

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



PURIFICACION DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO HUMANO RECOMBINANTE
PRODUCIDA EN *Pichia pastoris*

POR:

Q.F.B. MARCOS JAIR GUERRERO MUÑOZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Diciembre del 2002, Monterrey, N. L.

c.1

2002

G8

'S6

QP

TM

572

Q.F.B.

MARCO

S

JAIR

CUE

RR

RO

MU

ÑO

Z



1080116949

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PURIFICACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO
RECOMBINANTE PRODUCIDA EN *Pichia pastoris***

Por:

Q.F.B. MARCOS JAIR GUERRERO MUÑOZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Diciembre del 2002, Monterrey, N.L.



TM

QP572

.56

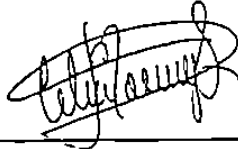
G8

2002

PURIFICACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

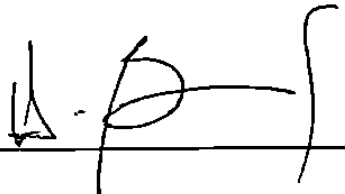
RECOMBINANTE PRODUCIDA EN *Pichia pastoris*

Aprobación de Tesis:



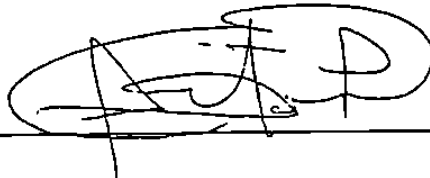
M.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Asesor



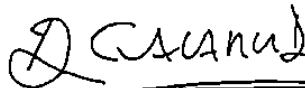
Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña

Co-asesor



Dr. Marco Antonio Rito Palomares

Co-asesor externo



Dr. Dionicio Angel Galarza Delgado

Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña por darme la oportunidad de ser parte de la ULIEG.

A la M.C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez por sus consejos.

Al Dr. Marco Antonio Rito Palomares por brindarme su apoyo.

A todo el personal docente de la ULIEG que contribuyeron en mi formación y realización del presente trabajo.

Al personal de laboratorio de Biología celular por su valiosa ayuda en la realización de los ensayos de actividad biológica.

Al personal del Centro de Neurobiología de la UNAM en Querétaro y en especial a la Dra. Carmen Clapp por habernos proporcionado la línea celular Nb2 y el protocolo para hacer los ensayos de actividad lactogénica de la HGHR.

A mis compañeros de generación: Carmen, Rafa, Enrique y Gloria, por haber hecho más placentera la hora de comida.

Al equipo Bofos por haberme permitido ingresar al selecto grupo de futbolistas.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

DEDICATORIA.

A Dios por permitirme llegar al final de una etapa más en mi vida profesional.

A mis padres *Juan Antonio Guerrero Moreno* y *Rosa Elia Muñoz de Guerrero* por brindarme siempre su consejo y apoyo incondicional.

A mis hermanos *Tony* por ser mi amigo, compañero de sueños y echarme porras en el fútbol rápido.

A mis hermanas *Erika* y *Karla* por ser mis hermanitas.

A *Diana* por brindarme su apoyo y acompañarme durante este tiempo.

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucléico
ADNc	ADN complementario
AOX 1	Alcohol Oxidasa 1
BMG	Medio mínimo amortiguado con glicerol
BMM	Medio mínimo amortiguado con metanol
°C	Grados centígrados
C.I.A.	Cromatografía de Intercambio Aniónico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
hrs	horas
HGHr	Hormona del crecimiento humano recombinante
HGHrc	Hormona del crecimiento humano recombinante comercial
HGHrp	Hormona del crecimiento humano recombinante purificada
hGH	Gen de la Hormona del crecimiento humano recombinante
kDa	Kilodaltones
M	Mclar
µl	Microlitros
min	min
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
EGPA-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
EGPA-Nativo	Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo
UV	Ultravioleta
X g	No. de veces la fuerza gravitacional
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de extracto de levadura y peptona

RESUMEN

Marcos Jair Guerrero Muñoz
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Diciembre del 2002

Título de estudio: Purificación de la hormona del crecimiento humano recombinante producida en *Pichia pastoris*.

Número de páginas: 48

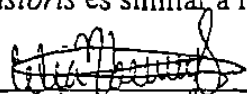
Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Area de estudio: Biotecnología

Propósito y método de estudio: La hormona del crecimiento humano (HGH) es un polipéptido globular de 191 aminoácidos con dos puentes disulfuro y peso molecular de 22 kDa. La HGH es necesaria para el crecimiento postnatal y para el metabolismo normal de carbohidratos, lípidos, nitrógeno y minerales. Se dice que sus efectos son anabólicos, diabotogénicos y lipolíticos, actuando a través de mecanismos directos e indirectos. Escamilla Treviño en 1996 construyó un cassette expresor del ADNc de HGH con el que obtuvo cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de HGHr, alcanzando una producción de 12 mg/L en el medio de cultivo a nivel matraz. Posteriormente, Sánchez Domínguez en 1998 obtuvo una cepa multicopia de dicho cassette que produjo un 44 % más de HGHr. Una vez que se tenía la clona productora de HGHr se inició con ensayos preliminares de purificación por cromatografía de intercambio aniónico pero no se obtuvo una buena separación, ya que la proteína se eluyó a diferentes concentraciones de NaCl en conjunto con otras proteínas, logrando obtener una pureza máxima del 50 % al eluir con 0.9 M de NaCl.

El objetivo del presente estudio fue purificar la HGH producida en *Pichia pastoris*. Se fermentó la cepa productora de HGHr de *Pichia pastoris*, se eliminaron las células por centrifugación y el medio de cultivo se pasó por una columna de intercambio aniónico donde se aumentó la pureza de un 11 % al 15 %, con un 70 % de recuperación. Posteriormente, se precipitó con sulfato de amonio y se mantuvo la pureza del 15 % y con un 98 % de recuperación. Finalmente, se pasó por una columna de cromatografía de exclusión molecular recuperándose un 70% con una pureza final del 99 %. Se evaluó la actividad lactogénica de la HGHr purificada y HGHr comercial, resultando una DE 50 de $6.53 \text{ ng/ml} \pm 0.26$ y $5.25 \text{ ng/ml} \pm 0.58$ respectivamente.

Contribuciones y Conclusiones: Se logró establecer un esquema de purificación de 3 pasos, en el que se determinaron las condiciones óptimas para la cromatografía de intercambio aniónico y exclusión molecular, con una recuperación total del 48 % y una pureza del 99 % estimada por densitometría de EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie. Además, el ensayo de actividad lactogénica con células Nb2 mostró que la HGHr producida en *P. pastoris* es similar a la de la HGH comercial.



M.C. Celia Nohe mí Sánchez Domínguez
Asesor



Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Co-asesor

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Hormona del crecimiento humano	1
1.2	Uso terapéutico de HGH	3
2	ANTECEDENTES	4
2.1	Obtención de hormona de crecimiento humano	4
2.2	Estrategias para la producción de HGHr en <i>Escherichia coli</i>	6
2.3	Purificación de HGHr producida en <i>E. coli</i>	8
2.4	Producción de HGHr en <i>Pichia pastoris</i>	9
2.5	Purificación de HGHr producida en <i>P. pastoris</i>	11
3	OBJETIVO GENERAL	13
4	OBJETIVOS PARTICULARES	13
5	MATERIALES	14
5.1	Químicos	14
5.2	Biológicos	14
5.3	Equipo	14
6	METODOLOGÍA	16
6.1	Estrategia general	16
6.2	Fermentación	17
6.3	Cuantificación de proteínas totales del medio de cultivo	17
6.4	Purificación de HGHr	18
6.5	Espectroscopía de ultravioleta	19
6.6	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, desnaturalizantes reductoras y no reductoras	19
6.7	Inmunodetección por “Western blot” de la HGH	20
6.8	Evaluación de la actividad lactogénica	21
7	RESULTADOS	24
7.1	Fermentación	24

7.2	Purificación de HGHr.....	25
7.3	Caracterización de la HGHr purificada.....	29
7.3.1	Espectroscopía de UV.....	29
7.3.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	30
7.3.3	Inmunodetección por “Western blot” de la HGH.....	30
7.3.4	Evaluación de la actividad lactogénica.....	31
8	DISCUSIÓN	33
9	CONCLUSIONES	37
10	BIBLIOGRAFÍA	38
11	APENDICE	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo tridimensional de la hormona de crecimiento humano.....	1
Figura 2.	El complejo multigénico hGH-hPL.....	2
Figura 3.	Fuentes de hormona de crecimiento humano, así como sus características.....	5
Figura 4.	Estrategias de producción de HGHR en <i>E. coli</i>	6
Figura 5.	Producción de HGHR en <i>E. coli</i>	7
Figura 6.	Esquema general de purificación de HGHR producida en <i>E. coli</i>	8
Figura 7.	Crecimiento de <i>P. pastoris</i>	9
Figura 8.	Proteínas contenidas en el medio de cultivo fermentado con cepa unicopia y multicopia de <i>P. pastoris</i> productora de HGHR.....	11
Figura 9.	Cromatografía de intercambio aniónico.....	12
Figura 10.	Estrategia general utilizada para el proceso de purificación.....	16
Figura 11.	Variación de pH durante la fermentaciones iniciadas a pH=6 y 8.....	24
Figura 12.	Variación de turbidez y concentración de HGHR durante la fermentación.....	25
Figura 13.	EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie de las fracciones colectadas en la cromatografía de intercambio aniónico eluída con amortiguador a pH=8.....	26
Figura 14.	EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie de las fracciones colectadas en la cromatografía de intercambio aniónico eluída con amortiguador a pH=9.....	27
Figura 15.	EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie de las fracciones colectadas en la cromatografía de exclusión molecular.....	28
Figura 16.	EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie con 15 µg de HGHR purificada a partir del medio de cultivo fermentado por <i>P. pastoris</i>	28
Figura 17.	Espectro de UV de HGHR y HGHC.....	29
Figura 18.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	30

Figura 19.	Western blot de HGHr durante el proceso de purificación	31
Figura 20.	Evaluación de actividad lactogénica de HGHr	32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Funciones atribuidas a la HGH.....	3
Tabla 2.	Porcentaje de recuperación de HGHr durante las etapas de purificación.....	29
Tabla 3.	Comparación del porcentaje de recuperación de las etapas de purificación.....	35

1 INTRODUCCIÓN.

1.1 Hormona del crecimiento humano.

La HGH es un polipéptido globular de 191 aminoácidos sin residuos de azúcares, con dos puentes disulfuro y un peso molecular de 22 kDa (*Devos y cols.*, 1992) (figura 1).

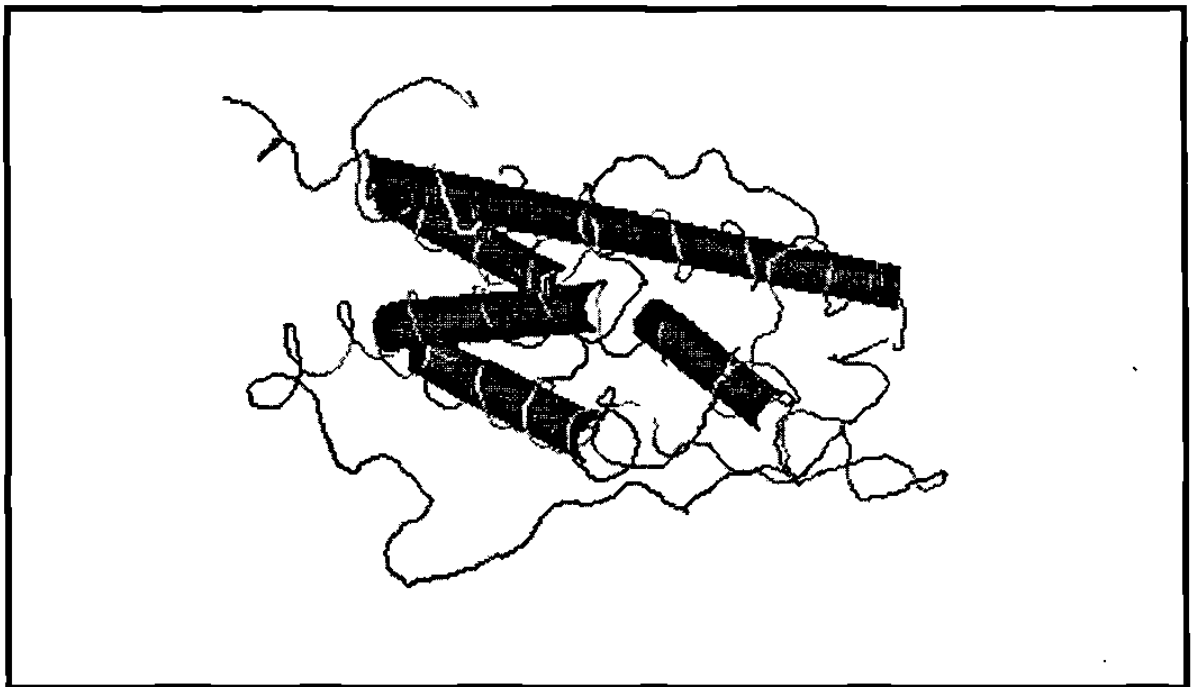


Figura 1. Modelo tridimensional de la hormona de crecimiento humano. Se muestran las hélices alfa que constituyen la proteína (barras).

La síntesis de HGH se lleva a cabo en los somatotrofos de la hipófisis anterior como resultado de la expresión del gen hGH-N. Este se ubica en el brazo largo del cromosoma 17, entre las bandas q22-q24, junto con los genes de la familia hGH-hPL (hGH-V, hPL-1, hPL2 y hPL3), con los que guarda una alta similitud (*Chen y cols.*, 1989) (figura 2).

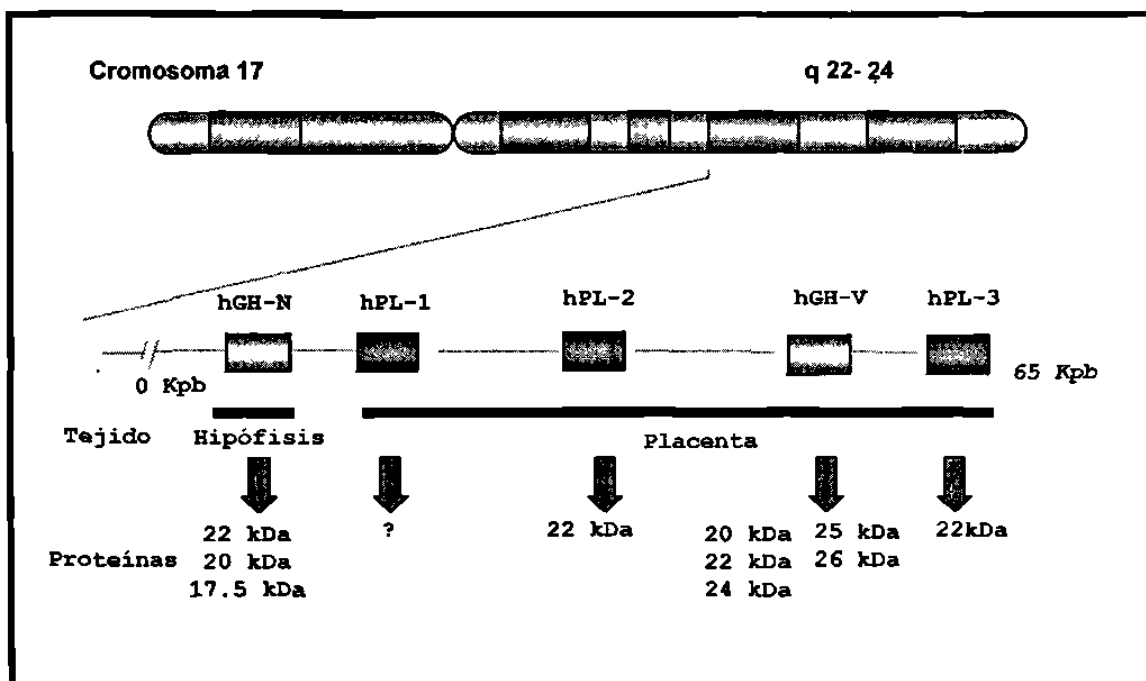


Figura 2. El complejo multigénico hGH-hPL. Se indica su localización en el cromosoma 17, la organización de los genes que lo constituyen, el tejido en que se expresan y las isoformas proteicas para las que codifica cada gen.

La HGH es responsable del crecimiento postnatal. Además, disminuye la utilización de glucosa, aumenta la disponibilidad de ácidos grasos, promueve la utilización de aminoácidos y la síntesis proteica. Generalmente disminuye el tejido adiposo y aumenta la masa muscular (tabla 1). Otros efectos incluyen el aumento de la absorción de calcio por el intestino, excreción de calcio e hidroxiprolina vía urinaria y retención de sales (fosfato, potasio, sodio) (<http://web.indstate.edu/theme/mwking/peptide-hormones.html>).

La mayoría de los niños con hiposecreción de HGH presentan velocidades de crecimiento inferiores al tercer percentil y casi siempre retraso en la maduración esquelética (Henry, 1993).

Tabla 1. Funciones atribuidas a la HGH.

INMUNIDAD Y CICATRIZACION

- Resistencia a enfermedades comunes.
- Capacidad de cicatrización.
- Cicatrización de lesiones antiguas.
- Cicatrización de otras lesiones.
- Tratamiento de úlceras.

FACTORES SEXUALES

- Duración de la erección.
- Aumento de la libido.
- Potencia/frecuencia de la actividad sexual.
- Frecuencia de la micción nocturna.
- Regulación y control del ciclo menstrual.
- Bochornos y síntomas asociados.
- Efectos positivos en el sistema reproductivo.
- Incrementa el volumen de la leche materna.

FUERZA Y TONO MUSCULAR

- Aumenta la fuerza muscular.
- Promueve la ganancia de masa muscular.
- Proporciona energía en general.

GRASAS

- Remoción de ácidos grasos.
- Eleva los niveles de colesterol "bueno"(HDL).
- Reducción de grasa.

PIEL Y PELO

- Elasticidad de la piel.
- Engrosamiento de la piel.
- Textura de la piel.
- Crecimiento de pelo nuevo.
- Desaparición de arrugas.
- Hidratación de la piel.

FUNCION MENTAL

- Estabilidad emocional.
- Memoria.
- Aspecto general y actitud.
- Energía mental y claridad de pensamiento.

SISTEMA CIRCULATORIO

- Mejora la circulación.
- Estabiliza la presión sanguínea.
- Mejora el funcionamiento del corazón.

HUESO

- Aumenta la flexibilidad en la espalda y articulaciones.
- Tratamiento de fracturas óseas.
- Tratamiento de osteoporosis.

Fuente: Time, 1998

1.2 Uso terapéutico de HGH.

Inicialmente, la hormona era utilizada para curar el enanismo hipofisiario, sin embargo en 1996, Seroño obtuvo la aprobación de la FDA para el tratamiento de pérdida de peso en pacientes con SIDA debido a un descontrol metabólico caracterizado por una pérdida de tejido adiposo y masa muscular. Esta es la mayor causa de muerte en pacientes con SIDA. En dicho estudio, la HGH se administró en conjunto con terapia antiviral. Después de 20 semanas de terapia con HGH, los pacientes aumentaron en promedio 1.6 Kg de masa corporal y disminuyó la cantidad de tejido adiposo comparado con el placebo. Sin embargo no hubo ningún efecto en la supervivencia del paciente (<http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/GH.htm>). En el mismo año, se

aprobó para utilizarla en el tratamiento de insuficiencia cardiaca ya que la interacción de HGH con IGF-1 ayuda a controlar la morfología y funcionamiento del corazón (*Sacca y cols*, 1996). Desde 1997 se utiliza HGH, andrógenos y algunos estrógenos para minimizar discapacidades asociadas con el síndrome de Turner. La incidencia de esta enfermedad es de 1 en 2500 a 7000 nacimientos, donde arriba del 95 % de los fetos afectados son abortados. También se utiliza en personas con baja estatura causada por insuficiencia renal o después de un trasplante de riñón (<http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/GH.htm>).

En 1998, la revista Time trató en su portada el tema de los usos de la HGH. Son tantos y tan diversos los efectos que se le están descubriendo a esta hormona para contrarrestar algunos problemas de la vejez, que se ha llegado a proponer como fuente de “eterna juventud”. Además de ser la cura para el enanismo hipofisiario, se emplea como anabólico en el atletismo, en la prevención de síntomas de la vejez, y en el tratamiento de traumatismos por sus propiedades regenerativas (tabla 1) (*Elían y cols.*, 1999).

2 ANTECEDENTES.

2.1 Obtención de hormona de crecimiento humano.

La HGH se obtenía a partir de hipófisis humanas, sin embargo era muy costosa y podía contener patógenos humanos tales como el prion causante de la enfermedad Creutzfeld-Jacob. Sin embargo, en la década de los 70's, con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, se logró producir HGH recombinante en la bacteria *Escherichia coli* (*Goeddel y cols.*, 1979), con esto se abarataron los costos y aumentó la producción. Este sistema de expresión se ha utilizado desde 1985 para la producción de HGH recombinante por la compañía Genentech (protropina), a la que luego le siguieron:

Lilly (humatrope), Biotech (bio-tropin), Novo Nordisk (norditropin), Serono (serostim) y otras más. Sin embargo, debido a que durante la producción de HGHR en *E. coli* la proteína recombinante se encuentra frecuentemente con modificaciones indeseables (metionina extra, plegamiento incorrecto, formas agregadas, oxidadas y desamidadas, etc.) y contaminada con sustancias de alta pirogenicidad, se requiere de esquemas de purificación laboriosos para obtenerla con la pureza, estructura y actividad biológica deseadas. Por ello, los esfuerzos subsecuentes se enfocaron a la búsqueda de mejores sistemas de expresión, habiéndose intentado la producción en *Saccharomyces cerevisiae* (Tokunaga y cols., 1985), *Bacillus subtilis* (Franchi y cols., 1991), cultivos de células de mamíferos (Pavlakis y cols., 1981; Ortiz-López, 1993), lo mismo que en animales transgénicos (Kerr y cols., 1997). Desafortunadamente, estos sistemas de expresión no ofrecen un nivel de producción superior aún al de *E. coli* y por lo tanto no son rentables.

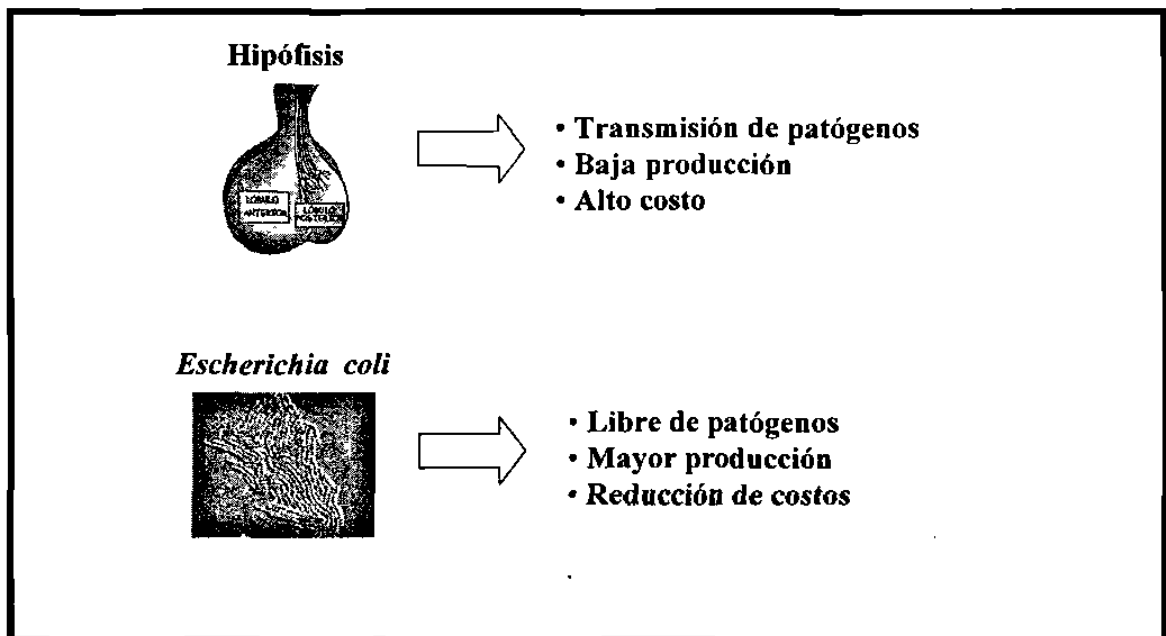


Figura 3. Fuentes para la obtención de hormona de crecimiento humano. La HGH se obtenía a partir de hipófisis de cadáveres. Sin embargo, con el surgimiento de la tecnología del ADN recombinante se logró producir en mayor cantidad y libre de patógenos en *E. coli*.

2.2 Estrategias para la producción de HGhr en *Escherichia coli*.

E. coli produce HGhr en forma de agregados insolubles en el citoplasma llamados cuerpos de inclusión, cuando se le introduce un vector de expresión que contenga un promotor fuerte y la secuencia codificante (ADNc) de la HGh (Goeddel y cols., 1979). También puede ser secretada al espacio periplásmico si al vector mencionado con anterioridad, se le inserta una secuencia señal (Becker y cols., 1986); o bien, puede ser secretada al medio de cultivo utilizando un vector con las características mencionadas para poder secretar la proteína al espacio periplásmico, pero añadiendo al vector la secuencia codificante de una proteína que permeabiliza la membrana exterior y permite la salida de la HGhr y demás proteínas que se encuentran en el espacio periplásmico (Kato y cols., 1987) (figura 4).

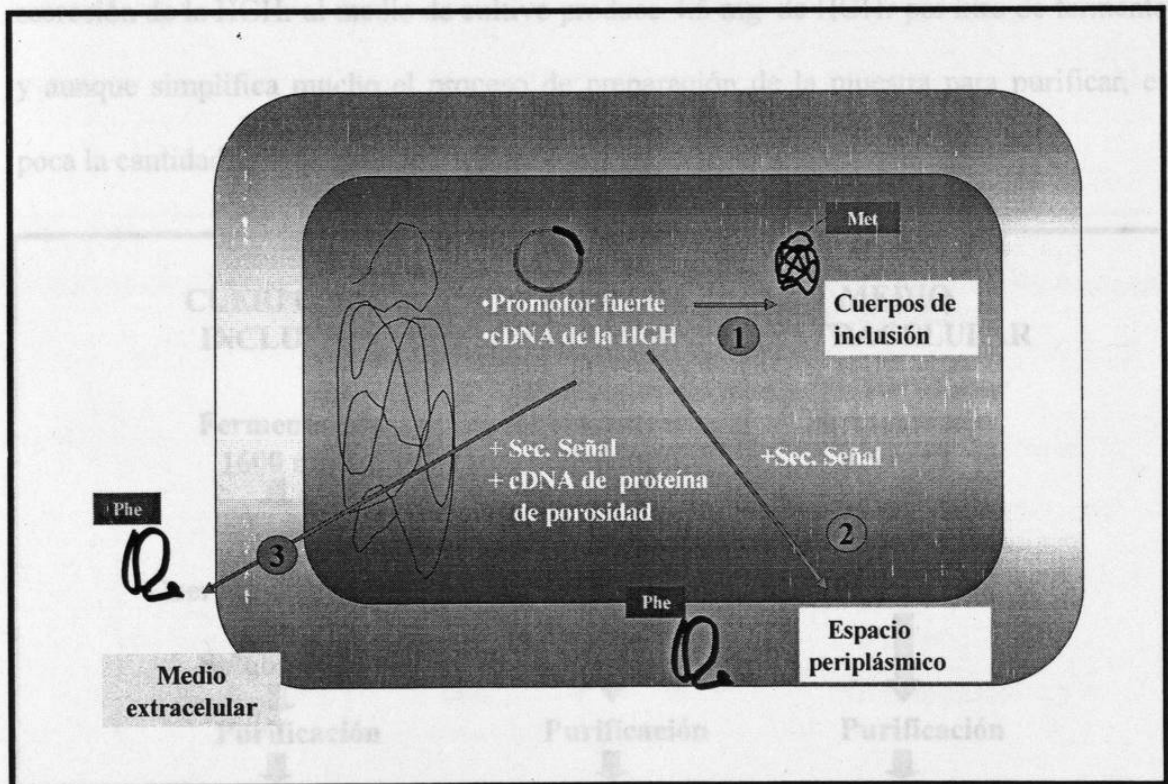


Figura 4. Estrategias de producción de HGhr en *E. coli*. En citoplasma la proteína se produce en forma de cuerpos de inclusión, en periplasma y medio extracelular en forma nativa.

Figura 5. Esquema de estrategias de producción de HGhr en *E. coli*.

La producción citoplásmica de la hormona en forma de cuerpos de inclusión produce en la fermentación un par de gramos de HGhr por cada litro de fermento. Mediante lisis y centrifugación a baja velocidad se separan los cuerpos de inclusión, los cuales son solubilizados mediante agitación vigorosa y utilizando condiciones desnaturalizantes, para posteriormente purificar la proteína por técnicas de precipitación y cromatografía de líquidos. Al final se recupera un 50 % de la proteína producida en la fermentación (figura 5). Cuando es secretada al espacio periplásmico, se producen 20.6 mg de HGhr por litro de fermento. El proceso de preparación de la muestra para la purificación se simplifica ya que se elimina el paso de solubilización de los cuerpos de inclusión, debido a que en este caso la proteína se encuentra en forma nativa. Sin embargo, se obtiene un 43 % de la hormona producida en la fermentación (figura 5). La secreción de la HGhr al medio de cultivo produce 4.5 mg de HGhr por litro de fermento y aunque simplifica mucho el proceso de preparación de la muestra para purificar, es poca la cantidad que se obtiene (figura 5).

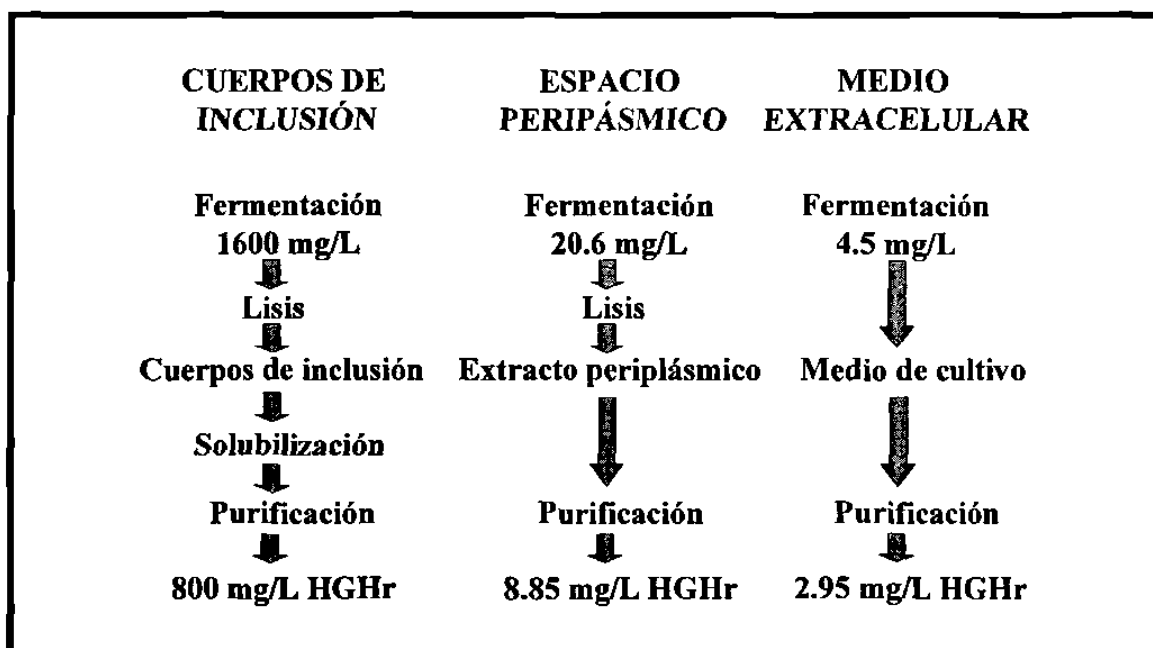


Figura 5. Esquema de estrategias de producción de HGhr en *E. coli*.

2.3 Purificación de HGhr producida en *E. coli*.

La metodología para la purificación de la hormona producida en *E. coli* está ampliamente descrita, sin embargo son pocos los reportes del porcentaje de recuperación en los procesos de purificación de la HGhr, y están principalmente adaptadas para la producción intracelular de HGhr en *Escherichia coli*. El esquema de purificación de la hormona básicamente es el mismo cuando se produce la proteína en forma de cuerpos de inclusión, secreción al espacio periplásmico o al medio extracelular. Una primera etapa consiste en una precipitación con sulfato de amonio (20 % - 60 % de saturación) para eliminar la mayor cantidad de proteínas contaminantes que puedan interferir en los pasos siguientes (Kenneth y cols, 1981; Flodh, 1986; Igout y cols, 1993). Debido a que permanecen contaminantes de las etapas preliminares, se tiene que emplear técnicas cromatograficas como intercambio iónico o afinidad con anticuerpos y exclusión molecular (Olson y cols, 1981; Flodh, 1986; Oliveira y cols., 1999; Patra y cols., 2000)

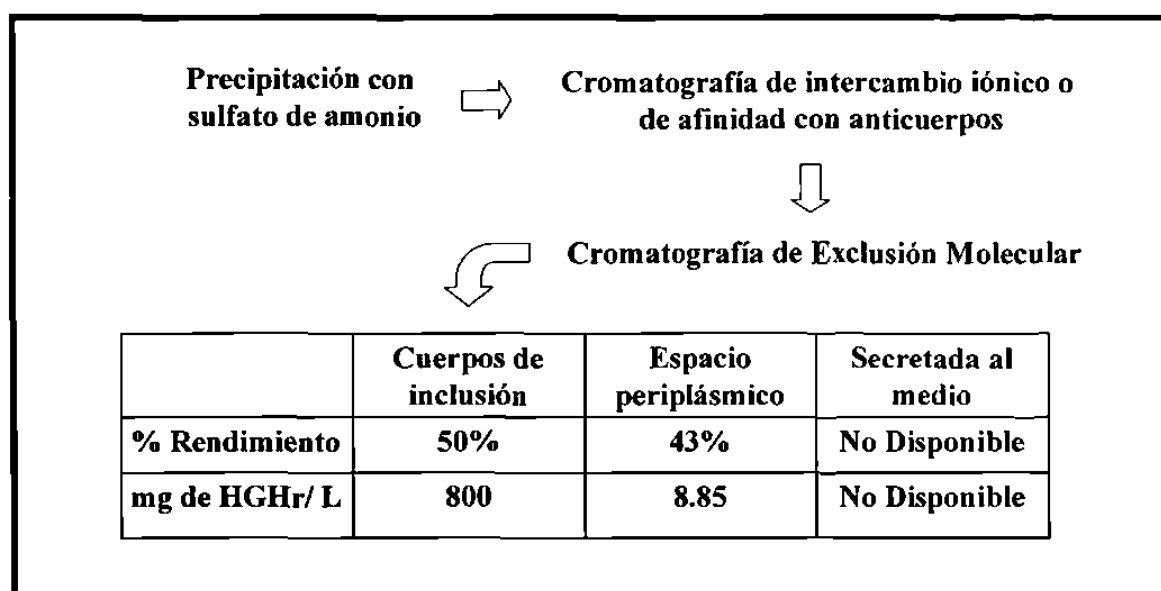


Figura 6. Esquema general de purificación de HGhr producida en *E. coli*.

(figura 6). A pesar de que los cuerpos de inclusión están compuestos por un 90 % de HGhr en forma agregada, es muy difícil disgregar la hormona a su forma monomérica, por lo que se pierde un 50 % o más de la proteína (*Patra y cols.*, 2000). Por otra parte, cuando la proteína es purificada a partir del espacio periplásmico, el esquema consiste de 6 etapas iniciando con una precipitación al 50 % de sulfato de amonio y se pasa por columnas de exclusión molecular, intercambio aniónico, e interacciones hidrofóbicas en fenil sefarosa para obtenerla con una pureza cercana al 100 % y un rendimiento total en el proceso del 43 % (*Oliveira y cols.*, 1999).

2.4 Producción de HGhr en *Pichia pastoris*.

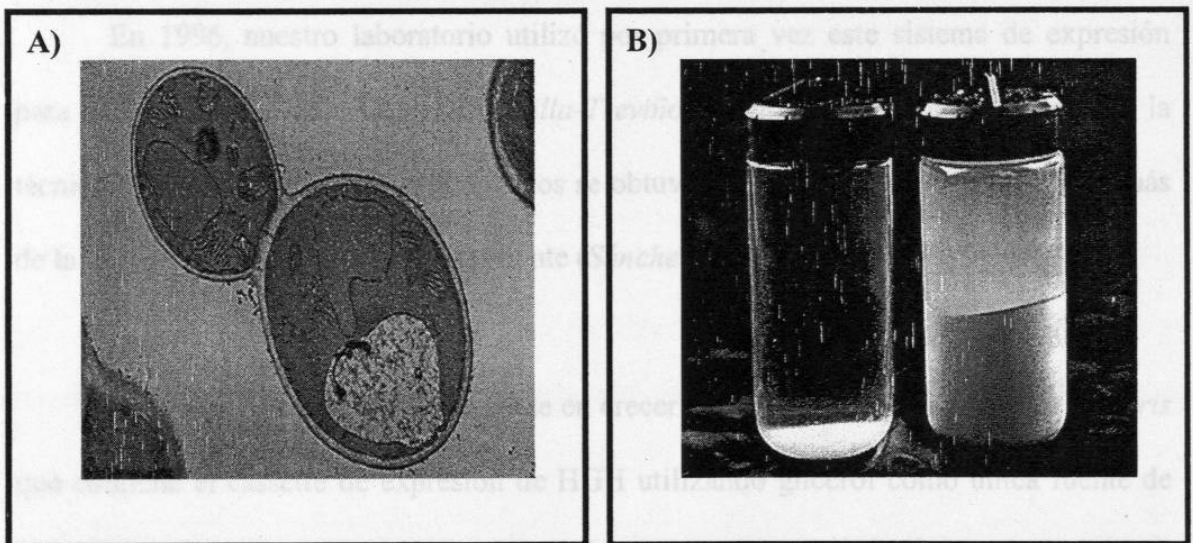


Figura 7. Crecimiento de *P. pastoris*. A) Se muestra la levadura en gemación. B) Se puede observar la masa celular alcanzada después de 10 horas de fermentación en matraz baffleado (frasco de lado izquierdo) y fermentador (frasco lado derecho).

P. pastoris es una levadura metilotrófica (capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono) que lleva a cabo modificaciones postraduccionales, produce niveles de proteínas recombinantes de uno a dos órdenes de magnitud por encima de *Saccharomyces cerevisiae* (*Faber y cols.*, 1995), es capaz de secretar proteínas heterólogas al medio de

cultivo (donde los niveles de proteínas nativas son muy bajos) y que en contraste con esta última, puede cultivarse a densidades celulares de más de 100 g/l de peso seco (*Siegel y Brierley, 1989*).

El promotor del gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (aox1) de *P. pastoris* es uno de los que más se emplean para dirigir la síntesis de proteínas recombinantes. Es tan fina su regulación, que en presencia de otra fuente de carbono que no sea metanol (ejem. glicerol o glucosa) el sistema esta apagado completamente (*Ellis y cols., 1985*), bastando reemplazar dicha fuente por metanol para encenderlo (*Invitrogen, 2000*).

En 1996, nuestro laboratorio utilizó por primera vez este sistema de expresión para la producción de HGHr (*Escamilla-Treviño, 1996*). Posteriormente, mediante la técnica de transformación de esferoplastos se obtuvo un clona que produce un 44 % más de la hormona que la obtenida inicialmente (*Sánchez-Domínguez, 1998*) (figura 8).

El proceso de producción consiste en crecer en matraz la levadura *Pichia pastoris* que contiene el cassette de expresión de HGH utilizando glicerol como única fuente de carbono, hasta alcanzar la biomasa necesaria. Posteriormente, se reemplaza el medio de cultivo utilizando como fuente de carbono metanol para activar el promotor de AOX1 lo que conducirá la expresión proteica (*Invitrogen, 2000*). Después de la inducción se cosecha el fermento, separando el caldo donde se encuentra la proteína de interés, el cual se analiza por EGPA-SDS; así como para procesos posteriores.

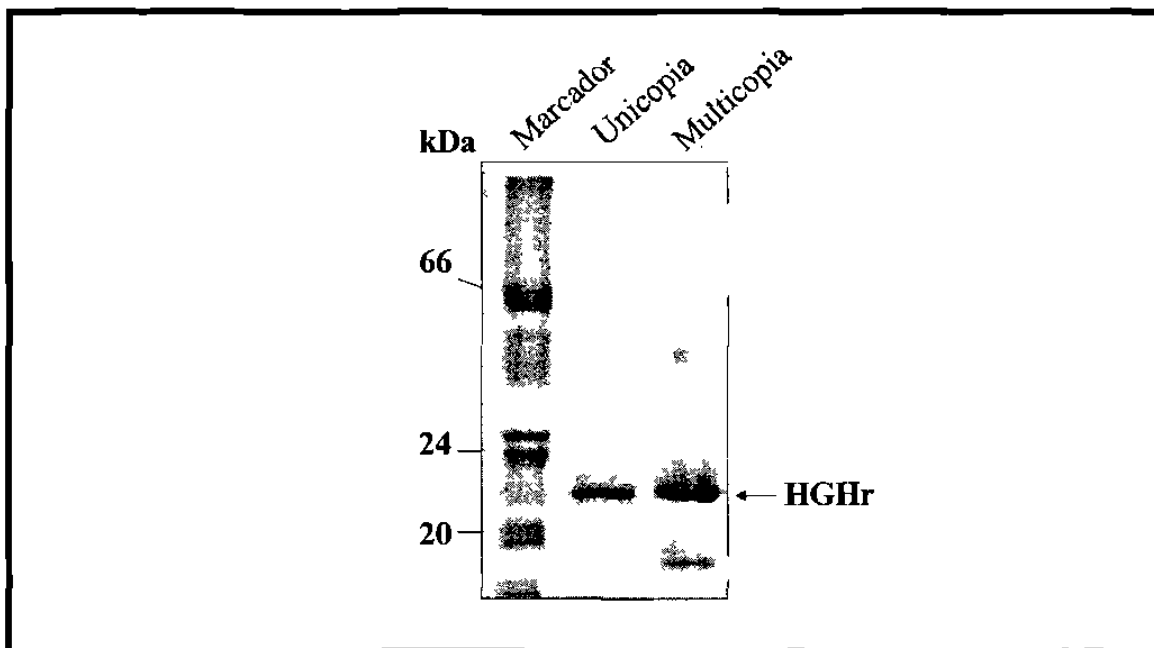


Figura 8. Proteínas contenidas en el medio de cultivo fermentado con cepa unicopia y multicopia de *P. pastoris* productora de HGHR.

2.5 Purificación de HGHR producida en *P. pastoris*.

En un ensayo preliminar de purificación por cromatografía de intercambio aniónico en condiciones no desnaturizantes no se obtuvo en una fracción mayoritaria, sino que la HGHR se eluyó a lo largo de la purificación, y no se alcanzó el nivel de pureza deseado (Sánchez-Domínguez, 1998) (figura 9).

Se sabe que la HGHR tiene mayor solubilidad a pH=7-12.5 (Patra y cols., 2000), mientras que la fermentación termina a pH=2.5, con lo que disminuye la solubilidad de la proteína y favorece la formación de agregados por reacción de entrecruzamiento entre proteínas (Katakam y cols., 1997; Parkins y cols., 2000; Patra y cols., 2000) ,

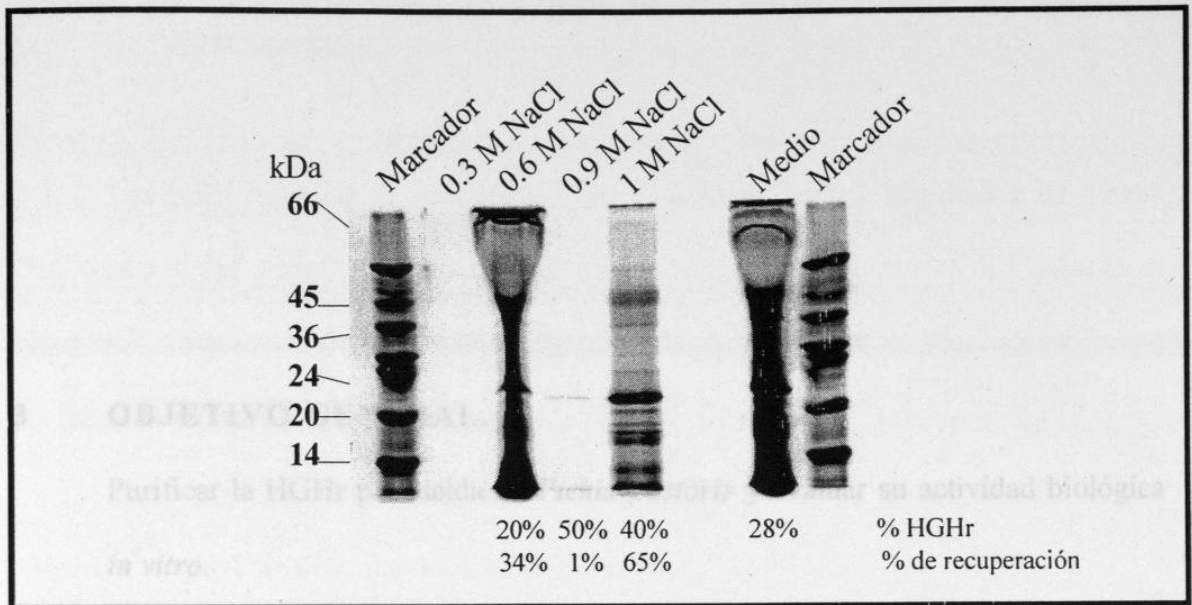


Figura 9. Cromatografía de intercambio aniónico. En los carriles se muestra el marcador de peso molecular, las proteínas eluidas a 0.3 M de NaCl, 0.6 M de NaCl, 0.9 M de NaCl y 1 M de NaCl, el medio de cultivo y marcador de peso molecular.

4.1 Comparar fermentaciones a pHs iniciales de 6 y 8 en medio mínimo.
 En nuestro laboratorio se cuenta con cepas de *Pichia pastoris* productoras de GHs humanas variante, de 20 kDa y 22 kDa, además de las GHs bovina, caprina, equina y canina. Se ha establecido el proceso de obtención de la cepa sobreproductora pero no se cuenta con una metodología para la purificación y análisis de la proteína. Lo anterior nos motiva a establecer una metodología para la purificación de la HGh de 22 kDa producida en *Pichia pastoris* que serviría de base para la purificación de las otras GHs con las cuales se cuenta en nuestro laboratorio.

4.2 Purificar la HGhr del medio de cultivo mediante técnicas cromatográficas.
 4.3 Caracterizar la HGhr purificada utilizando EGPA-SDS, espectroscopia de UV y electrotransferencia-inmuno-detección ("Western-blot").
 4.4 Evaluar su actividad biológica *in vitro* mediante el efecto sobre la proliferación de células Nb2.

3 OBJETIVO GENERAL.

Purificar la HGhr producida en *Pichia pastoris* y evaluar su actividad biológica *in vitro*.

4 OBJETIVOS PARTICULARES.

- 4.1 Comparar fermentaciones a pHs iniciales de 6 y 8 en medio mínimo.
- 4.2 Purificar la HGhr del medio de cultivo mediante técnicas cromatográficas.
- 4.3 Caracterizar la HGhr purificada utilizando EGPA-SDS, espectroscopia de UV y electrotransferencia-inmunodetección (“Western-blot”).
- 4.4 Evaluar su actividad biológica *in vitro* mediante el efecto sobre la proliferación de células Nb2.

5 MATERIALES.

5.1 Químicos.

Los reactivos para la preparación de soluciones fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO. EUA) y Merck de México (Monterrey, N.L.), además el sustrato POD para la reacción colorimétrica en el western blot se adquirió en Roche Molecular Biochemicals de EUA.

La resina Q Sepharose FF y Sephacryl HR 100 fueron adquiridas de la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ. EUA).

5.2 Biológicos.

Se utilizó la cepa productora de HGHR de *Pichia pastoris* obtenida por *Sánchez-Domínguez en 1998* y HGH comercial de la casa comercial de Eli Lilly & Co (Indianapolis, Indiana EUA).

El anticuerpo de oveja contra HGH conjugado con digoxigenina y el anticuerpo secundario de oveja conjugado con peroxidasa fueron obtenidos de la casa comercial Roche Molecular Biochemicals (Grenzacherstrasse, Suiza).

5.3 Equipo.

Sistema de enfriamiento So-Low Environmental Equipment Cincinnati Ohio USA (Ultra-Low Freezer) a -80 °C, centrífugas y ultracentrífugas Beckman modelos: Allegra 21R, Optima TLX, TJ-6, J2-MI y L5-5OE y de la marca eppendorf modelos: 5414, 5415C y 5402. Incubadoras Shel Lab SL (Sheldon Manufacturing Inc) Modelos: 1535 y 1330GX, y Shaker-Bath (ORBIT) de Lab Line. Un sistema de digitalización y análisis de imagen GEL DOC 1000/PC de la marca BIORAD, espectrofotómetro Beckman modelo

Du-70, balanzas OHAUS modelos *Analytical Plus* y *Precision Standard*, potenciómetro digital ORION modelo 420 A, concentrador al vacío CENTRIVAP LABCONCO, fuentes de poder para electroforesis Gibco-BRL-Life Technologies Inc., modelo 500 High Current, cámaras de electroforesis horizontal BIORAD, campana de extracción LABCONCO y gabinete de bioseguridad nivel II (LABCONCO).

6 METODOLOGÍA.

6.1 Estrategia general.

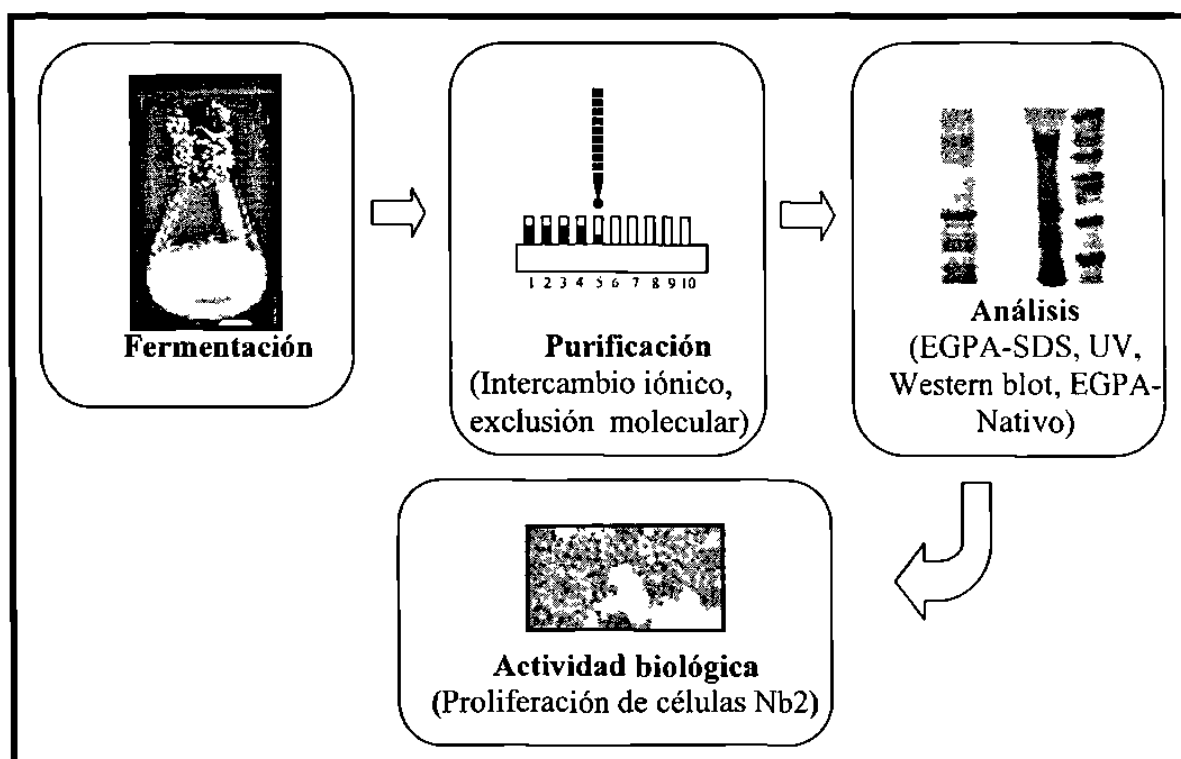


Figura 10. Estrategia general utilizada para el proceso de purificación. Se hizo la fermentación para la producción de GHr en *Pichia pastoris*, posteriormente se purificó la hormona por cromatografía de intercambio aniónico y exclusión molecular, se caracterizó y finalmente se evaluó la actividad biológica.

El trabajo experimental consistió de las siguientes etapas:

- Fermentación:** Se inició a pH=8 para que la GHr secretada al medio extracelular durante y al final de la fermentación se encuentre en las condiciones de pH óptimas.
- Purificación:** Se evaluaron estrategias de purificación de la GHr mediante técnicas de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio aniónico y exclusión molecular.
- Análisis:** Se hizo el análisis de GHr purificada mediante EGPA-SDS, EGPA-Nativo, espectroscopia de UV y Western Blot.

- d) **Actividad Biológica:** Se evaluó la actividad lactógena de la HGHR purificada comparada con la HGHC.

6.2 Fermentación.

- a) A partir de un stock en glicerol al 15 %, la cepa sobreproductora de HGHR se sembró en estrías en una placa de agar YPD y se incubó por 3-5 días a 30°C.
- b) Posteriormente, se inoculó una colonia y se resuspendió en 2 matraces conteniendo 150 ml de medio BMG a pH=6 y pH=8, respectivamente.
- c) Se incubó a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar la DO 600 nm=1.4.
- d) Se centrifugó a 4000 X g por 10 min en la centrífuga Beckman modelo Allegra 21R y el paquete celular se resuspendió en 150 ml de medio BMM (medio de inducción).
- e) Se incubó a 30°C y se añadió metanol hasta alcanzar una concentración final de 0.75 % cada 24 hrs durante 120 hrs.

Durante la inducción se tomaron muestras de cada 24 hrs y cada una de las muestras se centrifugó a 4000 X g por 10 min en la centrífuga Beckman modelo Allegra, se descartó el paquete celular y al medio de cultivo se le midió el pH, turbidez (DO_{450nm}), proteínas totales y HGHR.

6.3 Cuantificación de proteínas totales del medio de cultivo.

Se determinaron las proteínas totales de las muestras colectadas durante la fermentación por el método de Bradford, construyendo una curva de calibración con BSA de 1-25 µg/ml en volúmenes finales de reacción de 1 ml. Se mezcló 500 µl de

medio de cultivo o estándar con 500 μ l de reactivo de Bradford (Pierce) y se incubó por 5 min.

6.4 Purificación de la HGHR.

- a) 150 ml de medio de cultivo libre de células se dializaron contra 1 litro de Tris-HCl pH=8 y 9 50 mM, EDTA 0.2 mM, azida de sodio al 0.1 %, DTT 1 mM, PMSF 2 mM en frío (4°C-10°C) con agitación, efectuando 3 cambios de este buffer cada 2 horas.
- b) Posteriormente, se pasó por una columna Q Sepharose FF de 7 cm X 2 cm (equivalente a un volumen de 8 ml), equilibrada con 30 ml de KCl 50 mM, Tris-HCl pH=8 y 9 50 mM, EDTA 0.2 mM, azida de sodio al 0.1 %, DTT 1 mM y PMSF 2 mM a un flujo de 0.8 ml/min.
- c) Se eluyó utilizando 10 ml de KCl 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M en Tris-HCl pH= 8 y 9 50 mM, EDTA 0.2 mM, azida de sodio al 0.1 %, DTT 1 mM y PMSF 2 mM a un flujo de 0.8 ml/min a 4-10°C y se colectaron fracciones de 1 ml.
- d) Después las fracciones fueron visualizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS) al 15 %, teñidos con azul de Coomassie.
- e) Las fracciones que contenían la HGHR se mezclaron y se le añadió sulfato de amonio hasta alcanzar un 60 % de saturación y se dejó a -20°C por toda la noche.
- f) El volumen total se repartió en tubos eppendorff de 2 ml y se centrifugó a 10000 X g por 20 min a 4°C en la centrífuga marca eppendorf modelo 5402, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 300 μ l de KCl 100 mM, Tris-

HCl pH=8.8-9 50 mM, EDTA 0.2 mM, azida de sodio al 0.1 %, DTT 1 mM, PMSF 2 mM.

- g) Finalmente, se paso por una columna de Sephacryl HR 100 de 20 cm X 0.5 cm (equivalente a un volumen de 12 ml) equilibrada con 24 ml de KCl 100 mM, Tris-HCl pH=8.8-9 50 mM, EDTA 0.2 mM, azida de sodio al 0.1 %, DTT 1 mM, PMSF 2 mM con un flujo de 0.1 ml/min a 4-10°C y se recolectaron fracciones de 0.3 ml.
- h) Después las fracciones fueron visualizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS) al 15 %, teñidos con azul de Coomassie.

6.5 Espectroscopía de ultravioleta.

Se tomó un volumen equivalente a 100 ng de HGHR de las fracciones purificadas o de la HGHC, se diluyó a una concentración final de 100 ng/ml y se dializó contra 50 mM Tris-HCl pH= 8.8, 0.2 mM EDTA, 100 mM NaCl, cambiando 2 veces el buffer cada 2 hrs a 4-10°C. Posteriormente se hicieron las lecturas de absorbancia en el rango de UV (200 nm a 350 nm) a temperatura ambiente.

6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas, desnaturalizantes reductoras y no reductoras.

- a) Las muestras, los geles de poliacrilamida en condiciones nativas, desnaturalizantes reductoras y no reductoras se prepararon de acuerdo al método descrito por *Laemmli* en 1970.
- b) Las muestras se disolvieron y se corrieron a 90 volts por 2.5 horas.

- c) Se sumergió el gel en las soluciones y por los tiempos de agitación siguientes (a 10 rpm): Solución fijadora (Metanol 50 % y ácido acético 10 %) 30 minutos; Solución de Coomassie (Azul brillante de Coomassie G 0.05 %, Metanol 50 %, ácido acético 10 %) 45 minutos; Solución decolorante (Metanol 5 %, ácido acético 7 %) toda la noche con los cambios de solución que sean necesarios. Cuando se haya desteñado, el gel se deja en agitación con agua.
- d) Para hacer una estimación de la pureza, la imagen del gel se digitalizó mediante el sistema GELDOC 1000 (Biorad) y se determinó el perfil densitométrico utilizando el programa *Molecular Analyst* de la misma compañía. Una vez determinada la abundancia relativa de HGHR, se estimó la producción total en mg/L, empleando el valor de las proteínas totales determinado con anterioridad.

$$\text{Abundancia relativa} = \frac{\text{Proteínas totales} \times \% \text{ HGHR}}{100}$$

6.7 Inmunodetección por “Western blot” de la HGHR.

- a) Se preparó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes usando de 0.5 a 2 microgramos de muestra.
- b) El sandwich se ensambló de acuerdo a las instrucciones del manual casa comercial Bio-Rad para el mini trans- Blot electrophoretic transfer cell.
- c) El sandwich se sumergió en la cámara que contiene el amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20 %) y se transfirió a 150 Volts por 1.5 horas a temperatura ambiente. Se removió la membrana y se escurrió cuidadosamente.

- d) La membrana se colocó en un recipiente con PBS + 5 % leche descremada en polvo (Svelty) con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquearla. Se lavó la membrana con PBS + Tween-20 0.05 % por 15-20 minutos, 3 veces.
- e) Se agregó el anticuerpo de oveja contra HGH a una concentración de 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo en PBS y se dejó en agitación suave durante toda la noche a 4°C).
- f) Se lavó 3 veces con PBS + Tween-20 0.05 % cada 15 minutos.
- g) Se agregó el segundo anticuerpo (anti oveja) y se agitó suavemente por 90 minutos.
- h) Se lavó 3 veces con PBS + Tween-20 0.05 % cada 15 minutos.
- i) Se agregó 2.5 μL de peróxido de hidrógeno y se reveló la membrana con una solución fresca de 2.5 mg de diaminobenzidina en 10 ml de Acetato de Sodio 100 mM.
- j) Se detuvo la reacción con metabisulfito de sodio 10 mM, pH 9.6.
- k) La imagen se digitalizó en un scanner de cama plana marca Hewlett-Packard.

6.8 Evaluación de la actividad lactogénica.

Se descongeló una alícuota de 1 ml de células Nb2 sumergida en nitrógeno líquido y se inocularon en botellas de 50 ml con 5 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con suero de caballo (10 %), suero bovino fetal (10 %), 2-Mercaptoetanol (10^{-4} M), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$) a 37 °C en atmósfera de 5 % CO_2 -95 % aire durante 7 o 10 días, determinando diariamente la concentración de células en el medio de cultivo (no debe exceder 1×10^6 cel/ml). Después se hizo lo siguiente:

- a) El medio de cultivo con células Nb2 se transfirió a un tubo Elkay y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
- b) Se descartó el medio de cultivo por aspiración y la pastilla de células se resuspendió en medio DMEM suplementado con suero de caballo (10 %), suero bovino fetal (1 %), 2-Mercaptoetanol (10^{-4} M), penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 μ g/ml), y se incubaron 24 horas bajo las condiciones anteriormente descritas.
- c) Posteriormente el cultivo se colectó en tubos Elkay y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el medio de cultivo y la pastilla de células se resuspendió a una concentración de $0.5 - 1.0 \times 10^5$ células/ml en el medio de DMEM suplementado con suero de caballo (10 %), 2-Mercaptoetanol (10^{-4} M), penicilina (50 U/ml), estreptomicina (50 μ g/ml) y HGH. Para verificar la actividad biológica de la HGH purificada, los ensayos se establecieron de la siguiente manera:
- HGH producida en *P. pastoris* [diluciones logarítmicas de 1×10^{-3} a 1×10^{-3} ng/ml en PBS (0.01M) a pH 7.4].
 - HGH comercial [diluciones logarítmicas de 1×10^{-3} a 1×10^{-3} ng/ml en PBS (0.01M) a pH 7.4].
 - Control negativo [PBS (0.01M) a pH 7.4].
- d) Se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂-95 % aire durante 48 horas.
- e) Se homogenizó cada pocillo por pipeteo y se tomaron 10 μ l de la suspensión de células y se contaron en hemocitómetro.

- f) Se determinó el porcentaje de crecimiento celular de cada dosis de HGHr con respecto al máximo alcanzado y se construyó una gráfica de % de respuesta máxima vs dosis de HGH para determinar por interpolación la dosis a la que se produce el 50 % del efecto máximo.

7 RESULTADOS

7.1 Fermentación.

Las fermentación iniciada a pH=6 disminuyó hasta pH=2.8, mientras que la iniciada a pH=8 en 120 horas disminuyó hasta 7.1 (figura 11).

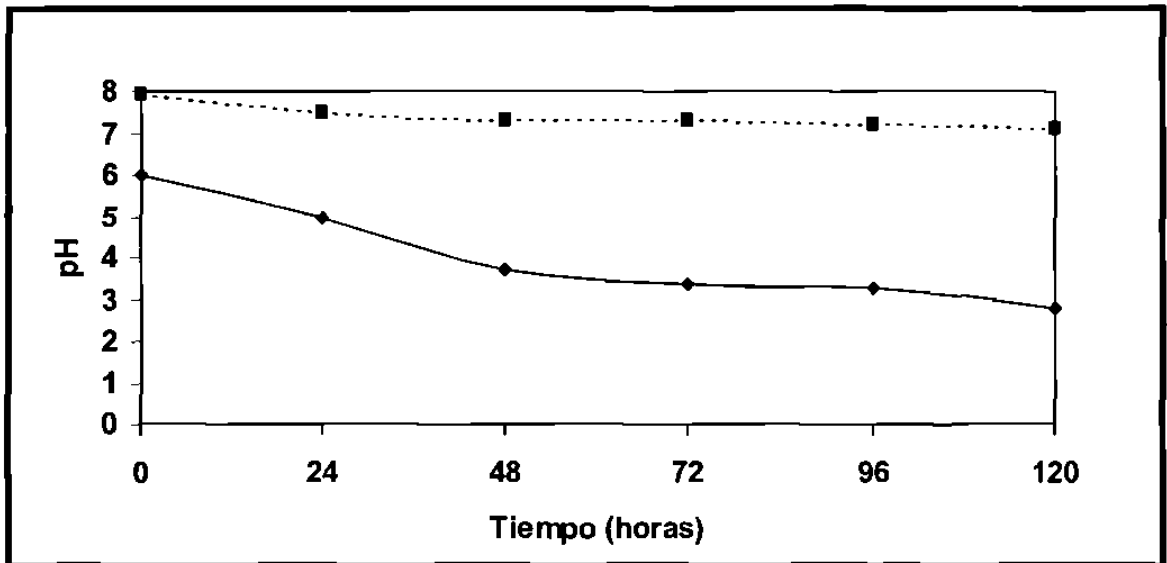


Figura 11. Variación de pH durante la fermentaciones iniciadas a pH=6 y 8. La línea continua indica la fermentación iniciada a pH=6, mientras que la línea punteada la iniciada a pH=8.

La turbidez del medio de cultivo libre de células en las fermentaciones iniciadas a pH=6 y pH=8 alcanzaron a las 48 hrs los máximos de $DO_{450\text{ nm}}=0.94$ y 0.1 , respectivamente. Posteriormente en ambos casos disminuyó, sin embargo en la fermentación iniciada a pH=6 volvió a incrementarse terminando con una $DO_{450\text{ nm}}=0.92$, mientras que en la iniciada a pH=8 disminuyó hasta terminar a una $DO_{450\text{ nm}}=0.08$ (figura 12).

La concentración de HGHr durante la fermentación iniciada a pH=6 disminuyó a las 48 hrs de 7.4 mg/L (24 hrs) a 6.5 mg/L , a las 72 hrs aumentó a 13.8 mg/L , pero disminuyó a las 96 hrs 13 mg/L y finalmente terminó a 16 mg/L (figura 12A). Cuando

se inició a pH=8, la producción en las primeras 72 hrs era 6.3 mg/L, más baja que la determinada al mismo tiempo en la fermentación iniciada a pH=6 (13.8 mg/L) (figura 9B). Posteriormente, en las últimas 48 hrs de fermentación hubo un incremento desde 6.3 mg/L (72 hrs) hasta 22.7 mg/L (120 hrs) en promedio (figura 12B).

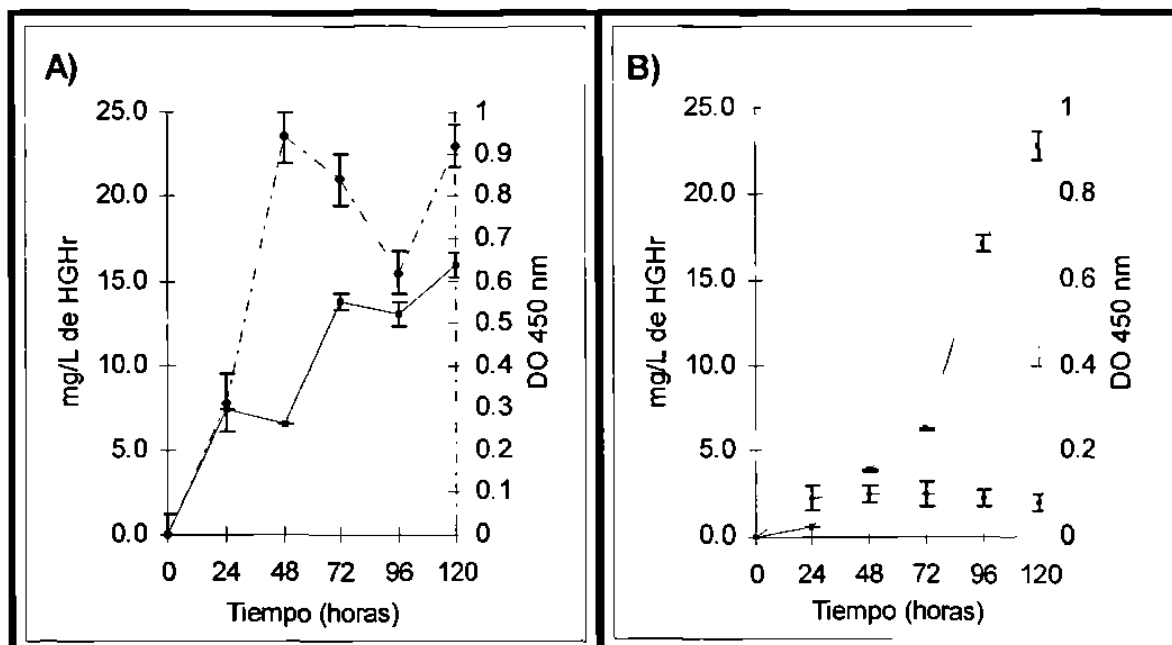


Figura 12. Variación de turbidez y concentración de HGHR durante la fermentación. A) Gráfica de concentración en mg/L de HGHR y turbidez (DO_{450nm}) con respecto al tiempo durante la fermentación iniciada a pH=6. **B)** Gráfica de concentración en mg/L de HGHR y turbidez (DO_{450nm}) con respecto al tiempo durante la fermentación iniciada a pH=8.

7.2 Purificación de HGHR.

En principio, el medio de cultivo de la fermentación iniciada a pH inicial=8 dializado, se pasó por una columna de intercambio aniónico en donde las proteínas son adsorbidas por la resina Q Sepharose FF, cargada positivamente que interacciona con las cargas negativas de las proteínas presentes por fuerzas electrostáticas. Estas proteínas son desplazadas por los iones cloruro de las diferentes concentraciones de KCl (0.1 M, 0.2, 0.3M) en Tris-HCl pH=8 50 mM, EDTA 0.2 mM, azida de sodio al 0.1%, DTT 1 mM y PMSF 2 mM. En la figura 13 se puede observar que la HGHR, es eluida a las

concentraciones de 0.1 M KCl, 0.2 m KCl y 0.3 M KCl con otras proteínas contaminantes entre las que se encuentra una proteína de aproximadamente 25 kDa, la cual no se podría eliminar por cromatografía de exclusión molecular ya que esta técnica tiene poca resolución y se buscaba que la diferencia en peso molecular entre las proteínas sea mínimo de 5 kDa. Debido a ésto, se modificó a pH=9 el amortiguador de diálisis y de elución para tratar de eliminar la proteína de aproximadamente 25 kDa aunque existieran otras proteínas contaminantes que se podrían eliminar posteriormente por cromatografía de exclusión molecular. En la figura 14 se puede observar que la HGhr, en conjunto con otras proteínas contminantes, es eluída a una concentración de 0.1 M KCl mientras que a concentraciones de 0.2 M y 0.3 M de KCl se libera la proteína de 25 kDa aproximadamente que se encuentra en mayor proporción en el medio de cultivo.

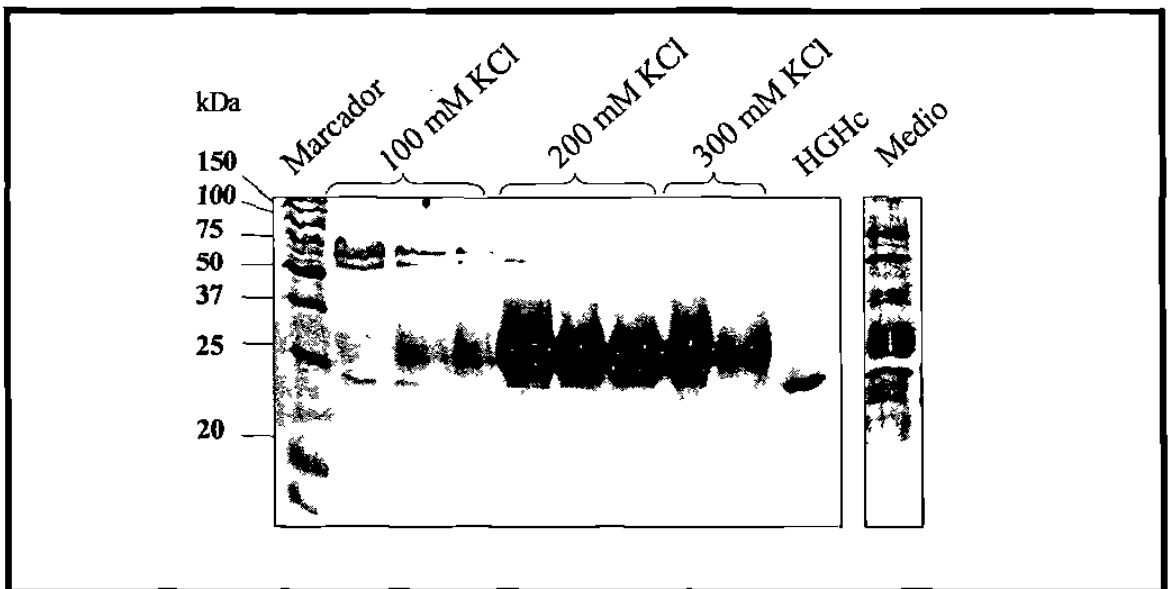


Figura 13. EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie de las fracciones colectadas en la cromatografía de intercambio aniónico eluída con amortiguador a pH=8.

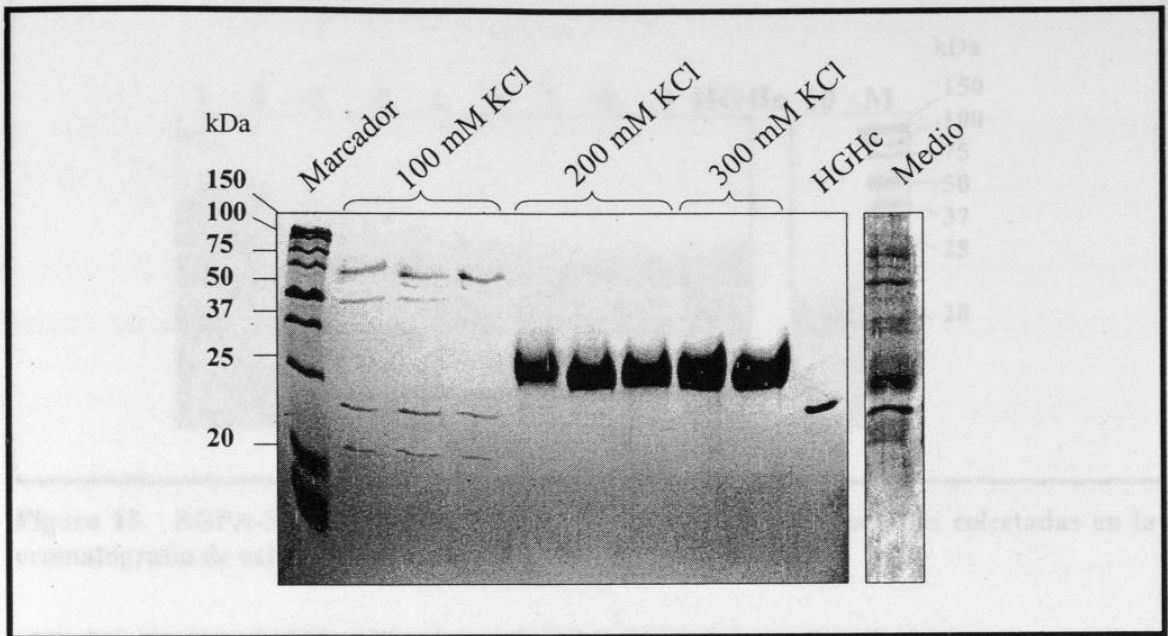


Figura 14. EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie de las fracciones colectadas en la cromatografía de intercambio aniónico eluída con amortiguador a pH=9.

Para eliminar las proteínas contaminantes de la HGHe en las fracciones colectadas cuando se eluyó la columna con 0.1 M de KCl, estas se mezclaron y se precipitaron con sulfato de amonio (60% de saturación) para concentrar la muestra y pasarla por la columna de exclusión molecular (Sephacryl HR 100) ya que en esta técnica solamente se puede colocar un volumen de muestra equivalente del 2% al 3% del volumen de la columna donde las proteínas son separadas de acuerdo a su peso molecular. En la figura 15 se muestra un EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie que contiene fracciones colectadas en la cromatografía de exclusión molecular. En los carriles 1 y 2 se observan las proteínas contaminantes de mayor peso molecular, en el carril 9 la HGHe y en el 10 la proteína contaminante de $PM \approx 20$ kDa.

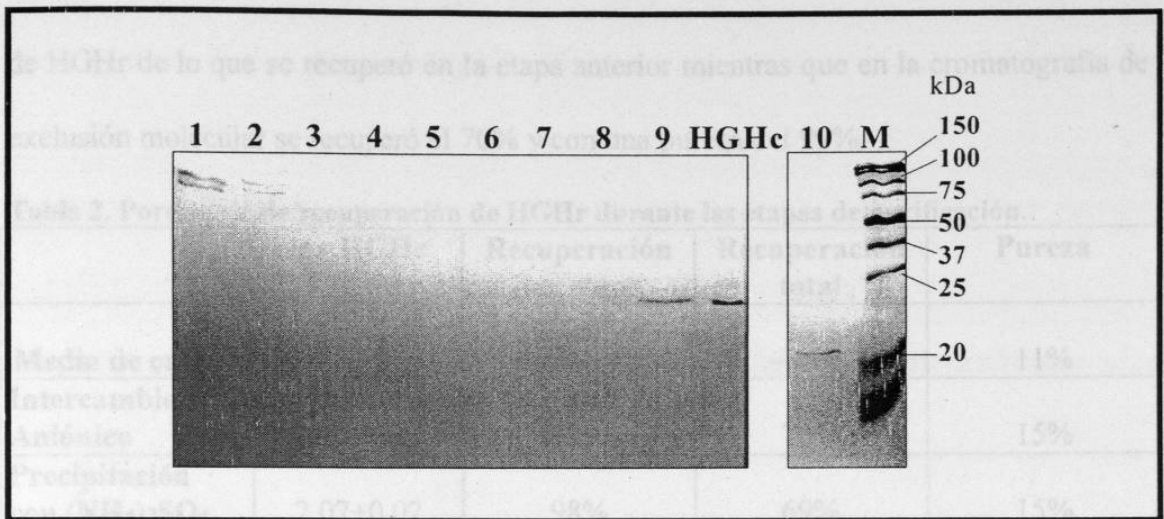


Figura 15. EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie de las fracciones colectadas en la cromatografía de exclusión molecular.

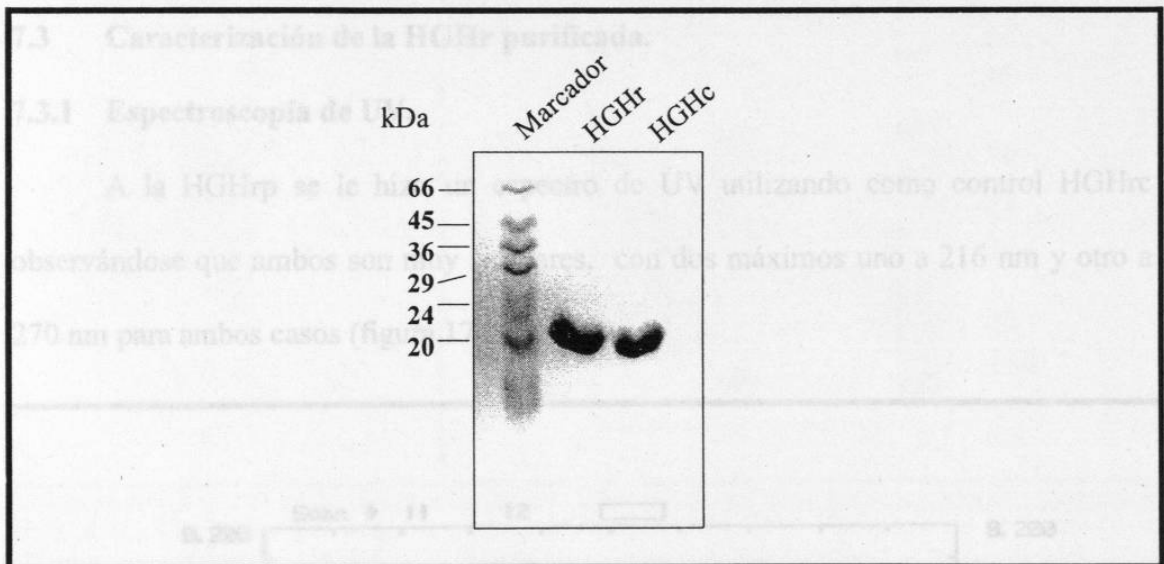


Figura 16. EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie con 15 µg de HGHRp a partir del medio de cultivo fermentado por *P. pastoris* comparada con la misma cantidad de HGHe.

Una vez que se observó que la HGHR ya no tenía proteínas contaminantes, se determinó la pureza por densitometría de EGPA-SDS en cada etapa de la purificación de HGHR. En la tabla 2 se muestra como la pureza de HGHR aumenta de un 11% al 15% con un 70% de recuperación cuando se pasa por la columna de intercambio aniónico; en la precipitación con sulfato de amonio se obtuvo con la misma pureza y se perdió el 1%

de HGHR de lo que se recuperó en la etapa anterior mientras que en la cromatografía de exclusión molecular se recuperó el 70% y con una pureza del 99%.

Tabla 2. Porcentaje de recuperación de HGHR durante las etapas de purificación.

	mg HGHR	Recuperación por etapa	Recuperación total	Pureza
Medio de cultivo	3	-----	-----	11%
Intercambio Aniónico	2.11±0.1	70%	70%	15%
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄	2.07±0.02	98%	69%	15%
Exclusión molecular	1.44±0.09	70%	48%	99%

7.3 Caracterización de la HGHR purificada.

7.3.1 Espectroscopía de UV.

A la HGHRp se le hizo un espectro de UV utilizando como control HGHRc observándose que ambos son muy similares, con dos máximos uno a 216 nm y otro a 270 nm para ambos casos (figura 17).

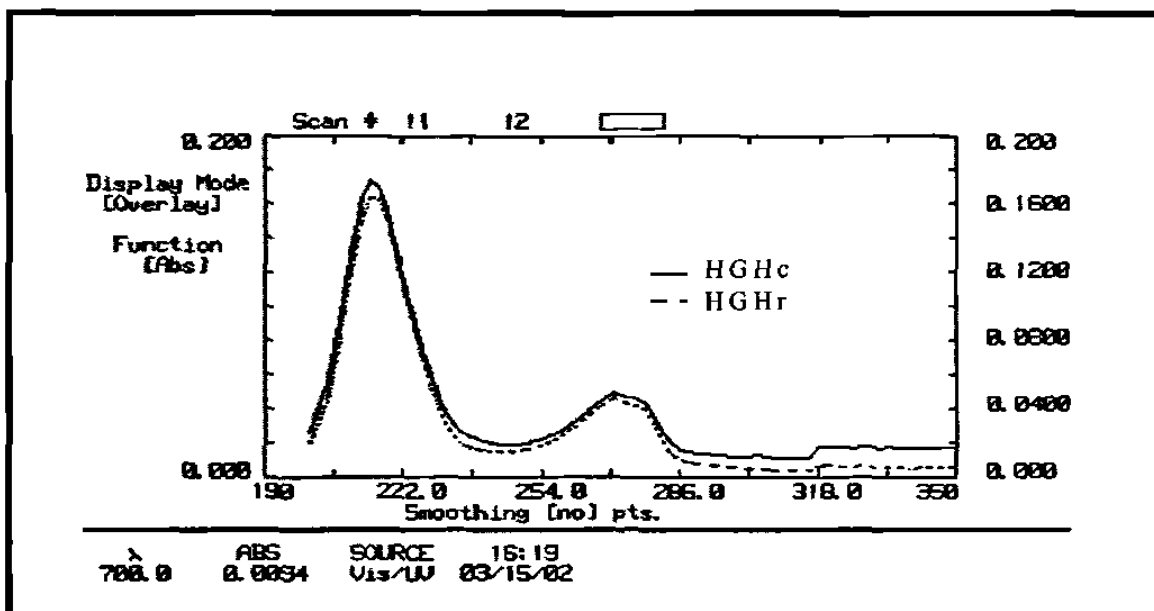


Figura 17. Espectro de UV de HGHRp y HGHRc. La línea continua indica la HGHRc mientras que la línea segmentada indica la HGHRp.

7.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida.

El EGPA-Nativo, EGPA-SDS en condiciones no reductoras y reductoras sugieren que la HGHrp tiene una conformación similar a la HGHrc, sus puentes disulfuro estan intactos y que tiene un $PM \approx 22$ kDa, respectivamente, ya que el comportamiento electroforético de la HGHrp y la HGHrc fue similar (figura 18).

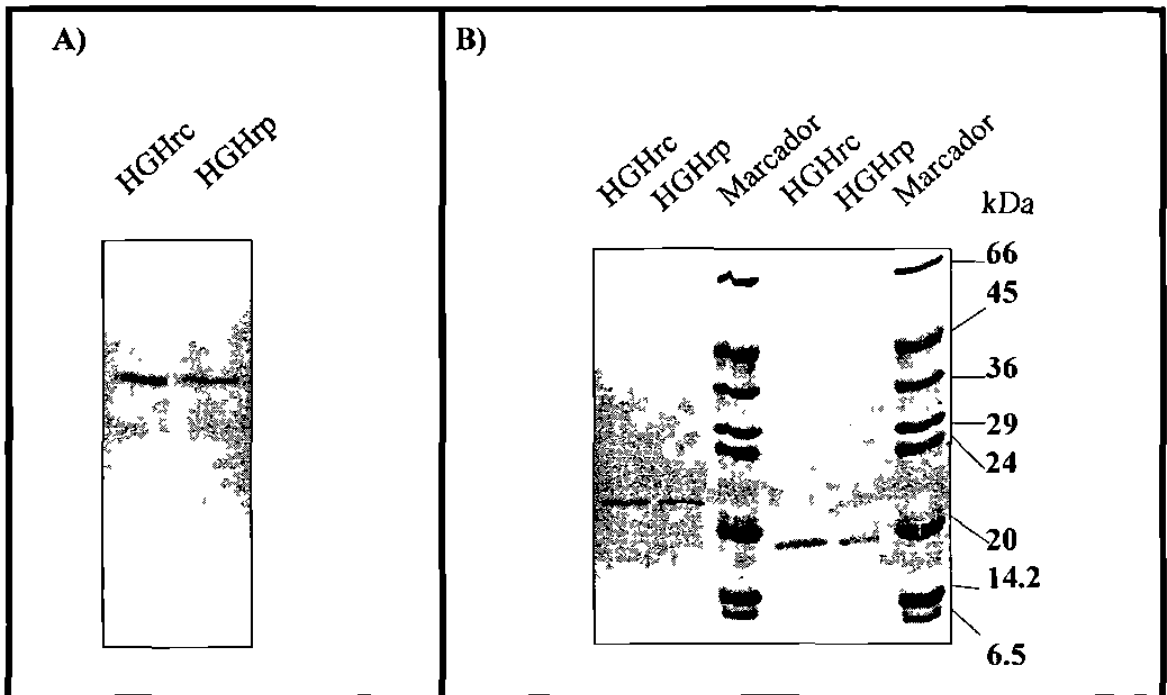


Figura 18. Electroforesis en geles de poliacrilamida. A) EGPA-Nativo donde se muestran la HGHrc y la HGHrp. B) EGPA-SDS donde las muestras en los carriles 1 y 2 fueron hechas en condiciones reductoras, mientras que los demás carriles fueron hechos en condiciones no reductoras.

7.3.3 Inmunodetección por “Western blot” de la HGH.

En la figura 19 se observa la detección de HGHr en forma monomérica y formas agregadas de la proteína en el medio de cultivo inducido con metanol en la fermentación (carril medio inducido), mientras que en el medio de cultivo sin inducir no se detectó la HGHr (carril medio sin inducir). También con esta prueba se pudo confirmar que la

HGHr se obtuvo en la fracción eluída a 100 mM KCl y las formas agregadas de HGHr en las fracción eluída a 300 mM.

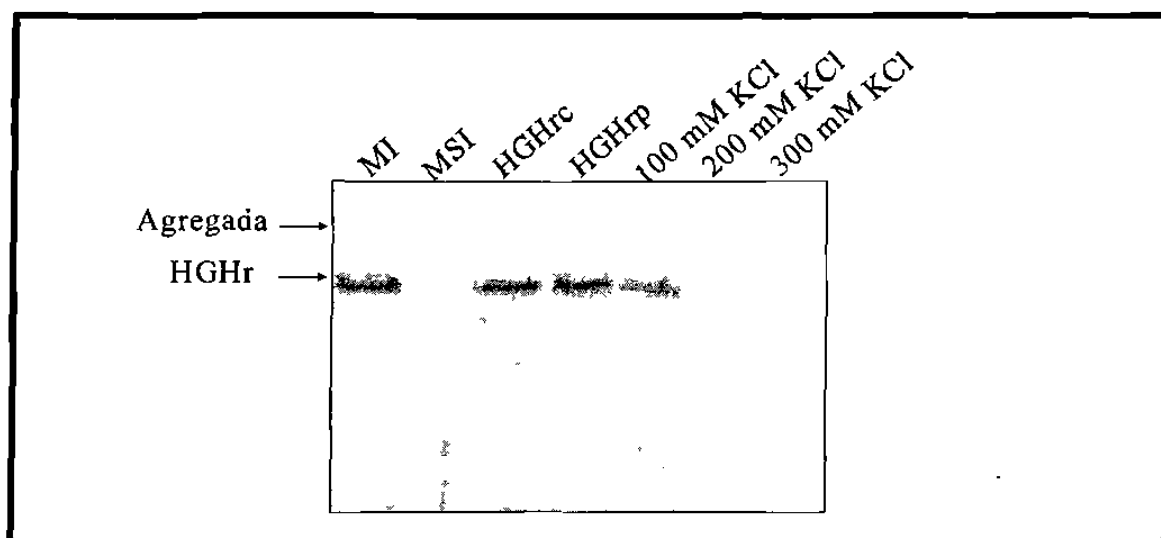


Figura 19. Western blot de HGHr durante el proceso de purificación. En los carriles se muestra el medio de cultivo inducido con metanol durante la fermentación (MI), sin inducir (MSI), HGHrc, HGHrp de *Pichia pastoris* y las fracciones colectadas correspondientes a 100 mM, 200 mM KCl y 300 mM KCl.

7.3.4 Evaluación de la actividad lactogénica.

Se ensayaron concentraciones desde 1×10^{-3} ng/mL hasta 1×10^3 ng/mL de HGHrc y HGHrp en PBS pH 7.4 y se determinó el promedio de células presentes en el medio de cultivo al final del bioensayo. Posteriormente con la concentración de células se graficó el porcentaje de respuesta máxima vs ng/ml de HGH y se observó que la respuesta de proliferación de las células Nb2 para HGHrc y HGHrp es similar ya que la dosis efectiva 50 (DE 50) fue de $5.25 \text{ ng/ml} \pm 0.58$ y $6.53 \text{ ng/ml} \pm 0.26$, respectivamente.

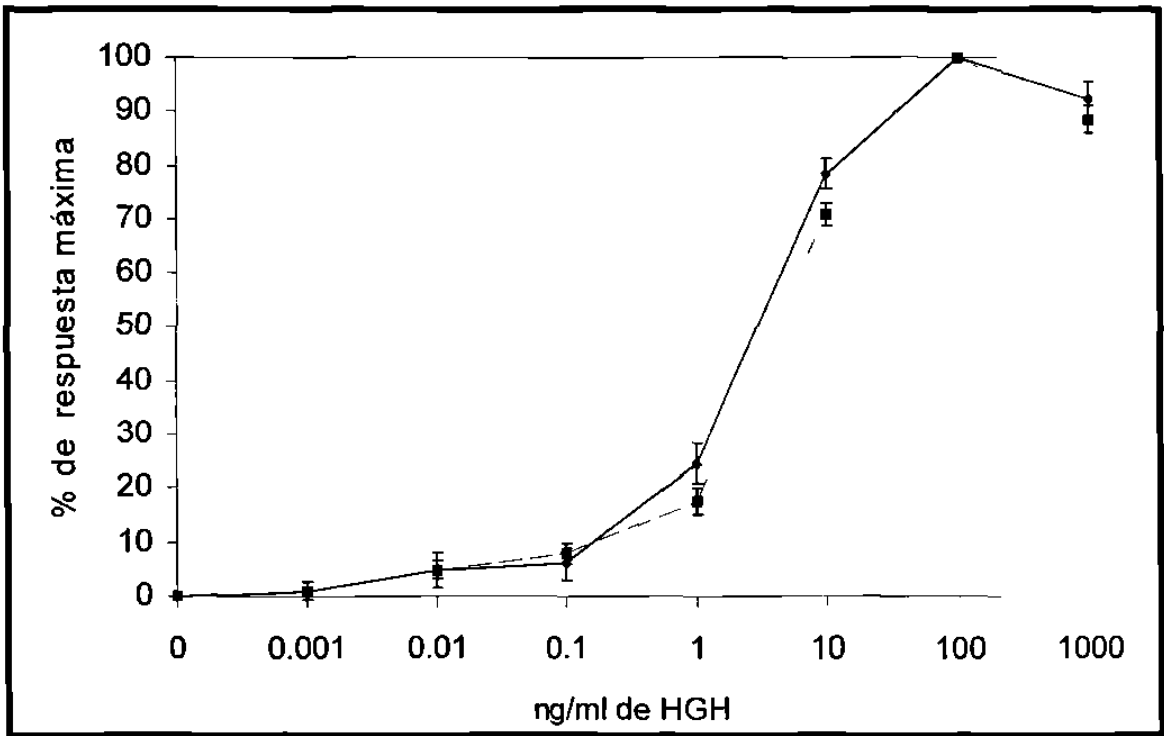


Figura 20. Evaluación de actividad lactogénica de HGHRp. Las barras en cada uno de los puntos de las líneas indican la desviación estandar. La línea continua corresponde a la HGHRc y la línea segmentada corresponde a HGHRp.

8 DISCUSIÓN.

En nuestro laboratorio se demostró previamente que el sistema de expresión *P. pastoris* es capaz de sintetizar y secretar HGHR al medio extracelular hasta nivel de fermentador. La identidad de la hormona se determinó confirmando su $PM \approx 22$ kDa, identidad inmunológica por Western blot y secuenciación de sus primeros 15 aminoácidos, siendo iguales a los de la HGH (*Escamilla-Treviño y cols, 1996*). Posteriormente, se logró la obtención de una clona multicopia que produce un 44% más de HGHR (*Sánchez-Domínguez, 1998*) con respecto a la obtenida por primera vez (*Escamilla-Treviño y cols, 1996*). Sin embargo era necesario purificar la hormona para hacer ensayos para saber su actividad biológica, por lo que se inició con los ensayos preliminares de purificación por cromatografía de intercambio iónico en donde la HGHR no fue eluída de una manera apropiada (*Sánchez-Domínguez, 1998*), lo que sugería que estaba agregada con otras proteínas del medio de cultivo.

Se sabía que el pH final de la fermentación a nivel matraz era 2.5 (*Sánchez-Domínguez, 1998*). Por otro lado, la HGH tiene mayor solubilidad a $pH=7-12.5$ (*Patra y cols, 2000*), por lo que en el presente estudio se decidió modificar la formulación del amortiguador de pH para tener un pH inicial=8 en el medio de cultivo y así mantener el rango de pH de mayor solubilidad para la HGHR. Además se comparó con una fermentación iniciada a $pH=6$, donde se observó que el pH disminuía considerablemente (hasta 2.8), la turbidez (grado de agregación) del medio de cultivo libre de células equivale a una $DO_{450\text{ nm}}=0.92$ y la producción fue de 16 mg/L de HGHR con una pureza del 40%. Mientras que en la fermentación iniciada a $pH=8$, este disminuyó a $pH=7.1$, además también se logró disminuir 11.4 veces el valor de turbidez

y aumentar la concentración de HGHR a 22.7 mg/L con una pureza del 11%. Estos resultados fueron alentadores ya que el valor de turbidez había disminuído bastante pero este parámetro no nos indicaba específicamente el grado de agregación de la HGHR, sino el de todas las proteínas presentes en el medio de cultivo fermentado.

Posteriormente, se inició con la purificación de la HGHR por cromatografía de intercambio aniónico, lográndose eluir la HGHR en forma de monómero a 100 mM de KCl y las formas agregadas a 300 mM de KCl. En esta etapa, se aumentó la pureza de la hormona de un 11% al 15% con un 70% de recuperación. Como se puede observar en la tabla 3, la etapa de precipitación se hizo con la intención de concentrar la muestra, ya que se obtiene un alto porcentaje de recuperación (98%) con respecto a la etapa anterior y la misma pureza. Fue necesario concentrar la muestra para poder pasarla por una columna de exclusión molecular ya que con esta técnica se obtiene muy diluída. En la cromatografía de exclusión molecular se recuperó el 70% y aumentó la pureza hasta un 99%. En la tabla 3 se puede observar que los porcentajes de recuperación en la cromatografía de intercambio aniónico y precipitación son similares a los obtenida por Oliveira y cols., en 1999 y Patra y cols., 2000, mientras que en la cromatografía de exclusión molecular fueron más bajos. Esto probablemente se debe a que el proceso se desarrollo por gravedad logrando un flujo de 0.1 ml/min, mientras que la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech recomienda de 1-5 ml/min. Con este esquema de purificación de tres etapas se logra un 48% de recuperación total y un 99% determinada por densitometría de EGPA-SDS. El esquema es más sencillo que el utilizado para HGHR producida como cuerpos de inclusión o como proteína secretada al espacio periplásmico que consiste de 6-7 etapas (Oliveira y cols, 1999; Patra y cols., 2000). Sin embargo, es de gran importancia estandarizar este esquema de purificación en un equipo

de cromatografía de líquidos de alta resolución, ya que cuando se hace la cromatografía en una jeringa y con flujo por gravedad depende mucho de la habilidad y experiencia de la persona y factores como la forma de empaque de la columna donde se debe tener cuidado de que no se formen burbujas, el aire disuelto en el eluyente y la adición del eluyente en forma muy rápida provocan mucha turbulencia y pueden introducir burbujas en la columna que hacen que los ensayos sean difíciles de reproducir. Si se desea utilizar este esquema de purificación para las demás GHs es necesario tomar en cuenta las condiciones de fermentación, ya que estas determinarán la calidad de la hormona. Además, se debe seleccionar el pH adecuado de trabajo durante la purificación y encontrar la concentración de sales en la cual se eluye la GH de interés en la cromatografía de intercambio aniónico.

Tabla 3. Comparación del porcentaje de recuperación de las etapas de purificación.

	<i>P pastoris</i>	<i>E coli</i>		
Localización	Medio extracelular	Cuerpos de inclusión	Espacio periplásmico	Medio extracelular
Intercambio Aniónico	70%	68%	84%	ND
Precipitación con (NH₄)₂SO₄	98%	ND	93%	ND
Exclusión Molecular	70%	78%	92%	ND

*ND=No disponible.

En el presente estudio se confirmó la identidad de la HGHR por espectroscopia de UV, geles en condiciones nativas y desnaturalizantes en condiciones reductoras y no reductoras, además del “western blot” y mostrar una actividad biológica similar a la

producida en *Escherichia coli*. Si se desea utilizar la HGHr producida y purificada de *P. pastoris* para administrarla a pacientes es necesario realizar una serie de pruebas que corroboren su pureza, identidad, integridad y actividad biológica, para lograr el efecto deseado sin reacciones adversas. Dentro de esta serie de pruebas de control de calidad se encuentran la determinación de ADN del huésped, ya que posee la capacidad de introducir ADN potencialmente oncogénico o transformante. También la determinación de péptidos contaminantes provenientes del huésped es de gran importancia, ya que pueden provocar reacciones alérgicas al paciente. Ciertas condiciones de manufactura y almacenamiento pueden inducir cambios químicos y físicos, los cuales pueden afectar la pureza, estabilidad, calidad y eficacia del producto. Los cambios químicos y post-traduccionales incluyen pero no están limitados a: cambios en la composición de carbohidratos, patrón de glicosilación, desamidación, oxidación, isomerización, fragmentación (hidrólisis) y rompimiento de puentes disulfuro. Si estas variantes tienen propiedades diferentes (solubilidad alterada, estabilidad *in vivo* e *in vitro*, pK y eficacia biológica) a las del producto deseado, serán impurezas del producto. Otro tipo de cambios son los físicos que incluyen procesos no covalentes tales como agregación, desnaturalización, precipitación y adsorción. Una alta concentración de producto cuando hay rompimiento, desnaturalización parcial o agitación mecánica pueden inducir agregación. Los agregados del producto tienen una estructura química idéntica pero difieren en estructura secundaria y terciaria (DiPaolo y cols, 1999).

9 CONCLUSIONES.

- 1 El pH final de las fermentaciones iniciadas a pH=6 y pH=8 fue de 2.8 y 7.1, respectivamente.
- 2 La concentración de HGHR en las fermentaciones iniciadas a pH=6 y pH=8 fue de 16 mg/L con 40% de pureza y 22.7 mg/L con 11% de pureza, respectivamente. Es decir, se produjo 1.4 veces más HGHR al nuevo pH. Además, la turbidez fue 11.5 veces menor.
- 3 Se estableció un esquema de purificación de 3 pasos, en el que se determinaron las condiciones óptimas para la cromatografía de intercambio aniónico y exclusión molecular, con un rendimiento total del 48% y una pureza del 99% estimada por densitometría de EGPA-SDS teñido con azul de Coomassie.
- 4 La espectroscopía de UV los geles en condiciones nativas y desnaturalizantes en condiciones reductoras y no reductoras, además del “western blot”, confirmaron la identidad de la hormona.
- 5 El ensayo con células Nb2 mostró que la HGHR producida en *P. pastoris* tiene una actividad lactogénica similar a la HGH comercial.

10 BIBLIOGRAFÍA.

Ausubel, F.M, Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1995). Short Protocols in Molecular Biology; A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. Tird Edition. Editorial Board, USA.

Becker, G.W., Hsiung, H.M. (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli* Purification and characterization. **204** (1): 145-150.

Beckman LF 3000 Series Protein Sequencer. Operation Manual. 1992, Beckman Instruments, Inc. Analytical Business Unit. Fullerton, CA 92634-3100.

Binder, L., Vogel, T., Hadary, D., Elberg, G., Gertier, A. (1989). Chimeric bovine-human growth hormone prepared by recombinant DNA technology: Binding properties and biological activitiy. *Molecular Endocrinology*. **3**(6): 923-930.

Bio-Rad Labs, "Ready gels application guide". Catalog number 161-0993.

Bio-Rad laboratories. 2000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547 USA. www.discover.bio-rad.com.

Boguszewski, C.L., Svensson, P.A., Jansson, T., Clark, R., Carlsson, M.S., Carlsson, B. (1988). Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83** (8): 2878-2885.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.

Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. **112**(2): 195-203.

Chang CN, Rey M, Bocchner B y Gray G. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene*, **55**: 189-196.

Chapman, G. E., Rogers, K. M., Brittain, T., Bradshaw, R. A., Bates, O. J., Turner, C., Cary, P. D., Crane-Robinson, C. (1981). The 20,000 molecular weight variant of human growth hormone. *The Journal of Biological Chemistry*. **256** (5): 2395-2401.

Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE, Seeburg PH. (1989). The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics*. **4**(4):479-97.

Clark RG, Mortensen DL, Carlsson LM, Spencer SA, McKay P, Mulkerrin M, Moore J, Cunningham BC. (1996). Recombinant human growth hormone (GH)-binding protein

enhances the growth-promoting activity of human GH in the rat. *Endocrinology*. (10):4308-15.

Cohen, S.A., Chang, H., Boyer, Helling, R. (1973). Construction of biological functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:3240-3244.

Cooke, N.E., Ray, J., Emery, J.G., Liebhaber, S.A. (1988). Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 9001-9006.

Darbre, A. (1986). Analytical methods. In practical Protein Chemistry: A Handbook (A. Darbre, ed.) John Wiley and Sons, New York. pp. 227-335.

Devos, M. A., Ultsch M., Kossiakoff, A. A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of complex. *Science*. 255:306-312.

DiPaolo, B., Pennetti, A., Nugent, L., Venkat, K. (1999). Monitoring impurities in biopharmaceuticals produced by recombinant technology. *PSTT*. 2 (2): 70-82.

Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A.F., Harpold, M. M., Gingeras, T. R. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 5(5):1111-21.

Escamilla-Treviño, L. L., (1996). Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHR) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL.

Faber, K.N., Harder., W., Veenhuis, M. (1995). Review: Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. *Yeast*. 11: 1131-1344.

Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, Pardo F, Biondi B y Sacca L (1996). A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.*, 334 (13): 809-814.

Flodh, H. (1986). Human growth hormone produced with recombinant DNA technology: development and production. *Acta Paediatr. Scand.* 325: 1-9.

Franchi, E., Maisano, F., Testori, S.A., Galli, G., Toma, S., Parente, L., Ferra, F.D., Grandi, G. (1991). A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnology*, 18: 41-54.

Frankenne, F., Scippo, M., Van Beeumen, J., Igout, A., Hennen, G. (1990). Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71 : 15-18.

Garza-Ulloa, H. (1986). Determination of Amino Acids in Wort and Beer by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *American Society of Brewing Chemists, Inc.* **44** (2), 47-51.

Gellerfors, P., Pavlu, B., Axelsson, K., Nyhlén C, Johansson S. (1990). Separation and Identification of Growth Hormone Variants with High Performance Liquid Chromatography Techniques. *Acta Paediatr Scand* (Suppl) **370**: 93-100.

Gershoni, J. M., y Palade, G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. Review. *Anal Biochem.* **131**(1):1-15.

Goeddel, D.V. (1991). Gene expression: Technology. Methods in enzymology Academic Press Inc.

Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itajura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozari, G., Crea, R., Seeburg, P. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*, **281**(5732): 544-548.

Gray, G.L., Baldrige, J.S., McKeown, K.S., Heyneker, H.L., Chang CN. (1985). Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene* **39**: 247-254.

Hames, B.D., y Rickwood, D. (1981). "Gel Electrophoresis of Proteins: A practical Approach", IRL Press Ltd., Oxford.

Harris, T.J.R. (1983). Genetic Engineering. (Ed) Academic Press, London, , **4**:127-185.

Hashimoto, Y., Kamioka, T., Hosaka, M., Mabuchi, K., Mizuchi, A., Shimazaki, Y., Tsuno, M., Tanaka, T. (2000). Exogenous 20 K growth hormone (GH) suppresses endogenous 22K GH secretion in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85** (2): 601-606.

Henry, J. B. (1993). Diagnóstico y tratamiento clínicos. Masson-Salvat Medicina. 9ª Edición. pp.318-320.

Hsiung, H.M., Cantarell, A., Luirink, J, Udega, B, Veros, A. J, y Becker., G. W. (1989). Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Biotechnology.* **7**:267-271.

http://www.ubi.pt/~ubiquim/revistas/rev5_2.html

Igout, A., Van Beeumen, J., Frankenne, F., Scippo, M. L., Devreese, B., Hennen, G. (1993). Purification and biochemical characterization of recombinant human placental growth hormone produced in *Escherichia coli*.. *Biochem. J.* **295**: 719-724.

Igout, A., Scippo, M.L., Frankenne, F., Hennen, G. (1989). Expression and secretion of the human placental growth hormone in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 17 (10): 3998.

Invitrogen (2000). Products for Gene Expression and Analysis. Instruction manual. Pichia Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Version L.

Kato, C., Kobayashi, T., Kudo, T., Furusato, T., Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Ohtsukaa, E., Ikehara, M., Yanagida, T., Kato, H., Moriyama, S., y Horikoshi, K. (1987). Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *E. coli*. *Gene*. 54:197-202.

Kelley, R.F., Winkler, M.E. (1990). Folding of eukariotic proteins produced in *Escherichia coli*. *Genetic Engineering*. 12:1-19.

Kenneth, C. O., Fenno, J., Lin, N., Harkins, R. N., Snider, C., Khor, W. H., Ross, M. J., Douglas F., Prender, G., Stebbing, N. (1981). Purified growth hormone from *E. coli* is biologically active. *Nature*. 293 (1): 408-411.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (259):680-5.

Lowe, P.E., Rhind, S.K., Sugrue, R., Marston F.A.O. (1987). Protein purification: Micro to Macro. Alan R. Liss Inc. 429-442.

Marston F.A.O. (1986). The purification of eukariotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 240:1-12.

Marston F.A.O., Lowe, P.A., Doel, M., Schoemaker, J.M., White, S., Angal, S. (1984). Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 2:800-804.

Mendoza Maldonado, R. (1996). Hormona del crecimiento humana recombinante (HGHR) biosíntesis, purificación y producción de anticuerpos monoclonales. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL.

Mitraki, A., King, J. (1989). Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio/Technology*. 7:690-697.

Murray P. Deutscher. *Methods in Enzymology* Vol 182: Guide to Protein Purification. P: 613. Academic Press, Inc. 1990. San Diego, California.

Neville, D.M. (1971). Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J. Biol. Chem.*, 246(20):6328-34.

O'Connor B.H., Oeswein J.Q. (1993). "Formulación acuosa farmacéuticamente aceptable y estable de Hormona de Crecimiento Humana". Genetech, Inc. San Francisco, California, U.S.A. México, D.F.

Oliveira, J.E., Soares, C.R.J., Peroni, C.N., Gimbo, E., Camargo, I.M.C., Morganti, L., Bellini, L.H., Affonso, R., Arkaten, R.R., Bartolini, P., Ribela, M.T.C.P. (1999). High yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in *Escherichia coli* periplasmic space. *Journal of Chromatography A*. **852**:441-450.

ORIGEN technology Jill White Tel: 800-336-4436..

Patra, A.K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg L.C., Panda, A.K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *E. coli*. *Protein Expression and Purification*. **18**: 182-192.

Pavlakakis, G.N., Hizukaa, N., Gorden, P., Seburg, P.H., Hamer, D.H. (1981). Expression of two human growth hormone genes in monkey cell infected by simian virus 40 recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**:7398-7402.

Pharma Business. PMFARMA (www.pmfarma.com).

Ray, J., Jones, B.K., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E. (1989). Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology*, **125**:566-568.

Reisfeld, R.A., Lewwis, U.J. y William, D.E. (1962). *Nature*. 195-281.

Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare., J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast*, **8**:423-488.

Rye P.D. and Bovin N.V. (1998). Carbohydrate affinity PAGE for the study of carbohydrate-binding proteins. *Biotechniques*. **25**(1):146-51.

Sacca L, Fazio S. (1996). Cardiac performance: growth hormone enters the race. *Nature Medicine*, **2** (1):29-31.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda Edición. Cols. Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

Sanchez-Dominguez, C.N. (1998). Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de hormona del crecimiento humana recombinante y evaluación de esquemas de purificación. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, UANL.

Siegel, R.S., Brierley, R.A. (1989). Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**:403-404.

Thomas G.B., Bennett, P.A., Carmignac, D.F., I.C.A.F. Robinson. Glucocorticoid regulation of growth hormone (GH) secretagogue-induced growth responses and GH secretagogue receptor expression in the rat. *Growth Hormone & IGF Research* 2000, **10**, 45–52.

Tokunaga, T., Iwai, S., Gomi, H., Kodama, K., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Chisaka, O., Matsubara, K. (1985). Expression of synthetic human growth hormone gene in yeast. *Yeast*, **39**:117-120.

Wang, D.S., Sato, K., Demura, H., Kato, Y., Maruo, N., Miyachi, Y. (1999). Osteo-anabolic effects of human growth hormone with 22K- and 20K Daltons on human osteoblast-like cells. *Endocr. J.* **46** (1): 125-132.

Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**(16): 4406-12.

Wilbur H. Campbell, 1996, 1997; wcampbel@mtu.edu.

Williams, D.C. , Van Frank , R. M. , Muth, W.L., Burnett, J.P. (1982). Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science*. **215**:687-689.

Wood, D. C., Salsgiver, W. J., Kasser, T. R., Lange, G. W., Rowold, E., Violand, B. N., Johnson, A., Leimgruber, R. M., Parr, G. R., Siegel, N. R., Kimack, N. M., Smith, C. E., Zobel, J. F., Ganguli, S. M., Garbow, J. R., Bild, G., Krivi, G. G. (1989). Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. *The Journal of Biological Chemistry*. **264** (28): 14741-14747.

APÉNDICE

REACTIVOS

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

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

500X B (0,02 % biotina)

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

100XH (0.4 % histidina)

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

Amortiguador de fosfato de potasio 1 M pH 6.0.

Combinar 132 mL de 1 M K_2HPO_4 y 868 mL de 1 M KH_2PO_4 .

Amortiguador de fosfato de potasio 1 M pH 8.0.

Combinar 132 mL de 1 M K_2HPO_4 y 868 mL de 1 M KH_2PO_4 .

BMG pH=6 (Medio mínimo amortiguado con Glicerol)

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

BMG pH=8 (Medio mínimo amortiguado con Glicerol)

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

BMM pH=6 (Medio mínimo amortiguado con metanol)

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

BMM pH=8 (Medio mínimo amortiguado con metanol)

Mezclar 792.5 mL de agua destilada y 100 mL de Amortiguador de fosfatos pH=8.0. Esterilizar por autoclave y después agregar 7.5 mL de metanol, 100 mL de YNB 10X y 2 mL de biotina 500X. Almacenar a 4°C, la vida media es de un año.

Acrilamida-bisacrilamida

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

1.5 M Tris-HCl pH 8.8

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

0.5 M Tris-HCl pH 6.8

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

SDS 10 %

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

Amortiguador de muestra 2X para EGPA-SDS:

Mezclar las siguientes cantidades de reactivos:

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

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

Persulfato de amonio 10 %

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

Amortiguador de corrida 5X para EGPA-SDS

Mezclar las siguientes cantidades de reactivos:

	1 L
Tris	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g

Aforar a 1 L con agua destilada y verificar el pH (8.3 +/- 0.2). No ajustar.

Amortiguador de muestra 2X para EGPA-Nativo:

Mezclar las siguientes cantidades de reactivos:

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

Amortiguador de corrida 5X para EGPA-Nativo

Mezclar las siguientes cantidades de reactivos:

	1 L
Tris	15 g
Glicina	72 g

Aforar a 1 L con agua destilada y verificar el pH (8.3 +/- 0.2). No ajustar.

Solución fijadora

Metanol 50 % y ácido acético 10 %.

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

Solución colorante de Coomassie

Azul brillante de Coomassie G 0.25 g, Metanol 500 mL, ácido acético 100 mL. Aforar a 1 L con agua destilada.

Solución decolorante:

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

0.5 M EDTA pH 8.

Agregar 186.1 g de Na₂EDTA.2H₂O a 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8 con NaOH 10 N y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min.

1 M Tris-HCl pH 8.8-9

Disolver 121.1 g de Trizma en 700 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min.

1 M DTT.

Disolver 0.154 g de DTT en 1 ml de agua mili Q y mantener a -20°C tapados con papel aluminio.

0.2 M PMSF.

Disolver 0.35 g de PMSF en 10 ml de isopropanol y mantener a -20°C tapado con papel aluminio.

Amortiguador de diálisis para medio de cultivo.

Mezclar las siguientes cantidades de reactivos:

	1 L
1 M Tris-HCl pH 8.8-9	50 mL
0.5 M EDTA pH=8	2 mL
1 M DTT	1 mL
0.2 M PMSF	10 mL

Aforar a un litro con agua destilada..

Amortiguador sin KCl para la columna de intercambio aniónico.

Mezclar las siguientes cantidades de reactivos:

	1 L
1 M Tris-HCl pH 8.8-9	50 mL
0.5 M EDTA pH=8	2 mL
1 M DTT	1 mL
0.2 M PMSF	10 mL

Aforar a un litro con agua mili Q estéril.

Amortiguador con KCl para columna de intercambio aniónico.

Mezclar las siguientes cantidades de reactivos:

	1 L
1 M Tris-HCl pH 8.8-9	50 mL
0.5 M EDTA pH=8	2 mL
1 M DTT	1 mL
0.2 M PMSF	10 mL
KCl	149.1

Aforar a un litro con agua mili Q estéril.

Eluente para equilibrar la columna de intercambio aniónico.

Mezclar 0.25 ml de amortiguador con KCl y 9.75 ml de amortiguador sin KCl para columna de intercambio aniónico.

Eluente para cromatografía de intercambio aniónico.

100 mM KCl

Mezclar 0.5 ml de amortiguador con KCl y 9.5 ml de amortiguador sin KCl para columna de intercambio aniónico.

200 mM KCl

Mezclar 1 ml de amortiguador con KCl y 9 ml de amortiguador sin KCl para columna de intercambio aniónico.

300 mM KCl

Mezclar 1.5 ml de amortiguador con KCl y 8.5 ml de amortiguador sin KCl para columna de intercambio aniónico.

Eluente para cromatografía de exclusión molecular.

Mezclar 0.5 ml de amortiguador con KCl y 9.5 ml de amortiguador sin KCl para columna de intercambio aniónico.

PBS

Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄ en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a un litro con agua mili Q estéril.



