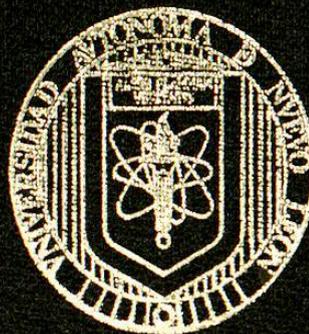


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

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

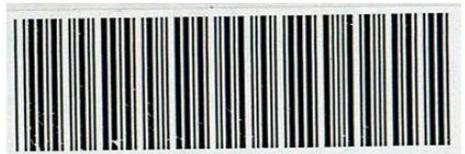
.S6

R6

2005

c.1

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



1080127594

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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

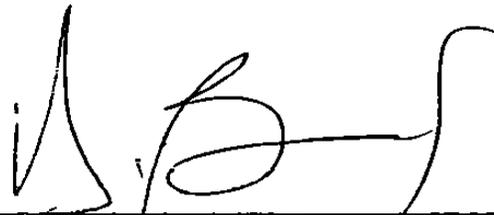
Monterrey, N. L., Septiembre del 2005



TM
QPS 72
.56
R6
2005

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

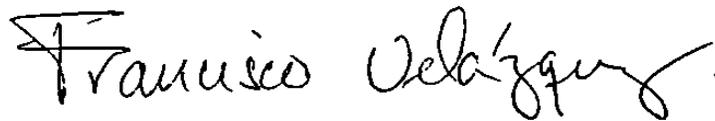
Aprobación de la Tesis:



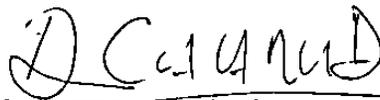
Dr. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis



Dr. GERARDO R. PADILLA RIVAS
Co-director de Tesis



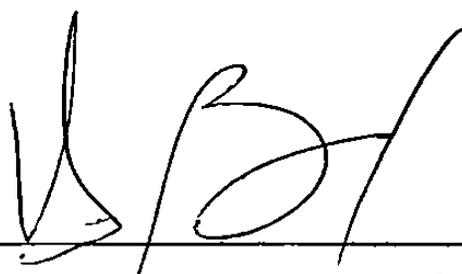
Dr. FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO
Co-director de Tesis



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.

Vo. Bo.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end, positioned above a solid horizontal line.

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**, **Chíú**, **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 secretarias: **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	
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	
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

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características de <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) 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 Sulfoxido
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	Mililitros
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 Ribonucleíco (ARN)
RNA_m	Acido Ribonucleíco mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril sulfato de sodio
seg	Segundos
Taq	<i>Thermus acuaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-Cl-EDTA.
temp	Temperatura
vol	Volúmen

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.

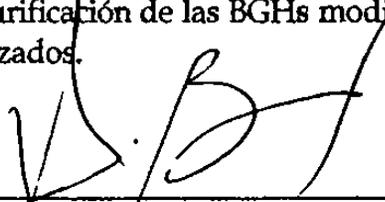
Área de Estudio:

Biotecnología

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.



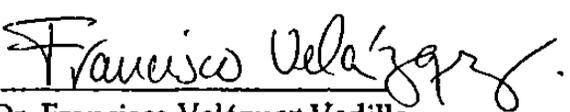
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

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 ^{4,5}. 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}.

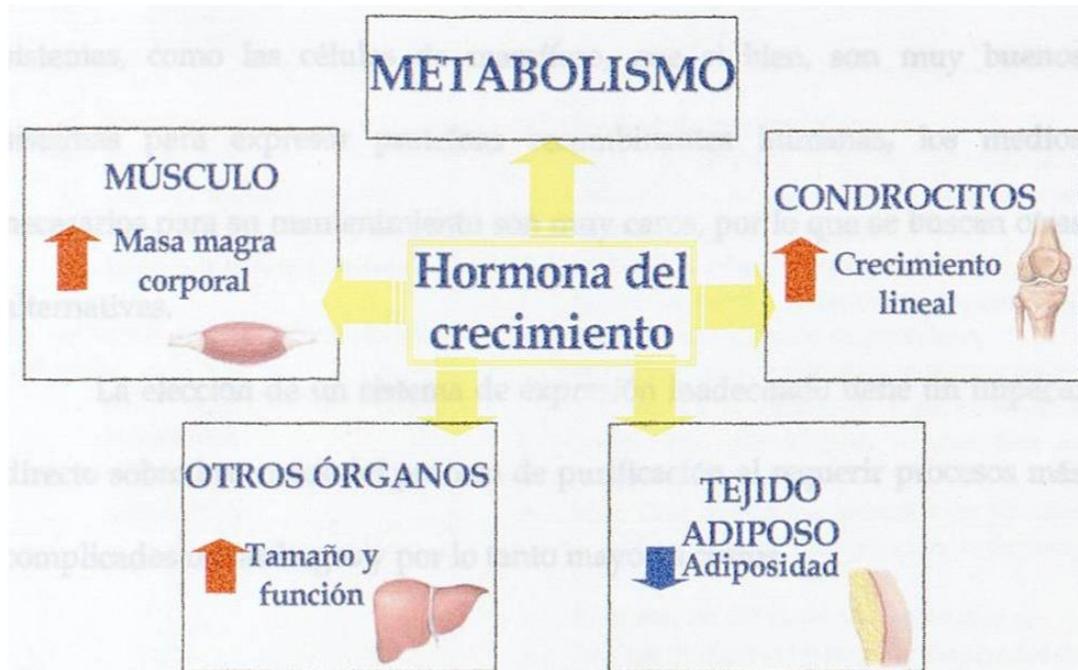


Figura 1. Funciones metabólicas de la BGH. Algunos de los órganos blancos de la BGH son el músculo, los huesos, el tejido adiposo, y otros órganos como hígado, corazón, etc. Actúa aumentando el tejido muscular, la función y el tamaño de algunos órganos, así como disminuyendo el tejido adiposo y aumentando 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.

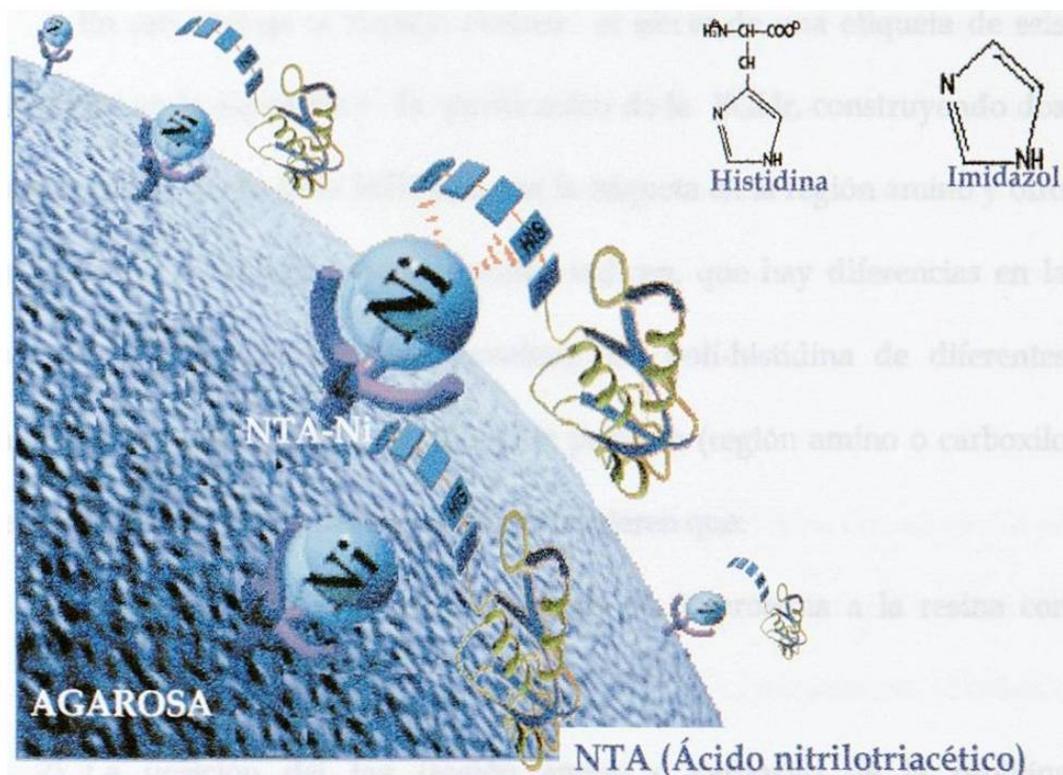


Figura 2. Purificación por etiquetas de poli-histidina. Se observa una esfera de agarosa que tiene un quelante (ácido nitrotriacético) reteniendo covalentemente a los iones Ni^{+2} . Los electrones que quedan libres interactúan con las seis histidinas que tiene la proteína de interés. Para eluir ésta 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.

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 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 cepoteca 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.

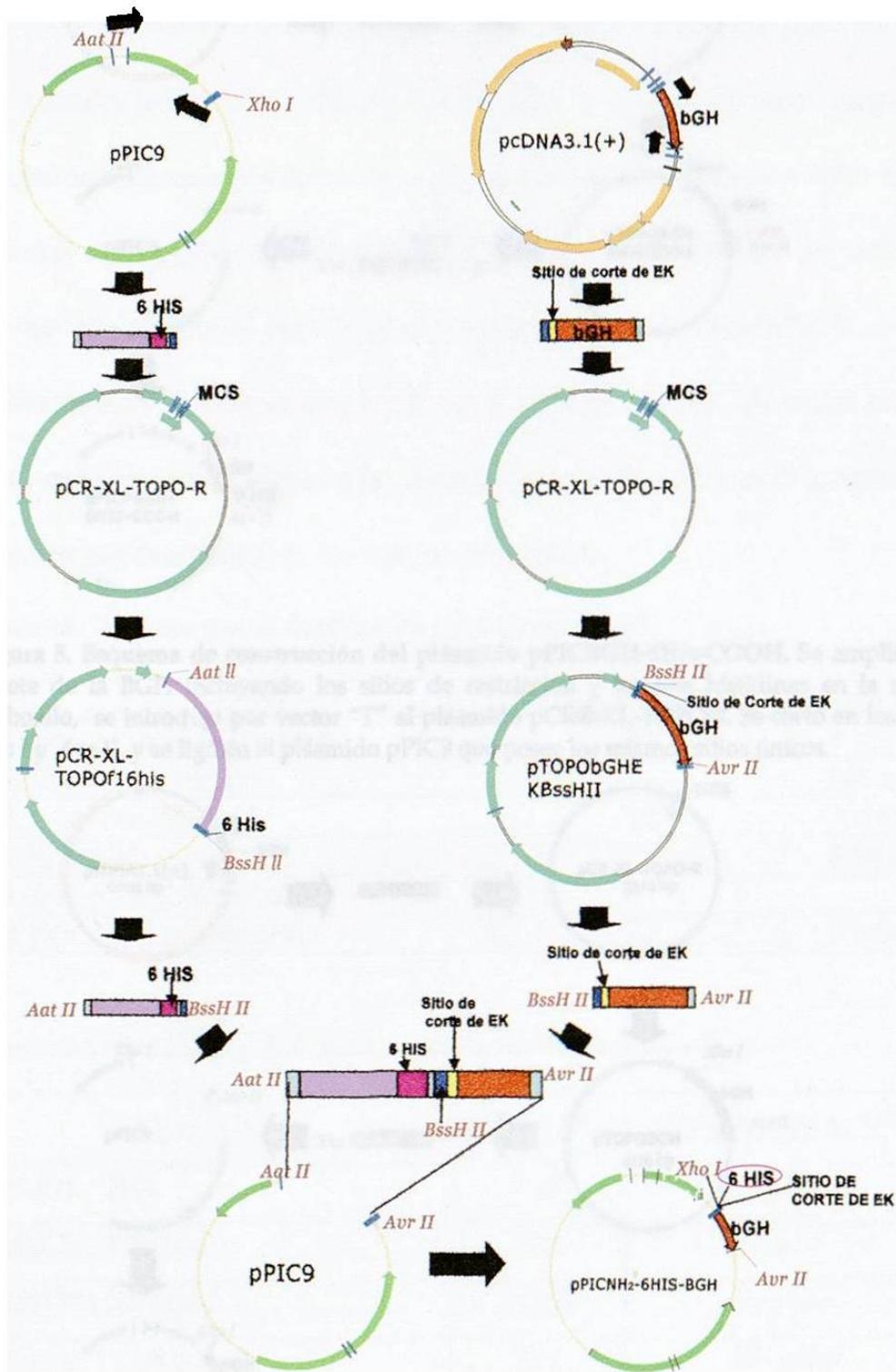


Figura 4. Esquema de construcción del plásmido pPIC9NH₂-6His-BGH. Para esta construcción se amplificaron dos fragmentos: uno a partir del vector pPIC9, que le agregara un nuevo sitio de restricción y seis histidinas, y otro a partir del pcDNA3.1 que amplifica el casete de la BGH con sus respectivos sitios 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.

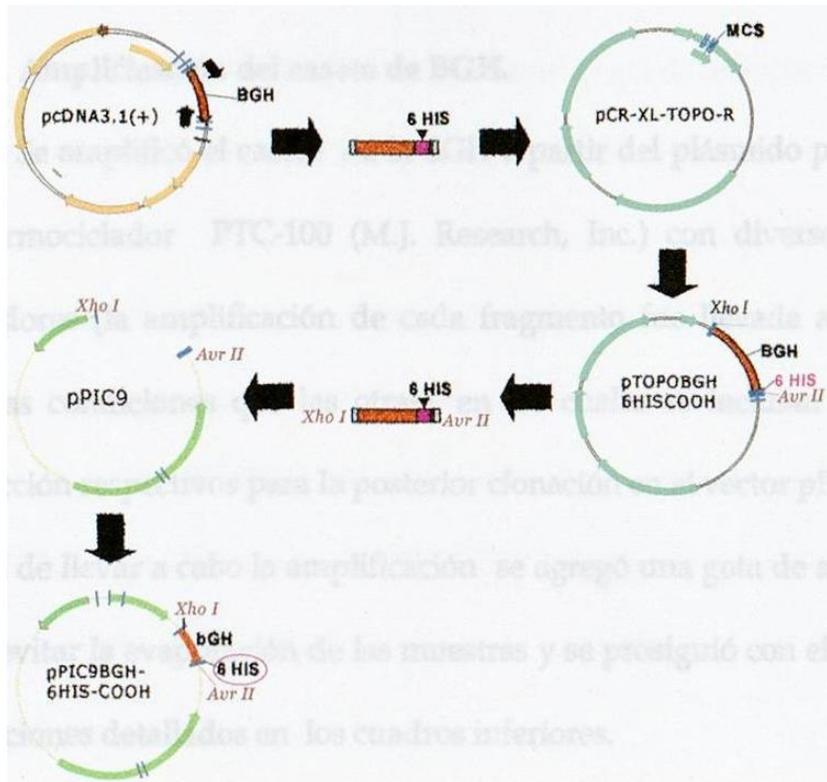


Figura 5. Esquema de construcción del plásmido pPIC9BGH-6His-COOH. Se amplificó el casete de la BGH incluyendo los sitios de restricción y las seis histidinas en la región carboxilo, se introdujo por vector "T" al plásmido pCR®-XL-TOPO®. Se cortó en los sitios *Xho I* y *Avr II*, y se ligó en el plásmido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

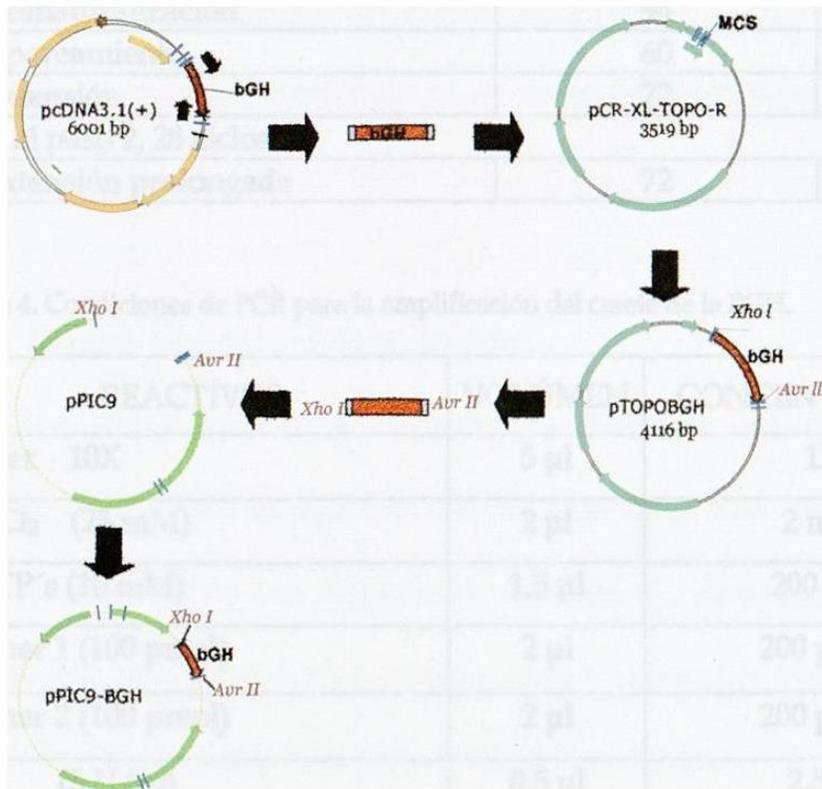


Figura 6. Esquema de construcción del plásmido portador del casete de la BGH sin etiqueta de poli-histidina. Se amplificó el casete de la BGH incluyendo los sitios de restricción y se introdujo por vector "T" al plásmido pCR®-XL-TOPO®. Se cortó en los sitios *Xho I* y *Avr II*, y se ligó en el plásmido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

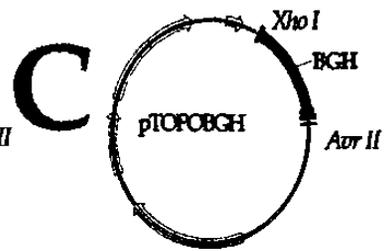
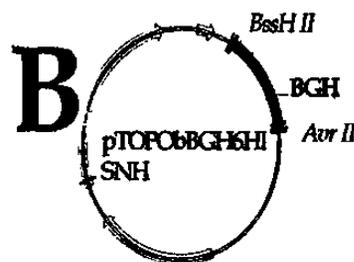
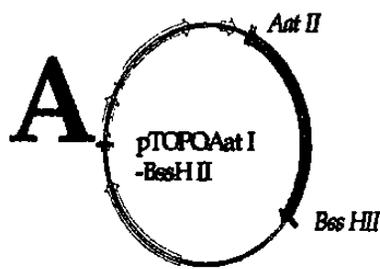
4.2.1.4 Secuenciación.

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 (lx)

Agua MQ	14.0 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl
Bss HII 4 U/µl	0.5 µl
Aat II 20 U/µl	1.0 µl
DNA 1.2 µg/µl.	2.5 µl

Volumen total 20.0 µl

Reactivo Volumen (lx)

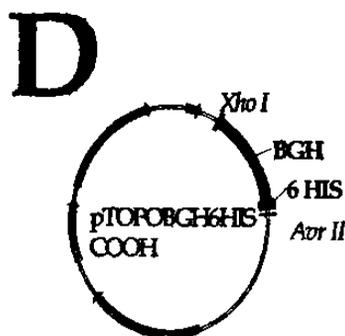
Agua MQ	14.2 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl
Bss HII 4 U/µl	0.5 µl
Avr II 4 U/µl	1.0 µl
DNA 1.3 µg/µl.	2.3 µl

Volumen total 20.0 µl

Reactivo Volumen (lx)

Agua MQ	14.6 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl
BSA 100x	0.5 µl
Xho I 20 U/µl	0.5 µl
Avr II 4 U/µl	1.0 µl
DNA 2.1 µg/µl.	1.4 µl

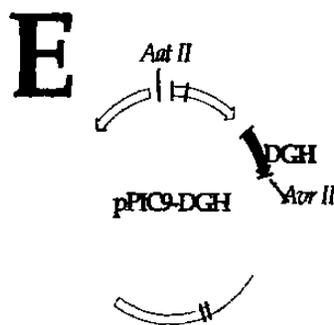
Volumen total 20.0 µl



Reactivo Volumen (lx)

Agua MQ	14.0 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl
BSA 100x	0.5 µl
Xho I 20 U/µl	0.5 µl
Avr II 4 U/µl	1.0 µl
DNA 1.5 µg/µl	2.0 µl

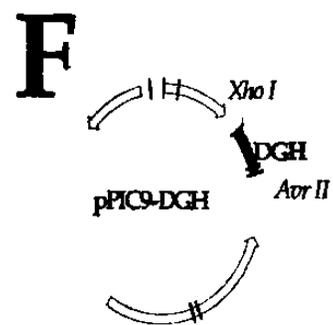
Volumen total 20.0 µl



Reactivo Volumen (lx)

Agua MQ	13.3 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl
Aat II 20 U/µl	0.2 µl
Avr II 4 U/µl	0.5 µl
DNA 1.5 µg/µl.	4.0 µl

Volumen total 20.0 µl

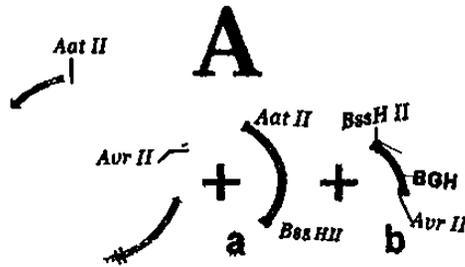


Reactivo Volumen (lx)

Agua MQ	14.0 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl
BSA 100x	0.5 µl
Xho I 20 U/µl	0.5 µl
Avr II 4 U/µl	1.0 µl
DNA 2.0 µg/µl	2.0 µl

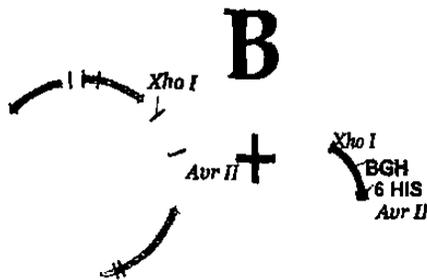
Volumen total 20.0 µl

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.



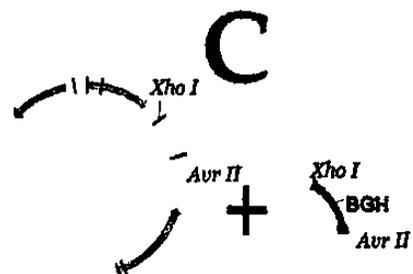
REACTIVO	Vol. (1x)
Agua MQ	10.7 µl
Buffer T4 ligasa 10X	2.0 µl
ATP 10 mM	2.0 µl
Inserto a: 25 ng/ µl b: 10 ng/ µl	1+1 µl
Esqueleto (100 ng/ µl)	3.0 µl
T4 DNA ligasa 400 U/µl	0.3 µl
Volumen total	20.0 µl

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 DO₆₀₀ 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 transformación 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⁻.

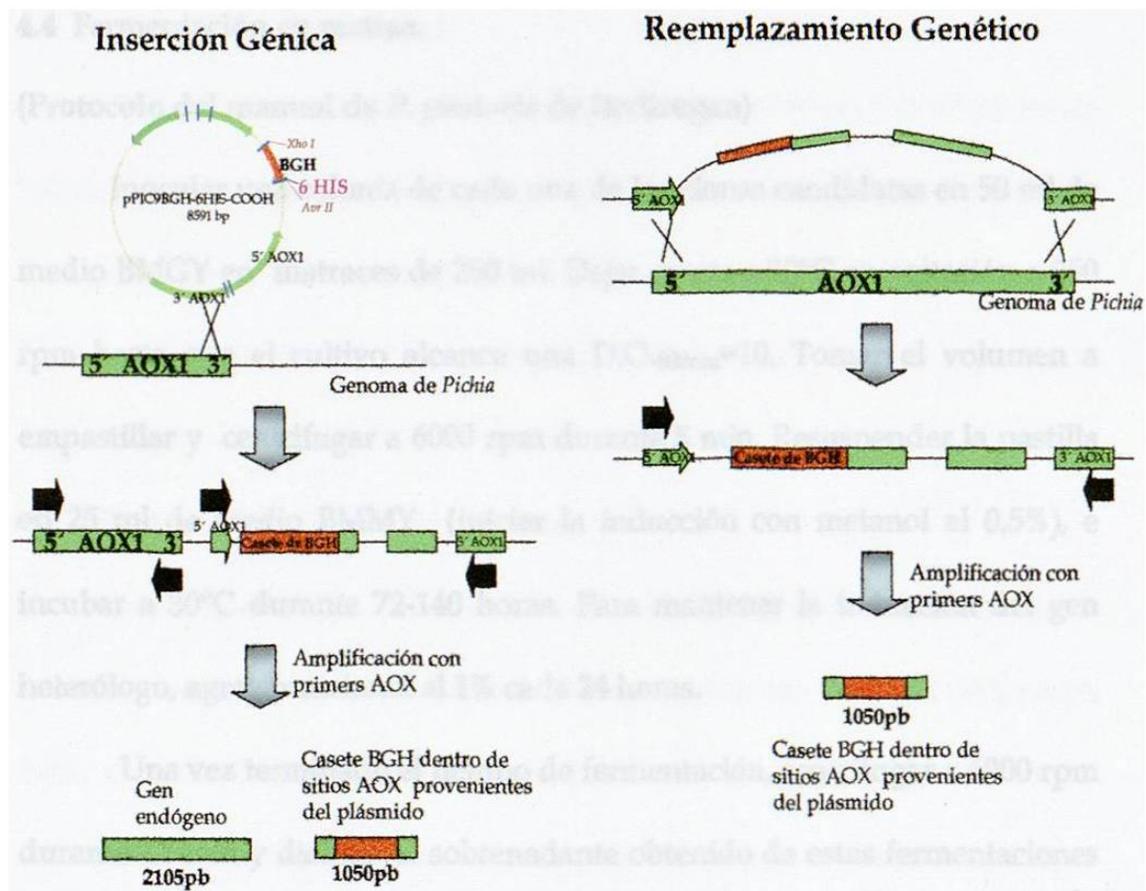


Figura 9. Recombinación en el genoma de *P. pastoris*. La incorporación del plásmido pPIC9 dentro del genoma del *P. pastoris* puede llevar a cabo eventos de recombinación como la inserción génica (generalmente resulta en cepas mut*), en donde al amplificar el DNA genómico y visualizarlo en gel de agarosa 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*).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 15 μ l con 1.5 μ l Buffer de PCR 10X, 1.5 μ l $MgCl_2$, 0.5 μ l dNTP, 150nM de cada AOX1 5' y AOX13' (0.5 μ l c/u), 0.2 U Taq DNA polimerasa (Promega) y 0.5 μ l 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 $D.O_{600nm}=10$. 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.

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.

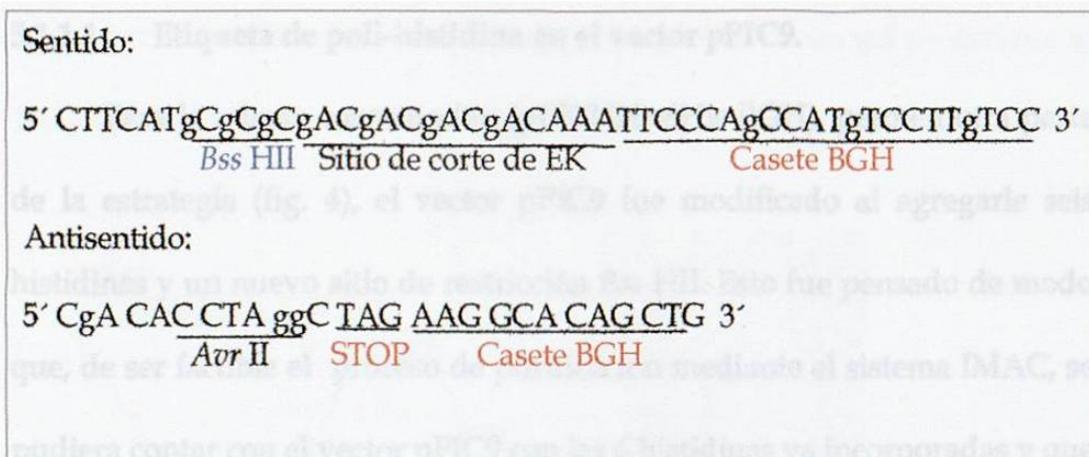


Figura 10. Primers para amplificar el casete de la BGH para la construcción pPICNH₂-6His-BGH. Estos primers se acoplan en una región al casete de la BGH y agregan los sitios de restricción *Avr* II y *Bss* HII, además de un sitio de corte para la enterokinasa.

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).

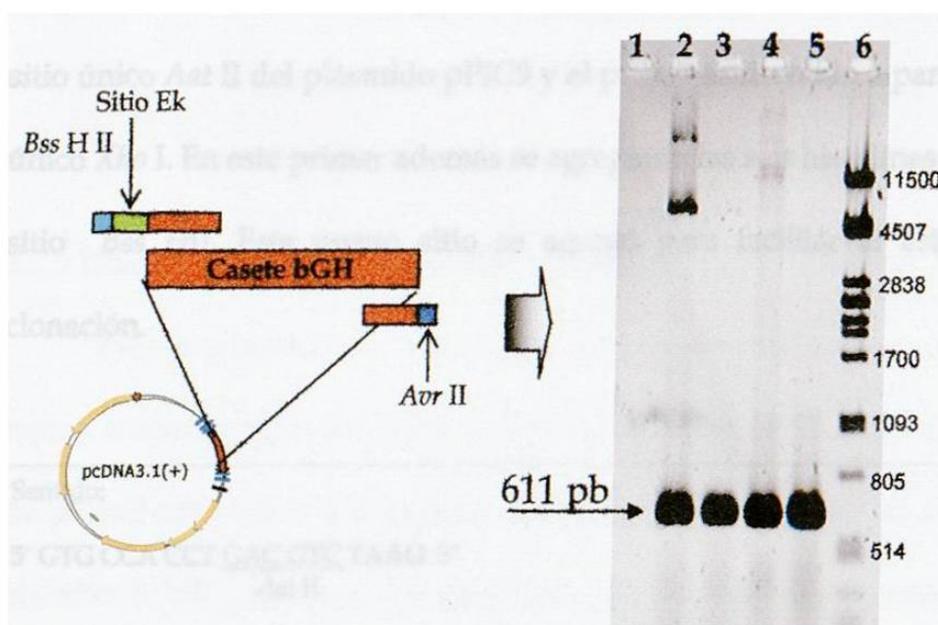


Figura 11. Amplificación con primers para la construcción pPICNH₂-6His-BGH. Los primers se acoplan a regiones terminales en el casete de la BGH y agregan los sitios de restricción *Bss*H II y *Avr* II para la estrategia de clonación. Gel de agarosa al 1%, carril 1) Control negativo, 2) pCDNA 3.1, 3) 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.

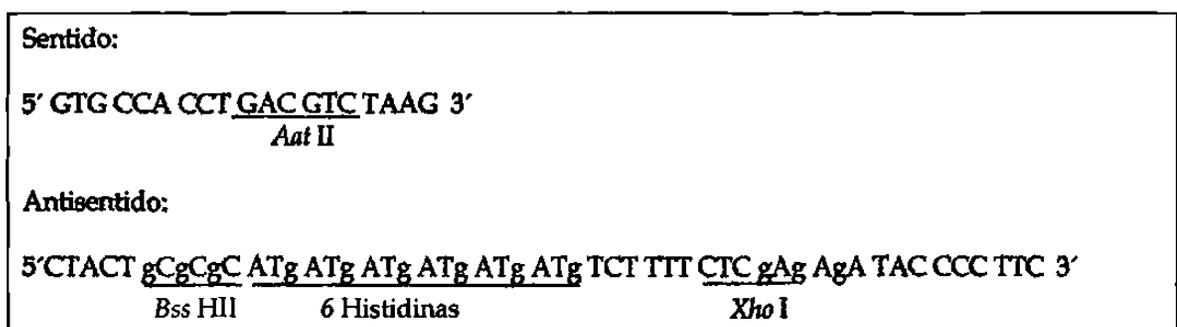


Figura 12. Primers para introducir poli-histidina al vector pPIC9. Primer sentido con el sitio único *Aat* II y primer antisentido con el nuevo sitio *Bss* HII y las seis histidinas para quedar incorporadas en el vector pPIC9.

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

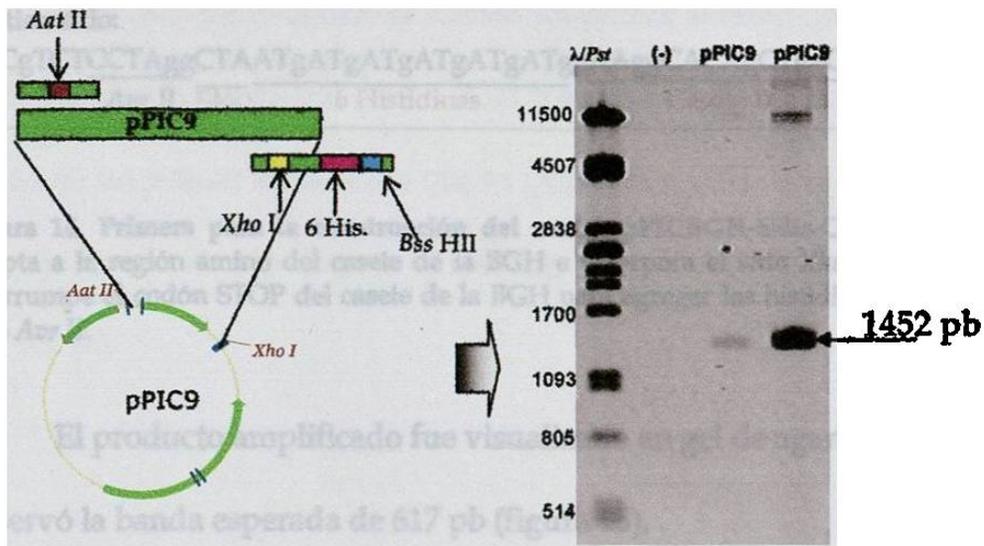


Figura 13. Amplificación con primers que incorpora poli-histidina al vector pPIC9. El primer sentido se pega al sitio único Aat II del vector pPIC9 y el primer antisentido se pega al sitio Xho I y agrega las 6 histidinas y el sitio de restricción Bss HII para la estrategia de clonación. Gel de agarosa 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).

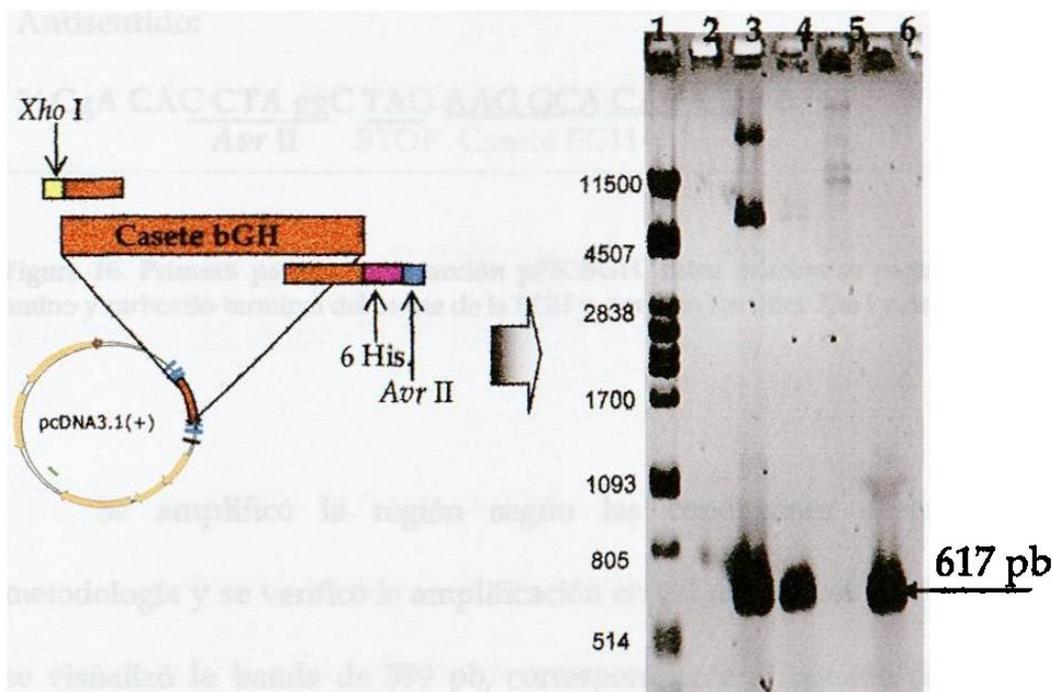


Figura 15. Amplificación con primers para la clonación del casete BGH para la construcción pPICBGH-6His-COOH. Los primers agregan los sitios *Xho* I y *Avr* II y las seis histidinas en la región carboxilo terminal del casete de la BGH. Gel de agarosa al 1%. Carril 1) λ /*Pst*, 2) Control negativo, 3) pCDNA3.1, 4) pCDNA 3.1 5) pPICEcGH 6) BGH. Se observa la banda del producto amplificado cuyo tamaño es de 617 pb.

