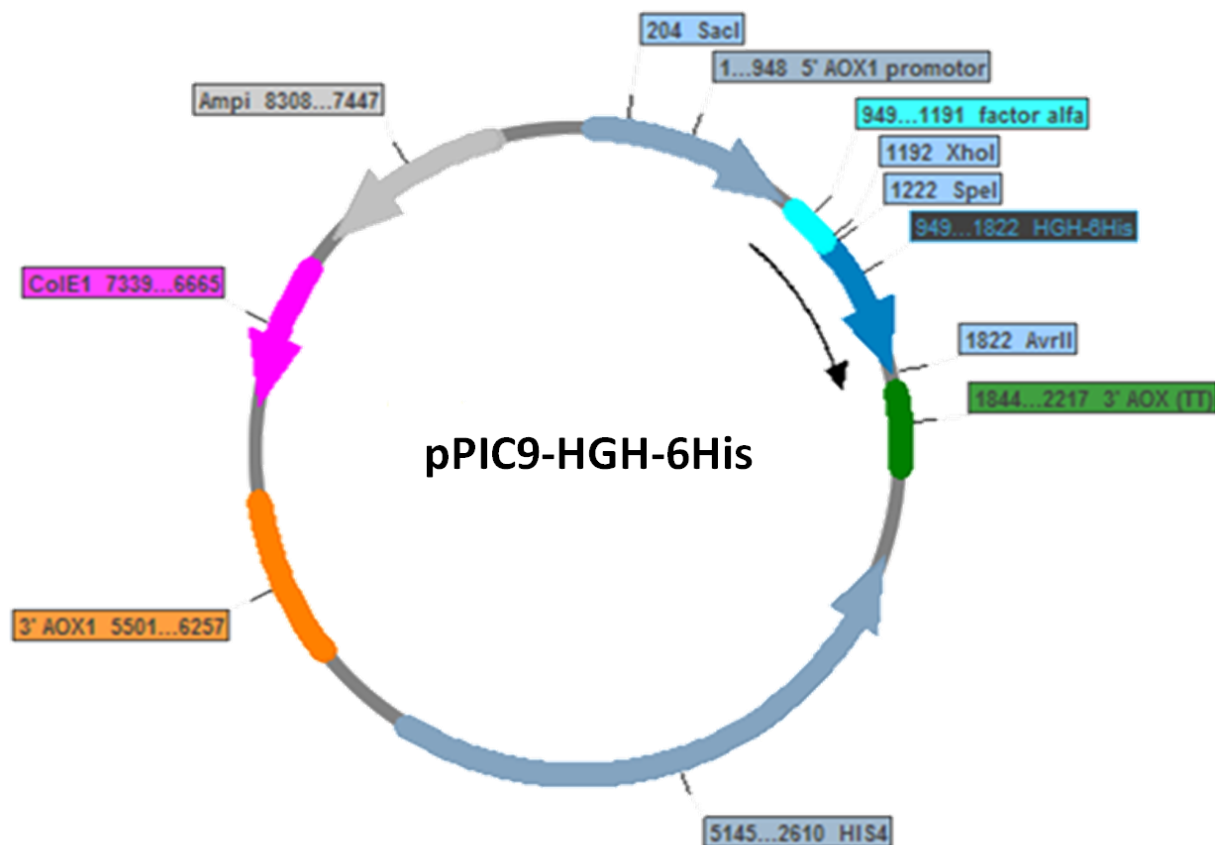
GCGGCCGGAATTAATTCGCCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGG
TCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATAC
TTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTGTCATTTTGTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGAT
CAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTGGGAAAATCATTTCGAGTTTGATGTTTTCT
TGGTATTTCCCACTCCTTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGAAGTTGTTTTGTGCAAGCTTATCGATAAG
CTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCG
CTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGTTATGCCGGTACTGCCGGGC
CTCTTGCGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTG
ATGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTT
CGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCCTGTGGATCTATCGAATCTAAA
TGTAAGTTAAAATCTCTAAATAATTAATAAGTCCCAGTTTCTCCATACGAACCTTAACAGCATTGCGGTGAG

ANEXOS

CATCTAGACCTTCAACAGCAGCCAGATCCATCACTGCTTGGCCAATATGTTTCAGTCCCTCAGGAGTTACGTC
TTGTGAAGTGATGAACTTCTGGAAGGTTGCAGTGTTAACTCCGCTGTATTGACGGGCATATCCGTACGTTGG
CAAAGTGTGGTTGGTACCGGAGGAGTAATCTCCACAACCTCTCTGGAGAGTAGGCACCAACAAACACAGATC
CAGCGTGTGTTACTTGTATCAACATAAGAAGAAGCATTCTCGATTTGCAGGATCAAGTGTTCAGGAGCGTAC
TGATTGGACATTTCCAAAGCCTGCTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGCAATACACTTGCCT
ACAATTTCAACCCTTGGCAACTGCACAGCTTGGTTGTGAACAGCATCTTCAATTCTGGCAAGCTCCTTGTCTG
TCATATCGACAGCCAACAGAATCACCTGGGAATCAATACCATGTTGAGCTTGAGACAGAAGGTCTGAGGCA
ACGAAATCTGGATCAGCGTATTTATCAGCAATAACTAGAACTTCAGAAGGCCAGCAGGCATGTCAATACT
ACACAGGGCTGATGTGTCATTTTGAACCATCATCTTGGCAGCAGTAACGAAGTGGTTTCTGGACCAAATAT
TTTGTCACTTAGGAACAGTTTCTGTTCCGTAAGCCATAGCAGCTACTGCCTGGGCGCCTCCTGCTAGCAC
GATACACTTAGCACCACCTTGTGGGCAACGTAGATGACTTCTGGGGTAAGGGTACCATCCTTCTTAGGTG
GAGATGCAAAAACAATTTCTTTGCAACCAGCAACTTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGGAAAGG
CAGAATTGCGTTCACCAGGAATATAGAGGCCAACTTTCTCAATAGGTCTTGCAAAACGAGAGCAGACTA
CACCAGGGCAAGTCTCAACTTGAACGTCTCCGTTAGTTGAGCTTCATGGAATTTCTGACGTTATCTATAG
AGAGATCAATGGCTCTCTAACGTTATCTGGCAATTGCATAAGTTCCTCTGGGAAAGGAGCTTCTAACACAG
GTGTCTTCAAAGCGACTCCATCAAACCTTGGCAGTTAGTCTAAAAGGGCTTTGTACCATTTTACGAACATT
GTCGACAATTGTTTACTAATTCATAATCTGTTCCGTTTTCTGGATAGGACGACGAAGGGCATCTTCAATT
TCTTGTGAGGAGGCCTTAGAAACGTCAATTTTGCACAATTCAATACGACCTTCAGAAGGGACTTCTTAGGT
TTGGATTCTTCTTAGGTTGTTCTTGGTGTATCCTGGCTTGGCATCTCCTTTCTTCTAGTGACCTTAGGGA
CTTCATATCCAGTTTTCTCTCCACCTCGTCCAACGTACACCGTACTTGGCACATCTAACTAATGCAAAATAA
AATAAGTCAGCACATTCCCAGGCTATATCTTCTTGGATTTAGCTTCTGCAAGTTCATCAGCTTCTCCCTAAT
TTTAGCGTTCAACAAAACCTTCGTCGTCAAATAACCGTTTGGTATAAGAACCTTCTGGAGCATTGCTCTTACGA
TCCCACAAGGTGGCTTCCATGGCTCTAAGACCCTTGTATTGGCCAAAACAGGAAGTGCCTTCAAAGTGACA
GAAACCAACACCTGTTTGTCAACCACAAATTTCAAGCAGTCTCCATCACAATCCAATTTCGATACCCAGCAA
TTTTGAGTTGCTCCAGATGTAGCACCTTTATACCACAAACCGTGACGACGAGATTGGTAGACTCCAGTTTGT
GTCCTTATAGCCTCCGGAATAGACTTTTTGGACGAGTACACCAGGCCAACGAGTAATTAGAAGAGTCAGC
CACCAAAGTAGTGAATAGACCATCGGGCGGTGAGTAGTCAAAGACGCCAACAAAATTTCACTGACAGGG
AACTTTTTGACATCTTCAGAAAGTTCGTATTAGTAGTCAATTGCCGAGCATCAATAATGGGGATTATACCA
GAAGCAACAGTGGAAAGTCACATCTACCAACTTTGCGGTCTCAGAAAAAGCATAAACAGTTCTACTACCGCC
ATTAGTGAAACTTTTCAAATCGCCAGTGGAGAAGAAAAAGGCACAGCGATACTAGCATTAGCGGGCAAG
GATGCAACTTTATCAACCAGGGTCTATAGATAACCCTAGCGCCTGGGATCATCCTTTGGACAACCTTTTCTG
CCAAATCTAGGTCCAAAATCACTTCATTGATACCATTATTGTACAACCTGAGCAAGTTGTGATCAGCTCCTC
AAATTGGTCTCTGTAACGGATGACTCAACTTGCACATTAACCTGAAGCTCAGTCGATTGAGTGAACCTTGAT
CAGGTTGTGAGCTGGTCAGCAGCATAGGGAACACGGCTTTTCTACCAAACCTCAAGGAATTATCAAACCT
CTGCAACACTTTCGATGACAGGTAGCAAGGGAAATGTCATACTTGAAGTCGGACAGTGAAGTGTAGTCTTGA
GAAATTCTGAAGCCGATTTTTATTATCAGTGAGTCAAGTCAAGGAGATCCTCTACGCCGACGCATCGTG
GCCGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATC
GGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGG
ACTGTTGGGCGCCATCCTTGCATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACT
GGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGGAATG
GTGATACCCGCATTCTTCAAGTGTCTTGAAGTCTCCTATCAGATTATGCCAACTAAAGCAACCCGAGGAGG
AGATTTTCAAGTAAATTTCTGACTTTTGGTCATCAGTAGACTCGAAGTGTGAGACTATCTCGGTTATGACA
GCAGAAATGTCCTTCTGGAGACAGTAAATGAAGTCCACCAATAAAGAAATCCTTGTATCAGGAACAAA
CTTCTGTTTTCGAACTTTTTCGGTGCCTTGAACATAAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGC
GGGCAATGCTTACCTTCTGGACCTTCAAGAGGTATGTAGGGTTTGTAGATACTGATGCCAACTTCAAGTAC
AACGTTGCTATTTTCGTTCAAACCATCCGAATCCAGAGAAATCAAAGTGTGTTTGTCTACTATTGATCCAAGCC
AGTGCAGTCTTGAACCTGACAATAGTGTGCTCGTGTGTTTGGAGTCACTTTGTATGAATAAATCTAGTCTTTG
ATCTAAATAATCTTACGAGCCAAGGCGATAAATACCCAAATCTAAAACCTTTTAAAACGTTAAAAGGACA

ANEXOS

AGTATGTCTGCCTGTATTAACCCCAAATCAGCTCGTAGTCTGATCCTCATCAACTTGAGGGGCACTATCTTG
TTTTAGAGAAATTTGCGGAGATGCGATATCGAGAAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCAA
GATCTCTGCCTCGCGCTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCAC
AGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGT
CGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGA
GCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGC
ATCAGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCA
GCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAAGAACATGTGAGCAA
AAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT
GACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG
CGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTT
TCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCG
CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCT
TGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAC
CACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAG
ATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGA
GATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA
TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGCT
TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGT
GCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG
GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG
AGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTC
GTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTG
CAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCAT
GGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTAC
TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAA
TACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAG
GATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACT
TTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGC
GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCA
CCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTC
TTCAAGAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTGACTCATGTTGGTATTGTGAAATAGACG
CAGATCGGGAACACTGAAAAATAACAGTTATTATTCG



Plásmido pPIC9-HGH-6His construido en la tesis.

5' AOX1 Promotor	Promotor del gen <i>aox1</i>
Factor alfa	Factor de secreción α de <i>S. cerevisiae</i>
HGH-6His	Secuencia codificante de HGH-6His
3' AOX (TT)	Sitio de terminación de la transcripción
HIS4	Gen de la histidinol deshidrogenasa
3'AOX1	Fragmento 3' del gen <i>aox1</i>
ColE1	Origen de replicación de <i>E. coli</i>
Ampi	Gen de resistencia a ampicilina

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Alan Roberto Márquez Ipiña

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Titulo: "ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES, BASADO EN ETIQUETAS DE HISTIDINA, PRODUCIDAS EN *Pichia pastoris*"

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en San Luis Potosí, S.L.P. el 15 de Julio de 1986, hijo de Francisco Roberto Márquez Bravo y Yolanda Ipiña Contreras.

Educación: Químico Farmacobiólogo egresado de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, grado obtenido en 2008 con desempeño sobresaliente en el modo de Examen General de Egreso de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas.