

3.3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA genómico de diferentes clonas fue analizado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar una zona específica del cassette de expresión y de esta manera verificar la integración del plásmido pPIC9KhGH20K al genoma de *P. pastoris*. El iniciador sentido o 5' (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') se aparea en la región 5'AOX1 (nucleótido 855-875) del plásmido pPIC9K, mientras que el iniciador antisentido o 3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') se aparea en la región 3'AOX1 TT (nucleótido 1327-1347) del mismo. La PCR en el plásmido pPIC9K trae como resultado la amplificación de un fragmento de 449 pb, mientras que en pPIC9KhGH20K el fragmento generado es de: 1016 pb. Por otro lado la PCR del DNA genómico de *P. pastoris* no recombinante da como resultado un producto de 2200 pb, correspondiente a la amplificación del gen AOX1, mientras que en la amplificación del DNA genómico de las cepas recombinantes de *P. pastoris* da como resultado la amplificación de dos bandas: una de 2200 pb y otra de 1016 pb, debido a que *P. pastoris* recombinante aún conserva el gen AOX1 (Mut⁺) pero además posee el cassette de expresión integrado al genoma de la levadura.

Las condiciones de reacción para la PCR se llevaron a cabo mediante modificaciones a las condiciones establecidas por Escamilla Treviño en 1996. Estas condiciones son las siguientes: amortiguador de PCR (Promega 10X), MgCl₂ 1.5 mM, DNA genómico a 25 ng/μL, dNTP's a 200 mM, iniciador 5' a 0.5 mM, iniciador 3' a 0.5 mM, agua ultrapura estéril y 0.5 unidades de Taq polimerasa en una reacción de 25 μL. El programa llevado a cabo en el termociclador fue el siguiente: una etapa inicial de desnaturalización del ciclo a 94°C (2 min), una etapa de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), alineación a 60°C (1 min) y extensión a 72°C (2 min) y una última etapa de

extensión a 72°C (7 min). Una vez finalizada la amplificación se realizó el análisis de 5 µL del producto de reacción de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.6% en TBE 1X (0.089 M de Tris-boratos, 0.089 M de ácido bórico y 0.002 M de EDTA).

3.3.3.4 Inducción de la expresión del DNAc de HGH 20K

Para realizar la inducción del DNAc de hGH de 20K se realizaron fermentaciones en dos fases: En la primera fase se busca el aumento de masa celular empleando un medio de cultivo mínimo amortiguado, siendo la fuente de carbono glicerol o glucosa. En esta etapa se encuentra reprimida la producción de la proteína recombinante debido a que el promotor que dirige la síntesis se encuentra apagado. En la segunda fase, se activa el promotor de *AOX1* al agregar metanol al medio de cultivo, convirtiéndose en la única fuente de carbono disponible. En esta etapa se produce la proteína recombinante.

Las clonas fueron analizadas mediante fermentaciones a nivel matraz, para verificar de esta manera la expresión del producto recombinante (HGH 20K). Colonias aisladas de cada una de las colonias fueron inoculadas en 25 mL de medio BMG en matraces de 250 mL y se crecieron a 30°C en agitación a 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ nm entre 2 y 6. Posteriormente el paquete celular se obtuvo por centrifugación a 10000 rpm (centrifuga ICE Centra, rotor 954) durante 5 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 25 mL de medio BMM (medio inductor). En seguida, se incubó a 30°C durante 96 h para inducir la expresión del gen heterólogo (hGH). Para mantener la inducción se agregó metanol al 100% cada 24 h a una concentración final de 0.75%. Una vez terminado el tiempo de fermentación, las células fueron separadas del medio de cultivo mediante

centrifugación a 10000 rpm (centrifuga ICE Centra, rotor 954) durante 5 min. El sobrenadante obtenido de estas fermentaciones fue utilizado para realizar análisis en geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE); determinación de proteínas totales; y para establecer la cinética de crecimiento, para así determinar si existía alguna variación en su crecimiento con respecto a la producción de HGH 20K

3.3.4 Selección de clonas conteniendo copias múltiples del cassette de expresión

El procedimiento para generar clonas resistentes a G418 (geneticina) requiere de una selección inicial de transformantes His⁺, seguido de un tamizaje variando los niveles de resistencia a G418. La resistencia a G418 es conferida por el gen kanamicina presente en pPIC9K.

Se realizó un tamizaje preliminar que permitió analizar un gran número de clonas de forma rápida y simplificada, éste se llevó a cabo determinando el nivel de resistencia a G418 de las diferentes clonas, el cual se relaciona con el número de copias del cassette de expresión integrado al genoma de la levadura.

De las clonas recombinantes obtenidas mediante la técnica de formación de esferoplastos, se tomaron 103 colonias y se replicaron en placas con RDB (sin histidina), además se utilizaron 5 controles (GS115, GS115pPIC9K-Sal I, GS115pPIC9K-Dra I, GS115pPIC9hGH22K, pPIC9KhGH22K). La Tabla III muestra las características de dichos controles.

Tabla III.- Descripción de los controles

| | |
|--|---|
| GS115 (C3-6.3)* | Cepa original de <i>Pichia pastoris</i> . |
| GS115pPIC9K- <i>Sal</i> I (C3-6.6)* | Cepa de <i>Pichia pastoris</i> transformada con el vector pPIC9K, digerido con <i>Sal</i> I. |
| GS115pPIC9K- <i>Dra</i> I (C3-6.5)* | Cepa de <i>Pichia pastoris</i> transformada con el vector pPIC9K, digerido con <i>Dra</i> I. |
| GS115pPIC9hGH22K (C3-6.4)* | Cepa unicopia de <i>Pichia pastoris</i> transformada con el vector pPIC9hGH22K, portadora de una copia del DNAc de HGH 22K |
| GS115pPIC9KhGH22K (C3-6.3)* | Cepa multicopia de <i>Pichia pastoris</i> transformada con el vector pPIC9hGH22K, portadora de múltiples copias del DNAc de HGH 22K |

* Ver Anexo 2.

Cada una de las colonias se crecieron en placas de microtitulación conteniendo cada pozo 200 μ L de YPD. La inoculación se llevó a cabo mediante la punción de la colonia con un palillo de dientes estéril y la posterior resuspensión de las células en los 200 μ L del medio YPD. Las placas de microtitulación se incubaron a 30°C durante dos días (no requiere de agitación). Transcurridos los dos días de incubación, se tomaron placas nuevas de microtitulación y se les añadió 190 μ L de YPD a cada pozo. Este segundo juego de placas de microtitulación fue inoculado con 10 μ L de cada uno de los pozos de la primera placa de microtitulación, utilizando una pipeta multicanales. Nuevamente las placas de microtitulación se incubaron a 30°C durante dos días. Transcurridos los dos días de incubación, se inoculó un tercer juego de placas de microtitulación, de la misma manera que el segundo juego, esto con el fin de obtener densidades celulares semejantes en cada una de las clonas analizadas y evitar de esta manera falsos positivos. Después de la incubación se tomó el tercer juego de placas de microtitulación y se resuspendieron las células de cada pozo con una pipeta multicanales. Se tomaron 5 μ L de cada pozo y se inocularon en placas con YPD que contenían G418 a concentraciones finales de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0, y

4.0 mg/mL. Para este ensayo se utilizaron placas con 36 divisiones, lo que permitió separar cada una de las clonas analizadas.

Las placas se incubaron a 30°C y se revisaron después de 2, 3, 4, y 5 días para identificar las clonas resistentes a G418. Finalmente, se analizaron de los resultados obtenidos.

3.3.5 Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K

Para la selección de la clona sobreproductora de HGH 20K, se tomaron en cuenta dos consideraciones: por un lado se llevó a cabo la selección de clonas que crecieron a dosis altas de G418 y por otro lado se evaluaron los niveles de producción de estas clonas. Para determinar los niveles de producción se realizaron: a) Fermentaciones a nivel matraz, con un tiempo final de inducción de 140 h; b) Determinación de proteínas totales del medio de cultivo libre de células por el método de Bradford (Bradford, 1976); c) Estimación del porcentaje (%) relativo de hGH 20K mediante análisis densitométrico de geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (Sambrook, 1989); d) Cálculo de la concentración de HGH 20K relacionando el % relativo de ésta con respecto a las proteínas totales. Además, se realizó una correlación entre la resistencia al antibiótico G418 y los niveles de producción de HGH de 20K obtenidos.

3.3.5.1 Análisis de proteínas

En este sistema de expresión el producto es secretado al medio de cultivo, por lo cual fué necesario separarlo de las células al final de las fermentaciones. El medio de cultivo obtenido fue dializado contra agua ultrapura y se utilizó para realizar el análisis de proteínas. Las bolsas de diálisis con 10 mL de medio de cultivo permanecieron sumergidas en 4 L de agua fría (4°C) durante 2 h con agitación moderada. Se realizaron dos cambios mas de agua cada 12 h. El medio dializado en todos los casos se llevó a un volumen final de 13 mL con agua ultrapura. Posteriormente, 500 μ L del medio dializado de cada una de las muestras se secaron al vacío. La pastilla de proteínas se resuspendió en 15 μ L de buffer SDS-PAGE, se calentaron durante 5 min a 100°C, y se centrifugaron por 5 segundos para bajar el líquido condensado y se aplicaron los 15 μ L para la electroforesis en gel de poliacrilamida.

La determinación de las proteínas totales se realizó por el métodos de Bradford (Bradford, 1976). Este método cuantifica la unión del azul brillante de Coomassie a una proteína desconocida y compara esta unión a las cantidades diferentes de una proteína estándar. Se determinó la absorbancia a 595 nm y se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino en un intervalo de concentración de 0.25 a 8 μ g/mL. Tanto las muestras como los estándares fueron preparados por triplicado. Los cálculos se realizaron utilizando una recta de calibración determinada por el método de mínimos cuadrados con el apoyo del programa computacional *Microsoft Excel*.

Para el análisis de las proteínas se utilizó un gel de poliacrilamida discontinuo al 15% (como gel separador). Una vez colocadas las muestras en el gel, se aplicó un voltaje inicial de 80 mV hasta que el colorante penetró en el

gel concentrador aproximadamente 1 cm, luego se aumentó el voltaje a 120 mV hasta que el colorante salió totalmente del gel separador (8.3 cm x 10.2 cm x 0.1 cm). El gel fue desensamblado y colocado en un recipiente de plástico que contenía solución fijadora (metanol 50% v/v, ácido acético 10 % v/v en agua ultrapura) y permaneció en éste durante 1 hora con agitación a 40 rpm. Se retiró la solución fijadora y el gel fue teñido con la solución colorante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie 0.5 % p/v, metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v, en agua ultrapura) durante 25 minutos con agitación a 40 rpm. Transcurrido este tiempo se retiró la solución colorante de Coomassie y se añadió la solución decolorante (metanol 5 % v/v, ácido acético 7 % v/v, en agua ultrapura); en este caso se realizaron cambios periódicos de la solución decolorante con agitación a 40 rpm y permaneció en esta solución hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel.

El porcentaje relativo de HGH 20K se determinó por densitometría en gel. Este se basa en la medición de la intensidad de la coloración de las bandas de proteínas obtenidas en el gel provenientes del medio de cultivo, y el % se calculo con respecto a la sumatoria de las intensidades de todas las bandas presentes en el carril. La concentración de HGH en el medio de cultivo fue calculada con este porcentaje en relación a las proteínas totales presentes en el mismo medio y determinada por Bradford. El equipo empleado fue un sistema de fotodocumentación Gel Doc 1000 (BIO-RAD).

CAPITULO 4

4. RESULTADOS

4.1 Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGh22K en *E. coli* XL1-Blue

Se logró la transformación de células calcio-competentes de *E. coli* XL1-Blue con los plásmidos: pBS , pJV, pPIC9K y pPIC9hGh22K. En todos los casos las preparaciones de DNA plasmídico a gran escala mostraron valores de A_{260}/A_{280} de 1.8 a 2.0, los cuales fueron considerados aceptables en las preparaciones de DNA plasmídicos tal y como se muestra en la Tabla IV. El rendimiento obtenido en cada una de las preparaciones mostró estar dentro de los límites reportados en la bibliografía (500 a 2000 μg por litro de cultivo). Por lo tanto, la cantidad de DNA plasmídico obtenida fue suficiente para realizar todas las manipulaciones subsecuentes.

Tabla IV.- Rendimiento y calidad de las preparaciones plasmídicas

| Plásmido | A 260/A 280 | Rendimiento $\mu\text{g}/\text{L}$ |
|-------------|-------------|------------------------------------|
| pBS | 2.03 | 1798 |
| pJV | 1.94 | 1930 |
| pPIC9K | 2.07 | 3485 |
| pPIC9hGH22K | 2.01 | 2739 |

4.2 Construcción del plásmido pBS20K

Las digestiones preparativas con *Xho* I y *Hind* III de pBS y pJV se llevaron de manera eficiente a juzgar por su análisis en el gel de agarosa. Los fragmentos requeridos para la ligación fueron recuperados mediante la técnica de fibra de vidrio siliconizada de manera adecuada.

Los resultados de la transformación de *E. coli* XL1-Blue con el plásmido recombinante construido (pBS20K) empleando diferentes estrategias se muestran en la Tabla V.

Tabla V.- Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBS20K

| Tratamiento | Colonias blancas | Colonias azules | No. Total de Colonias |
|--|------------------|-----------------|-----------------------|
| TE (Control negativo) | 0 | 0 | 0 |
| pUC18 (Control positivo) | 0 | 290 | 290 |
| pBS + Fragmento* + Ligasa | 157 | 51 | 208 |
| pBS + Fragmento* - Ligasa | 0 | 0 | 0 |
| pBS + <i>Hind</i> III + Ligasa | 41 | 441 | 482 |
| pBS + <i>Hind</i> II - Ligasa | 0 | 0 | 0 |
| pBS + <i>Xho</i> I + <i>Hind</i> III+Ligasa | 0 | 81 | 81 |
| pBS + <i>Xho</i> I + <i>Hind</i> III- Ligasa | 0 | 0 | 0 |

*Fragmento *Xho* I-*Hind* III de 609 pb correspondiente a la secuencia completa del DNAC de hGH 20K.

Se obtuvieron un total de 208 colonias, de las cuales 51 colonias eran de color azul y 157 fueron de color blancas (transformadas con plásmido recombinante). Se analizaron 18 colonias (donde 16 de ellas provenían de colonias blancas y 2 de colonias azules, utilizadas como control), por electroforesis en gel de su DNA, mostrando que 15 colonias presentaron un DNA con un tamaño aproximado a 3549 pb, lo que era de esperarse ya que

poseían la inserción de un fragmento de 609 pb (DNAC hGH 20K). Las 3 colonias restantes presentaron el patrón de pBS (plásmido receptor). Se eligieron solamente 4 colonias para su caracterización con las endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Hind* III, *Sac* I, *Xho* I, *Pst* I, *Xho* I-*Hind* III, *Pvu* II, *Xba* I, *Xba* I-*Sma* I. La caracterización exhaustiva mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron a los tamaños esperados (Fig. 15), según el mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido pBS20K construido conteniendo la secuencia completa del DNAC de hGH 20K.

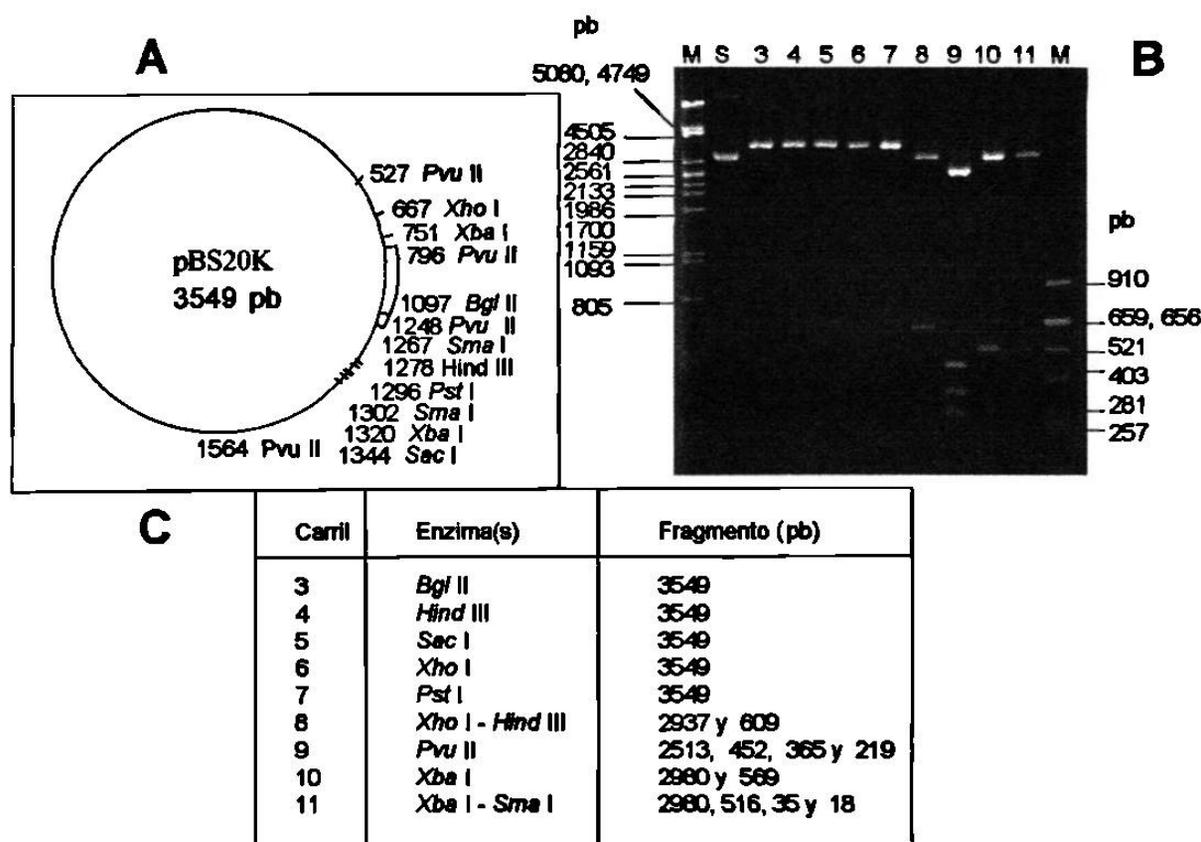


Figura 15. - Caracterización enzimática del plásmido pBS20K. El panel A muestra una representación gráfica del mapa de restricción de este plásmido. El panel B muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% de las digestiones de pBS20K con diferentes enzimas de restricción (carriles del 3 al 11). M, marcadores de peso molecular (λ -*Pst* I y pBR322-*Alu* I respectivamente); S, pBS20K circular. El panel C muestra los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos de las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. El patrón de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

4.3 Construcción del plásmido pBSPIC9

Las digestiones preparativas con *Sac* I y *Xba* I de pBS y pPIC9hGH22K se llevaron de manera eficiente a juzgar por su análisis en el gel de agarosa. Los fragmentos se recuperaron de forma adecuada mediante la técnica de fibra de vidrio siliconizada.

Los resultados de la transformación de *E. coli* XL1-Blue con el plásmido recombinante construido (pBSPIC9) se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI.- Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBSPIC9

| Tratamiento | Colonias blancas | Colonias azules | Número total de colonias |
|---------------------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| TE (Control negativo) | 0 | 0 | 0 |
| pUC18 (Control positivo) | 0 | Incontables | Incontables |
| pBS + Fragmento* - Ligasa | 0 | 0 | 0 |
| pBS + Fragmento*+ Ligasa | 6 | 60 | 66 |

*Fragmento de 1018 pb desde *Sac* I hasta *Xba* I del plásmido pPIC9hGH22K.

Se obtuvo un total de 66 colonias, de las cuales 60 colonias eran de color azul y solamente 6 resultaron blancas (transformadas con plásmido recombinante). El análisis inicial del DNA de 8 colonias (6 de ellas provenían de colonias blancas y 2 de colonias azules utilizadas como control), mostró que solo el DNA de 3 colonias poseían la inserción de un fragmento de 1018 pb, teniendo como resultado un plásmido recombinante de un tamaño aproximado de 3955 pb. Las 3 colonias restantes presentaron el patrón de pBS. Se eligieron 3 colonias para su caracterización con las endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Sac* I, *Sma* I, *Xba* I, *Sac* I-*Sma* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Xho* I, *Xba* I-*Sma* I. La caracterización exhaustiva mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron a los tamaños esperados (Fig. 16), según el

mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido construido pBSPIC9, el cual contiene 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9 desde la posición 209 hasta la posición 948; la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y por último posee 19 pb del extremo 5' del DNAC de hGH 22K, correspondientes a la proteína madura. Estas regiones fueron clonadas con el fin de facilitar la siguiente construcción.

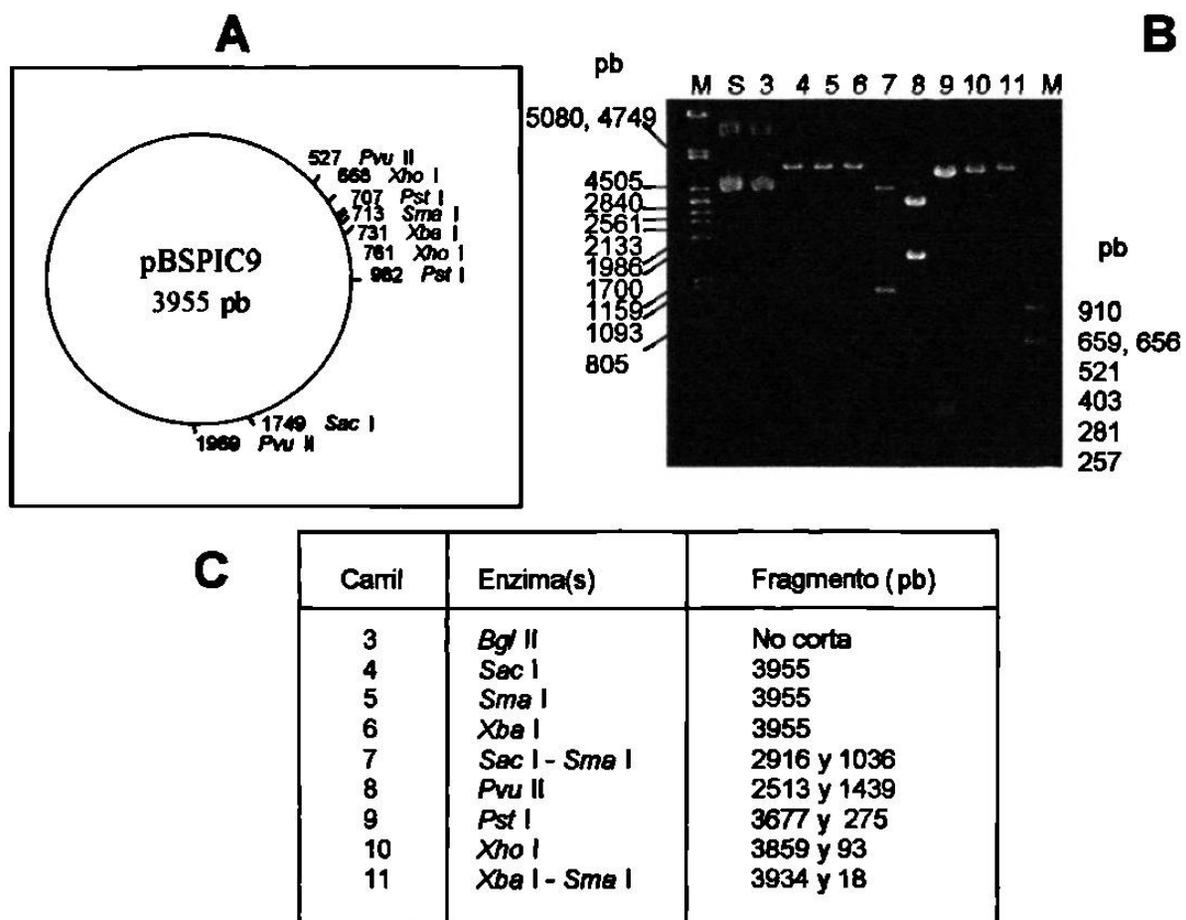


Figura 16.- Caracterización enzimática del plásmido pBSPIC9. El panel A muestra una representación gráfica del mapa de restricción de este plásmido. El panel B muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% de las digestiones de pBSPIC9 con diferentes enzimas de restricción (carriles del 3 al 11). M, marcadores de peso molecular (*lambda*-*Pst* I y pBR322-*Alu* I respectivamente); S, pBSPIC9 circular. El panel C muestra los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos de las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. El patrón de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

4.4 Construcción del plásmido pBSPIC20

Para la construcción de pBSPIC20 se llevó a cabo primero la digestión de pBS20K con la enzima *Xba* I liberándose los fragmentos de 569 pb 2980 pb. Posteriormente, al digerir este DNA con la enzima *Sma* I, el fragmento de 569 pb sufrió un doble corte, generándose los fragmentos de 516, 35 y 18 pb. La verificación de la liberación del fragmento de 516 pb (producto de la doble digestión de pBS20K con *Xba* I y *Sma* I) se llevó a cabo mediante su comparación con el fragmento de 569 pb (producto de la digestión de pBS20K solo con *Xba* I) ya que los fragmentos de 18 y 35 pb tienen poca resolución en este tipo de gel, tal como se muestra en la Figura 17.

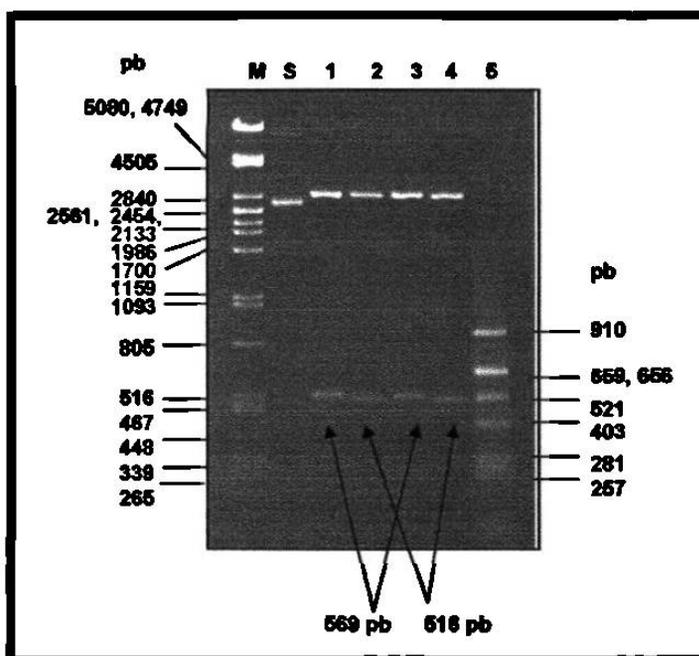


Figura 17.- Verificación de la liberación del fragmento de 516 pb producto de la doble digestión de pBS20K con *Xba* I y *Sma* I. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los fragmentos obtenidos de las digestiones de pBS20K con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sma* I. M marcadores de peso molecular (*Lambda-Pst* I y pBR322-*Alu* I, respectivamente). S Plásmido pBS20K superenrollado. Carriles 1 y 3, digestión de pBS20K con la enzima *Xba* I (liberando el fragmento de 569 pb); carriles 2 y 4, digestión de pBS20K con *Xba* I-*Sma* I (liberando el fragmento de 516 pb).

Las digestiones preparativas con *Xba* I y *Sma* I de pBSPIC9 y pBS20K se llevaron de manera eficiente a juzgar por su análisis en el gel de agarosa. La recuperación de los fragmentos de ligación se llevó de manera adecuada mediante la técnica de fibra de vidrio siliconizada.

Los resultados de la transformación de *E. coli* XL1-Blue con el plásmido recombinante construido (pBSPIC20) se muestran en la Tabla VII.

Tabla VII.- Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBSPIC20

| Tratamiento | Colonias Azules | Colonias Blancas |
|-------------------------------|-----------------|------------------|
| TE | 0 | 0 |
| pPUC18) | 0 | 600 |
| pBSPIC9 + *Fragmento + Ligasa | 29 | 5 |
| pBSPIC9 + *Fragmento - Ligasa | 0 | 0 |

*Fragmento de 516 pb de *Xba* I a *Sma* I de pBS20K.

Se levantaron 6 colonias (5 de ellas provenían de colonias blancas y 1 de colonias azules, utilizada como control), para un análisis inicial de su DNA. Se observó que solamente 1 colonia mostró un tamaño de DNA de aproximadamente 4453 pb. Las colonias restantes presentaron el patrón de pBSPIC9 (3955 pb). La caracterización exhaustiva con las endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Sac* I, *Sma* I, *Xba* I, *Sac* I-*Sma* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Xho* I, *Xba* I-*Sma* I mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron a los tamaños esperados (Figura 18), según el mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido pBSPIC20, el cual contiene el fragmento del DNAC de hGH 20K a partir de codón 7.

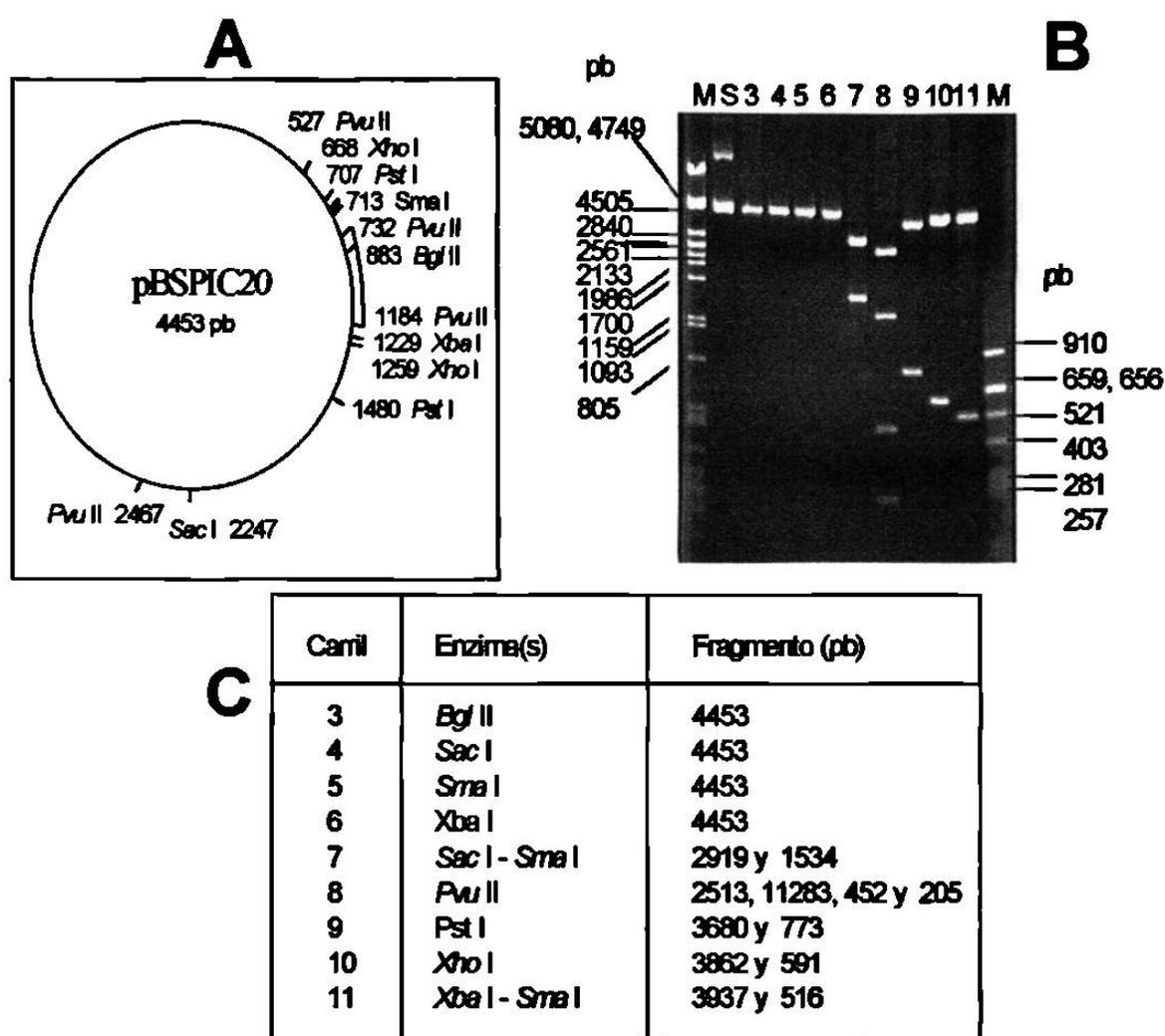


Figura 18 - Caracterización enzimática del plásmido pBSPIC20. El panel A muestra una representación gráfica del mapa de restricción de este plásmido. El panel B muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% de las digestiones de pBSPIC20 con diferentes enzimas de restricción (carriles del 3 al 11). M, marcadores de peso molecular (λ -*Pst* I y pBR322-*Alu* I respectivamente); S, pBSPIC20 superenrollado. El panel C muestra los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos de las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. El patrón de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

4.5 Construcción del vector pPIC9KhGH20K

Las digestiones preparativas con *Sac* I y *Eco* RI de pPIC9K y pBSPIC20, se llevaron de manera eficiente a juzgar por su análisis en el gel de agarosa.

El análisis electroforético de la reacción de ligación mostró que dicha reacción se llevó a cabo de forma aceptable y suficiente. La figura 19 muestra la presencia de las bandas correspondientes a los fragmentos de 1546 y 8258 pb en el caso del control negativo (sin ligasa) y la desaparición de dichas bandas cuando estos fragmentos fueron sometidos a la acción de la enzima ligasa. Las digestiones adicionales de *Apa* I y *Sna* B1 (para eliminar los plásmidos de partida pBSPIC20 y pPIC9K) antes y después de la ligación, no fueron verificadas electroforéticamente, debido a la cantidad tan pequeña de DNA a ligar. Sin embargo, se obtuvieron resultados satisfactorios al momento de transformar, lo que nos confirmó la eficiencia de corte de cada una de estas enzimas.

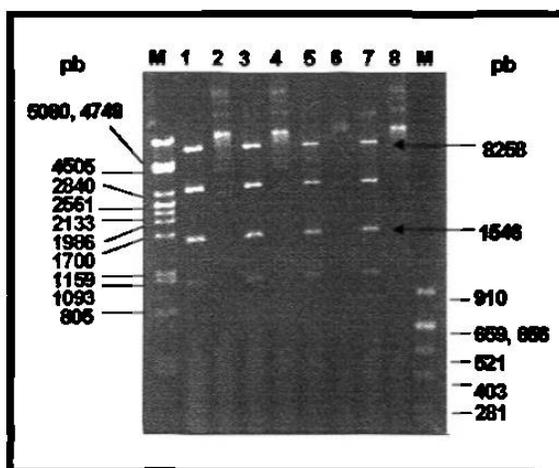


Figura 19.- Reacción de ligación para generar a pPIC9KhGH20K. Gel de agarosa al 0.8%. M marcador de peso molecular (λ + *Pst* I y pBR322 + *Alu* I respectivamente). Los carriles del 1 al 4 representan las ligaciones A, incubadas 16°C (carriles 1 y 2) y 37°C (carriles 3 y 4) , sin ligasa y con ligasa respectivamente. Los carriles del 5 al 8 representan los mismos tratamientos mencionados anteriormente pero con la ligación B.

De la transformación de *E. coli* XL1-Blue se obtuvieron un total de 544 colonias. En la Tabla VIII se muestran los resultados de la transformación, incluyendo los controles que se emplearon, así como el número de colonias analizadas y número de colonias que resultaron positivas.

Tabla VIII.- Resultados obtenidos con la transformación del plásmido pPIC9KhGH20K

| Tratamiento | Número de colonias obtenidas | Número de colonias analizadas | Número de colonias positivas |
|---|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| TE | 0 | | |
| pBR322 | 1283 | | |
| pPIC9K | 15 | | |
| pPIC)K + <i>Sac</i> I + <i>Eco</i> R I | 0 | | |
| *Ligación A, ***incubación a 16°C - Ligasa | 0 | | |
| *Ligación A, ***incubación a 16°C + Ligasa | 139 | 10 | 5 |
| *Ligación A, ***incubación a 37°C - Ligasa | 0 | | |
| *Ligación A, ***incubación a 37°C + Ligasa | 212 | 10 | 8 |
| **Ligación B, ***incubación a 16°C - Ligasa | 0 | | |
| **Ligación B, ***incubación a 16°C + Ligasa | 42 | 10 | 9 |
| **Ligación B, ***incubación a 37°C - Ligasa | 0 | | |
| **Ligación B, ***incubación a 37°C + Ligasa | 151 | 10 | 9 |

*Sin corte adicional *Apa* I, *Sna* B1 de los fragmentos de ligación.

**Con corte adicional *Apa* I, *Sna* B1 de los fragmentos de ligación.

***Temperatura de incubación de la ligación.

Se eligieron 40 colonias (10 de cada uno de los tratamientos: Ligación A y B, a 16° y 37° C, respectivamente) para un análisis inicial de su DNA en forma superenrollada (circular), tal como se muestra en la Figura 20. Se observó que todas las colonias mostraron un tamaño de DNA mas grande que pPIC9K (9276 pb), lo que era de esperarse, ya que la inserción del fragmento de 1546 pb generaría como resultado un plásmido de 9804 pb (pPIC9KhGH20K).

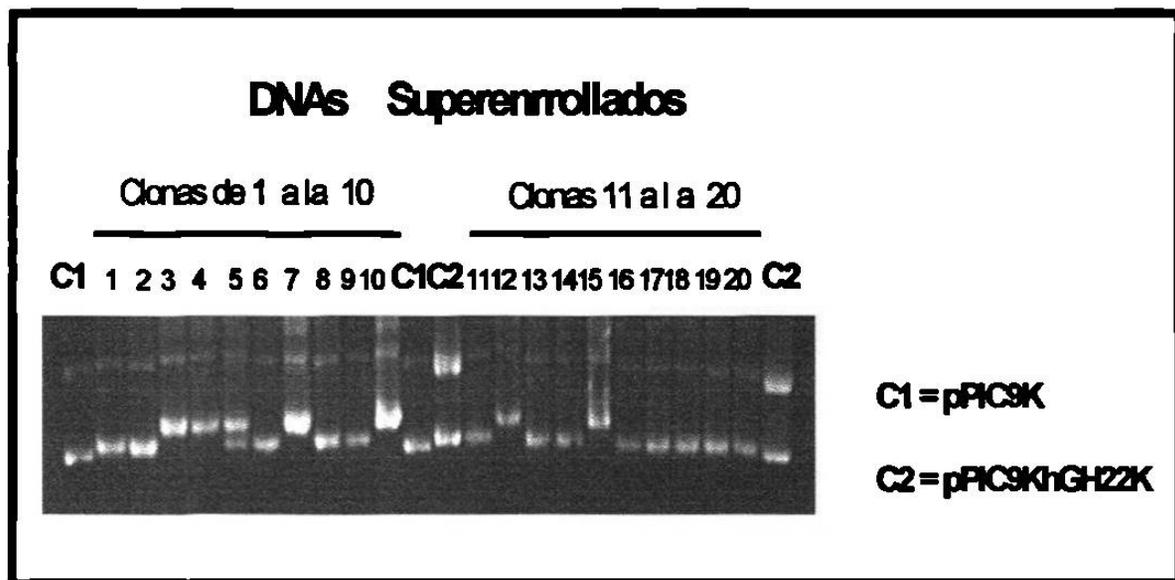


Figura 20.- DNAs Superenrollados de las clonas de pPIC9KhGH20K. Muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.6% del DNA superenrollado de 20 de las 40 clonas analizadas, utilizando como controles de corrimiento a pPIC9K y pPIC9khGH22K. Se observa que el tamaño obtenido de dichas clonas esta por arriba del tamaño de pPIC9K (9276 pb).

Posteriormente, las 40 clonas fueron sometidas a un análisis preliminar con la enzima *Pvu* II, donde se observó que solo 31 de ellas presentaban el patrón esperado, es decir la liberación de los fragmentos de: 6131, 2949, 452 y 267 pb. Las 9 clonas restantes presentaban un patrón de restricción entre pPIC9K y pBSPIC20, La Figura 21 muestra solo 20 de las 40 clonas analizadas con la enzima *Pvu* II.

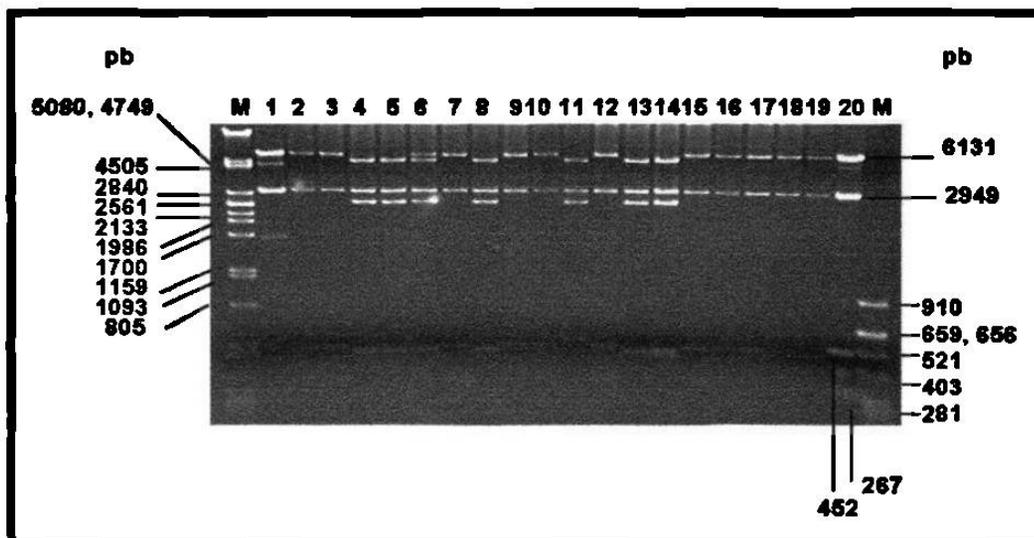


Figura 21.- Clonas de pPIC9KhGH20K caracterizadas con *Pvu* II. Gel de agarosa al 1.0%. M marcador de peso molecular (λ + *Pst* I y pBR 322 + *Alu* I respectivamente). Los carriles del 1 al 20 muestran 20 de las 40 clonas sometidas a un análisis con la enzima *Pvu* II. Los carriles del 15 al 20 muestran un ejemplo del patrón adecuado de corte (liberación de los fragmentos de 6131, 2949, 452 y 267 pb). Los carriles del 4 al 6 muestran el patrón diferente de corte que se encontró.

Finalmente, se eligieron 8 clonas diferentes para su análisis exhaustivo con las enzimas de restricción: *Sal* I, *Dra* I, *Sac* I-*Eco* RI, *Sac* I-*Avr* II, *Pst* I, *Xba* I, *Xho* I, *Bgl* II y *Pvu* II. La caracterización exhaustiva mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, corresponde a los tamaños esperados, según el mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido construido pPIC9KhGH20K. La Figura 22 muestra la caracterización exhaustiva de pPIC9KhGH20K.

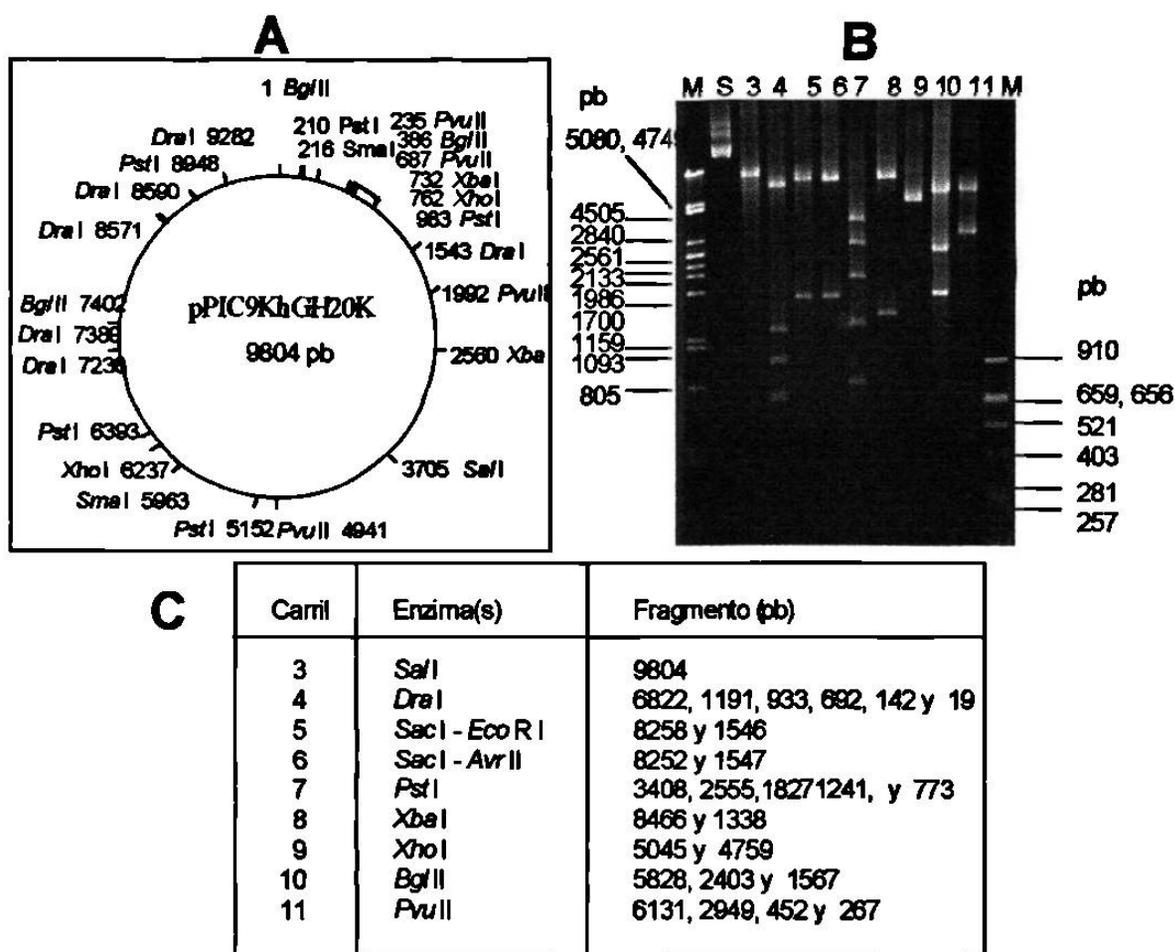


Figura 22.- Caracterización enzimática del plásmido pPIC9KhGH20K. El panel A muestra una representación gráfica del mapa de restricción de este plásmido. El panel B muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% de las digestiones de pPIC9KhGH20K con diferentes enzimas de restricción (carriles del 3 al 11). M, marcadores de peso molecular (λ -*Pst* I y pBR322-*Alu* I respectivamente); S, pPIC9KhGH20K superenrollado. El panel C muestra los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos de las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. El patrón de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

4.5.1. Secuenciación

Se logró realizar la secuenciación de un fragmento de 724 pb del plásmido pPIC9KhGH20K, tal como se muestra en la Figura 23. De este fragmento secuenciado, 171 pb corresponden a la secuencia señal de levadura: factor α de *Saccharomyces cerevisiae*. Además posee 19 pb del extremo 5' del DNAc de hGH 22K e incluye a partir del codón 7 hasta el codón de terminación del DNAc de hGH 20K de la proteína madura; 13 pb (desde *Sma* I a *Eco* RI) que corresponden a un fragmento de la región de policonación del vector pPIC9K. Una vez obtenida la secuencia se envió a comparar al *Blast*, indicando que ésta correspondía al tipo de GH (hormona del crecimiento). De esta manera se aseguró la integración del DNAc de hGH 20K al plásmido pPIC9K

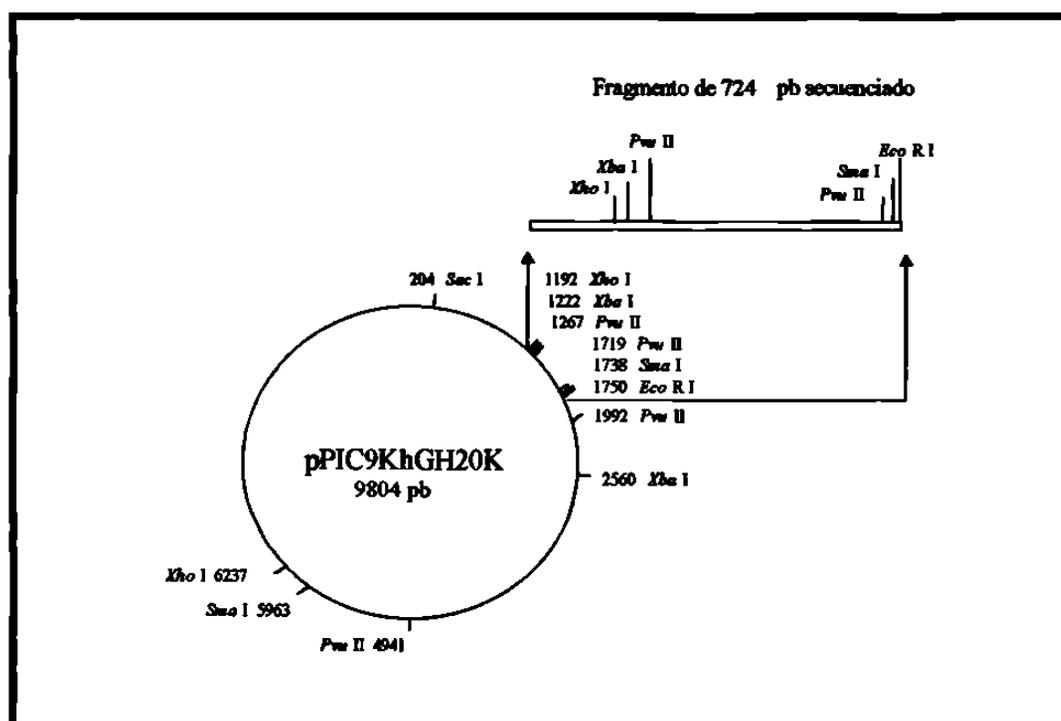


Figura 23. Secuencia de pPIC9KhGH20K de 724 pb. Se muestra la localización del fragmento secuenciado de 724 pb en el plásmido pPIC9KhGH20K, donde se resaltan los sitios mas importantes.

4.5.2 Aislamiento a mediana escala del DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K

Las clonas 39 y 40 fueron empleadas para preparar DNA plasmídico a mediana escala. En la Tabla IX se presentan los valores de rendimiento y calidad de las preparaciones de DNA. La cantidad obtenida también fue suficiente para realizar los ensayos posteriores.

Tabla IX.- Rendimiento y calidad de las preparaciones plasmídicas a mediana escala

| Plásmido (pPIC9KhGH20K) | A260/A280 | Rendimiento µg/mL |
|----------------------------|-----------|----------------------|
| Clona 39 | 1.88 | 430 |
| Clona 40 | 2.23 | 256 |

4.6 Transformación de *P. pastoris* GS115

Se obtuvieron colonias aisladas de *Pichia pastoris* cepa GS115 mediante su inoculación por estría en las placas que contenían YPD.

De las preparaciones plasmídicas de las clonas 39 y 40 obtenidas por mediana escala, se eligió solamente la clona 39 para su digestión preparativa con las enzimas *Sal* I y *Dra* I. Observamos en el caso de *Sal* I una digestión total mediante la linearización del plásmido. En cambio con *Dra* I fue evidenciada por la liberación de 6 fragmentos (6822, 1191, 933, 692, 142, y 19 pb). Ambos DNAs fueron utilizados para la transformación de *Pichia pastoris* GS115.

En la preparación de esferoplastos, los inóculos con 10 μ L fueron los que alcanzaron una D.O.₆₀₀ nm de 0.3 al día siguiente de su inoculación (18 h).

En ensayos independientes, se encontró un 70% de formación de esferoplastos de las células de *Pichia pastoris* GS115 tanto a 25 como a 40 min de incubación con la enzima zimolasa. Los resultados de la transformación obtenidos con ambos tratamientos fueron muy similares, ya que no existe diferencia en el número de colonias obtenidas, tal como se muestra en la Tabla X.

Tabla X.-Transformación por la técnica de formación de esferoplastos

| Tiempo de incubación | Tratamiento | No. de colonias |
|--------------------------|-------------------|-----------------|
| 25 min | TE | 0 |
| | GS115pPIC9K-Sal I | 0 |
| | GS115pPIC9K-Dra I | 1 |
| | GS115HGH20K-Sal I | 34 |
| | GS115HGH20K-Dra I | 113 |
| 40 min | TE | 0 |
| | GS115pPIC9K-Sal I | 1 |
| | GS115pPIC9K-Dra I | 0 |
| | GS115HGH20K-Sal I | 35 |
| | GS115HGH20K-Dra I | 116 |
| Número total de colonias | | 300 |

La aparición de colonias fue monitoreada durante 4 a 6 días. Este método proporcionó una selección inicial de transformantes HIS4⁺, ya que solamente las células que integraron en su genoma el vector pPIC9KhGH20K (conteniendo el cassette de expresión), pudieron crecer en medio carente de histidina. Se obtuvo un total de 300 colonias por la técnica de transformación por formación de esferoplastos. En la prueba de viabilidad no fue posible determinar el número exacto de células debido a la gran cantidad de estas.

4.7 Selección de clonas multicopias del cassette de expresión, mediante su crecimiento a dosis crecientes del antibiótico G418 (geneticina)

De un total de 300 colonias obtenidas mediante la técnica de formación de esferoplastos, se escogieron 103 colonias para realizar el tamizaje de clonas multicopias mediante su crecimiento a dosis crecientes del antibiótico G418. De éstas, 78 correspondían a las cepas de *P. pastoris* transformadas con el vector pPIC9khGH20K digerido con *Sal* I y las 25 restantes a las cepas de *P. pastoris* transformadas con el vector pPIC9khGH20K digerido con *Dra* I (ver Anexo 2, a partir de C3-2.1 hasta C3-6.1). Además se utilizaron 5 controles, los cuales incluían a: GS115 (cepa de *P. pastoris* sin transformar), GS115pPIC9K-*Sal* I (cepa transformada sólo con el vector: pPIC9K) I, GS115pPIC9K-*Dra* I (cepa transformada sólo con el vector: pPIC9K), GS115pPIC9hGH22K (cepa unicopia: portadora de una copia del DNAC de HGH 22K), GS115pPIC9KhGH22K (cepa multicopia: portadora de múltiples copias del DNAC de HGH 22K). Las 108 clonas fueron crecidas en placas con RDB sin histidina para corroborar la selección de transformantes HIS4⁺. Dichas clonas se distribuyeron en 3 placas (ver Anexo 2), cada una con 36 divisiones, lo que permitió separar cada una de las clonas analizadas, tal como se muestra en la Figura 24.

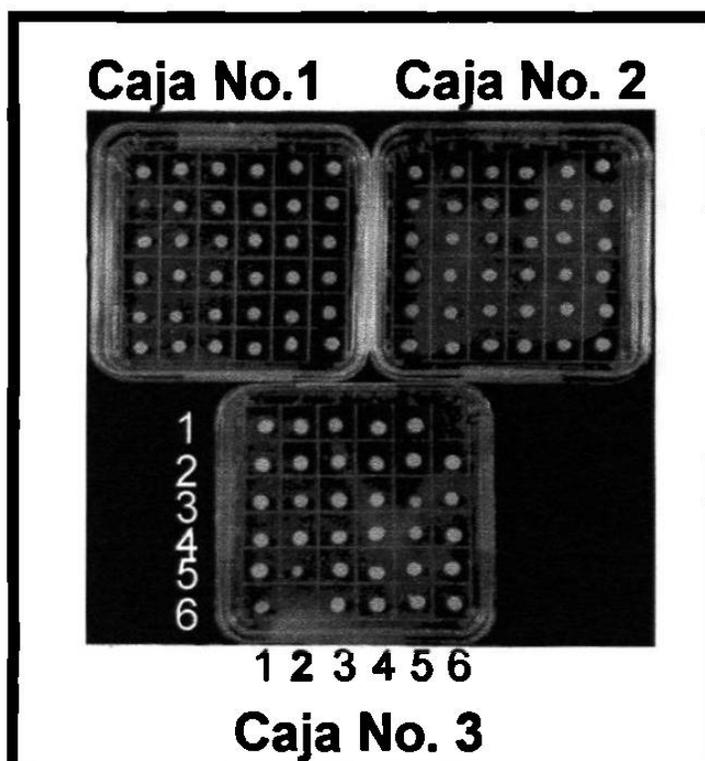


Figura 24.- Crecimiento en RDB agar sin histidina para corroborar la selección de transformantes $HIS4^+$. Muestra el total de las clonas analizadas crecidas en cajas con RDB agar sin histidina (primera selección), así también como los controles utilizados. En la caja No. 3 posición 6.2 (C3-6.2) muestra la ausencia de crecimiento, en este caso se refiere a la cepa de GS115 utilizada como control (esta cepa no puede crecer sin histidina).

Una vez corroborada la selección de transformantes $HIS4^+$, las clonas fueron pasadas a placas de YPD agar con G418 a diferentes dosis, generando así un nuevo juego de placas. Cada juego de placas incluyó placas con YPD que contenían G418 a concentraciones finales de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0, y 4.0 mg/mL. El crecimiento de las colonias se observó a partir del tercer día de incubación. Finalmente al sexto día se determinó la concentración máxima de crecimiento alcanzada en cada una de las clonas, en las diferentes concentraciones del antibiótico G418. La Figura 25 muestra solo un ejemplo de los resultados obtenidos en el tamizaje de la selección a G418, de forma particular los obtenidos para la caja No. 1, donde se observa tanto el crecimiento total de las clonas analizadas (caja sólo con YPD sin antibiótico), como la restricción del crecimiento de algunas de estas clonas (caja con G418

a una concentración de 0.25 hasta 1.5 mg/mL). En el Anexo 3 se muestra la concentración máxima de antibiótico alcanzada por cada una de las clonas.

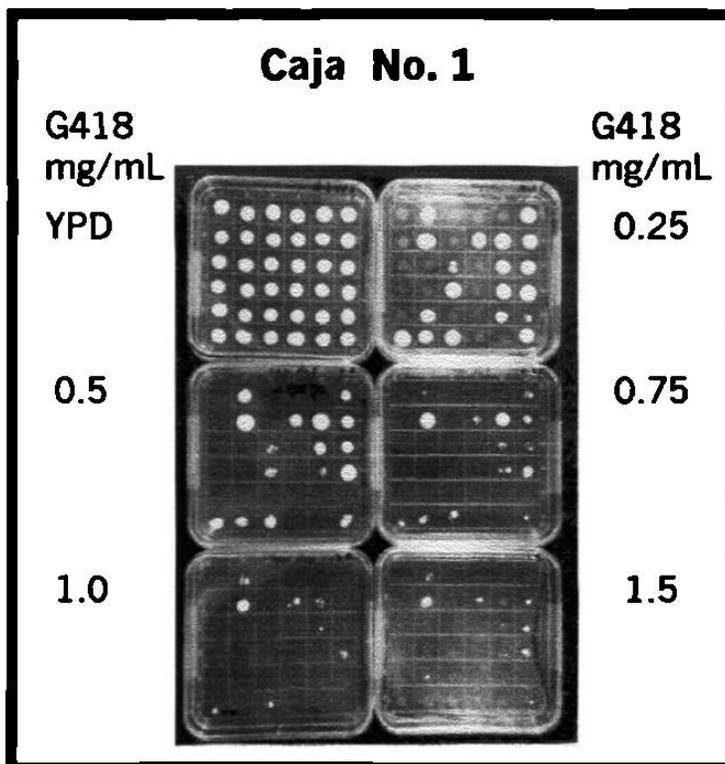


Figura No. 25.- Selección por G418 de las clonas obtenidas. Muestra un ejemplo de selección, en este caso se refiere a cada una de las clonas utilizadas en la Caja No. 1 crecidas a diferentes dosis del antibiótico. Nótese la ausencia de crecimiento de algunas clonas al aumentar la dosis del antibiótico, así como la permanencia del crecimiento.

Se obtuvieron un total de 51 clonas que crecieron en las diferentes concentraciones de G418, lo cual corresponde a un 49.51% del total de clonas analizadas (103 clonas), tal como se muestra en la Tabla XI.

Tabla XI.- Porcentaje de clonas que crecieron a concentraciones crecientes de G418

| Concentración de G418 (mg/mL.) | Caja No. 1 (Número de clonas) | Caja No. 2 (Número de clonas) | Caja No. 3 (Número de clonas) | Porcentaje obtenido |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| 0.0 (Solo YPD) | todas | todas | todas | 100.0% |
| 0.25 | 5 | 4 | 7 | 15.5% |
| 0.5 | 2 | 2 | 2 | 5.8% |
| 0.75 | 5 | 3 | | 7.8% |
| 1.0 | 2 | 2 | 1 | 4.9% |
| 1.5 | 1 | 2 | 2 | 4.9% |
| 1.75 | | 2 | | 1.9% |
| 2.0 | 2 | | | 1.9% |
| 3.0 | 2 | | | 1.9% |
| 4.0 | 2 | 2 | | 3.9% |
| Porcentaje total de clonas que crecieron a concentraciones crecientes de G418 | | | | 49.51% |

4.8 Caracterización genotípica y fenotípica de las cepas obtenidas

4.8.1 Extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De las 51 clonas que crecieron en las diferentes concentraciones de G418 se eligieron al azar 8, a las que se les realizó extracción de DNA genómico y se les comprobó mediante PCR la integración del gen heterólogo al genoma de *P. pastoris*. De las 8 clonas elegidas al azar, 4 de ellas provenían de la transformación de *P. pastoris* GS115 con el plásmido pPIC9KhGH20K digerido con *Sal* I (clonas denominadas como: GS115HGH20K-*Sal* I-1 a la 4). Las 4 clonas restantes provenían de la transformación con el mismo plásmido pero digerido con *Dra* I (clonas denominadas como: GS115HGH20K-*Dra* I -1 a la 4). Como controles para la amplificación se realizó tanto la extracción de DNA genómico de las cepa GS115 (cepa nativa de *P. pastoris*), GS115pPIC9K (cepa transformada con el

vector pPIC9K y digerido con *Sal* I), y GS115HGH22K (cepa transformada con el vector pPIC9hGH22K); como la extracción de DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K y pPIC9hGH22K. Los resultados obtenidos en la extracción del DNA se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII.- Rendimiento y calidad de las preparaciones de DNA genómico y plasmídico

| DNA genómico | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | Rendimiento µg/mL |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------|
| GS115pPIC9K- <i>Sal</i> I | 2.0 | 377 |
| GS115HGH20K- <i>Sal</i> I-1 | 1.7 | 621 |
| GS115HGH20K- <i>Sal</i> I-2 | 1.8 | 889 |
| GS115HGH20K- <i>Sal</i> I-3 | 1.9 | 647 |
| GS115HGH20K- <i>Sal</i> I-4 | 1.8 | 512 |
| GS115HGH20K- <i>Dra</i> I-1 | 1.7 | 290 |
| GS115HGH20K- <i>Dra</i> I-2 | 1.6 | 389 |
| GS115HGH20K- <i>Dra</i> I-3 | 1.9 | 640 |
| GS115HGH20K- <i>Dra</i> I-4 | 1.6 | 209 |
| GS115HGH22K | 1.9 | 977 |
| GS115 | 1.7 | 952 |
| DNA plasmídico | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | Rendimiento µg/mL |
| pPIC9K | 2.07 | 4150 |
| pPIC9K hGH20K | 1.88 | 430 |

La Figura 26 muestra los resultados obtenidos tanto en la extracción de DNA genómico como el análisis por PCR. Las muestras fueron separadas en geles de agarosa al 0.6%. Los DNAs genómicos y plasmídicos obtenidos en su mayoría fueron de buena calidad, a juzgar por su corrimiento en el gel y los resultados obtenidos en la relación de A_{260}/A_{280} . Los resultados encontrados en el análisis de PCR demuestran la integración del gen heterólogo (cassette de expresión para HGH 20K) al genoma de *P. pastoris* en las 8 clonas analizadas; mediante la amplificación de una banda de 1016 pb. Además indican que la integración se llevó a cabo en HIS4, dando como resultado transformantes Mut⁺, las cuales poseen el gen *AOX1* intacto; esto, evidenciado por la amplificación de una banda de 2200 pb (carriles del 2 al 9). Se puede observar además que existe variación en la dosis génica a juzgar por las diferencias en intensidades en la banda de 1016 pb amplificada (carril

3), lo cual indica una probable integración de múltiples copias del gen heterólogo (HGH 20K). Se encontró en la clona GS115HGH20K-*Dra* I-4 (carril 9) el reemplazamiento del gen *AOX1*, evidenciado por la ausencia de la banda de 2200 pb. En el caso del control GS115 (carril 11) se obtuvo la amplificación de la banda de 2200 pb, ya que posee solo el gen de *AOX1* y no el gen heterólogo. También se pudo observar en el carril 10, que la banda inferior de amplificación es ligeramente mayor (1060 pb) al resto de las bandas amplificadas. Esto debido a que el gen heterólogo proviene de hGH 22K. La amplificación de los plásmidos pPIC9KhGH20K y pPIC9K (utilizados como controles) se muestran en los carriles A y B respectivamente, mediante la aparición de las bandas de 1016 pb y 449 pb.

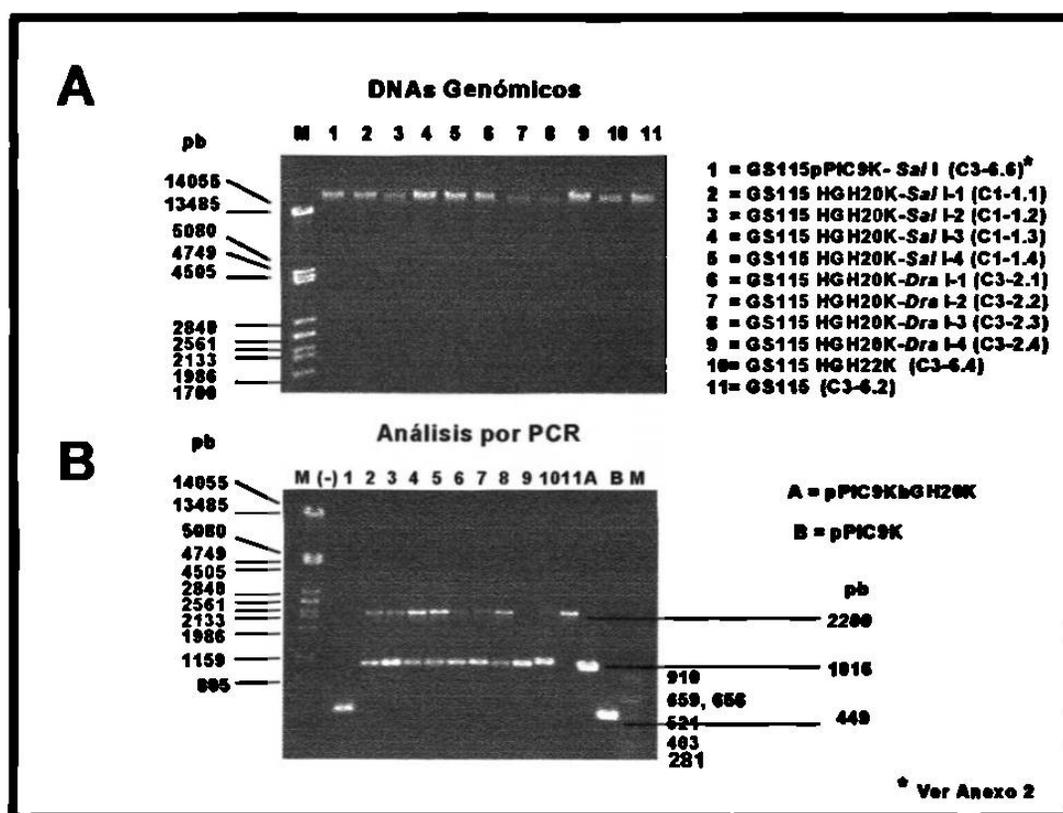


Figura 26.- Extracción de DNA genómico y PCR de ocho clonas elegidas al azar. Geles de agarosa al 0.6%. M marcador de peso molecular (λ +*Pst* I y pBR322 + *Afu* I respectivamente). El panel A muestra los DNAs genómicos extraídos por la técnica de TSNT. El panel B muestra un análisis de PCR realizado a los DNAs genómicos y plasmídicos extraídos. Se puede observar en este caso en el carril 3 la intensidad mayor de la banda de 1016 pb, lo que indica que probablemente el cassette de expresión se integró en más de una copia.