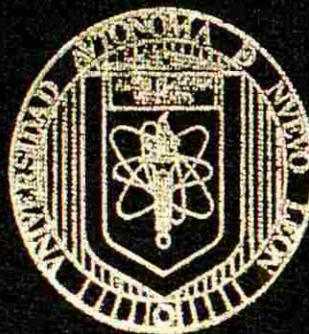


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



UTILIDAD DE UNA ETIQUETA DE POLI-HISTIDINA
PARA LA PURIFICACION DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO BOVINO RECOMBINANTE

POR

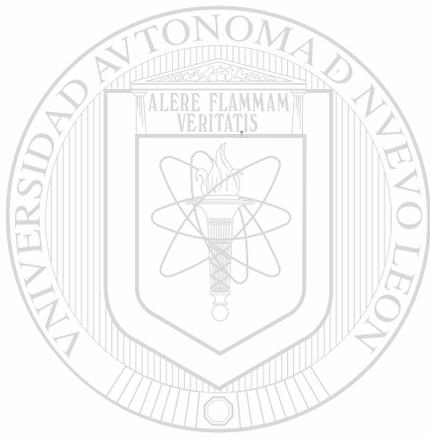
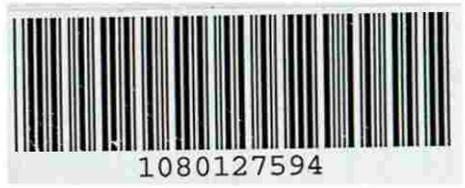
Q.F.B. MARIA DEL R. ROCHA PIZANA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Monterrey, N. L., Septiembre del 2005

TM
QP572
S6
R6
2005
c.1

O.F.B. MARIA DEL R. ROCHA PIZANA



UANL

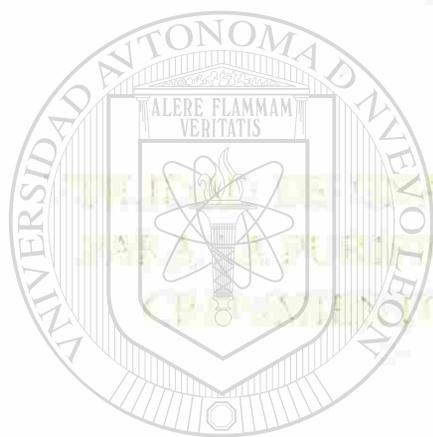
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



UANL

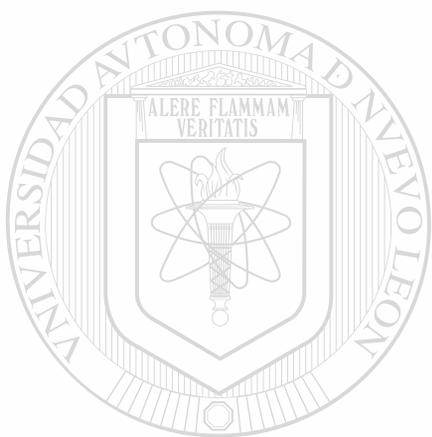
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
D.F.B. MARÍA DEL R. ROSA PIZARRA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

CON REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Monterrey, N. L., Septiembre 2015

TM
QPS 72
.S6
R6
2005



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



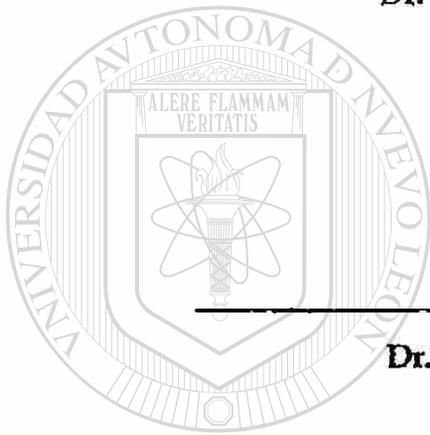
**UTILIDAD DE UNA ETIQUETA DE POLI-HISTIDINA PARA LA
PURIFICACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO BOVINO
RECOMBINANTE**

Aprobación de la Tesis:



Dr. HUGO A. BARRERA SALDAÑA

Director de Tesis



Dr. GERARDO R. PADILLA RIVAS

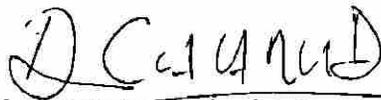
Co-director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Dr. FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO

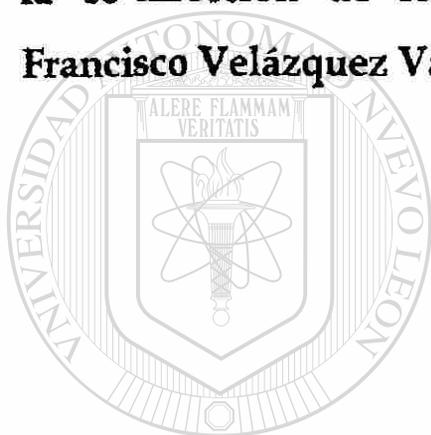
Co-director de Tesis



Dr. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector de Estudios de Postgrado

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.; bajo la dirección del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y la co-dirección de los Doctores Gerardo R. Padilla Rivas y Francisco Velázquez Vadillo.



UANL

Vo. Bo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dr. HUGO A. BARRERA SALDAÑA

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida, por la fuerza, por ser mi reposo, la paz, la bondad y el amor. CONOZCO QUE TODO LO PUEDES.

A mi familia y en especial a mis papás Ing. **Ismael Rocha Ortiz** y **Rosalinda Pizaña de Rocha**, por el gran apoyo que siempre me dan, gracias por ser mi inspiración para superarme, por ser mis padres. A mis hermanos (**Rosario, Israel, Myriam, Elizabeth, Clarck, H. Ariel**) por su compañía tan cercana gracias al Internet, por que me quieren y porque me inspiran (puro cerebro!!).

A mis compañeras de generación: **Eda** y **Edith** por la buena experiencia que vivimos en la ULIEG.

A mis compañeros de laboratorio: **Iram, Luz, Ali, Chiú, Oscar, Clara** y **Elva** por todo lo que aprendí de ustedes y todo lo que compartí, sobre todo la emoción de los lunes al mediodía.

A los estudiantes de la ULIEG, **Margarita, Iván, Irma, Naika, Ángel** y **Karina** por ser compañeros y grandes amigos.

A los trabajadores: **Carmen Garza** gracias por ser una excelente persona y amiga, **Michelle** y **Christian** por toda su ayuda y su bellísima compañía.

A los de computación **Andrés, Fito, Alfredo** por todo el apoyo en mi tesis.

A las secretarías: **Denisse, Raquel, Normis, Juany, Iracema, Lupita** y **Sandra** por ser unas personas súper amables y siempre dispuestas a ayudar.

A los Doctores por su enseñanza: **Hugo Barrera**, todo mi respeto, confianza y admiración. **Jorge Ascacio** mil gracias por tu valiosísima ayuda, gracias a Dios que pude contar con ella. **Herminia Martínez, Francisco Velázquez, Gerardo Padilla** y **Agnés Revol** muchísimas gracias por todo lo que me enseñaron, es lo mejor que me llevo.

GRACIAS A TODOS!!

INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xii
 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	
1.1 Proteínas recombinantes.....	1
1.2 Hormona del crecimiento bovino recombinante (BGHr).....	2
1.3 Propiedades físicas y químicas de la BGH.....	4
1.4 Sistemas de expresión.....	5
1.4.1 <i>Pichia pastoris</i>	7
1.5 Proceso de purificación.....	8
1.5.1 Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados.....	10
1.5.1.1 Etiqueta de poli-histidina.....	11
1.6 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	15
 CAPÍTULO II: OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16

CAPÍTULO III: ESTRATEGIA GENERAL.....	17
--	-----------

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL.....	18
--------------------------	-----------

4.1.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.....	18
---	----

4.1.2 Biológicos.....	19
-----------------------	----

4.1.3 Equipo.....	19
-------------------	----

4.2 MÉTODOS.....	21
-------------------------	-----------

4.2.1. Construcción de plásmidos.....	21
--	-----------

4.2.1.1 Amplificación del casete de BGH.....	24
--	----

4.2.1.2 Clonación de fragmentos amplificados en pTOPO.....	25
--	----

4.2.1.3 Caracterización de clonas candidatas.....	25
---	----

4.2.1.4 Secuenciación.....	26
----------------------------	----

4.2.1.5 Subclonación en pPIC9.....	26
------------------------------------	----

4.2.1.6 Transformación "Ultra-competente" de <i>E. coli</i>	29
---	----

4.2.1.6.1 Preparación de las bacterias.....	29
---	----

4.2.1.6.2 Transformación de las bacterias.....	29
--	----

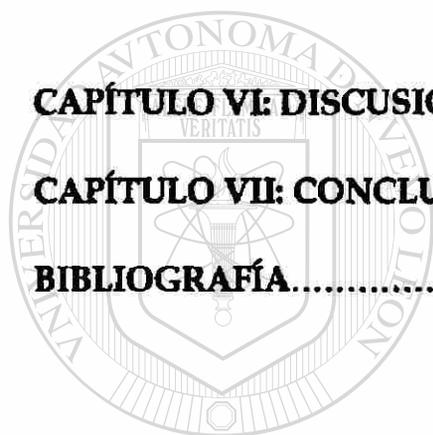
4.2.1.7 Caracterización por PCR y con enzimas de restricción.....	30
--	----

4.2.1.8 Caracterización por secuenciación nucleotídica.	30
--	----

4.3 Integración de los vectores pPIC9bGH, pPIC9NH-6His-bGH y pPIC9bGH-6His-COOH al genoma de <i>P. pastoris</i>.....	31
---	-----------

4.3.1	Protocolo para electroporación en <i>P. pastoris</i>	31
4.3.2	Reacción de PCR para confirmar la integración genómica.....	32
4.4	Fermentación en matraz.....	34
4.5	Producción en biorreactor.....	35
4.6	Ultraconcentración de las muestras.....	35
4.7	Western blot.....	35
4.7.1	Transferencia electroforética.....	35
4.7.2	Inmunotinción.....	37
4.8	Pruebas de purificación.....	38
 CAPÍTULO V: RESULTADOS		
5.1	Diseño de primers y amplificación del casete de la BGH.....	39
5.1.1	Diseño de primers y amplificación para pPICNH ₂ -6His-BGH... 39	39
5.1.1.1	Etiqueta de poli-histidina en el vector pPIC9.....	41
5.1.2	Diseño de primers y amplificación para pPICBGH-6His-COOH. 42	42
5.1.3	Diseño de primers y amplificación para pPICBGH.....	44
5.2	Clonación de los fragmentos amplificados en el vector	
	pCR®-XL-TOPO®.....	45
5.2.1	Caracterización de las clonas candidatas.....	45
5.3	Subclonación de los fragmentos en el vector pPIC9.....	47
5.3.1	Caracterización por digestión y PCR de las clonas candidatas	
	en pPIC9.....	48

5.3.2 Caracterización por secuenciación.....	48
5.4 Incorporación de los plásmidos en el genoma de <i>P. pastoris</i>	51
5.5 Fermentaciones a nivel matraz.....	52
5.5.1. Análisis de los geles.....	52
5.6 Fermentaciones en biorreactor.....	54
5.7 Ensayos preliminares de purificación.....	56
5.8 Western blot.....	57
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.....	58
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	65



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características de <i>Escherichia coli</i> (E.coli) y <i>Pichia pastoris</i>	6
Cuadro 2. GHs producidas y semi-purificadas en el laboratorio de Biotecnología.....	8
Cuadro 3. Programa para la amplificación del casete de la BGH.....	24
Cuadro 4. Condiciones de PCR para la amplificación del casete de la BGH.	24
Cuadro 5. Cuadro de resultados obtenidos en la semipurificación de la NH ₂ (His) ₆ BGH por IMAC.....	57
Cuadro 6. Características de proteínas recombinantes producidas, según el programa ProtParam tool.....	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Funciones metabólicas de la BGH.....	4
Figura 2 Purificación por etiquetas de poli-histidina.....	12
Figura3. Estrategia general.....	17
Figura 4. Esquema de construcción del plásmido pPIC9NH ₂ -6His-bGH....	22
Figura 5. Esquema de construcción del plásmido pPICBGH-6His-COOH.	23
Figura 6. Esquema de construcción del plásmido portador del casete de la BGH.....	23
Figura 7. Digestiones para subclonación en pPIC9.....	27
Figura 8. Ligaciones para subclonación en pPIC9.....	28
Figura 9. Recombinación en el genoma de <i>P. pastoris</i>	33
Figura 10. Primers para amplificar el casete de la BGH para la construcción pPICNH ₂ -6His-BGH	40
Figura 11. Amplificación con primers para la construcción pPICNH ₂ -6His-BGH.....	40
Figura 12. Primers para introducir poli-histidina al vector pPIC9.....	41
Figura 13. Amplificación con primers que incorpora poli-histidina al vector pPIC9.....	42
Figura 14. Primers para la construcción del vector pPICBGH-6His-COOH.....	43

Figura 15. Amplificación con primers para la clonación del casete BGH para la construcción pPICBGH-6His-COOH.....	43
Figura 16. Primers para la construcción pPICBGH.....	44
Figura 17. Amplificación para la construcción pPICBGH.....	45
Figura. 18. Caracterización por PCR con primers M13.....	46
Figura 19. Caracterización por digestión con <i>Eco</i> RI y <i>Pvu</i> II.....	46
Figura. 20. Caracterización en pTOPO.....	47
Figura 21. Preparación de los fragmentos y del vector para la subclonación.....	47
Figura 22. Caracterización por PCR y por digestión.....	48
Figura 23. Primers pPIC9FM y pPIC9RM.....	49
Figura 24. Verificación por secuenciación nucleotídica	50
Figura 25. Plásmidos construidos.....	50
Figura 26. PCR con primers AOX1 para corroborar la presencia del casete de expresión de la BGH.....	51
Figura 27. Fermentaciones a nivel matraz.....	52
Figura 28. Análisis de los geles.....	53
Figura 29. Fermentación en biorreactor de la NH ₂ (His) ₆ -BGH.....	54
Figura 30. Fermentación en biorreactor de la BGH-(His) ₆ -COOH.....	55
Figura 31. Semipurificación de la NH ₂ (His) ₆ BGH.....	56
Figura 32. Análisis por Western blot.....	57
Figura 33. Fermentación a nivel tubo para ensayos de pH.....	60

ABREVIATURAS

AOX1	Alcohol oxidasa 1
bGH	Gen de la hormona del Crecimiento Bovino
BGH	Hormona del Crecimiento Bovino
BGHr	Hormona del Crecimiento Bovino recombinante
BMGY	Medio rico amortiguado con glicerol
BMMY	Medio rico amortiguado con metanol
°C	Grados Celsius
CaCl₂	Cloruro de Calcio
DNA	Acido desoxirribonucleico (ADN)
DNAc	DNA complementario al ARNm
dNTPs	Desoxirribunucleósidos trifosfatados
DMSO	Dimetil Sulfóxido
D.O.	Densidad Óptica
EDTA	Acido etilendiamino tetracético.
g	Gravedades
GH	Hormona del crecimiento
gr	Gramos
hrs	Horas
Kb	Kilopares de bases
KDa	Kilodaltons
LB	Luria B (caldo de crecimiento)

M	Concentración Molar
min	Minutos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
ml	Militros
µl	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
Mut⁺	Metanol utilization plus
Mut^s	Metanol utilization slow
M.P.M.	Marcador de peso molecular para proteínas.
MQ	Agua ultrapura (NANO pore)
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de Sodio
Ng	Nanogramos
NaOH	Hidróxido de Sodio
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos (en inglés)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés)
PGE	Polietilenglicol
pb	Pares de bases
pH	-log [H ⁺]
p/v	Relación peso/volumen
psi	Libras por pulgada cuadrada

RDB Base de Dextrosa para Regeneración (en inglés)

RNA Acido Ribonucleico (ARN)

RNA_m Acido Ribonucleico mensajero

rpm Revoluciones por minuto

SDS Lauril sulfato de sodio

seg Segundos

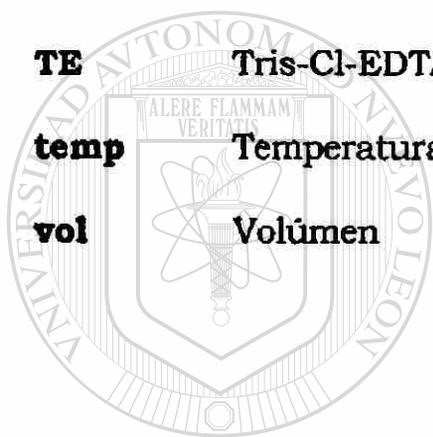
Taq *Thermus acuaticus*

TBE Tris-Borato-EDTA

TE Tris-Cl-EDTA.

temp Temperatura

vol Volúmen



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Q.F.B. María del Refugio Rocha Pizaña Fecha de graduación: Septiembre del 2005

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León

Título del estudio: Utilidad de una etiqueta de poli-histidina para la purificación de la hormona del crecimiento bovino recombinante.

Número de páginas: 69

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

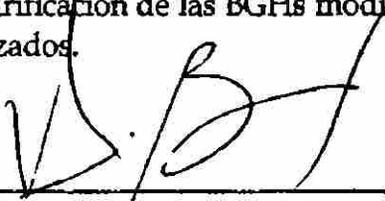
Área de Estudio:

Biotechnología

Introducción: La hormona del crecimiento bovino (BGH) es secretada en la hipófisis anterior de los vertebrados, consta de 191 aminoácidos y posee un peso molecular 22 KDa. Su administración produce en el ganado bovino crecimiento más rápido, un mayor aprovechamiento del alimento, aumento de la producción de leche, mejora de calidad en la carne, en desarrollo folicular provoca una mejor respuesta a la inducción de la ovulación múltiple en vacas.

Objetivo y metodología: El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una etiqueta de seis histidinas en la expresión y la purificación de la BGHr, construyendo tres versiones del casete de la BGH: una con la etiqueta en la región amino, otra en el carboxilo y una última sin etiqueta. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el DNAc de la BGH, incluir las etiquetas y dotar de los sitios de restricción para la estrategia de clonación. Los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector pTOPO y posteriormente subclonados en el vector pPIC9. Estas construcciones fueron caracterizadas por PCR, digestión enzimática y secuenciación, para finalmente linealizarlas e introducir las por recombinación en el genoma de *Pichia pastoris*. De cada construcción se seleccionaron clones y fueron fermentadas en matraz primero y a nivel de biorreactor posteriormente. Se semi-purificó la BGH usando la Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados (IMAC).

Contribuciones y conclusiones: La modificación del casete de la BGH, para introducirle etiquetas de poli-histidina, resultó compatible con su expresión. Las etiquetas favorecieron la semi-purificación de las BGHs modificadas por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados.



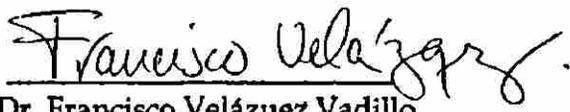
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

Director de tesis



Dr. Gerardo Padilla Rivas.

Co-director



Dr. Francisco Velázquez Vadillo

Co-director

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas recombinantes.

En 1973, cuando se inventó la tecnología del DNA recombinante o Ingeniería Genética, se empezó a manipular el DNA para aislarlo de un organismo e introducirlo a otro, consiguiendo la síntesis de proteínas que no se producían en el nuevo huésped; éstas son las denominadas proteínas recombinantes.

En la actualidad hay un gran número de proteínas recombinantes producidas con fines de diagnóstico, investigación y tratamiento, y cada día es mayor la demanda y producción de ellas, dadas sus siguientes ventajas: ¹

- Pueden ser producidas convenientemente en microorganismos, cultivo de células, plantas o animales completamente ajenos a su origen natural, tal es el caso de la producción de insulina en bacterias, anticuerpos humanos en plantas y vacunas en levaduras.
- Se producen grandes cantidades de proteína, resultando más barato y más fácil de purificar en comparación con el purificado a partir de su fuente natural.
- Se obtienen productos libres de patógenos y otros riesgos potenciales. Esto es particularmente importante en el caso de los productos farmacéuticos, ya que mucha gente ha contraído enfermedades como

SIDA y hepatitis B o C por empleo de hormonas o factores derivados de suero o sangre de terceros (por ejemplo, los factores de coagulación para el tratamiento de la hemofilia, los cuales ahora pueden administrarse como proteínas recombinantes, libres de contaminación).

- Pueden producirse proteínas que no existen en la naturaleza, como los anticuerpos de cadena simple, útiles en el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades.

Cada día es mayor la demanda y producción de proteínas recombinantes, y por esto también cada día se está buscando mejorar los procesos de purificación de las mismas.

1.2 Hormona del crecimiento bovino recombinante (BGHr).

En la década de 1930 científicos rusos reportaron que la inyección con extractos de pituitaria bovina aumentaba la producción de la leche en las vacas². Posteriormente este incremento fue atribuido a la BGH. Estos extractos sin embargo, no fueron comercializados por obtenerse muy poca proteína a partir de ellos y además por ciertas contaminaciones que se registraron. Con el surgimiento de la ingeniería genética a principios de la década de 1970, fue posible fabricar grandes cantidades de esta hormona. Ya para la década de 1980 se había demostrado que la BGH obtenida a partir del proceso biotecnológico aumentaba la producción de la leche y era segura para los consumidores³.

La administración de la BGHr, provoca en el ganado bovino un crecimiento más rápido, un mayor aprovechamiento del alimento, aumento de la producción de leche y la mejora de calidad en la carne ⁴⁵. También se ha reportado que su administración favorece el desarrollo folicular en folículos de desarrollo medio y avanzado, provocando una mejor respuesta a la inducción de la ovulación múltiple en vacas⁶. Además, se ha descrito ya su utilidad en el ganado caprino para aumentar la producción de leche³.

En reportes realizados en Estados Unidos la BGHr aumentó la producción de la leche cerca de un 1% en un año (en 1999), trayendo este incremento como consecuencia la disminución en los precios de la leche y a raíz de esto una serie de beneficios económicos a los ganaderos¹¹.

Dados sus atributos anabólicos y lactopoyéticos, para el sector ganadero la BGHr resulta de gran interés, requiriéndose mejores alternativas para su producción y purificación.

1.3 Propiedades físicas y químicas de la BGH.

La BGH es una proteína globular que consta de 191 aminoácidos⁷ y posee un peso molecular es de 22,000 daltones en su forma madura⁸. Como pre-hormona posee una extensión de 26 aminoácidos en el extremo N-terminal que actúa como péptido señal para su secreción⁹.

Este importante regulador metabólico es secretado en la hipófisis anterior y sus acciones fisiológicas más importantes son estimular directa o indirectamente procesos biológicos como la división celular, el crecimiento esquelético y la síntesis proteica¹⁰ (ver figura 1). Produce otros efectos, como el incremento en la oxidación de las grasas e inhibición del transporte de glucosa a los tejidos corporales^{5,11}.

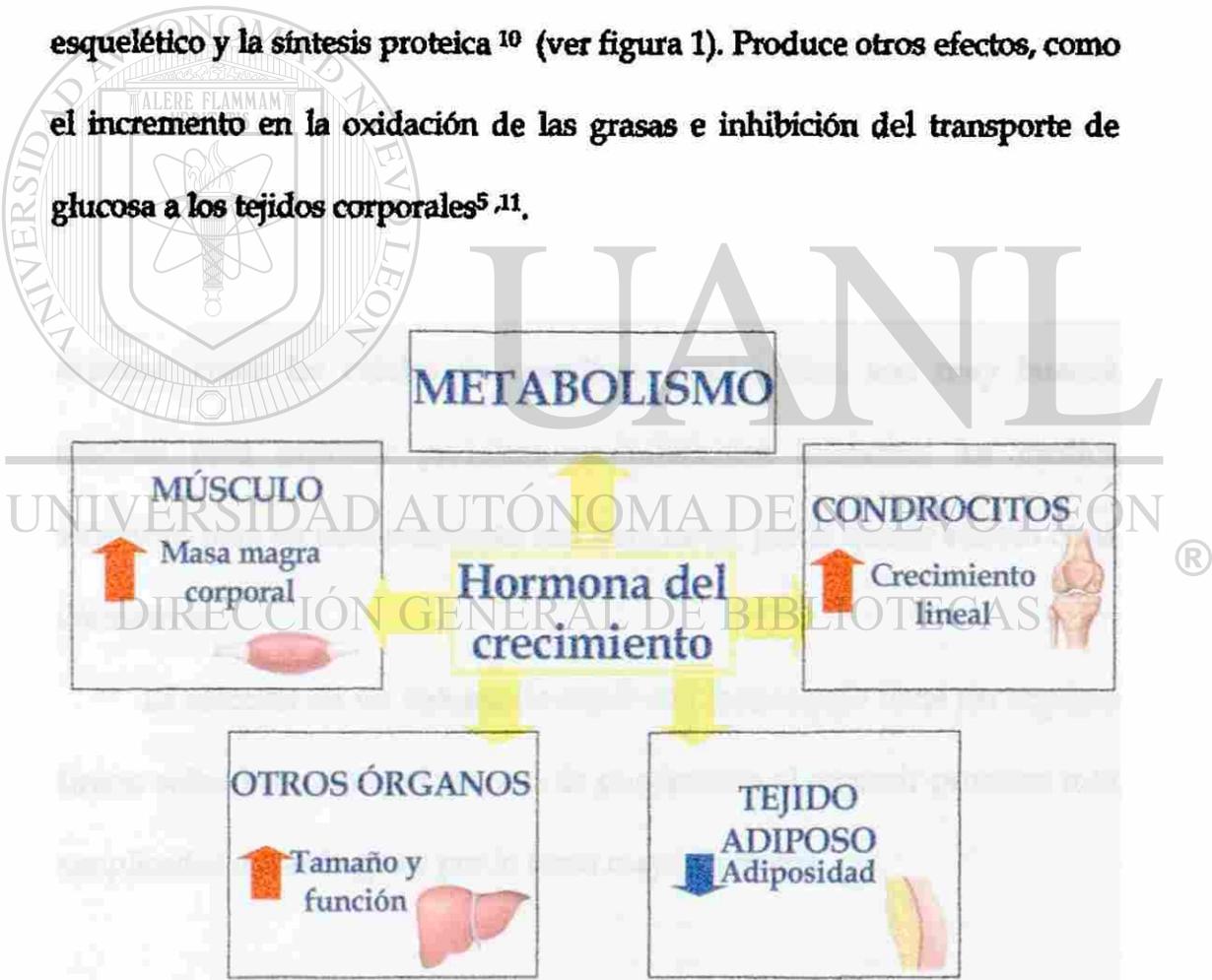


Figura 1. Funciones metabólicas de la BGH. Algunos de los órganos blancos de la BGH son el músculo, los huesos, el tejido adiposo, y otros órganos como hígado, corazón, etc. Actúa aumentando el tejido muscular, la función y el tamaño de algunos órganos, así como disminuyendo el tejido adiposo y aumentando el crecimiento lineal entre otras funciones^{3,8,12}.

1.4 Sistemas de expresión.

Elegir un sistema de expresión es un punto importante a considerar para la posterior selección del proceso de purificación de la proteína recombinante. Se consideran los siguientes puntos; 1) Si la proteína de interés requiere modificaciones pos-traduccionales (glicosilación, fosforilación, sulfatación y otros), es preferible que se seleccione un organismo que pueda llevarlas a cabo, como uno eucariota. 2) La forma en la que nuestro organismo huésped procesará la proteína de interés, si la liberará al medio de cultivo o la acumulará en forma de cuerpos de exclusión (en *Escherichia coli*), 3) La cantidad y tipo de proteínas endógenas que produce el huésped de expresión que puedan interferir con la purificación de la proteína recombinante. 4) Los requerimientos del huésped de expresión ya que hay sistemas, como las células de mamífero, que si bien, son muy buenos sistemas para expresar proteínas recombinantes humanas, los medios necesarios para su mantenimiento son muy caros, por lo que se buscan otras alternativas.

La elección de un sistema de expresión inadecuado tiene un impacto directo sobre los costos del proceso de purificación al requerir procesos más complicados o más largos y por lo tanto mayores costos.

E. coli. es un organismo que tiene grandes ventajas y es uno de los mayores productores de proteínas recombinantes. En nuestro laboratorio ya se ha trabajado con él y tuvo una buena producción de BGHr y GH humana (HGHr), pero al querer separar la proteína de unión a maltosa de la hormona (BGHr o HGHr), se dificultó el proceso,¹³ por lo que se buscó un nuevo sistema para superar estos problemas. Para lo anterior se seleccionó la levadura *Pichia pastoris*, la cual al ser un organismo eucariota, ofrecía de inicio la ventaja sobre *E. coli* (ver cuadro 1) de procesar proteínas heterólogas de una forma más parecida al proceso natural.

Cuadro 1. Características de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pichia pastoris* (*P. pastoris*).

<i>E. coli</i> 	<i>P. pastoris</i> 
<ul style="list-style-type: none"> • Sencillo. • Económico. • Fácilmente manipulable. • Para la mayoría de las proteínas recombinantes. <p>En hormonas de crecimiento se han obtenido:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 800 mg/L de HGH intracelular • ~3 mg/L de HGH extracelular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fácilmente manipulable. • Gran preferencia por el metabolismo respiratorio, lo que permite cultivos más densos que otras levaduras. • >400 g/L p. húmedo de biomasa. • Expresión intra o extracelular de proteínas. • Plegamiento correcto de proteínas. • Modificaciones postraduccionales mejores que los de <i>S. cerevisiae</i> (procesamiento proteolítico, glicosilación y formación de puentes disulfuro). • Muy altos niveles de secreción de proteína heteróloga, con escasa secreción de proteína nativa. • Promotor <i>AOX1</i> inducido por metanol. • Sistema más barato y más rápido que los de eucariotas superiores.

1.4.1 *Pichia pastoris*.

P. pastoris se ha usado desde 1984 para producir unas 300 proteínas recombinantes¹⁴.

Esta levadura metilotrófica ofrece, entre otras, las siguientes ventajas:

a) La secreción de proteínas endógenas de *P. pastoris* es baja, por lo que la purificación de la proteína exógena es más sencilla¹⁵, b) Las proteínas no son hiperglicosiladas por esta levadura y la longitud de la cadena de azúcares agregados es más corta que en el caso de *S. cerevisiae*; c) Los niveles de producción de biomasa alcanzan densidades celulares de hasta 400g/L, y d) puede secretar la proteína recombinante al medio de cultivo¹⁶.

Esta levadura es usada como un sistema de expresión de proteínas recombinantes, donde el gen de interés se encuentra regulado por el promotor de la alcohol oxidasa I (AOX1), de modo que la expresión de la proteína es inducida cuando se agrega metanol al sistema, como su única fuente de carbono¹⁷.

Muchos trabajos publicados han reportado muy buenas producciones de proteínas expresadas en este sistema; Ouyang y cols (2003) reportaron que la producción de la GH porcina alcanzó el 90% de las proteínas secretadas en el medio, permitiendo la purificación en sólo dos pasos¹⁸.

En nuestro laboratorio ya se han clonado y expresado una media docena de GHs¹⁹ y algunas de ellas ya se han producido a nivel de

biorreactor,²⁰ (ver cuadro 2), por lo que está demostrado que este sistema es adecuado para trabajar.

Cuadro 2. GHs producidas y semi-purificadas en el laboratorio de Biotecnología.

HORMONA	PRODUCCIÓN mg/L	PUREZA
CFGH (hormona del perro)	170	50%
ECGH (hormona del caballo)	100	63%
BGH (hormona de la vaca)	150	56%
FCGH (hormona del gato)	90	70%
HGH (hormona humana)	80	75%
HPL (lactógeno placentario)	300	90%

Fuente: tesis Doctoral Jorge Ascacio Martínez.²¹

1.5 Proceso de purificación.

La selección del tipo y los pasos del proceso de purificación dependen directamente de la clonación, el huésped de expresión y la localización intra o extracelular de la proteína de interés, con el resultado final de obtener la proteína deseada con la pureza y la actividad biológica requerida y todo esto dentro de costos aceptables.

Una vez elegido el sistema de expresión, se debe evaluar el proceso de purificación con el que se va a trabajar. Este paso es crítico porque es el punto

que representa mayores costos en la producción de proteínas recombinantes²⁰.

Los métodos de separación de moléculas biológicas están basados en la diferencia de carga, tamaño y afinidad. En base a estas características se han desarrollado seis estrategias de purificación principales: precipitación diferencial, filtración en membrana, filtración en gel, intercambio iónico, cromatografía de interacciones hidrofóbicas y cromatografía de afinidad.

En el laboratorio se han hecho ensayos de purificación de las diversas GHs^{21,22} probando algunos de estos métodos y se han obtenido buenas cantidades de proteína y pureza de las mismas (ver cuadro 2).

El proceso de purificación con el que se ha trabajado, si bien a dado resultados satisfactorios, es limitante al requerirse adecuaciones para cada hormona, ya que estas presentan diferencias en sus propiedades físico-químicas. Por ello optamos por buscar las condiciones ideales para obtener cada una de ellas, lo cual incrementa los costos en el proceso de purificación.

Con el fin de buscar una alternativa para hacer más sencillos, económicos y aplicables los procesos de purificación desarrollados para las GHs, se estudió la posibilidad de analizar otros procesos, optándose por la Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados.

1.5.1 Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados.

En 1975 Porath, Carlsson, y Olsson introducen la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (Immobilized Metal Affinity Chromatography ó IMAC) como una nueva tecnología para el fraccionamiento de proteínas.²³ En la década de 1980 Eugene Sulkowski pasa la IMAC de un papel empírico a una herramienta analítica^{24,25} y en 1989 él mismo concluye que la afinidad de una proteína por un ion metálico inmovilizado incrementa con el número de residuos de histidina accesibles y que la retención varía con el ión metálico empleado²⁶.

El principio de este mecanismo se basa en el enlace coordinado de un ion metálico unido covalentemente a un agente quelante, con una proteína que tiene histidinas.

La cromatografía de afinidad permite separar moléculas específicas a partir de una mezcla compleja de proteínas presentes en un medio de crecimiento.

Los sistemas de purificación que utilizan etiquetas de afinidad nos dan las ventajas de permitir, en algunos casos, la purificación de una proteína en un solo paso, con un efecto mínimo tanto en la estructura terciaria de la proteína como en su actividad biológica, siendo aplicable a un gran número de proteínas.

1.5.1.1 Etiqueta de poli-histidina.

La etiqueta de poli-histidina es uno de los sistemas de etiquetado de proteínas más usados, estando basado en la afinidad de múltiples histidinas (de 4 a 10) en tandem, con iones metálicos inmovilizados que pueden ser Ni^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} ó Zn^{+2} . Los metales son retenidos por agentes quelantes (es comúnmente usado el ácido nitrotriacético Ni-TA) con grupos reactivos, unidos covalentemente a un soporte sólido.

Una etiqueta de histidinas fusionada a la proteína de interés se une a los cationes divalentes del ion (Ni^{+2} , por ejemplo), inmovilizados en la resina de la columna de afinidad (ver figura 2). Las proteínas que no se unen se eluyen y la proteína de interés es recobrada posteriormente por elusión con imidazol o reduciendo el pH. Los residuos de histidina en una secuencia de poli-histidina tienen un pKa de 6 y es protonado cuando el pH es reducido a 4.5-5.3. Bajo estas condiciones la proteína etiquetada no puede unirse a los iones y se disocia de la resina²⁷.

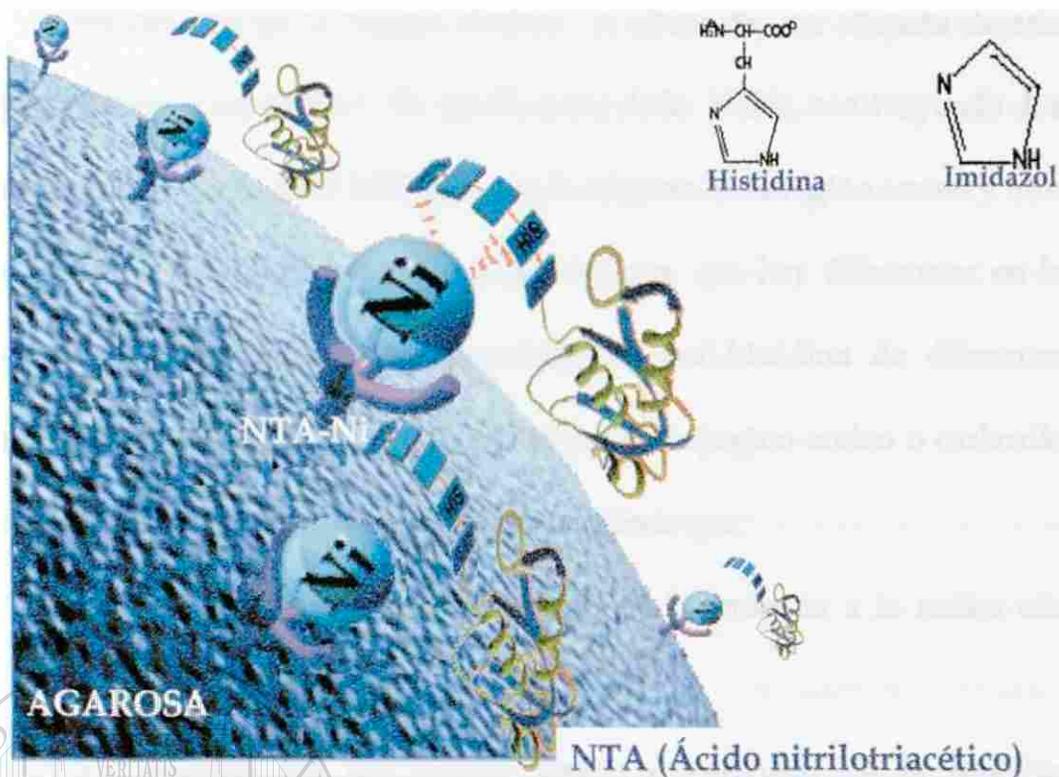


Figura 2. Purificación por etiquetas de poli-histidina. Se observa una esfera de agarosa que tiene un quelante (ácido nitrilotriacético) reteniendo covalentemente a los iones Ni^{2+} . Los electrones que quedan libres interactúan con las seis histidinas que tiene la proteína de interés. Para eluir ésta se agrega imidazol que compite con las histidinas por los electrones (al ser muy parecidos en estructura). La figura fue tomada de www.sigma-aldrich.com

Se han hecho ya una cantidad considerable de estudios usando estas etiquetas. Se comparo en uno por ejemplo, la eficiencia en la purificación con una etiqueta de seis histidinas contra la etiqueta de la Glutation S-Transferasa (GST), ambas en la región amino terminal de la proteína. Se usaron una serie de 15 proteínas humanas diferentes, expresándolas en un sistema bacteriano. Se observó que, si bien la pureza obtenida por los dos métodos era similar, en algunas de las proteínas fue mayor el rendimiento que se obtuvo con la etiqueta de poli-histidina que con la etiqueta de GST²⁸.

En este trabajo se decidió evaluar el efecto de una etiqueta de seis histidinas en la expresión y la purificación de la BGHr, construyendo dos versiones del casete de la BGH uno con la etiqueta en la región amino y otro en la región carboxilo, ya que reportes indican, que hay diferencias en la expresión y purificación de proteínas con poli-histidina de diferentes tamaños (6-10 histidinas) y en diferente posición (región amino o carboxilo terminal de la proteína de interés). Estos sugieren que:

- 1) La posición del tag afecta la unión de la proteína a la resina con iones²⁹.
- 2) La posición del tag (región amino o carboxilo de la proteína recombinante) afecta los niveles de expresión³⁰.
- 3) Se ha documentado que los tag protegen a las proteínas solubles de la proteólisis intracelular y aumenta su solubilidad^{31,32,33}.

Woestenenk y cols (2004) purificaron 20 proteínas humanas etiquetadas con seis histidinas en su región amino o carboxilo, y ellos concluyeron que para su trabajo la etiqueta en la región carboxilo mejoraba los niveles de expresión de las proteínas³⁴. También, otros estudios como el de Mohanty y cols (2003) afirman que la posición de la etiqueta afecta algunas propiedades de la proteína, como niveles de expresión y disolución, mejorando las condiciones de éstas³⁵.

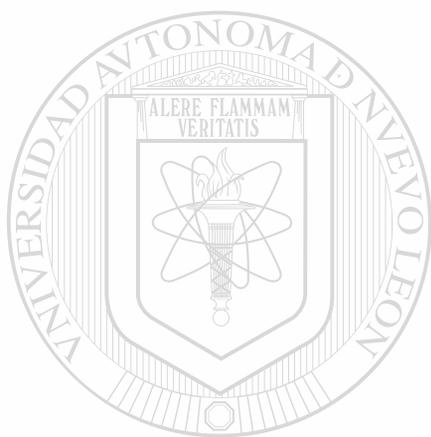
La purificación de proteínas con etiqueta de poli-histidina se ha llevado con éxito a cabo en diversos sistemas de expresión como bacterias³⁶, levaduras³⁷, células de mamífero³⁸ y células de insecto infectadas con baculovirus^{39,40} y en la mayoría de estos trabajos se destaca la purificación de las proteínas recombinantes en uno o muy pocos pasos.

Se han ingresado más de 100 estructuras de proteínas con etiquetas en el banco de datos de Proteínas (Protein Data Bank). De la familia GH-CSH solo se han purificado la GH y la prolactina (hPRL)⁴¹ humanas con el método de etiquetado con histidinas⁴².

En 1997, a la GH humana le fue agregada una etiqueta con 6 seis histidinas en su región amino, fue expresada en *E. coli* en una jarra de fermentación de 5 L y purificada en un solo paso, obteniendo 2.2 g/L de la proteína con una pureza del 99%⁴³.

1.6 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

Nuestro Laboratorio cuenta con una decena de cepas de *Pichia pastoris* productoras de GHs de diversos organismos. Los esfuerzos para purificar cada una de estas hormonas representan un gran reto, por lo que en este trabajo se plantea desarrollar una estrategia de purificación para la BGHr que pudiera ser aplicable a todas ellas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la factibilidad de producir la BGHr fusionada a una etiqueta de poli-histidina y purificarla por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Modificar el casete de expresión de la BGH para introducirle codones para la etiqueta de poli-histidina, ya sea en el extremo amino o en el carboxi terminales.
2. Introducir los casetes modificados al genoma de *P pastoris*.
3. Ensayar la producción de las BGHs etiquetadas con poli-histidina a nivel matraz.
4. Desarrollar el esquema de purificación propuesto, para las dos versiones de las BGHs etiquetadas con poli-histidina.
5. Evaluar la eficiencia del nuevo proceso de purificación de la BGHr etiqueta de poli-histidina.

CAPITULO III

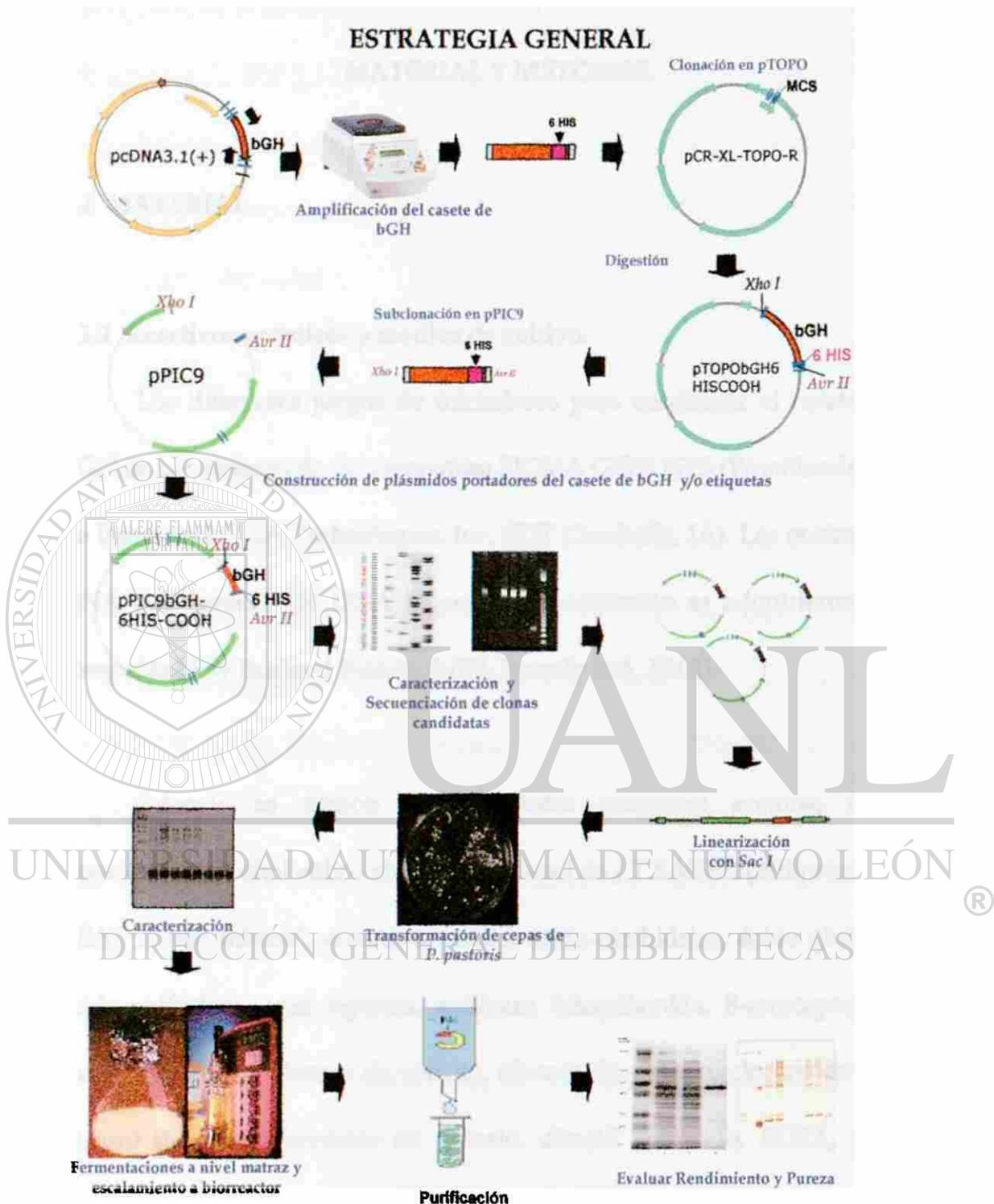


Figura3. Estrategia general. Empleando la PCR, se amplificó el casete de la BGH a partir de un plásmido portador del DNAC (pCDNA 3.1), incorporando vía cambios en los oligonucleótidos, sitios de restricción y/o la etiqueta de poli-histidina. Este producto amplificado fue clonado en pTOPO y subclonado en pPIC9. Se hizo una caracterización de las clonas candidatas y una vez corroborada la fidelidad en la amplificación, las construcciones se linealizaron con la enzima *Sac I*, para ser insertadas por recombinación homóloga en el genoma de *Pichia pastoris*. Las cepas que incorporaron el casete, fueron fermentadas a nivel matraz y escaladas en biorreactor. Se estableció un esquema de purificación con IMAC para estas construcciones y se evaluó el rendimiento y la pureza del nuevo proceso empleado.

CAPITULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.

Los diferentes juegos de iniciadores para amplificar el casete de la BGH se adquirieron de las compañías SIGMA GENOSYS (Woodlands, Tx) y de Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT Coralville, IA). Las enzimas Taq DNA polimerasa, T4 DNA Ligasa y de restricción se adquirieron de la compañía New England Biolabs (NEB, Beverly MA, EUA).

Además se usaron los siguientes reactivos: acetona, alcohol isopropílico, alcohol etílico absoluto, metanol de J.T.BAKER (Phillipsburg NJ, USA), Aceite mineral, acetato de sodio, ácido clorhídrico, ácido glutámico, ácido sulfúrico, agar, agarosa, antifoam, bisacrilamida, B-mercaptoetanol, cloruro de calcio, cloruro de cobalto, cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de zinc, dicromato de potasio, dimetil sulfóxido, EDTA, etanol, glicerol anhidro, glucosa, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, histidina, TEMED, leucina, L-metionina, sulfato de zinc, urea, yoduro de potasio, yoduro de sodio, lisina, nitrato de plata, persulfato de amonio, polietilenglicol, sorbitol, sulfato cúprico, sulfato de amonio, sulfato de calcio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio de SIGMA-

ALDRICH (St. Louis MO, EUA). Bactoagar, bactopectona y yeast nitrogen base (YNB) de DIFCO (Sparks, MD, EUA). Azul de Coomassie de BIO-RAD (Hercules, CA. EUA). Leche svelty de NESTLE. El estuche para la clonación en pTOPO se adquirió de Invitrogen Co. (Gaithersburg, MD. EUA). Resina y estuche de Buffers para proteínas etiquetadas con histidinas de Novagen (Darmstadt, Alemania).

4.1.2 Biológicos.

El plásmido pCDNA 3.1(+) portador del casete de la bGH fue proporcionado por el Centro de Investigación de Alimentación Animal de E.U. (USDA, ARS, US, Meat Animal Research Center). El plásmido pCR®XL-TOPO® y las células electrocompetentes™ TOP10OR del estuche TOPO®XL-PCR Cloning de Invitrogen Co. (Gaithersburg, MD. EUA). La subclonación para transferencia a la levadura se realizó en el plásmido pPIC9 proveniente de la plasmidoteca de la ULIEG. Este fue transformado en la cepa de *E. coli* XL-1Blue. Para expresar los casetes se usó la cepa de *Pichia pastoris* GS115, estas dos últimas cepas provienen de la cepateca de la ULIEG.

4.1.3 Equipo.

Se emplearon los siguientes equipos y aparatos: fermentador New Brunswick Scientific Bioflo 3000 (Edison, N.J. USA), regulador de voltaje MODEL 500 marca BRL, microondas marca Goldstar, pH-metro modelo 420A marca ORION, mechero fisher 1201-21, pipeteador Pipet-aid

Drumond Scientific Co., plancha de calentamiento marca CORNING PC-35, biofotómetro marca Eppendorf, baño seco Thermolyne Type 17600 Dry-Bath, electroporador BIO-RAD Pulse Controller Plus Gene pulser II, campana de seguridad clase II Labcono Purifier class II, refrigerador-congelador General Electric, fuente de poder Gibco BRL Electrophoresis Power Supply Model 250 y un termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller, M.J. Research, Inc.

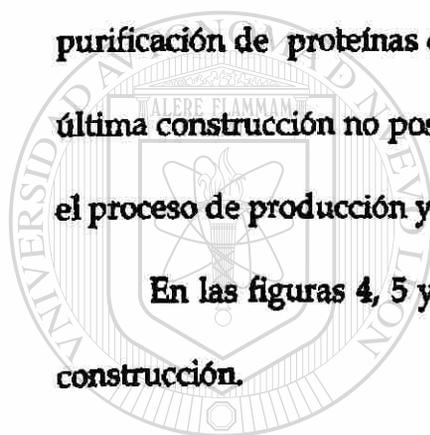
Para la digitalización y el análisis de los geles se utilizaron los programas GEL DOC 1000/PC y Gelpro32 analyzer de BIO-RAD (Hercules, CA. EUA). Los programas utilizados vía INTERNET fueron: Entrez NCBI (National Centre for Biotechnology Information), BLAST Network Service (Blaster), Gene Bank (ICGEB, Trieste, Italia), CLUSTALW, el programa utilizado para comunicación en la red fue Microsoft Internet Explorer 6.0. El procesador de texto utilizado fue Microsoft Word XP Home Edition (Microsoft Corporation) y el procesador gráfico fue Microsoft Photo Editor (Microsoft Corporation).

4.2 MÉTODOS

4.2.1. Construcción de plásmidos.

Con el cDNA de la BGH se planeó la construcción de tres plásmidos: uno de ellos presenta una etiqueta de seis histidinas en la región amino terminal del casete, el otro la presenta en la región carboxilo, para así evaluar si existieran diferencias en el proceso de purificación con estas dos versiones (tomando en cuenta reportes en donde existen diferencias en la eficiencia de purificación de proteínas que portan etiqueta en uno u otro extremo^{34,35}). La última construcción no posee etiquetas y se utilizó sólo como un testigo para el proceso de producción y purificación.

En las figuras 4, 5 y 6 se describen las estrategias seguidas para cada construcción.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

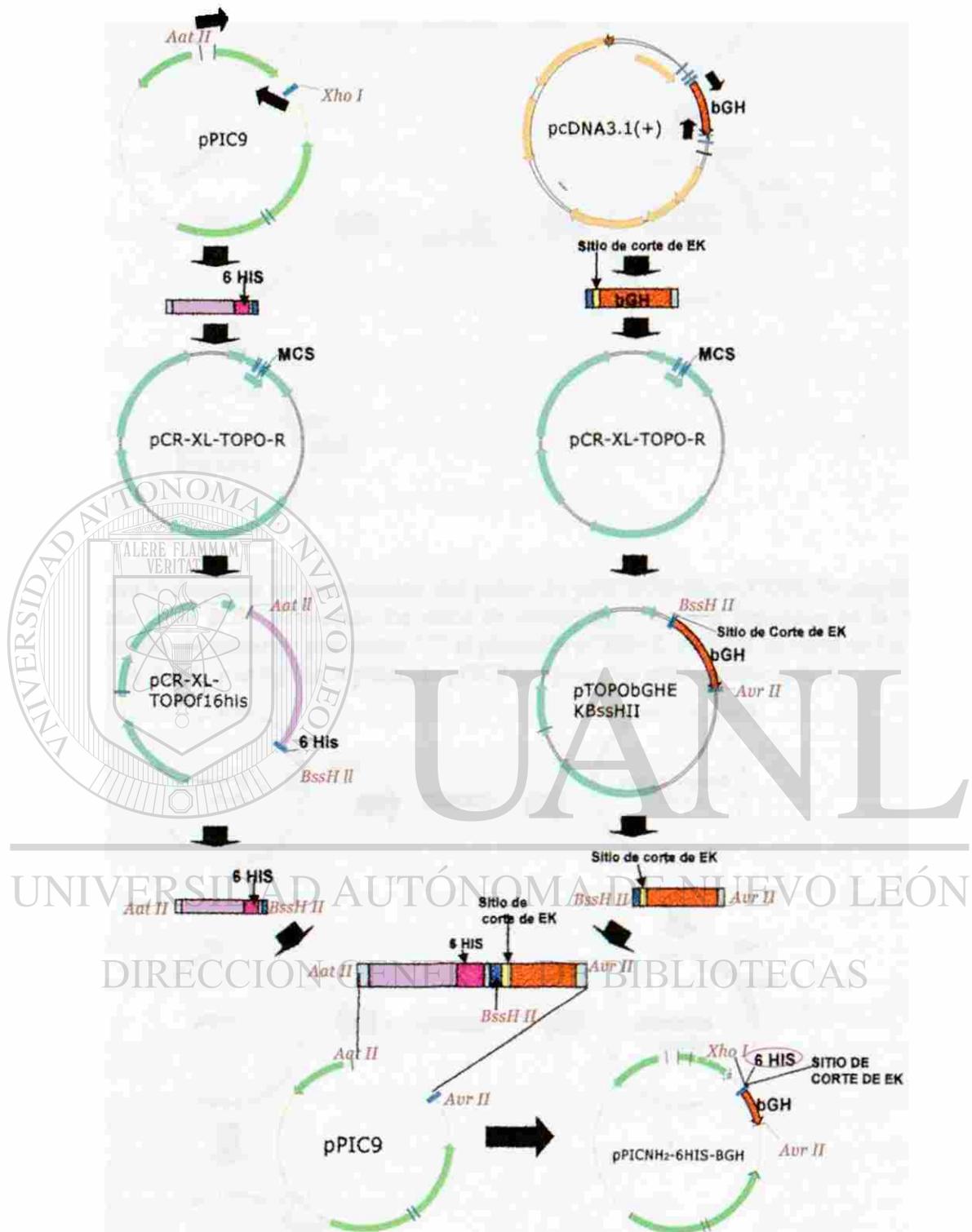


Figura 4. Esquema de construcción del plásmido pPIC9NH₂-6His-BGH. Para esta construcción se amplificaron dos fragmentos: uno a partir del vector pPIC9, que le agregara un nuevo sitio de restricción y seis histidinas, y otro a partir del pcDNA3.1 que amplifica el casete de la BGH con sus respectivos sitios de restricción para la subclonación. Estos dos fragmentos se introdujeron al vector pTOPO y luego fueron cortados en los respectivos sitios, realizando la ligación de los dos fragmentos al vector pPIC9.

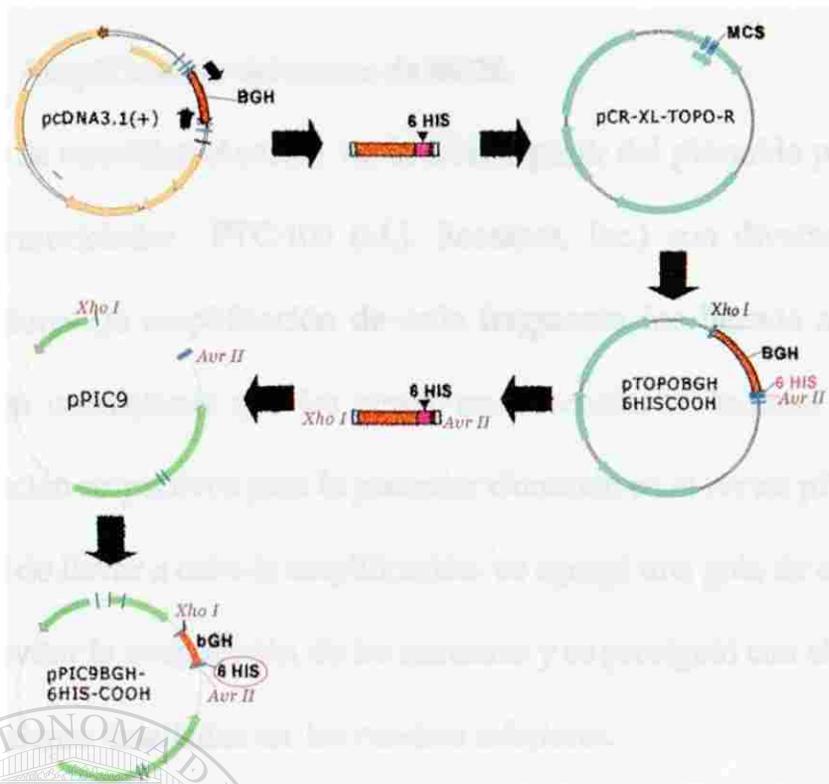


Figura 5. Esquema de construcción del plásmido pPIC9BGH-6His-COOH. Se amplificó el casete de la BGH incluyendo los sitios de restricción y las seis histidinas en la región carboxilo, se introdujo por vector "T" al plásmido pCR®-XL-TOPO®. Se cortó en los sitios *Xho I* y *Avr II*, y se ligó en el plásmido pPIC9 que posee los mismos sitios únicos.

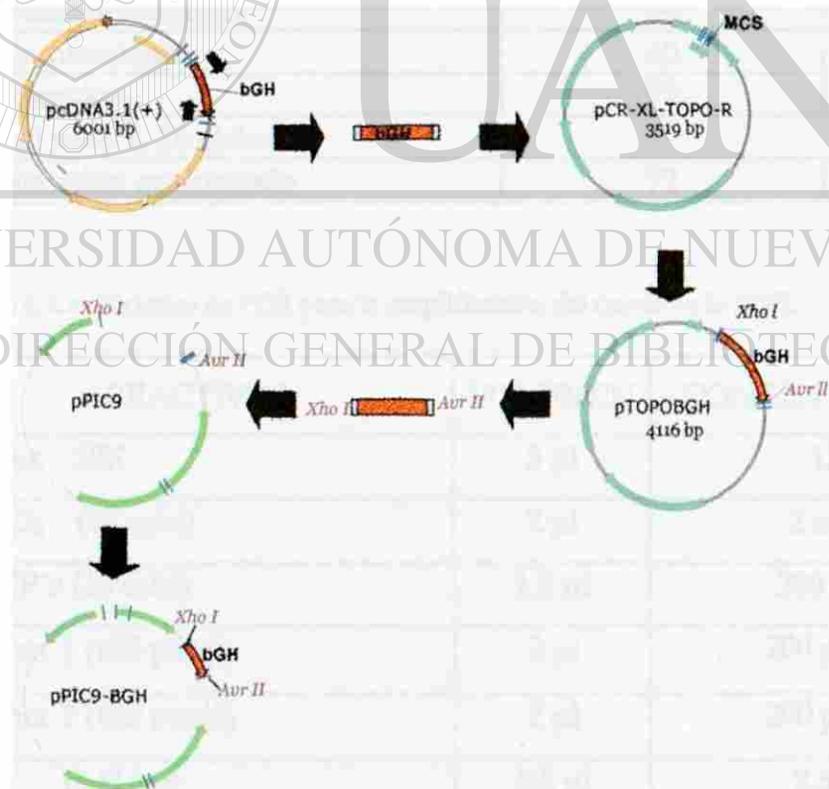


Figura 6. Esquema de construcción del plásmido portador del casete de la BGH sin etiqueta de poli-histidina. Se amplificó el casete de la BGH incluyendo los sitios de restricción y se introdujo por vector "T" al plásmido pCR®-XL-TOPO®. Se cortó en los sitios *Xho I* y *Avr II*, y se ligó en el plásmido pPIC9 que posee los mismos sitios únicos.

4.2.1.1 Amplificación del casete de BGH.

Se amplificó el casete de la BGH a partir del plásmido pCDNA3.1 en un termociclador PTC-100 (M.J. Research, Inc.) con diversos juegos de iniciadores (la amplificación de cada fragmento fue llevada a cabo en las mismas condiciones que las otras), en los cuales se incluían los sitios de restricción respectivos para la posterior clonación en el vector pPIC9.

Antes de llevar a cabo la amplificación se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras y se prosiguió con el programa y condiciones detallados en los cuadros inferiores.

Cuadro 3. Programa para la amplificación del casete de la BGH.

ETAPA	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1. Desnaturalización inicial	95	5 min
2. Desnaturalización	94	40 seg
3. Apareamiento	60	1 min
4. Extensión	72	1 min
5. Ir al paso 2, 28 ciclos		
6. Extensión prolongada	72	7 min

Cuadro 4. Condiciones de PCR para la amplificación del casete de la BGH.

REACTIVOS	VOLÚMEN	CONCENTRACIÓN
Buffer 10X	5 µl	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	2 mM
dNTP's (10 mM)	1.5 µl	200 µM
Primer 1 (100 pmol)	2 µl	200 pmol
Primer 2 (100 pmol)	2 µl	200 pmol
Taq (5 U/µl)	0.5 µl	2.5 U
H ₂ O	36.5 µl	—
DNA	0.5 µl	—
Volumen final	50 µl	—

De las reacciones de PCR se corrieron en gel de agarosa 5 µl (1/10 del volumen de reacción) para verificar el éxito de la misma.

4.2.1.2 Clonación de fragmentos amplificados en pTOPO.

Los fragmentos amplificados fueron clonados en el plásmido comercial pCR®-XL-TOPO®, siguiendo las indicaciones del estuche TOPO®XL-PCR Cloning de INVITROGEN. Este paso fue usado para contar con una cantidad suficiente de producto amplificado para las posteriores manipulaciones.

Se crecieron las bacterias transformadas en placas con agar LB-kanamicina a 37°C por 18-20 horas. Después de este tiempo, de las colonias que crecieron se seleccionaron clonas candidatas y se procesaron por la técnica de las minipreparaciones con el protocolo descrito por Sambrook y cols.⁴⁴

4.2.1.3 Caracterización de clonas candidatas.

Las clonas candidatas fueron caracterizadas por retraso en la migración en el gel de agarosa, de los plásmidos que incorporaron el producto amplificado con respecto al plásmido sin producto amplificado. Estas clonas retrasadas fueron además caracterizadas por digestión con la enzima *Eco RI* que flanquea el sitio múltiple de clonación.

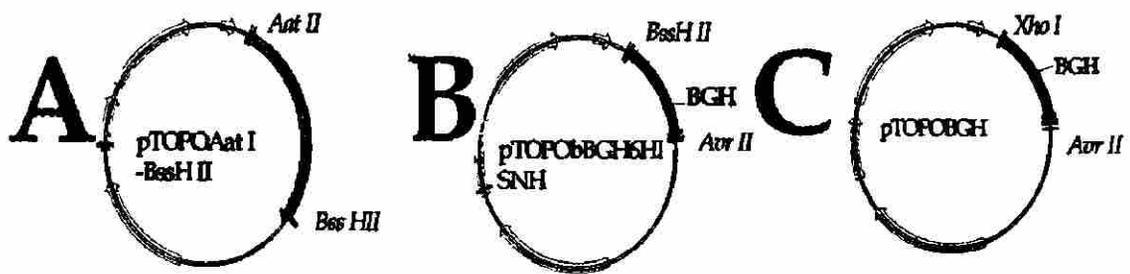
4.2.1.4 Secuenciación.

Como una última prueba de caracterización, fueron secuenciadas las clonas candidatas con el estuche de LiCOR y con los primers M13 reverso y forward marcados con RDyeTM800 y 700 y que se aparean en el plásmido pTOPO. La reacción para secuenciación fue cargada en un gel de poli-acrilamida al 3.7% con urea al 50% y resuelta en el secuenciador LiCOR DNA 2000.

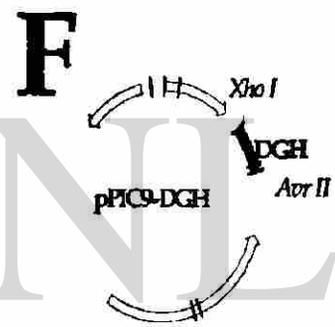
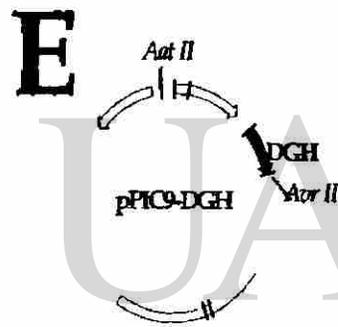
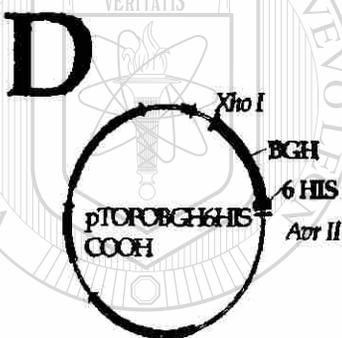
4.2.1.5 Subclonación en pPIC9.

Los casetes y fragmento clonados en pTOPO se digirieron con las enzimas de restricción respectivas. La digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% y se cortó la banda de interés y se siguieron las indicaciones del protocolo del estuche QUIAEX II. Una vez que se purificó la banda, se preparó una reacción de ligación con el vector de subclonación pPIC9.

En las siguientes tablas (figuras 7 y 8) se describen las cantidades que fueron usadas tanto para la restricción como para la ligación de los fragmentos, así como una figura respectiva, en donde se indica de donde provienen los fragmentos cortados y los fragmentos que fueron ligados.

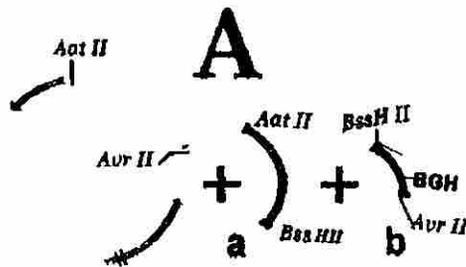


Reactivo	Volumen (1x)	Reactivo	Volumen (1x)	Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	14.0 µl	Agua MQ	14.2 µl	Agua MQ	14.6 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl	NEBuffer 4 10X	2.0 µl	NEBuffer 4 10X	2.0 µl
Bss HII 4 U/µl	0.5 µl	Bss HII 4 U/µl	0.5 µl	BSA 100x	0.5 µl
Aat II 20 U/µl	1.0 µl	Avr II 4 U/µl	1.0 µl	Xho I 20 U/µl	0.5 µl
DNA 1.2 µg/µl.	2.5 µl	DNA 1.3 µg/µl.	2.3 µl	Avr II 4 U/µl	1.0 µl
				DNA 2.1 µg/µl.	1.4 µl
Volumen total	20.0 µl	Volumen total	20.0 µl	Volumen total	20.0 µl



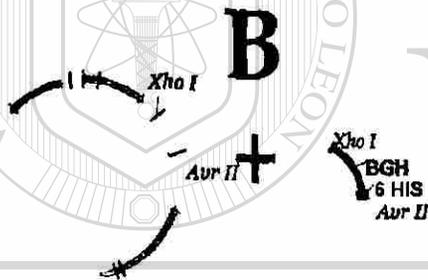
Reactivo	Volumen (1x)	Reactivo	Volumen (1x)	Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	14.0 µl	Agua MQ	13.3 µl	Agua MQ	14.0 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl	NEBuffer 4 10X	2.0 µl	NEBuffer 4 10X	2.0 µl
BSA 100x	0.5 µl	Aat II 20 U/µl	0.2 µl	BSA 100x	0.5 µl
Xho I 20 U/µl	0.5 µl	Avr II 4 U/µl	0.5 µl	Xho I 20 U/µl	0.5 µl
Avr II 4 U/µl	1.0 µl	DNA 1.5 µg/µl.	4.0 µl	Avr II 4 U/µl	1.0 µl
DNA 1.5 µg/µl	2.0 µl			DNA 2.0 µg/µl	2.0 µl
Volumen total	20.0 µl	Volumen total	20.0 µl	Volumen total	20.0 µl

Figura 7. Digestiones para subclonación en pPIC9. A) Digestión para fragmento AatII-XhoI. B) Digestión para pTOPOBGH6HisCOOH. C) Digestión para pTOPOEKBssHII. D) Digestión para pTOPOBGH. E) Digestión con pPIC9DGH con enzimas Aat II y Avr II F) Digestión con pPIC9DGH con enzimas Xho I y Avr II.



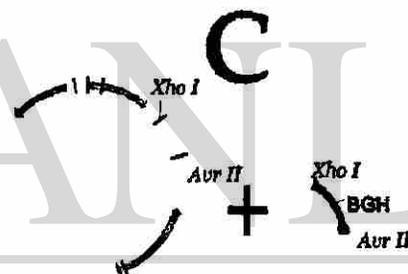
REACTIVO	Vol. (1x)
Agua MQ	10.7 µl
Buffer T4 ligasa 10X	2.0 µl
ATP 10 mM	2.0 µl
Inserto a: 25 ng/ µl b: 10 ng/ µl	1+1 µl
Esqueleto (100 ng/ µl)	3.0 µl
T4 DNA ligasa 400 U/µl	0.3 µl
Volumen total	20.0 µl

Relación vector-inserto 1:1
 Vector: 6619 pb
 Fragmento A: 1452 pb
 Fragmento B: 611 pb



REACTIVO	Vol. (1x)
Agua MQ	10.5 µl
Buffer T4 ligasa 10X	2.0 µl
ATP 10 mM	2.0 µl
Inserto 2.5 (ng/ µl)	4.0 µl
Esqueleto 115 (ng/ µl)	1. µl
T4 DNA ligasa 400 U/µl	0.5 µl
Volumen total	20.0 µl

Relación vector-inserto 1:1
 Vector: 7984 pb
 Fragmento : 617 pb



REACTIVO	Vol. (1x)
Agua MQ	12.2 µl
Buffer T4 ligasa 10X	2.0 µl
ATP 10 mM	2.0 µl
Inserto 9 (ng/ µl)	2.0 µl
Esqueleto 115 (ng/ µl)	1.0 µl
T4 DNA ligasa 400 U/µl	0.3 µl
Volumen total	20.0 µl

Relación vector-inserto 1:1
 Vector: 7984 pb
 Fragmento : 599 pb

Figura 8. Ligaciones para subclonación en pPIC9. En cada tabla se especifican las condiciones usadas para la ligación y los fragmentos que iban a ligarse, así como la relación vector:inserto que fue usada. A) ligación para obtener la construcción pPICNH₂-6His-BGH. B) ligación para obtener la construcción pPICBGH-6His-COOH. C) ligación para obtener la construcción pPIC9BGH.

La ligación se llevó a cabo a 16°C por 16 h, después de lo cual se inactivó a 65°C por 10 min. Los plásmidos ligados fueron transformados en cepas de *E.coli* XL1-Blue.

4.2.1.6 Transformación "Ultra-competente" de *E. coli*

Se siguió con el método de transformación ultracompetente descrito por Sambrook, pero se realizaron algunas modificaciones. A continuación se describe el protocolo.

4.2.1.6.1 Preparación de las bacterias:

Inocular un medio con las bacterias XL1-Blue y crecer toda la noche en LB (con tetraciclina en una concentración de 5 µg/ml). Por la mañana, tomar 1 ml de este medio e inocular en 100 ml de medio SOB, crecer a 37°C hasta una $DO_{600} = 0.4$. Colocar en hielo durante 10 min. Centrifugar a 2500g (5000rpm) durante 10 min a 4°C. Resuspender gentilmente en 20 ml de $CaCl_2$ 0.1 M. y colocar en hielo durante 20 min. Centrifugar a 2500g (5000 rpm) por 10 min a 4°C y remover el $CaCl_2$. Por último resuspender en 2 ml de $CaCl_2$ agregando DMSO a una concentración final del 7% y colocar en hielo durante 10 minutos.

4.2.1.6.2 Transformación de las bacterias:

Mezclar 100 µl de células con un tercio de la reacción de ligación e incubar en hielo por 30 minutos (para cada ligación). Realizar el choque térmico a 42°C por 90 segundos en baño de agua sin agitación e inmediatamente poner el tubo en hielo por 1-2 minutos. Agregar 0.9 ml de medio LB a temperatura ambiente e incubar 1 hora a 37°C, 225 r.p.m. Después

de este tiempo centrifugar 10 minutos a 5000 r.p.m. y resuspender la pastilla en el aprox 50 μ l de agua destilada. Plaquear en cajas con medio LB+ampicilina+tetraciclina e incubar toda la noche.

De las colonias que crecieron se seleccionaron candidatas y se caracterizaron por PCR, por digestión y por último por secuenciación

4.2.1.7 Caracterización por PCR y con enzimas de restricción.

Las clonas candidatas fueron caracterizadas por PCR con los primers AOX1 que flanquean la región en la que se introdujo el gen, que es de aproximadamente de 1050 pb. Se corrió la reacción en gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio.

Se caracterizó con la enzima *Pvu* II, esta enzima tiene un sitio dentro del casete de la BGH, lo que nos permitiría diferenciar el fragmento clonado de la hormona de perro (se utilizó el esqueleto de vector de esta hormona).

La caracterización con esta enzima nos liberaba cuatro fragmentos de 4908, 2948, 494 y 276 pb.

4.2.1.8 Caracterización por secuenciación nucleotídica.

Las clonas fueron caracterizadas por secuenciación con el estuche de LiCOR con ddNTP's marcados IRDyeTM800 y con los primers pPICFM (forward) y pPICRM (reverso) que se aparean en el plásmido pPIC9.

4.3 Integración de los vectores pPIC9BGH, pPIC9NH-6His-BGH y pPIC9BGH-6His-COOH al genoma de *P. pastoris*.

Los vectores fueron linealizados con *Sac I*, con 2 μ l (que corresponden a 2 μ g) de vector en 50 μ l de reacción. Se seleccionaron candidatas, las cuales fueron crecidas en medio YPD a 30°C por 24 horas para extraer el DNA genómico de la levadura y determinar el fenotipo de cada clona candidata.

4.3.1 Protocolo para electroporación en *P. pastoris*.

(Protocolo del manual de *P. pastoris* de Invitrogen)

Inocular la cepa GS115 en un tubo con 10 ml de medio YPD y crecer en agitación a 30°C. Leer la DO_{600} hasta alcanzar 3-4. Inocular 250 μ l de este tubo en un matraz con 250 ml medio YPD (el objetivo es tener las células en fase log por la mañana con una DO de aprox. 1). Centrifugar las células en un recipiente de 1L por a 3000 rpm por 10 min. Resuspender en 250 ml de agua helada (sin vortexear). Transferir a un recipiente de 500 ml y centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos. Resuspender en 20 ml de sorbitol 1M frío y transferir a un tubo falcon de 50 ml y centrifugar a 3000 por 10 minutos. Resuspender en 1 ml de sorbitol 1M, y mantener en hielo.

Usar 80 μ l de la las levaduras para la trasformación y agregar 15 μ l de la digestión con *Sac I* (aprox 1/3 del total) transferir a una cubeta para

electroporación y mantener en hielo por 5 minutos. Electroporar las células de acuerdo a los parámetros establecidos para *Saccharomyces cerevisiae* (indicaciones sugeridas en el manual del electroporador) e inmediatamente después agregar 1 ml de sorbitol 1M frío y plaquear distribuyendo todo el volumen en 4-5 cajas con medio RDB y dejar crecer a 30°C por 3-5 días.

Después de este tiempo se seleccionaron clonas candidatas y se les realizó una extracción de DNA genómico por la técnica de TSNT.

4.3.2 Reacción de PCR para confirmar la integración genómica.

Para el análisis del fenotipo por PCR se utilizaron los primers AOX1 que amplifican el gen de la alcohol oxidasa que se encuentra en el genoma de la levadura. Debido a los eventos de recombinación (figura 9) se pueden esperar dos tipos de cepas, las mut⁺ (Metanol utilization plus: fenotipo silvestre de utilización de metanol) y las mut⁻ (Metanol utilization slow: fenotipo que metaboliza lentamente el metanol, al carecer del gen de la alcohol oxidasa, debido a un evento de reemplazamiento en este gen). En la amplificación con los primers AOX1 se observarían dos bandas: de 1050 pb y 2105, en el caso de la cepa mut⁺ y una sola la banda de 1050pb en el caso de la cepa mut⁻.

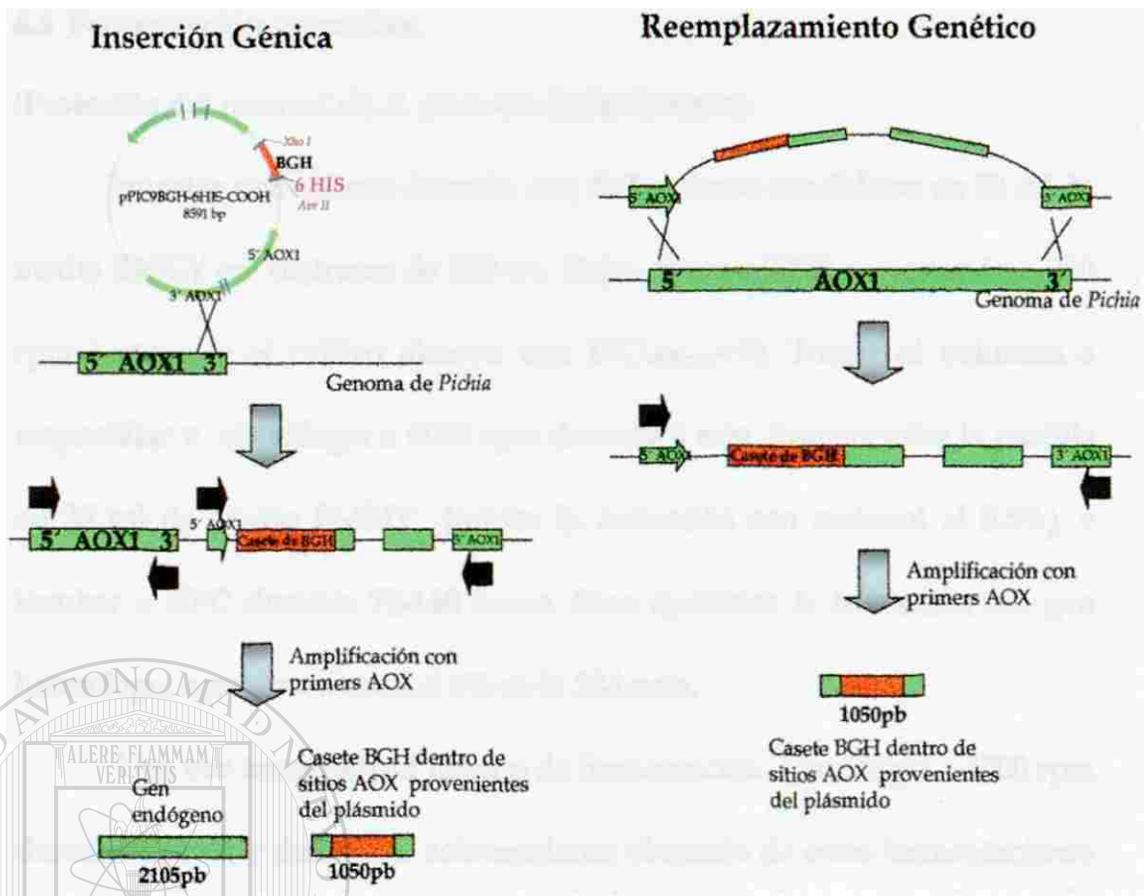


Figura 9. Recombinación en el genoma de *P. pastoris*. La incorporación del plásmido pPIC9 dentro del genoma del *P. pastoris* puede llevar a cabo eventos de recombinación como la inserción génica (generalmente resulta en cepas mut*), en donde al amplificar el DNA genómico y visualizarlo en gel de agarosa observaríamos dos productos (el gen propio de la levadura, y el nuevo casete introducido), o podríamos esperar un reemplazamiento genético, en donde se observaría únicamente el fragmento amplificado del nuevo casete introducido que ha reemplazado al gen de la levadura (generalmente resulta en cepas mut*).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 15 µl con 1.5 µl Buffer de PCR 10X, 1.5 µl MgCl₂, 0.5 µl dNTP, 150nM de cada AOX1 5' y AOX13' (0.5 µl c/u), 0.2 U Taq DNA polimerasa (Promega) y 0.5 µl de DNA utilizando el programa que sugiere el estuche de *P. pastoris* para los primers AOX1.

4.4 Fermentación en matraz.

(Protocolo del manual de *P. pastoris* de Invitrogen)

Inocular una colonia de cada una de las clonas candidatas en 50 ml de medio BMGY en matraces de 250 ml. Dejar crecer a 30°C en agitación a 250 rpm hasta que el cultivo alcance una $D.O._{600nm} \approx 10$. Tomar el volumen a empastillar y centrifugar a 6000 rpm durante 5 min. Resuspender la pastilla en 25 ml de medio BMMY (iniciar la inducción con metanol al 0,5%), e incubar a 30°C durante 72-140 horas. Para mantener la inducción del gen heterólogo, agregar metanol al 1% cada 24 horas.

Una vez terminado el tiempo de fermentación, centrifugar a 6000 rpm durante 12 min y dializar el sobrenadante obtenido de estas fermentaciones con buffer Tris 20 mM pH 8.4 haciendo cambios cada cuatro horas por 4 veces.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Se tomó un volumen determinado de cada muestra y se precipitaron las proteínas del medio usando metanol/cloroformo. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrimamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 20% a 80 volts hasta que las muestras entraron en el gel separador y después de esto se aumentó el voltaje hasta 130 volts.

El gel fue teñido con colorante azul de coomassie por 12 hrs y después de este tiempo se destiñó con solución decolorante hasta que fueron visibles las bandas de interés.

4.5 Producción en biorreactor.

Se llevaron a escala de biorreactor las construcciones con etiquetas de histidinas en la región amino y en la región carboxilo, siguiendo el protocolo desarrollado por Ascacio M. (2004). La fermentación se llevó a cabo en un biorreactor Bioflo 3000 de New Brunswick Scientific de 1 litro.

4.6 Ultraconcentración de las muestras.

Se tomaron 100 ml de cada fermentación de biorreactor y se ultradializaron en una unidad de ultraconcentración con tris-cl 20 mM, en un baño de hielo con agitación y a una presión de 40 psi, hasta reducirse el volumen a aproximadamente 4-5 ml. La membrana para ultraconcentrar es de un poro de 10,000 Daltons. Las muestras ultraconcentradas fueron cuantificadas por Bradford y corridas en gel SDS-PAGE para verificar la integridad de las proteínas.

4.7 Western blot.

Para corroborar la identidad de las proteínas producidas se realizó un western blot utilizando un anticuerpo anti-BGH que es producido en nuestro laboratorio (Pérez y cols 2003)⁴⁵ y como segundo anticuerpo se usó anticuerpo anti-conejo conjugado de peroxidasa de rábano.

4.7.1 Transferencia electroforética.

Llenar de agua la unidad refrigerante de la cámara de transferencia y congelar a -20°C.

Realizar un SDS-PAGE con las muestras de cada fermentación así como controles (Albúmina sérica bovina y el testigo negativo de expresión como controles negativos para la reacción y BGH comercial como control positivo).

Usando guantes para evitar contaminación en el manejo de la membrana: equilibrar el gel y se sumergir la membrana, papel filtro y la esponja de fibra en buffer de transferencia (de 15 min a 1 hora en dependencia del grosor del gel).

Ensamblar el sándwich y rotular la membrana de nitrocelulosa señalando con un lápiz la orientación en la que se realizó previamente el SDS-PAGE.

Colocar:

- El casete sobre una superficie limpia con el lado gris hacia arriba.
- La esponja de fibra prehumedecida.
- Dos hojas de papel filtro Whatman prehumedecidas,
- La membrana de nitrocelulosa prehumedecida.*
- El gel equilibrado.*
- Dos hojas de papel filtro Whatman prehumedecidas.
- La esponja de fibra prehumedecida.

*Revisar que no queden burbujas de aire, remover las que quedaron rodando sobre el sándwich un tubo de vidrio.

Cerrar el casete firmemente, siendo cuidadoso de no mover el gel y el papel de filtro del sándwich y colocar el casete en el módulo. Adicionar la unidad de refrigeración, colocar el módulo en la cámara y llenar completamente con

buffer. Agregar una barra de agitación magnética y poner a girar lo más rápido posible.

Conectar la fuente de poder e iniciar la corrida a 100 volts durante 1 hora 15 minutos.

Una vez terminada la corrida, desensamblar el sándwich y remover la membrana para procesarla.

4.7.2 Inmunotinción.

Bloquear la membrana de nitrocelulosa con solución bloqueadora durante 1 hr a 30°C. Realizar 3 lavados con 20 -25 ml de PBS-Twen (1:1000), durante 10 minutos cada lavado.

Hacer una dilución 1:5000 de suero hiperimmune anti-BGH con buffer diluyente y se colocar 30 ml en el recipiente incubando 2 h en agitación a temp ambiente.

Lavar 3 veces con PBS-Twen 20 (1:1000) 10 min cada uno.

Hacer una dilución el anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa 1:15000 con buffer diluyente y se colocar 30 ml en el recipiente incubando 1 h en agitación constante a temp ambiente.

Lavar 3 veces con PBS-Twen 20 (1:1000) 10 min cada uno.

REVELADO: 30 ml de PBS 0.1 M pH 7.4 tibio (dejar previamente en incubadora de 37°C) + 15 mg de 3'3' diamino bencidina, colocar la membrana y agregar 60 µl de H₂O₂ al 30%. Detener la reacción con 1 ml de HCl 5 N. Realizar varios lavados con agua.

Finalmente colocar las membranas entre dos pedazos de papel filtro y presionar entre dos cristales hasta que se sequen.

4.8 Pruebas de purificación.

Protocolo para la purificación con IMAC de Novagen.

Preparar la resina de la siguiente manera; poner un ml de resina en un tubo eppendorff de 2 ml, centrifugar por 4 min a 4000 rpm, eliminar el sobrenadante y agregar 1.5 ml de agua destilada estéril, centrifugar de nuevo en las mismas condiciones y descartar el sobrenadante. Repetir el lavado con agua por 2 veces más. Poner 1 ml de tris-Cl 20 mM pH 8.0, y pasar a un tubo falcon de 15 ml en donde se agregó también la muestra (que ya había tenido una diálisis previa con tris 20 mM pH 8.0 y una concentración de 15 veces el vol inicial), llevar a un volumen de 10 ml con tris 20 mM pH 8.0. Poner en agitación leve por 2 horas en el cuarto frío. Pasar esta mezcla a una columna plástica de BIORAD de 1x9 cm. Dejar que se asiente la resina por 20 minutos y recolectar la fracción eluida en un tubo falcon de 15 ml (esta fracción corresponde a las proteínas contaminantes en el medio de fermentación).

Hacer dos lavados de 6 ml cada uno, con buffer de lavado que contiene 0.5 mM de imidazol, y recuperar las fracciones eluidas. Hacer un gradiente de imidazol de 50, 100, 200 y 400 mM para ver con que concentración podría despegarse la proteína de la resina y recolectar las fracciones eluidas de aproximadamente 6 ml de volumen total de cada una.

Un volumen de las fracciones fue precipitado y corrido en geles SDS-PAGE para el análisis del proceso de purificación. Estos geles fueron analizados por el programa Gelpro 32 de BIO-RAD. A cada una de las fracciones recuperadas se les determinaron proteínas totales por Bradford para ver que porcentaje del total representaban.

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Diseño de primers y amplificación del casete de la BGH.

Para amplificar del DNAC de la BGH de las tres construcciones (estrategia en figuras 4, 5 y 6), se diseñaron los primers que se describen en las figuras 10, 14 y 16. Para el diseño de estos primers se tomó en cuenta la secuencia del DNAC que codifica para la BGH madura, reportada en el GenBank (gi | 30794287).

5.1.1 Diseño de primers y amplificación para pPICNH₂-6His-BGH.

Para esta construcción se diseñaron primers (figura 10), que se adaptaban a una región del casete de la BGH y además agregan el sitio *Avr* II (en el extremo carboxilo terminal del casete, primer antisentido), y en el extremo amino terminal un nuevo sitio de restricción *Bss* HII, así como un sitio de corte para la enterokinasa (primer sentido); esta enzima reconoce una secuencia Asp-Asp-Asp-Asp-Lys y corta justo a la derecha de ella, lo que nos da la posibilidad de remover la etiqueta de poli-histidina. La remoción de esta etiqueta es de importancia, ya que no se sabe aún si puede ser inmunogénica.

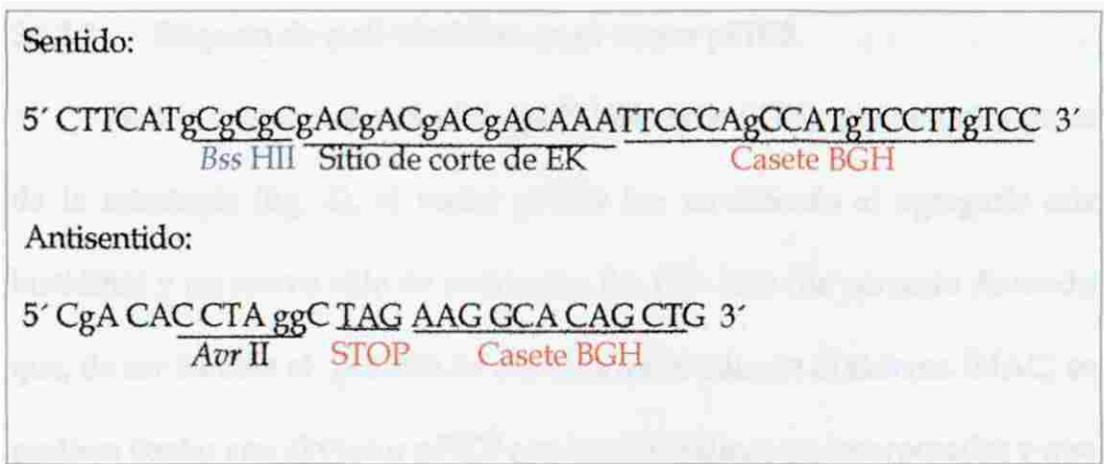


Figura 10. Primers para amplificar el casete de la BGH para la construcción pPICNH₂-6His-BGH. Estos primers se acoplan en una región al casete de la BGH y agregan los sitios de restricción *Avr* II y *Bss* HII, además de un sitio de corte para la enterokinasa.

Se amplificó con estos primers a partir de un plásmido portador del casete de la BGH, el producto final era de 611 pb, el cual fue corroborado en gel de agarosa al 1% (Figura 11).

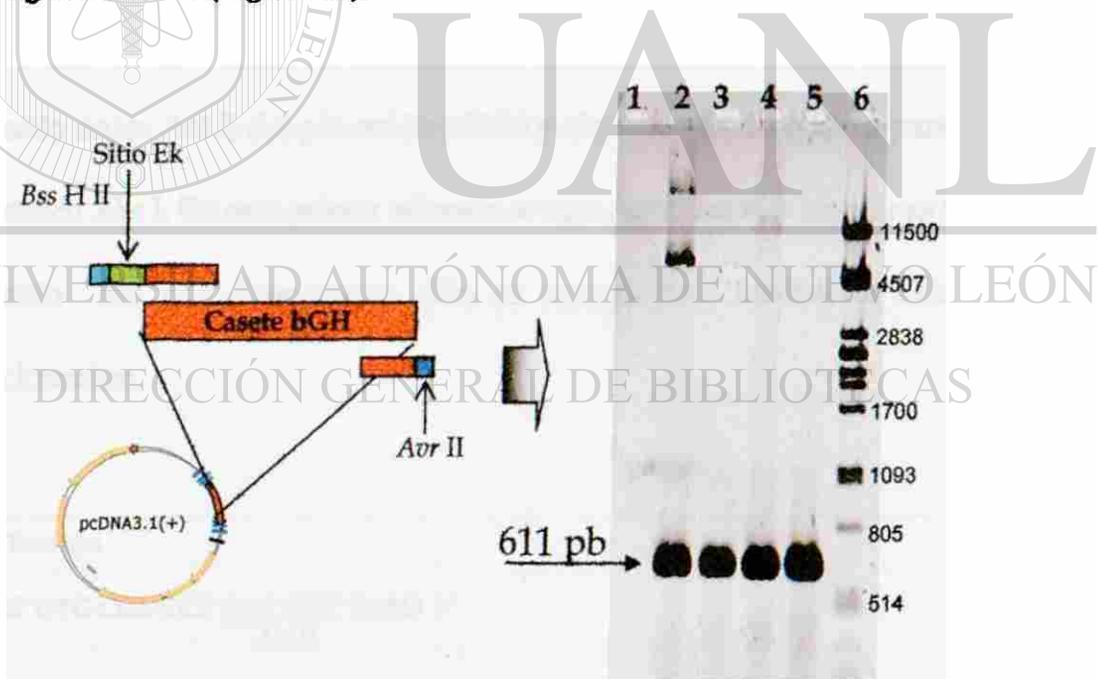


Figura 11. Amplificación con primers para la construcción pPICNH₂-6His-BGH. Los primers se acoplan a regiones terminales en el casete de la BGH y agregan los sitios de restricción *Bss*H II y *Avr* II para la estrategia de clonación. Gel de agarosa al 1%, carril 1) Control negativo, 2) pCDNA 3.1, 3) pCDNA3.1, 4) pPICecGH 5) BGH 6) marcador λ /Pst. Se observa la banda del producto amplificado cuyo tamaño es de 611 pb.

5.1.1.1 Etiqueta de poli-histidina en el vector pPIC9.

Para la misma construcción (pPICNH₂-6His-BGH), pero en otra parte de la estrategia (fig. 4), el vector pPIC9 fue modificado al agregarle seis histidinas y un nuevo sitio de restricción *Bss* HII. Esto fue pensado de modo que, de ser factible el proceso de purificación mediante el sistema IMAC, se pudiera contar con el vector pPIC9 con las 6 histidinas ya incorporadas y que facilitarían la clonación de los demás DNAs de las diferentes GHs con las que cuenta el laboratorio, añadiendo esta etiqueta en la región amino de cada una de ellas.

Para introducir las seis histidinas en pPIC9 antes de sitio *Xho* I (sitio donde están incorporados la mayoría de los casetes de las GHs) se diseñaron los primers descritos en la figura 12. El primer sentido se diseñó a partir del sitio único *Aat* II del plásmido pPIC9 y el primer antisentido a partir del sitio único *Xho* I. En este primer además se agregaron las seis histidinas y el nuevo sitio *Bss* HII. Este nuevo sitio se agregó para facilitar la estrategia de clonación.

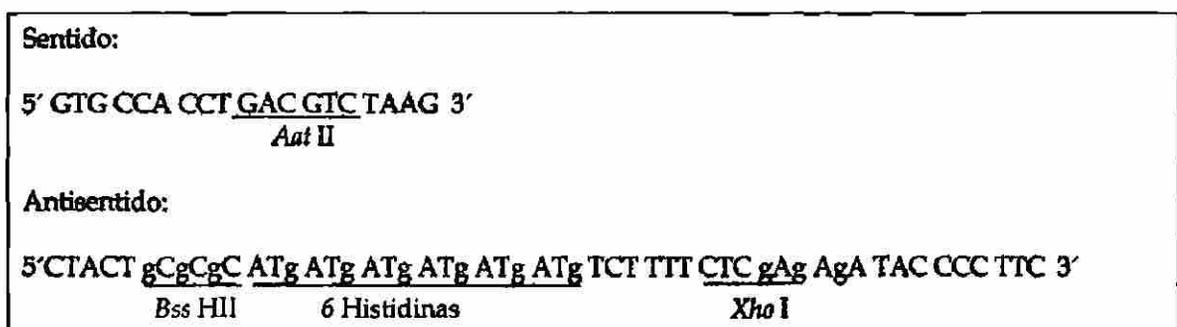


Figura 12. Primers para introducir poli-histidina al vector pPIC9. Primer sentido con el sitio único *Aat* II y primer antisentido con el nuevo sitio *Bss* HII y las seis histidinas para quedar incorporadas en el vector pPIC9.

El producto amplificado de 1452 pb fue visualizado en un gel de agarosa al 1% (Figura 13).

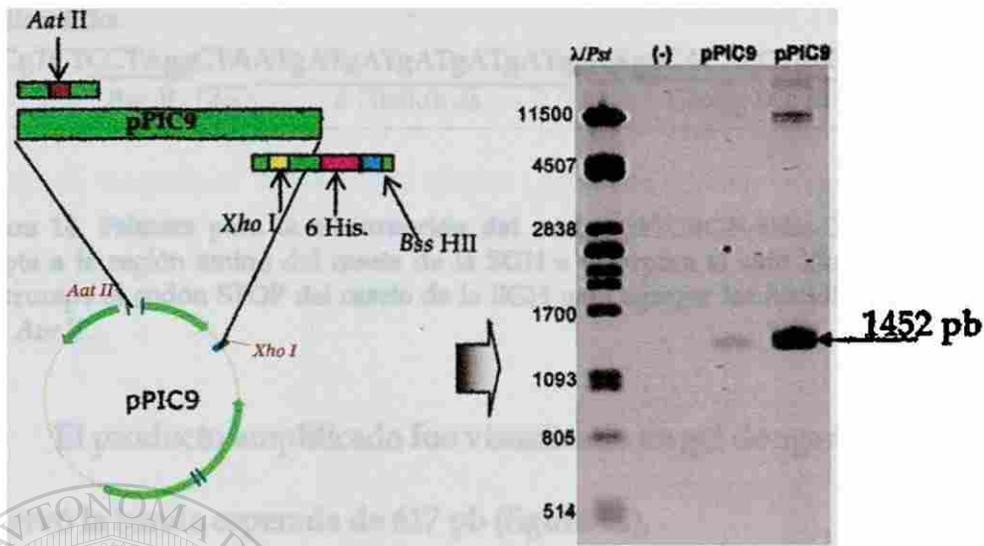


Figura 13. Amplificación con primers que incorpora poli-histidina al vector pPIC9. El primer sentido se pega al sitio único Aat II del vector pPIC9 y el primer antisentido se pega al sitio Xho I y agrega las 6 histidinas y el sitio de restricción Bss HII para la estrategia de clonación. Gel de agarosa al 1%, se observa la banda del producto amplificado cuyo tamaño es de 1452 pb.

5.1.2 Diseño de primers y amplificación para pPICBGH-6His-COOH.

Para esta construcción se diseñó un primer sentido que se adapta a la región aminoterminal del casete BGH y agrega el sitio de restricción Xho I y un primer antisentido que se pega a la región carboxilo terminal, interrumpe el codón STOP y agrega las seis histidinas e incluye el sitio de restricción Avr II para la estrategia de clonación (figura 14).

Sentido:

5' gCTgA CTC gAg AAA AgA TTC CCA gCC ATg TCC TTg 3'
Xho I Casete BGH

Antisentido:

5' CgTCTCCTAggCTAATgATgATgATgATgATggAaggCACAgCTggCCTCCCCgAA 3'
Avr II Stop 6 Histidinas Casete BGH

Figura 14. Primers para la construcción del vector pPICBGH-6His-COOH. Sentido: se adapta a la región amino del casete de la BGH e incorpora el sitio *Xho* I. Antisentido: se interrumpe el codón STOP del casete de la BGH para agregar las histidinas y se incluye el sitio *Avr* II.

El producto amplificado fue visualizado en gel de agarosa al 1% y se

observó la banda esperada de 617 pb (figura 15).

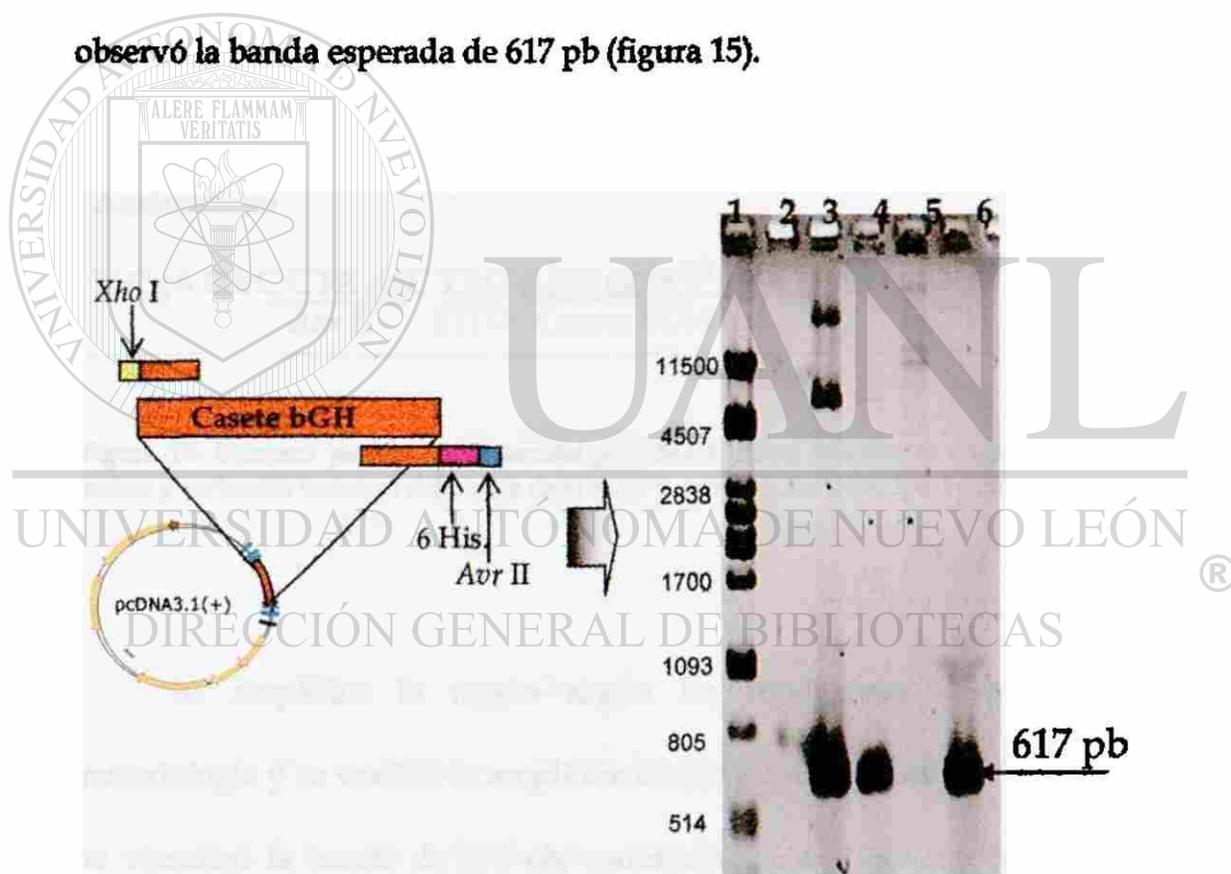


Figura 15. Amplificación con primers para la clonación del casete BGH para la construcción pPICBGH-6His-COOH. Los primers agregan los sitios *Xho* I y *Avr* II y las seis histidinas en la región carboxilo terminal del casete de la BGH. Gel de agarosa al 1%. Carril 1) λ/Pst , 2) Control negativo, 3) pcDNA3.1, 4) pcDNA 3.1 5) pPICEcGH 6) BGH. Se observa la banda del producto amplificado cuyo tamaño es de 617 pb.

5.1.3 Diseño de primers y amplificación para pPICBGH

Para esta construcción se diseñó un primer sentido que se adapta a la región amino terminal del casete BGH y agrega el sitio de restricción *Xho* I, así como un primer antisentido que se pega a la región carboxilo e incluye el sitio de restricción *Avr* II para la estrategia de clonación en el vector pPIC9 (figura 16).

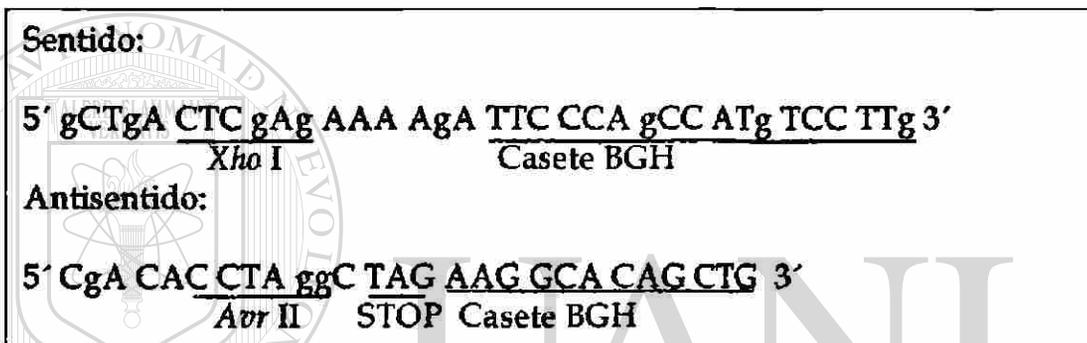


Figura 16. Primers para la construcción pPICBGH. Estos primers se pegan a la región amino y carboxilo terminal del casete de la BGH y agregan los sitios *Xho* I y *Avr* II.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se amplificó la región según las condiciones descritas en la metodología y se verificó la amplificación en gel de agarosa al 1%, en donde se visualizó la banda de 599 pb, correspondiente al tamaño del producto amplificado (figura 17).

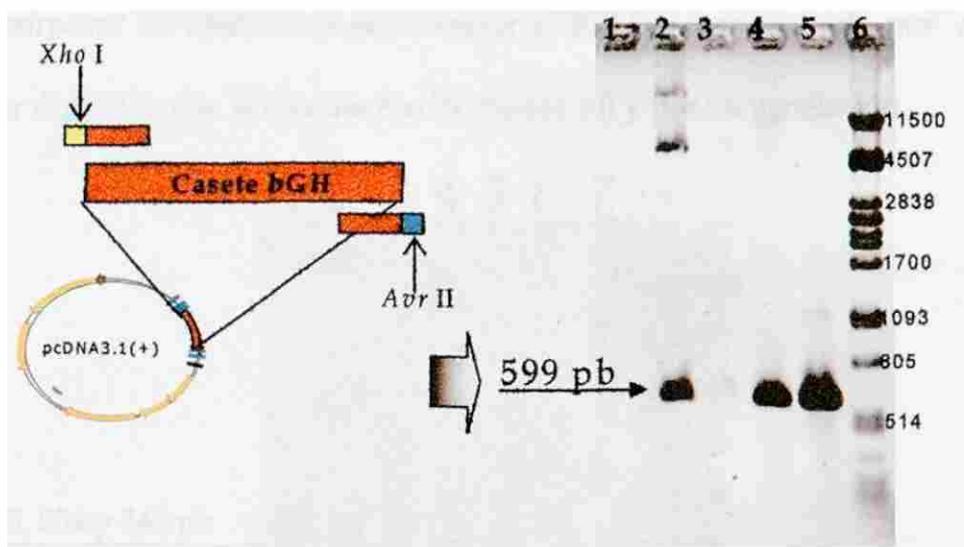


Figura 17. Amplificación para la construcción pPICBGH. Los primers se pegan al casete en su región amino y carboxilo y agregan los sitios de restricción *Xho* I y *Avr* II. Gel de agarosa al 1%, Carril 1) control (-), 2) pCDNA3.1, 3) pCDNA3.1, 4) pFICEcGH 5) BGH 6) λ/*Pst*. Se observa el producto amplificado cuyo tamaño es de 599 pb.

5.2 Clonación de los fragmentos amplificados en el vector pCR®-XL-TOPO®.

Los fragmentos amplificados fueron clonados siguiendo las indicaciones del estuche TOPO®XL-PCR de Invitrogen.

5.2.1 Caracterización de clonas candidatas.

Se levantaron alrededor de 20 colonias de cada una de las clonaciones, de las cuales un 80-100% resultaron contener el fragmento insertado. Esto fue corroborado por caracterización por PCR con los primers M13 que se pegan a ambos lados del inserto (figura 18), y por secuenciación con los mismos primers. Además se caracterizó por digestión usando las enzimas *Eco* RI, cuyo sitio en el vector se encuentra flanqueando el inserto y *Pst* II que se encuentra dentro del fragmento insertado (figura 19). El fragmento para

incorporar las histidinas en el vector pPIC9 fue caracterizado por retraso, por digestión con la enzima *Eco* RI (figura 20) y por secuenciación.

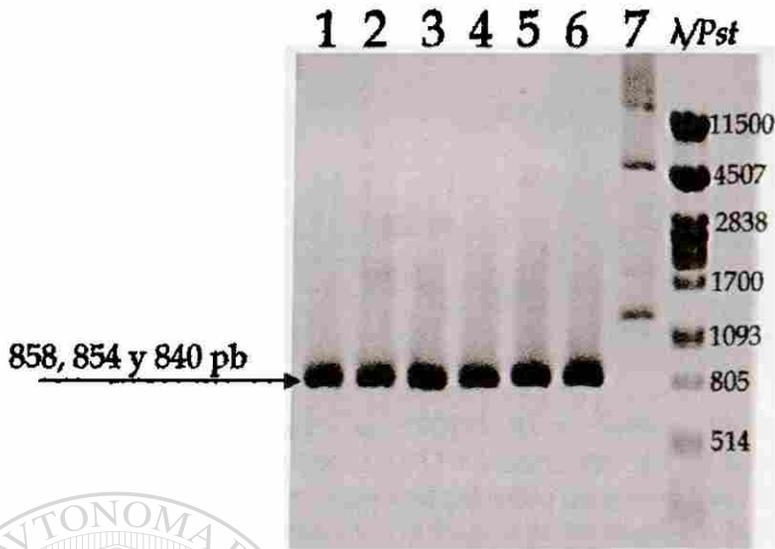


Figura 18. Caracterización por PCR con primers M13. Carril 1 y 2) clonas candidatas de pTOPOBGH6 HisCOOH, carril 3 y 4) clonas candidatas de pTOPOEKBssHII, carril 5, 6 y 7) clonas candidatas para pTOPOBGH, los fragmentos esperados son de 858, 854 y 840 pb, respectivamente.

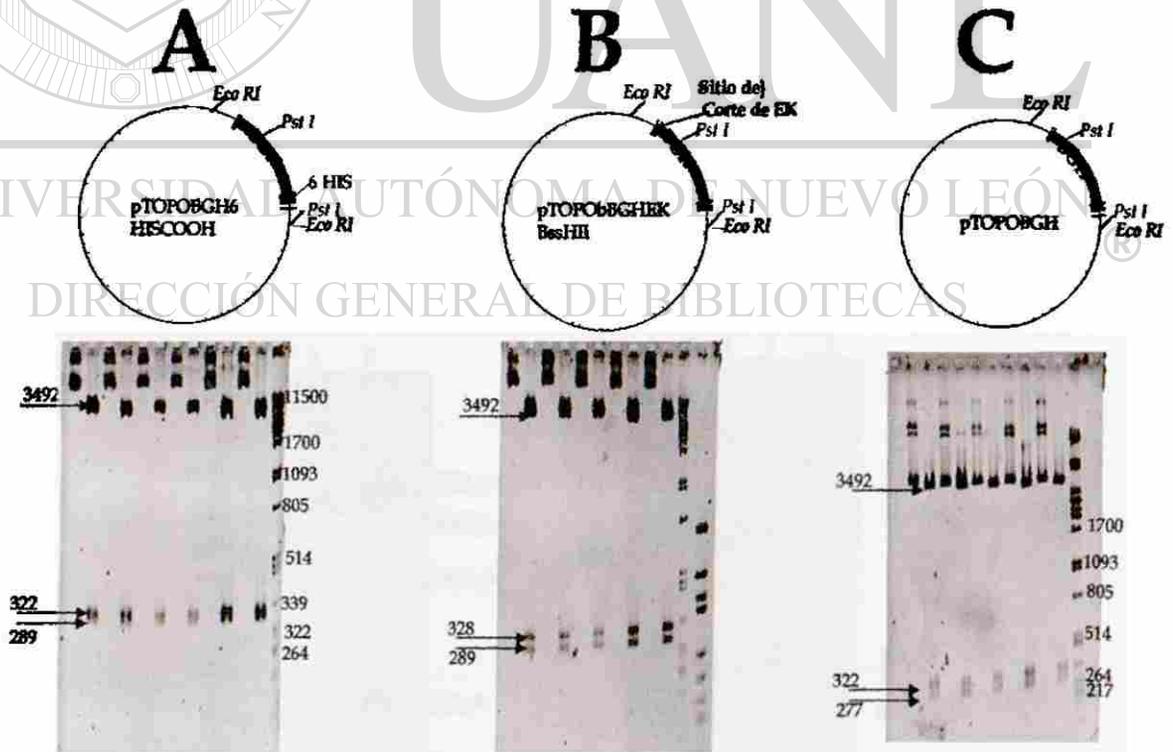


Figura 19. Caracterización por digestión con *Eco* RI y *Pvu* II. A, B y C) Caracterización con enzimas *Eco* RI- *Pst* I se muestra el plásmido con los sitios de restricción para la caracterización y los gels de las caracterizaciones, así como los fragmentos esperados. Todos corridos en gels de agarosa al 2%.

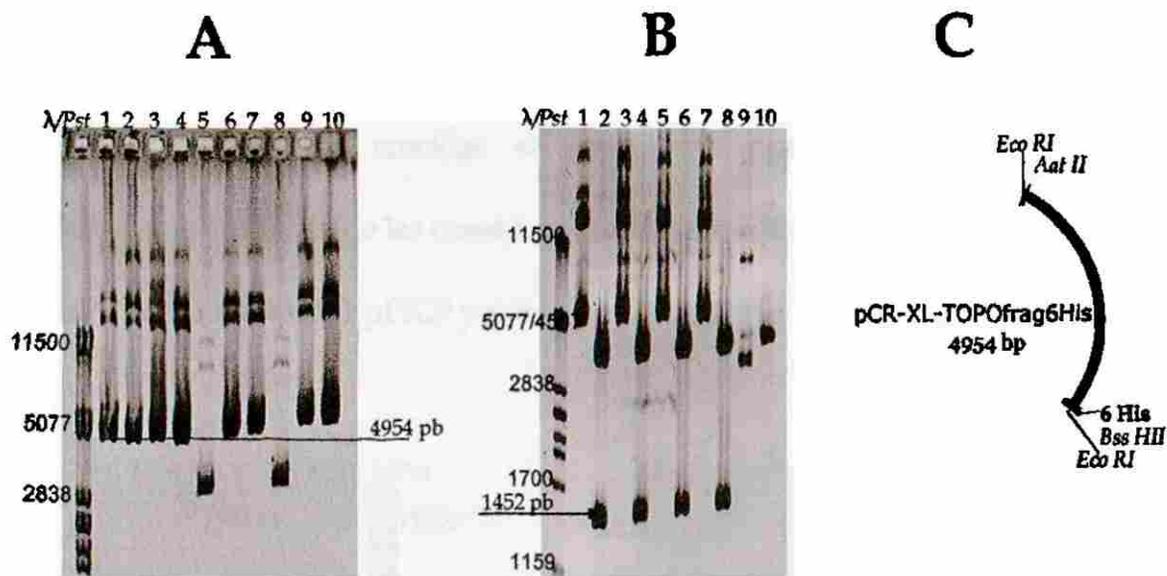


Figura 20. Caracterización en pTOPO. A) se observan 10 clonas candidatas retrasadas, pTOPO sin inserto: 3519 pb pTOPO + inserto: 4954 pb. B) Se seleccionaron las clonas que resultaron retrasadas con respecto al plásmido sin inserto y se analizaron por caracterización con la enzima *Eco* RI, liberando el fragmento insertado de 1452 pb. En el primer carril y demás carriles nones aparece una clona candidata sin restricción y en el segundo carril y el los demás carriles pares, la misma clona candidata digerida con *Eco* RI (así se siguió para una serie de 5 clonas candidatas). C) Vector pTOPO con inserto y los sitios de restricción para la caracterización.

5.3 Subclonación de los fragmentos en el vector pPIC9.

Los vectores y los fragmentos fueron digeridos y purificados con el estuche QUIAEX II (figura 21). Una vez purificados fueron ligados al vector pPIC9 y transformados en cepas de *E. coli* XL-1 Blue.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIOTECAS

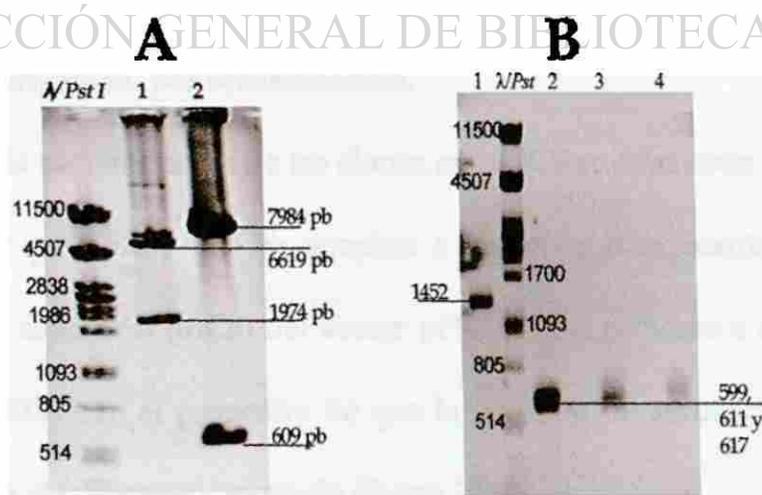


Figura 21. Preparación de los fragmentos y del vector para la subclonación. A) Vector pPIC9DGH 1) Cortado con *Aat* II / *Avr* II 2). Cortado con *Xho* I / *Avr* II. B) Verificación de la purificación de los fragmentos digeridos y purificados con el estuche QUIAEX II 1) fragmento de 1452 pb. Geles de agarosa al 1%.

5.3.1 Caracterización por digestión y PCR de las clonas candidatas en pPIC9.

De las colonias crecidas se levantaron aproximadamente 6-10 candidatas de cada una de las construcciones y se analizaron por PCR con los primers AOX1 del vector pPIC9 y por digestión con *Pvu* II (figura 22).

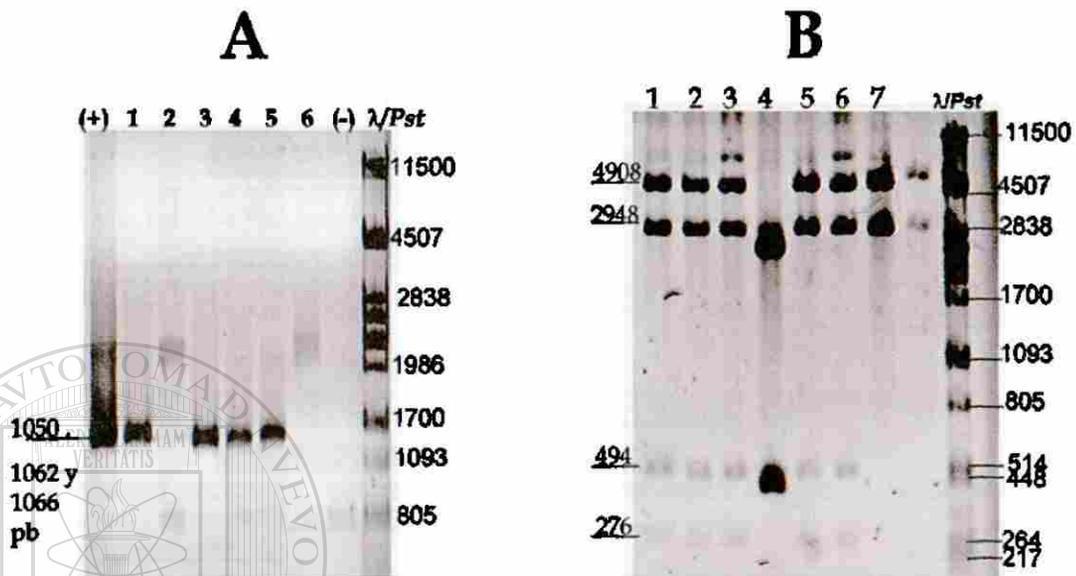


Figura 22. Caracterización por PCR y por digestión. Geles de agarosa al 1% A) Amplificación con primers AOX; Control (+), 1 y 2) Clona a y b construcción pPICNH₂-6His-BGH, 3 y 4) Clona c y d construcción pPIC9BGH, 5 y 6) Clona e y f construcción pPIC9BGH-6His-COOH, control (-). B) Caracterización por Digestión con *Pvu* II; 1 y 2) clonas para pPICNH₂-6His-BGH, 3 y 4) pPIC9BGH, 5 y 6) pPIC9BGH-6His-COOH. Fragmentos esperados: pPICBGH 4908, 2948, 494 y 276 pb. pPIC9: 5074, 2949 pb, como control para corte.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.3.2 Caracterización por secuenciación.

Para la secuenciación de las clonas en pPIC9 se diseñaron los primers pPIC9FM y pPIC9RM que se acoplan a regiones flanqueantes del sitio múltiple de clonación (MCS) del vector pPIC9, más próximo a este que los primers AOX1, con el propósito de que la reacción de secuenciación fuera más cercana al fragmento insertado (figura 23).

ACAGCAATAT ATAAACAGAA GGAAGCTGCC CTGCTTAA CTTTTTTTT TATCATCAIT ATTAGCTTAC

5' AOX1 Primer Site (865-875)

TTTCATAATT GCGACTGGTT CCAATTGACA AGCCTTTGAT TTAAACGACT TTAAACGACA ACTTGAGAAG

α-Factor (948-1216)

ATCAAAAAC AACTAATTAT TCGAAGGATC CAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala

GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT
Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp

GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT
Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp

← TTC TCG CTA TTT TCC ACC ACC ACC →

TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC ACC ACC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA
Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile

α-Factor Primer Site (1152-1172)

AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA
Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg

Signal cleavage (1204)

GAG GCT GAA GCT TAC GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG AAT TAA TTCGCCCTAG
Glu Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala Asn ***

ACATGACTGT TCCTCACTTC AAGTTGGGCA CTTACGAGAA GACCGGTCTT GCTAGATTCT AATCAAGAGG
TTC TCG CTA TTT TCC ACC ACC ACC

5' AOX1 Primer Site (1327-1347)

ATGTEACAAT GCCAATTGCC TGAGAGATGC AGGCTTCATT TTGATACTT TTTTATTGT AACCTATATA

AOX1 mRNA 3' end (1418)

GTATAGGATT TTTTGTGCA

Figura 23. Primers pPIC9FM y pPIC9RM. ○ Primers AOX1 ■ Primers pPIC9FM y pPIC9RM. Entre los sitios □ Xho I y Avr II, fueron insertados los casetes de la BGH.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Estos primers además servirían para amplificar y secuenciar todas las hormonas con las que cuenta el laboratorio, que se encuentran en el vector pPIC9.

En la figura 24 se describen los geles obtenidos mediante secuenciación, específicamente de las regiones en donde se encuentra la etiqueta de las construcciones pPICNH₂-6His-BGH y pPIC9BGH-6His-COOH.

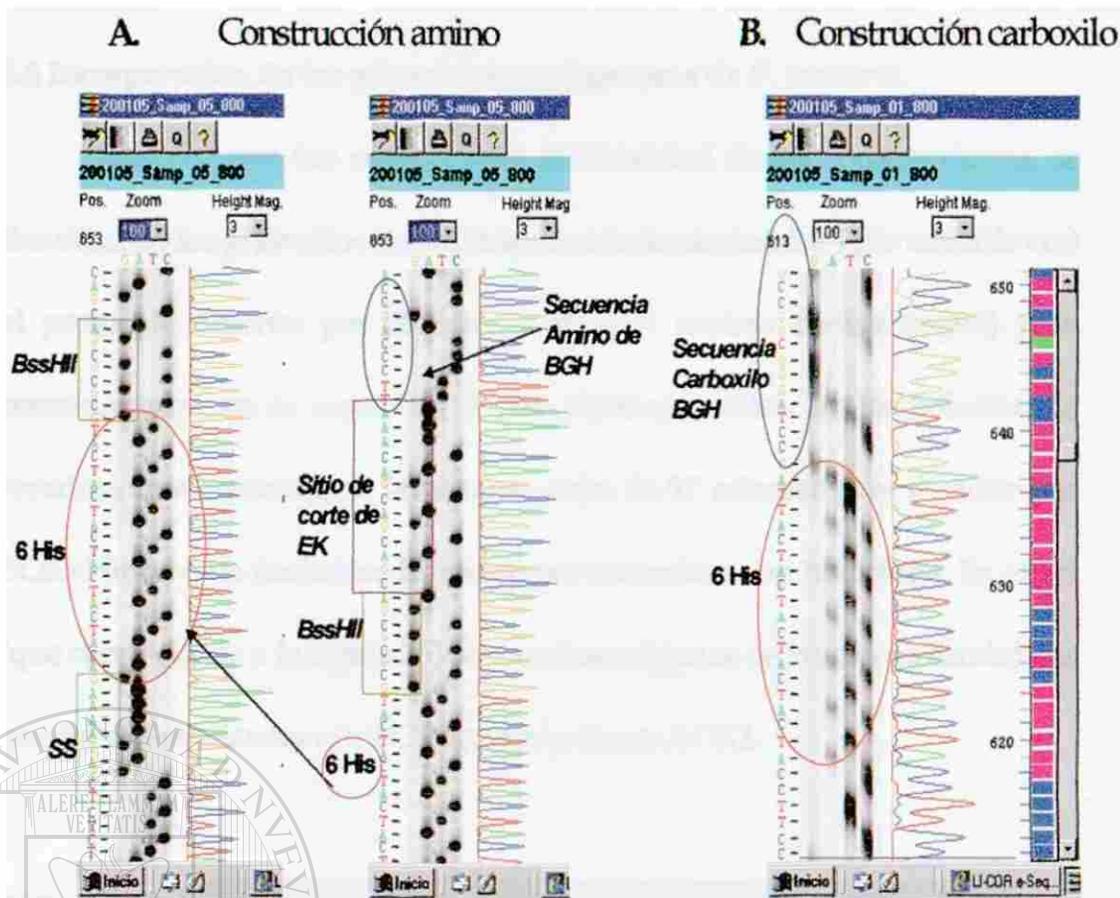


Figura 24. Verificación por secuenciación nucleotídica. Gels analizados por el software de secuenciación. A) Gel para la construcción pPICNH₂-6His-BGH en donde se observan las 6 histidinas en tandem y el nuevo sitio de restricción Bss HII. B) Gel para la construcción pPICBGH-6His-COOH.

En la figura 25 se esquematizan las tres construcciones obtenidas en este trabajo.

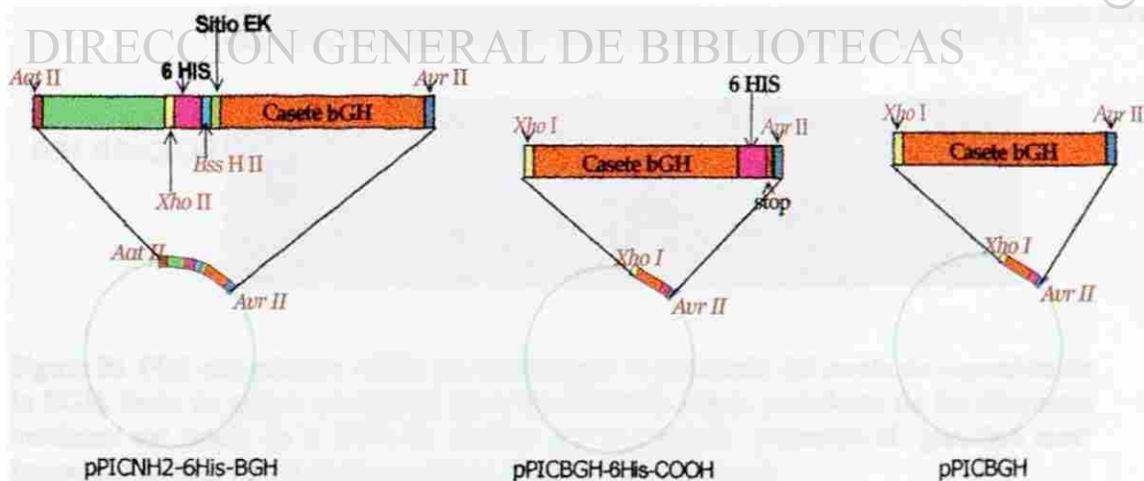


Figura 25. Plásmidos construídos. Se esquematizan los tres plásmidos portadores del casete de la BGH en el vector de recombinación pPIC9.

5.4 Incorporación de los plásmidos en el genoma de *P. pastoris*.

Una vez que fue comprobada la identidad de las construcciones, se linealizaron los plásmidos recombinantes con la enzima *Sac* I (de acuerdo con el protocolo descrito por el Estuche para *P. pastoris* de Invitrogen) y se transformaron en la cepa GS115 por electroporación. De las colonias de levadura que crecieron, se levantaron entre 36-37 colonias para detectar por PCR si hubo o no inserción del casete por recombinación homóloga. En el gel (que corresponde a la figura 26) se muestran algunas de las clonas candidatas que fueron analizadas por PCR con los primers AOX1.

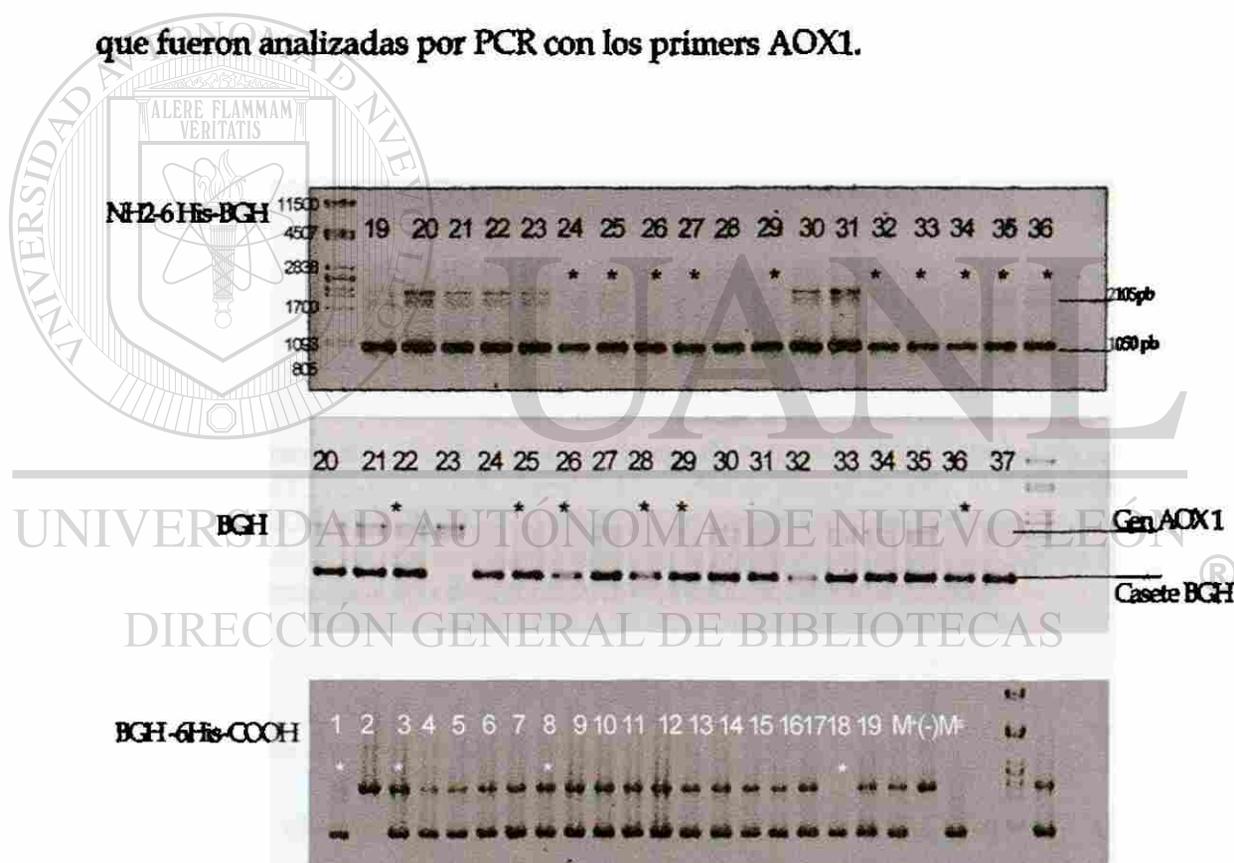
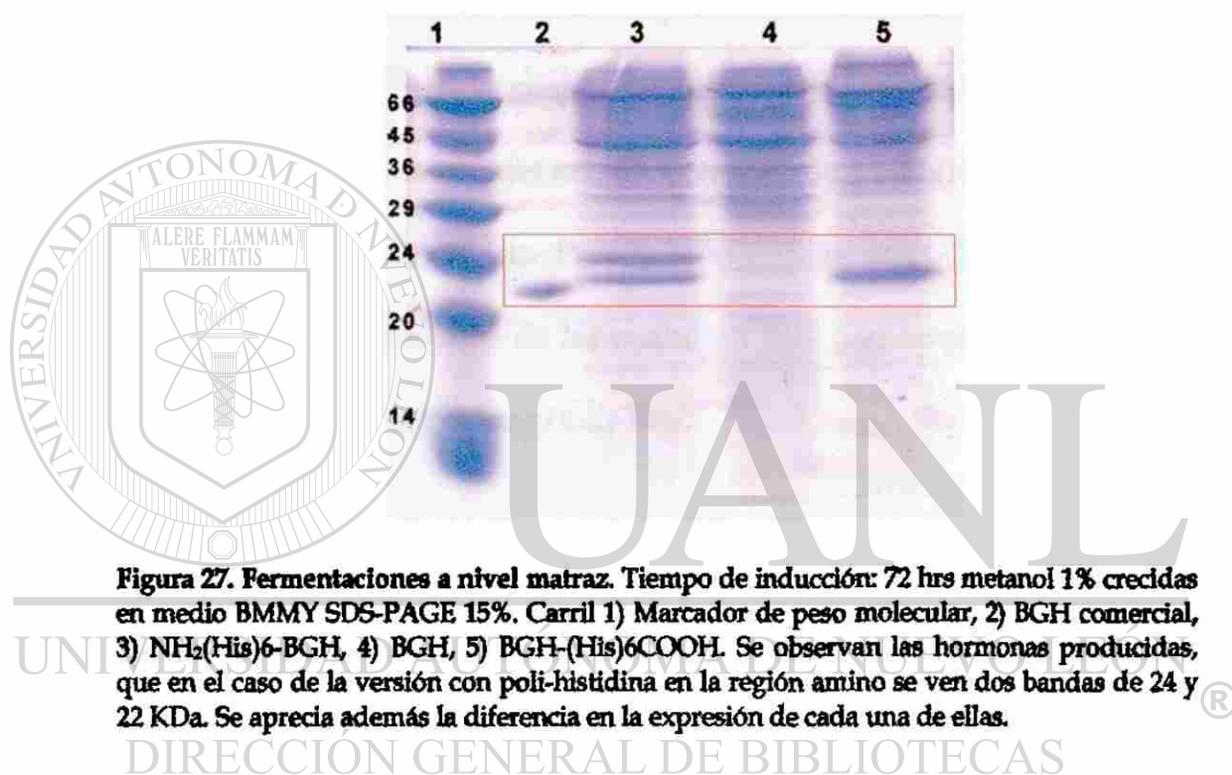


Figura 26. PCR con primers AOX1 para corroborar la presencia del casete de expresión de la BGH. Serie de clonas candidatas para las diferentes cepas portadoras de las diferentes versiones del casete de la BGH. Se observa que la mayoría presentan el genotipo mut⁺ (presencia del gen AOX1 endógeno como el casete BGH exógeno).

5.5 Fermentaciones a nivel matraz.

Se realizaron fermentaciones a nivel matraz de las cepas que por PCR fueron identificadas como mut^o. Se crecieron en 50 ml de medio rico (BMGY) y se indujeron en BMMY por 96 horas. En la figura 27 se observan las proteínas del medio de cultivo, resueltas por SDS-PAGE y teñidas con azul de coomassie.



5.5.1. Análisis de los geles.

En la visualización del gel de poliacrilamida se resalta que la cepa portadora del casete para la versión de la hormona con las histidinas en la región amino es la mayor productora de hormona y que posee dos bandas que dan reacción con el anticuerpo policlonal anti-BGH (figura 32). Además, se observa que es muy pobre la producción de la hormona sin histidinas, lo

que podría sugerir que las histidinas podrían estabilizar la proteína o protegerla contra la proteólisis.

Usando el programa Gelpro32 de BIO-RAD, analizamos los geles, y pudimos hacer una estimación de la cantidad de la hormona de interés con respecto a las proteínas totales producidas, presentes en el medio de fermentación; además de darnos el peso molecular de cada una de éstas (figura 28). La cantidad de hormona que se obtuvo de las fermentaciones a nivel matraz fue: Para la construcción $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{-BGH}$: 20.80 mg/L de proteínas totales, de las cuales un 31% corresponde a $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{-BGH}$, lo que equivale a 6.4 mg/L de ésta. Para la construcción $\text{BGH}-(\text{His})_6\text{COOH}$: 8.97 mg/L de proteínas totales, de las cuales un 20% corresponde a $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{-BGH}$, lo que equivale a 1.8 mg/L de ésta.

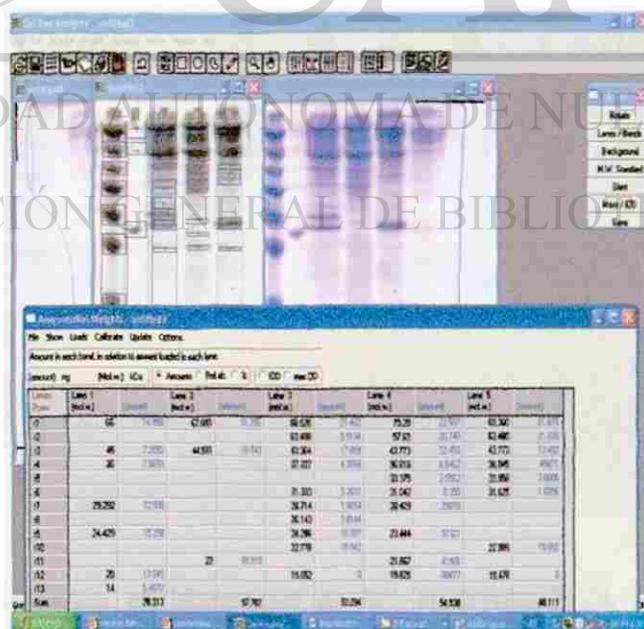


Figura 28. Análisis de los geles. Esquema con una tabla de análisis dada por el programa en donde se muestran los porcentajes de la proteína con respecto a las proteínas totales visualizadas y los pesos moleculares de las mismas. Para $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$ se observan dos bandas de 24 y 22 KDa. Para el carril de la BGH se observa una baja producción de hormona, a la altura de 22 KDa y para $\text{BGH}-(\text{His})_6\text{COOH}$ se observa una banda a la altura de 22.8 KDa.

5.6 Fermentaciones en biorreactor.

Debido a que la cantidad de hormona producida en matraz no es suficiente para hacer los ensayos de purificación, se optó por fermentar en biorreactor las construcciones con la etiqueta de poli-histidina en la región amino y carboxilo terminales de la hormona.

La fermentación de la cepa para la $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$ se llevó a cabo con un tiempo de inducción de 71 horas, terminando con un volumen de 500 ml totales de medio. Se tomaron muestras para monitorear la densidad celular y la cantidad de hormona producida (figura 29). La concentración de proteínas totales presentes en el medio fue de 418 mg/L, de los cuales un 25% corresponden a la hormona, que equivaldría a 104 mg/L.

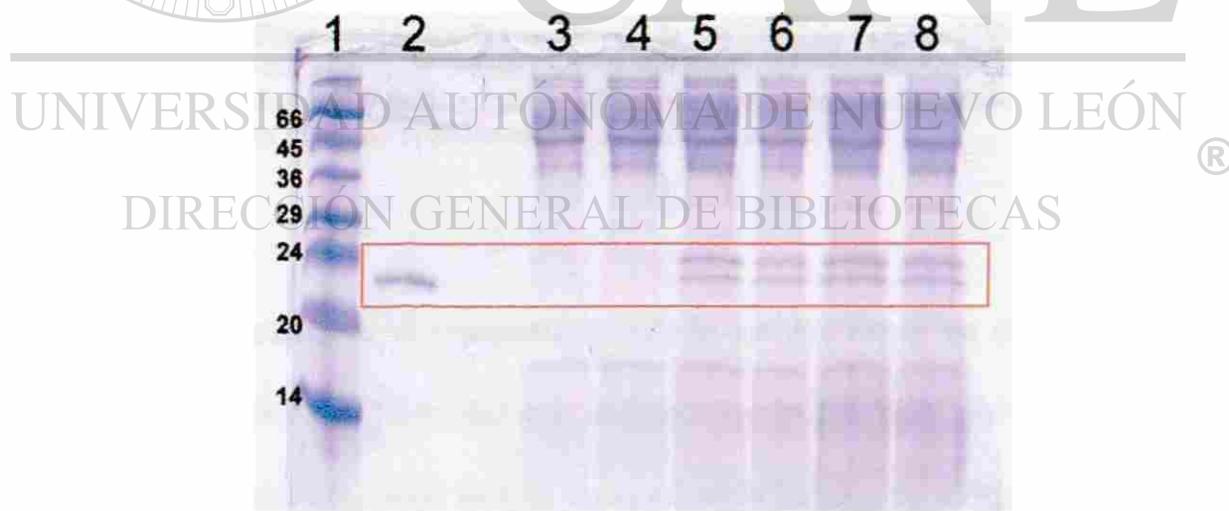


Figura 29. Fermentación en biorreactor de la $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{-BGH}$. SDS-PAGE 15%. Se tomaron 20 microlitros de muestra directa del medio de fermentación. Carril 1) Marcador de peso molecular, 2) BGH comercial, 3 y 4) fermentación a tiempo de inducción 0, 5) a 11 horas de inducción 6) 22 horas, 7) 46 horas y 8) 72 horas.

Para la fermentación de la cepa BGH-(His)₆COOH, se llevo a cabo la inducción en 48 horas y se terminó con un volumen de 600 ml. El tiempo de fermentación se redujo por problemas técnicos. También se tomaron muestras para monitorear la producción de proteína (figura 30). Se obtuvo una concentración de 267 mg/L de proteínas totales, de los cuales un 10% corresponden a la hormona, esto equivale a 26.7 mg/L.



Figura 30. Fermentación en biorreactor de la BGH-(His)₆-COOH. SDS-PAGE 15%. Se tomaron 20 microlitros de muestra directa del medio de fermentación. Carril 1) marcador de peso molecular, 2) BGH comercial, 3) fermentación a tiempo de inducción 0, 4) tiempo de inducción 12 horas, 5) 23 horas 6) 36 horas, 7) 42 horas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Analizando el comportamiento de las dos cepas en el curso de la fermentación, se determinó que ambas eran del fenotipo mut⁺ (al observar que toleraban bastante bien el metanol en la inducción, a diferencia de las cepas mut⁻, las cuales lo metabolizan lentamente y no toleran altas concentraciones del mismo).

5.7 Ensayos preliminares de purificación

Se hicieron algunos ensayos de purificación con las hormonas producidas a nivel de biorreactor, y el mejor ensayo obtenido se visualiza en la figura 31.

Se procuró que todo el proceso fuera llevado a cabo en pH 7.9-8.0. La muestra se dializó con tris 20 mM pH 8.0 y se dejó interaccionar con la resina por 3 horas, la cual estaba previamente cargada con los iones níquel. La resina fue luego lavada con 0.5 mM de imidazol (2 lavados de 6 ml) y se corrió un gradiente de elusión de 50, 100, 200 y 400 mM de imidazol. En la

figura 31 se observa que la proteína es retenida y eluída en la fracción de 50 mM de imidazol. En el cuadro 5 se detallan las cantidades manejadas durante el experimento, el porcentaje y la cantidad de proteína final obtenida.

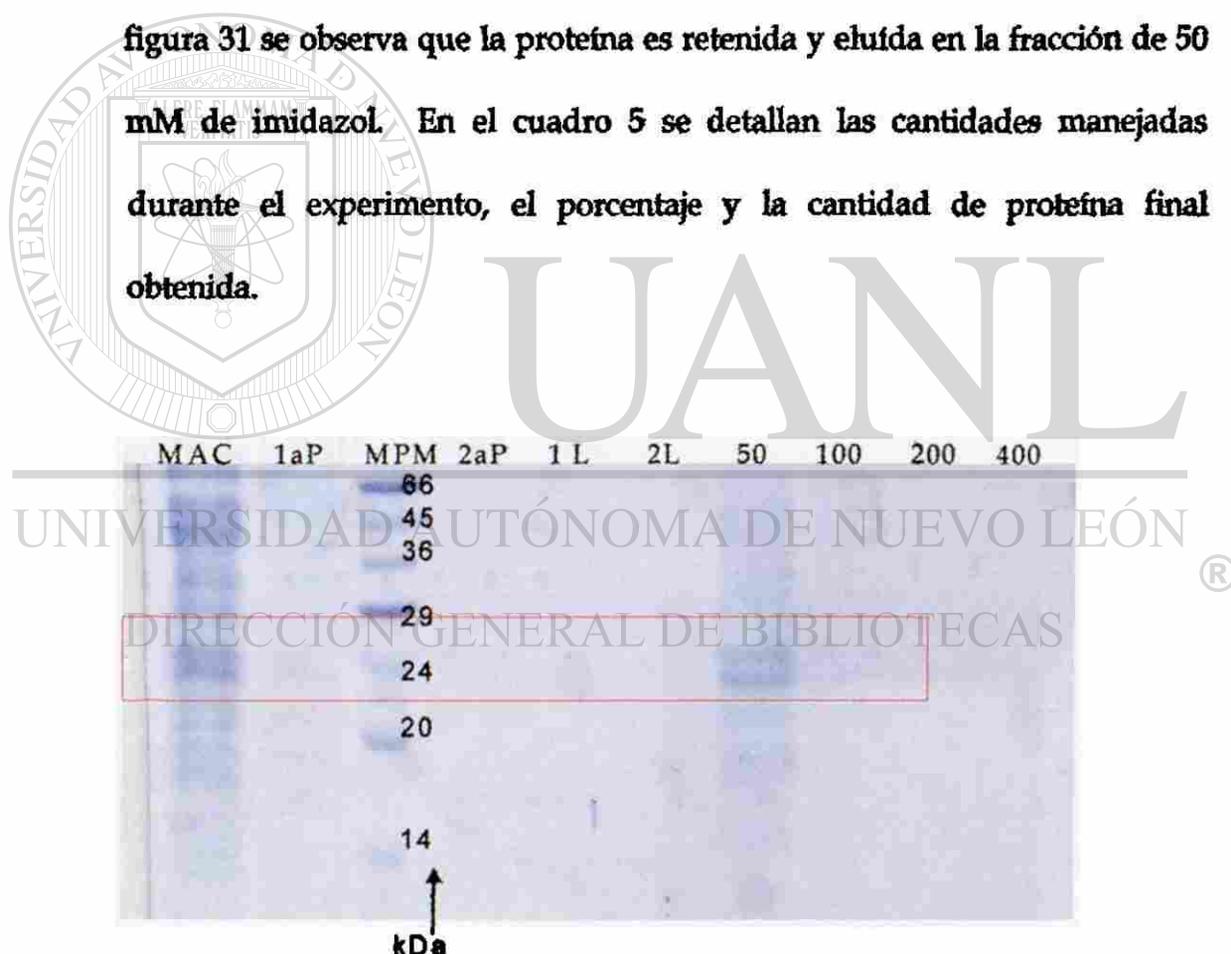


Figura 31. Semipurificación de la $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$. (MAC) muestra antes de cargar, (1aP) fracción eluída primaria, (MPM) marcador de peso molecular, (2aP) fracción eluída al pasar 10 ml de tris 20 mM pH 8.0, (1L) 1 er. lavado con imidazol 0.5 mM, (2L) 2do. lavado con imidazol 0.5 mM, (50, 100, 200 y 400) concentraciones mM de imidazol para eluir la proteína de interés.

Cuadro 5. Cuadro de resultados obtenidos en la semipurificación de la $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$ por IMAC.

	Proteínas totales ($\mu\text{g}/\text{L}$)	% que corresponde a $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$	$\mu\text{g}/\text{L}$ de $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$
Medio de cultivo	950	25	242.5
Purificación IMAC	180 *	60	108 **

* Fracción obtenida de la elusión con 50 mM de imidazol.

** Esta cantidad corresponde al 45% de la proteína inicial (242.5 $\mu\text{g}/\text{L}$).

5.8 Western blot.

Para comprobar la identidad de nuestra proteína producida se hizo un western blot previo al proceso de purificación de las muestras $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$ y $\text{BGH}(\text{His})_6\text{COOH}$ (Figura 32 A) . También se hizo un western blot de las muestras después de un proceso de purificación (figura 32 B). En ambas membranas se observa la proteína que migra ligeramente arriba de la BGH comercial.

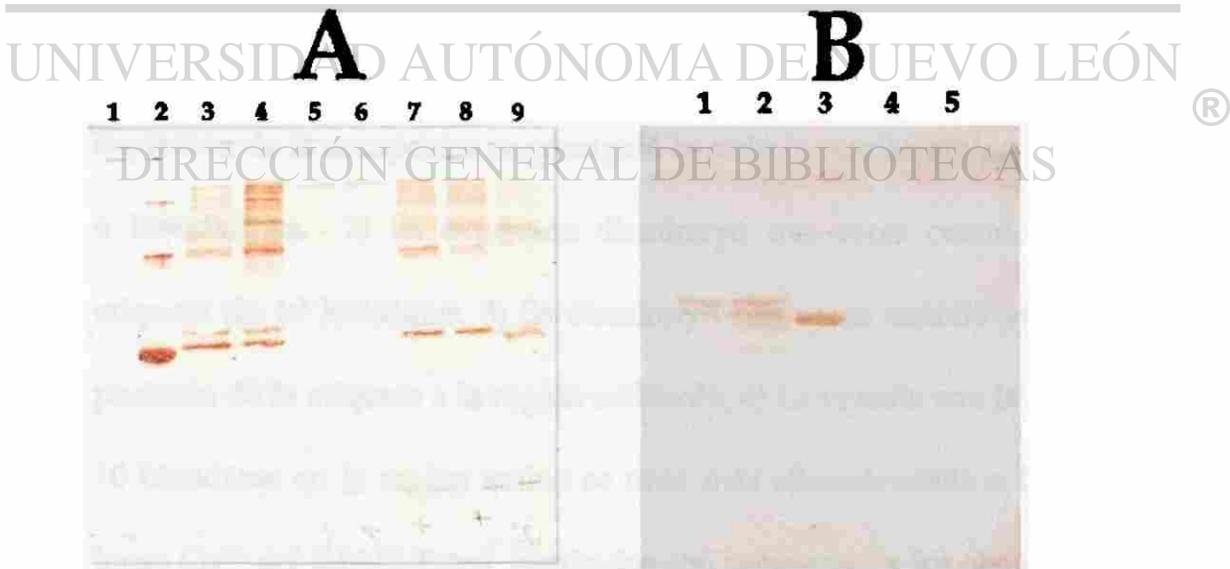


Figura 32 Análisis por Western blot. A) Western blot de fermentación en matraz. Carril 1) Albúmina sérica bovina, 2) BGH comercial, 3 y 4) clonas para $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$, 5y 6 clonas para BGH, 7 y 8) clonas $\text{BGH}(\text{His})_6\text{COOH}$, 9) Clona de GH de rata. Las muestras para BGH no estaban bien preparadas para correr la reacción. B) Western de purificación. Carril 1) purificación de $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$ eluída con 50 mM de imidazol, 2) elusión con 100 mM de imidazol, 3) BGH comercial, 4) Albúmina sérica, 5) pPIC9.

CAPITULO VI

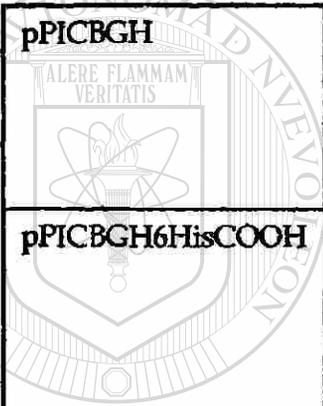
DISCUSIÓN

Las tres construcciones que contienen el casete de expresión de la BGH rindieron diferencias en los niveles de expresión y en el patrón electroforético. Estas construcciones solo difieren en que dos tienen una etiqueta de seis histidinas en los extremos de la BGH y la otra carece de esta etiqueta, por lo que se esperarían niveles de expresión muy similares. Sin embargo, se apreciaron diferencias (ver figura 27), tal y como se han descrito en trabajos como el de Mohanty y cols (2003). Estos investigadores construyeron cuatro vectores de expresión para *E. coli*, que codificaban para la proteína acuaporina Z (AqpZ): pET-NH6, pET-NH10, pET-CH6 y pET-CH10 (estos vectores sólo difieren en el número de histidinas y su posición en el extremo amino o carboxi terminal), observando que: 1) La mejor expresión de la acuaporina se consiguió usando la versión amino terminal de 6 histidinas. 2) La expresión disminuyó tres veces cuando se usó la etiqueta de 10 histidinas. 3) Se disminuyó seis veces cuando se cambió la posición de la etiqueta a la región carboxilo. 4) La versión con la etiqueta de 10 histidinas en la región amino se unió más eficientemente a la resina de iones Co^{+2} del IMAC. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en el presente trabajo, en donde se detectó que el nivel de expresión de la BGH con etiqueta en la región amino resulta mayor que la versión con la etiqueta en el carboxilo e incluso que con la versión sin etiqueta.

Se ha postulado que la etiqueta podría conferir mayor estabilidad a la proteína (comparar con expresión de BGH sin etiqueta en figura 27)^{34, 35,36}.

Las nuevas secuencias modificadas de la BGH fueron analizadas en el programa Prot Param tool⁴⁶ (cuadro 6), mismo que arrojó que la construcción con histidinas en el extremo amino, es en efecto, más estable que las otras, lo que concuerda con lo observado en nuestros resultados.

Cuadro 6. Características de las proteínas recombinantes producidas, según el programa ProtParam tool. En la tabla se observa que la vida media en levadura es tres veces mayor para la construcción con histidinas en la región amino que para las otras dos construcciones.

<p>pPICBGH</p> 	<p>Número de amino ácidos: 190 Peso molecular : 21744.9 KDa pI teórico: 7.83</p>	<p>Vida media estimada: 1.1 horas (reticulocitos de mamífero, <i>in vitro</i>). 3 min (levadura, <i>in vivo</i>). 2 min (<i>Escherichia coli</i>, <i>in vivo</i>).</p>
<p>pPICBGH6HisCOOH</p>	<p>Número de amino ácidos : 196 Peso molecular : 22567.7 pI teórico : 7.88</p>	<p>Vida media estimada : 1.1 horas (reticulocitos de mamífero, <i>in vitro</i>). 3 min (levadura, <i>in vivo</i>). 2 min (<i>Escherichia coli</i>, <i>in vivo</i>).</p>
<p>pPICNH26HisBGH</p>	<p>Número de amino ácidos : 203 Peso molecular : 23383.5 pI teórico : 6.82</p>	<p>Vida media estimada : 3.5 horas (reticulocitos de mamífero, <i>in vitro</i>). 10 min (levadura, <i>in vivo</i>). >10 horas (<i>Escherichia coli</i>, <i>in vivo</i>).</p>

Sin embargo, de la construcción sin etiquetas se esperaría mejor nivel de expresión, por lo que sería ideal replantear las condiciones en la fermentación, y en caso de que no se mejoren, hacer otro tipo de ensayos, como ver el uso preferencial de codones de la levadura, ver la posibilidad de usar otro tipo de promotor, (si otro sería más potente que el promotor usado actualmente), además evaluar si es posible agregar una secuencia pequeña

extra a la proteína que haga más eficiente la transcripción del mensajero y a su vez le de mayor estabilidad.

Comparada con la producción a nivel matraz, las fermentaciones a nivel de biorreactor aumentaron la expresión 16 veces en el caso de la versión amino y 15 veces en el del carboxilo. Sin embargo, se pudieron mejorar ciertos aspectos que podrían haber dado como resultado una mayor cantidad de proteína producida.

1) pH. Anteriormente se habían hecho ensayos a nivel tubo de ensayo con las proteínas, probando diferentes pHs. En estos ensayos se observó que a pH de 6, los niveles de la proteína recombinante de interés sobresalían con respecto a las proteínas endógenas de la levadura (figura 33).

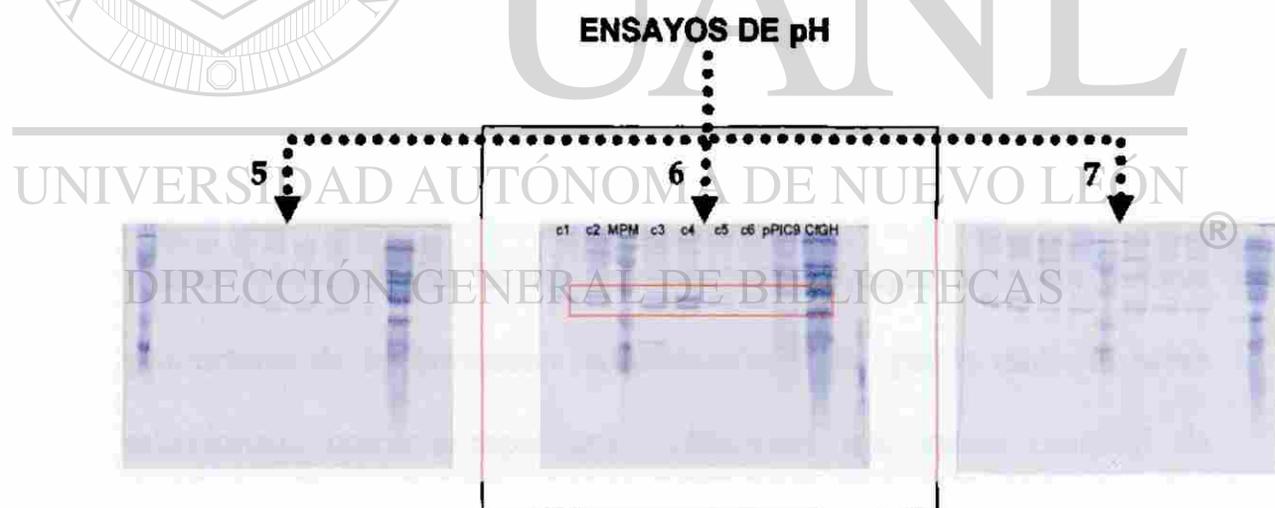


Figura 33 Fermentación a nivel tubo para ensayos de pH. Geles SDS-PAGE al 12% con el ensayo de cepas fermentadas a nivel de tubo. El pH 6 (buffer citratos pH 6, gel central), fue en el que mejor se expresaron las proteínas recombinantes (recuadro rojo dentro del gel) y en el que menor producción de proteínas endógenas hubo. El gel de la parte izquierda corresponde al ensayo con buffer de citratos pH 5, en donde se observa una menor expresión de las proteínas. El gel de la derecha corresponde a buffer de fosfatos pH 7.

Sin embargo la producción a nivel de biorreactor está estandarizada para iniciar a un pH de 5, terminándose a pH de 4. Se realiza de esta manera para evitar la degradación por proteasas, ya que por el tipo de aspas de la jarra de fermentación provoca la lisis celular y por lo tanto la liberación de proteasas. Debido a que el pH 5 no es el óptimo para la expresión preferencial de la proteína exógena, ésta disminuyó su nivel de expresión con respecto de las proteínas endógenas de la levadura. Esto fue mas evidente en la fermentación de la cepa BGH con poli-histidina en la región carboxilo (comparar figura 27, producción en matraz con figuras 29 y 30 producción en biorreactor).

2) Fenotipo. En el desarrollo de la fermentación en biorreactor se observó que las dos cepas que se habían seleccionado por PCR (BGH con etiquetas en región amino y la versión con etiqueta en carboxilo) se comportaron como mut^t, al responder rápida y favorablemente al metanol.

En las fermentaciones a nivel de biorreactor de diversas GHs desarrollada en nuestro laboratorio, se ha documentado que las cepas mut^s son mejores productoras de las hormonas recombinantes^{17,21,47}, por lo tanto, al haber seleccionado nosotros cepas mut^t, obtuvimos una menor cantidad de proteína de la que pudiéramos haber obtenido con cepas mut^s.

Se realizaron ensayos preliminares de purificación de las hormonas recombinantes producidas en biorreactor y si bien ya se ha obtenido aproximadamente un 60% de pureza y 45% de rendimiento (ver resultados

pág 57) de la hormona con la etiqueta en el extremo amino. Aún es necesario ajustar mejor las condiciones del proceso. Se consideran variables a optimizar el tiempo de interacción de la proteína con la resina, y las condiciones de astringencia del proceso, ya que en los intentos realizados se observó que permitir un mayor tiempo de interacción aumentaba la cantidad de proteína retenida; aunque aumentaban también los contaminantes, por lo que hay que compensar con una mayor astringencia, es decir, agregar una concentración de imidazol, como lo sugiere el protocolo de Novagen para minimizar por competencia la interacción de proteínas contaminantes con la resina.

Por lo anterior descrito, es necesario hacer mas ensayos para ver si es posible obtener la pureza y rendimiento óptimos para esta proteína usando esta cromatografía, ya que como se mencionó en los antecedentes se han obtenido mejores resultados purificando hormona del crecimiento por IMAC como en el reporte de Shin y cols (1997), quienes trabajaron con una etiqueta de 6 seis histidinas en la región amino de la GH humana, expresándola en *E. coli* en una jarra de fermentación de 5 L. Ellos reportan que la purificación fue realizada en un solo paso, obteniendo 2.2 g/L de la proteína con una pureza del 99%.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De los ensayos realizados con los vectores para expresar en *P. pastoris* proteínas recombinantes portando la etiqueta de poli-histidina en cualquiera de sus extremos se puede concluir:

La etiqueta de poli-histidina es compatible con la expresión de la hormona recombinante.

Aunque falta optimizar tanto la fermentación como la cromatografía, es posible deducir que, estos vectores facilitarán la expresión y purificación de

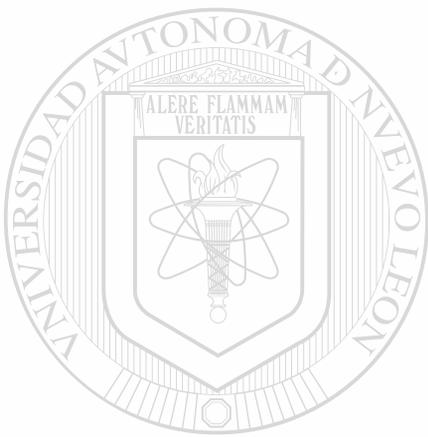
las distintas GHs, para las que se han construido cepas por ingeniería genética en la ULIEG.

La purificación por IMAC permitió obtener fracciones enriquecidas en la GH recombinante fusionadas a la etiqueta de poli-histidina, requiriéndose aún el optimizar el proceso.

El escalamiento en biorreactor incrementó en 16 (NH-6HisBGH) y 15 (BGH 6His-COOH) veces la producción de la BGH recombinante

Dentro del proceso de purificación, es necesario ajustar las condiciones como el tiempo de interacción de la proteína con la resina y las condiciones de astringencia del proceso, para optimizarlo.

A la par se requiere verificar la actividad biológica de las fracciones enriquecidas en la BGH recombinante etiquetada con poli-histidina, para asegurarse que la manipulación y modificación no altera esta cualidad.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFIA

- 1 <http://www.argenbio.org/h/biotecnologia/07.php>
- 2 Asimov, G.J. y Krouze, N.K. (1937). The Lactogenic reparations From the Anterior Pituitary and the Increase of Milk Yield in Cows. *J. Dairy Sci.* 20: 289-306.
- 3 Peel C. J. y Bauman D.E. (1987). Somatotropin and lactation. *J Dairy Sci.*; 70(2): 474-86.
- 4 Dohoo I.R., Leslie K., DesCôteaux L., Fredeen A., Dowling P., Preston A. y Shewfelt W.(2003) A meta-analysis review of the effects of recombinant bovine somatotropin 1. Methodology and effects on production. *Can J Vet Res.*; 67(4): 241-251.
- 5 Bauman, D. E. (1992). Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. *J. Dairy Sci.* 75: 3432.
- 6 Vera H. (1997). Tesis de maestría. Efecto de la administración de somatotropina bovina o precursores gluconeogénicos durante estadios tempranos y/o terminales de la foliculogénesis sobre la respuesta superovulatoria en bovinos. Centro de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- 7 Santom J.A., Dellacha J.M., Paladín A.C., Wolfensteinc C.M., Poskus E., Daurat S.T. y Biscogliol M.J. (1971). The amino acid sequence of bovine growth hormone. *FEBS Lett.* Volume 16, number 3.
- 8 Wood D.C., Salsgiver W.J., Kasser T.R., Lange G.W., Rowold E., Violand B.N., Johnson A., Leimgruber R.H., Parr G.R. y Siegel N.R. (1989) Purification and Characterization of Pituitary Bovine Somatotropin, *J. Biol. Chem.* 264: 14741-14747.
- 9 <http://www.people.vcu.edu/~elhaij/genetics/Notes/Unit1/fig8287.html>
- 10 Etherton T. D. (2004) Somatotropic function: The somatomedin hypothesis revisited. *J. Anim. Sci.* 82(E. Suppl.): E239-E244.
- 11 Bauman, D. E., Dunshea F.R., Boisclair Y.R., McGuire M.A., Harris D.M., y Houseknecht K.L. Regulation of nutrient partitioning: homeostasis, homeorhesis and exogenous somatotropin. In: *Proceedings VIIth International Conference of Production Disease in Farm Animals*, editado por Kallfelz F.A. Ithaca, NY: Cornell Univ. Press, 1989, p. 306-323.

12 Anderson E., y Evans M. (1937). The effect of the thyrotropic Hormone combined with small amounts of iodine upon the function of the thyroid gland. *Am J Physiol.* 120: 597 - 603.

13 Martínez A. (1994) Tesis de Maestría. Expresión en *E.coli* de las Hormonas del Crecimiento Humano y Bovino en fusión con la proteína de unión a maltosa. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L., México.

14 Daly R. y Eran T. (2005). Review. Expresión of heterologus proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol. Recog.* 18: 119-138.

15 Barr K.A. y Hopkins S.A. (1992). Protocol for efficient Secretion of HSA Devolped from *Pichia pastoris*. *Pharm Eng* 12(2): 48-51.

16 Cregg J.M., Vedvick T.S., Raschke W.C. (1993). Recent Advance in the expresión of foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* (11): 905-910.

17 Invitrogen corporation (1996). *Pichia* expression estuche (Protein expresión). A manual of methods for expresión of Recombinants Proteins in *Pichia pastoris*. San Diego, Ca 92121h.

18 Ouyang J., Wang J., Deng R., Long Q. y Wang X (2003) High-level expression, purification, and characterization of porcine somatotropin in *Pichia pastoris*. *Pro Exp Purif.* (32): 28-34.

19 Escamilla L. (1996). Tesis de Maestría. Biosíntesis de la hormona de crecimiento humano recombinante (HGHr) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L., N.L., México.

20 http://www.industria-farmaceutica.com/modules.php?op=modload&name=Top_List&file=index

21 Ascacio M. (2004). Tesis Doctoral: Producción en biorreactor, purificación y bioensayo de hormonas recombinantes del crecimiento. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L., N.L., México.

22 Guerrero M. (2002). Tesis de Maestría: Purificación de hormona de crecimiento recombinante producida en *Pichia pastoris*. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L., N.L., México.

23 Porath J., Carlsson K., Olsson I. y Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. (1975), *Nature* 258(5536): 598-9.

24 E. Sulkowski. (1985). *Trends in Biotechnology*, 3, No1, 1-6.

25 Anderson L., Sulkowski E. y Porath J. (1987). Facile resolution of alpha-fetoproteins and serum albumins by immobilized metal affinity chromatography. *Cancer Research*. 47: 3624-362.

26 Hemdan E., Zhao Y., Sulkowski E. y Porath J. (1989) Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 86: 1811-1815.

27 NOVAGEN 2000. Catalog. Purification. 130-134.

28 Scheich C., Sievert V. y Bussow H. (2003). An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography. *BioMed Central*. 3:12 1-7.

29 Fu P. y Maloney P.C. (1997). Evaluation of secondary structure of OxIT, the oxalate transporter of *Oxalobacter formigenes*, by circular dichroism spectroscopy. *J. Biol. Chem*. 272: 2129-2135.

30 Sachdev D. y Chirgwin J.M. (1998). Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 244: 933-937.

31 Kapust R.B y Waugh D.S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*. 8(8):1668-74.

32 Makrides S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 60(3):512-38.

33 Nilsson J., Stahl S., Lundeberg J., Uhlen M. y Nygren P.A.(1997). Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif*. 11(1):1-16.

34 Woestenenk E., Hammarström M., Van den Berg S., Hård T.y Berglund H (2004). His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *J. Struct. Funct. Genom*. 5: 217-229.

35 Mohanty A. y Wiener M. (2003) Membrane protein expression and purification: effects of polyhistidine tag length and position. *Pro. Exp. Purif.* 33: 311-325.

36 Chen B. Hai T. (1994). Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene.* 139:73-75.

37 Borsing L., Berger E.G. y Malissard M. (1997). Expression and purification of His-tagged beta 1,4 galactosyltransferase in yeast and COS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 586-590.

38 Janknecht R. y Nordheim A. (1992) Affinity purification of histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells. *Gene* 121:321-324.

39 Kuusinen A., Arvola M., Oker-Blom C. y Keinänen K. (1995) Purification of recombinant GluR-D glutamine receptor produced in Sf21 insect cells. *Eur J Biochem* 233: 720-726.

40 Alnemri E, Fernandez, Alnemri T, Nelki DS, Dudley K, DuBois GC, y Litwack G.(1993). Overexpression, characterization, and purification of a recombinant mouse immunophilin FKBP-53 and identification of an associated phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 6839-6843.

41 E.K. M. Ueda, PW Gout y L. Morganti (2001) Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic *Escherichia coli* extracts. *J. Chromatogr. A.* 922: (1-2): 165-75.

42 Ribela, M. T., Gout P.W y Bartolini P. (2003). Synthesis and chromatographic purification of recombinant pituitary hormones. *J of Chrom.B* (790):258-316.

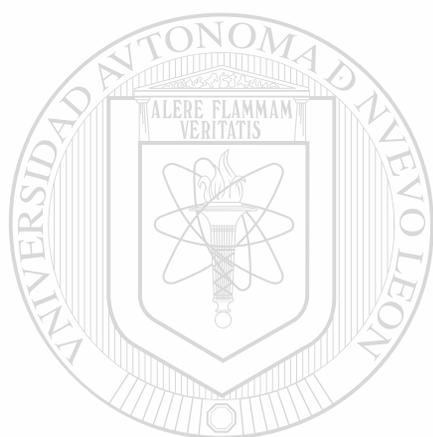
43 Nam-Kyu Shin, Dae-Young Kim, Chul-Soo Shin, Min-Sun Hong, Jeewon Lee y Hang-Cheol Shin (1997). High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process. *Biotechnology.* 62:143-151.

44 Sambrook, J. Fritsch, E. Maniatis, T. (1989). Molecular cloning; A Laboratory Manual. Segunda edición. Cols. Spring Harbor Laboratory Press.

45 Pérez A., Salinas M., Gallegos A., Pérez L., Padilla G. y Barrera H. (2004). Generación de anticuerpos policlonales desarrollados en el conejo contra la hormona de crecimiento bovina. Cartel presentado en el XXII Congreso Nacional de Investigación Biomédica. UANL.

46 <http://au.expasy.org/tools/protparam.html>.

47 Daly R. y Hearn T.W. (2004). Review. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18: 119-138.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

María del Refugio Rocha Pizaña

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: UTILIDAD DE UNA ETIQUETA DE POLI-HISTIDINA PARA LA PURIFICACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO BOVINO RECOMBINANTE

Campo de estudio: Biotecnología.

Biografía.

Lugar de Nacimiento: Monclova, Coahuila, México.

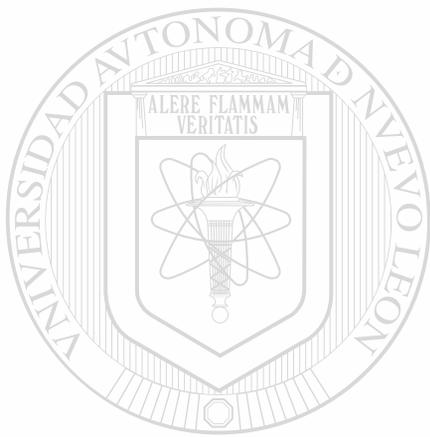
Fecha: 9 de Noviembre de 1977.

Padres: Ismael Rocha Ortiz y Rosalinda Pizaña de Rocha.

Educación.

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Grado obtenido: Químico Farmacéutico biólogo en 2000.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1000