

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) pPICEcGH 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.

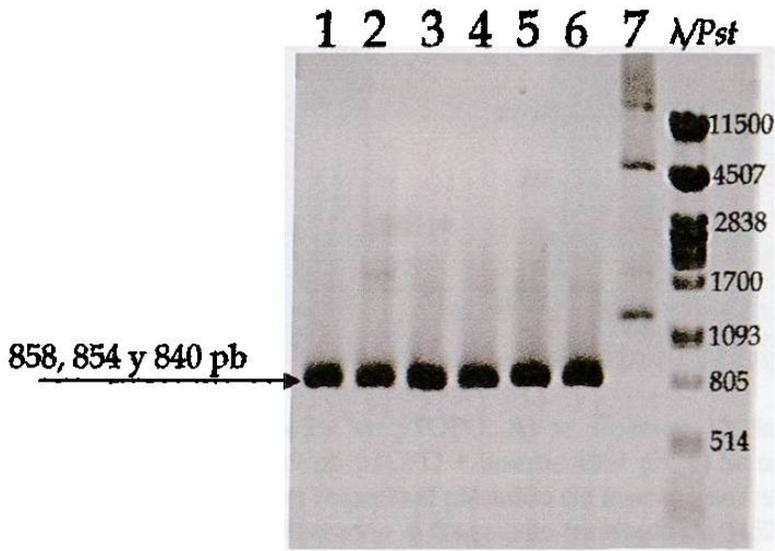


Figura 18. Caracterización por PCR con primers M13. Carril 1 y 2) clonas candidatas de pTOPOBGH6 HisCOOH, carril 3 y 4) clonas candidatas de pTOPOEKBssHII, carril 5, 6 y 7) clonas candidatas para pTOPOBGH, los fragmentos esperados son de 858, 854 y 840 pb, respectivamente.

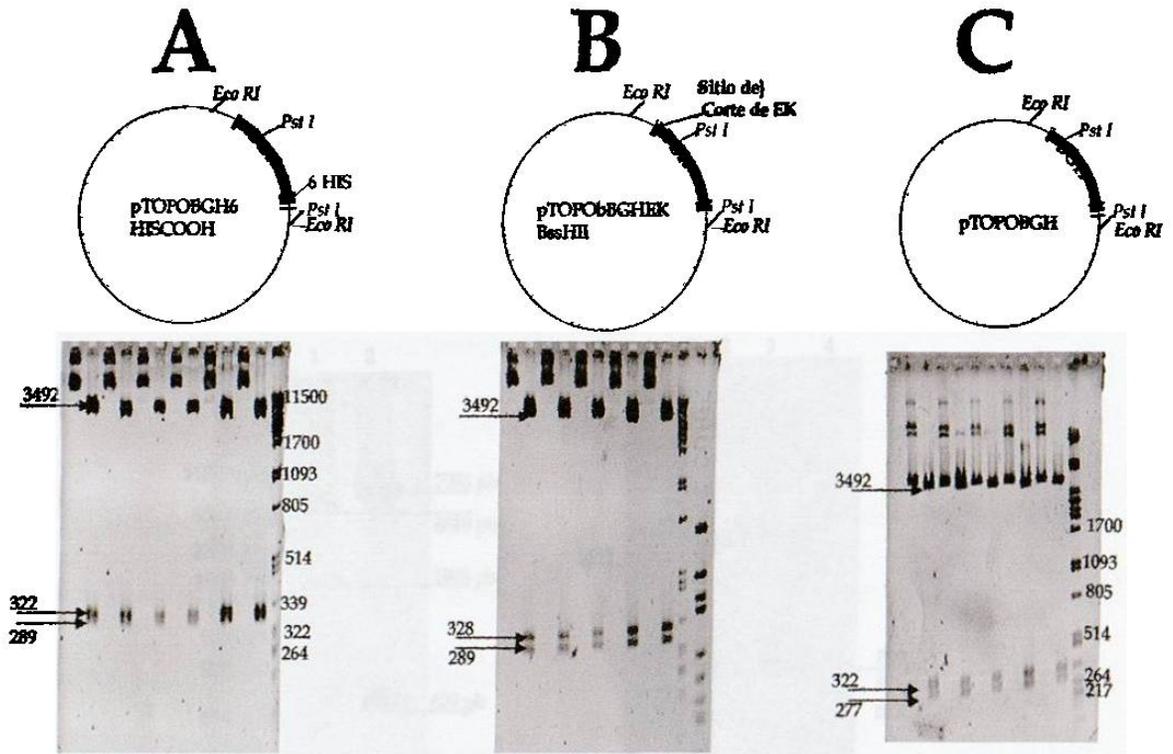


Figura 19. Caracterización por digestión con *Eco* RI y *Pvu* II. A, B y C) Caracterización con enzimas *Eco* RI- *Pst* I se muestra el plásmido con los sitios de restricción para la caracterización y los geles de las caracterizaciones, así como los fragmentos esperados. Todos corridos en geles de agarosa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

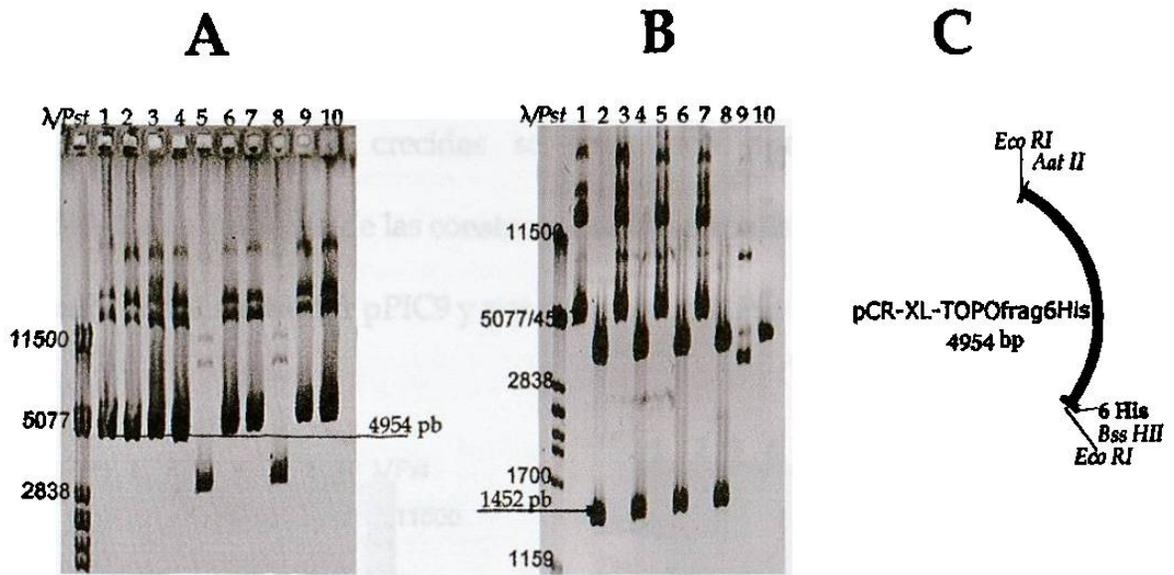


Figura 20. Caracterización en pTOPO. A) se observan 10 clonas candidatas retrasadas, pTOPO sin inserto: 3519 pb pTOPO + inserto: 4954 pb. B) Se seleccionaron las clonas que resultaron retrasadas con respecto al plásmido sin inserto y se analizaron por caracterización con la enzima *Eco* RI, liberando 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.

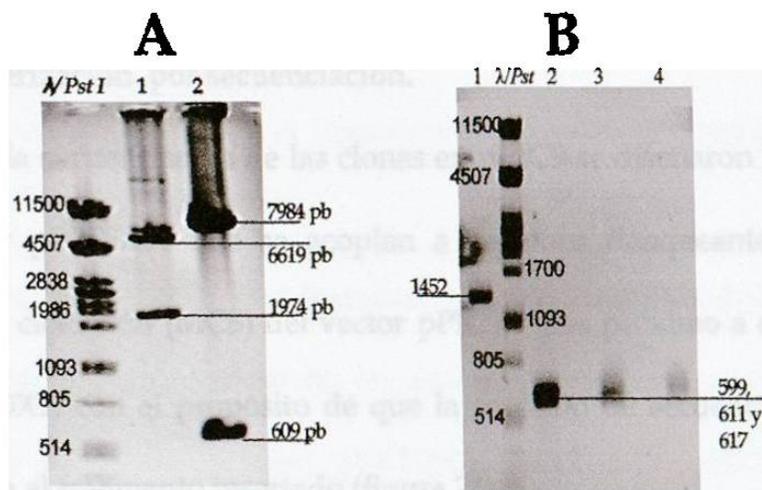


Figura 21. Preparación de los fragmentos y del vector para la subclonación. A) Vector pPIC9DGH 1) Cortado con *Aat* II / *Avr* II 2). Cortado con *Xho* I/*Avr* II. B) Verificación de la purificación de los fragmentos digeridos y purificados con el estuche QUIAEX II 1) fragmento de 1452 pb. Geles de agarosa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

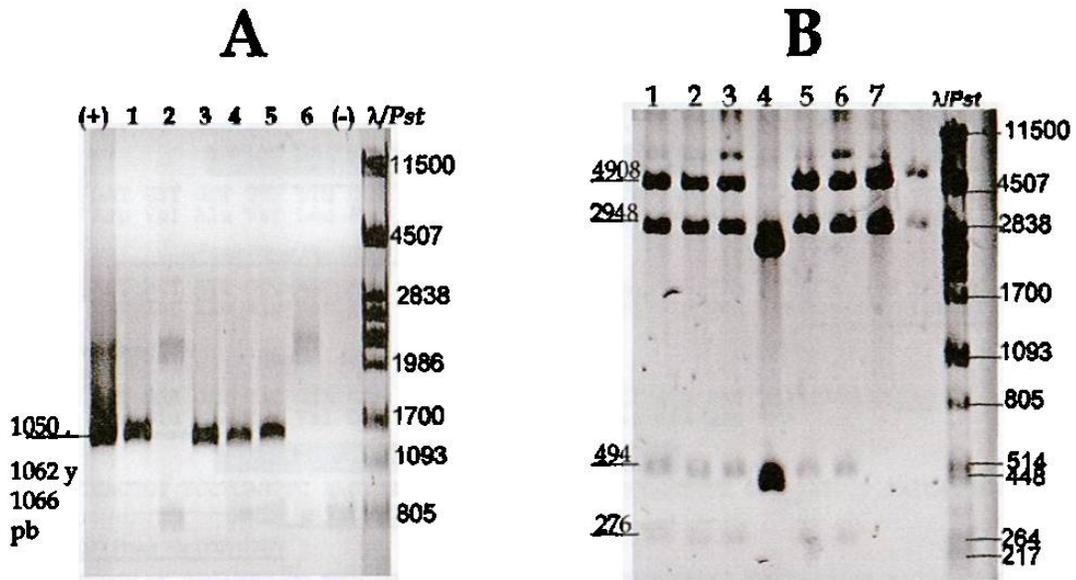


Figura 22. Caracterización por PCR y por digestión. Geles de agarosa al 1% A) Amplificación con primers AOX; Control (+), 1 y 2) Clona a y b construcción pPICNH₂-6His-BGH, 3 y 4) Clona c y d construcción pPIC9BGH, 5 y 6) Clona e y f construcción pPIC9BGH-6His-COOH, control (-). B) Caracterización por 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.

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).

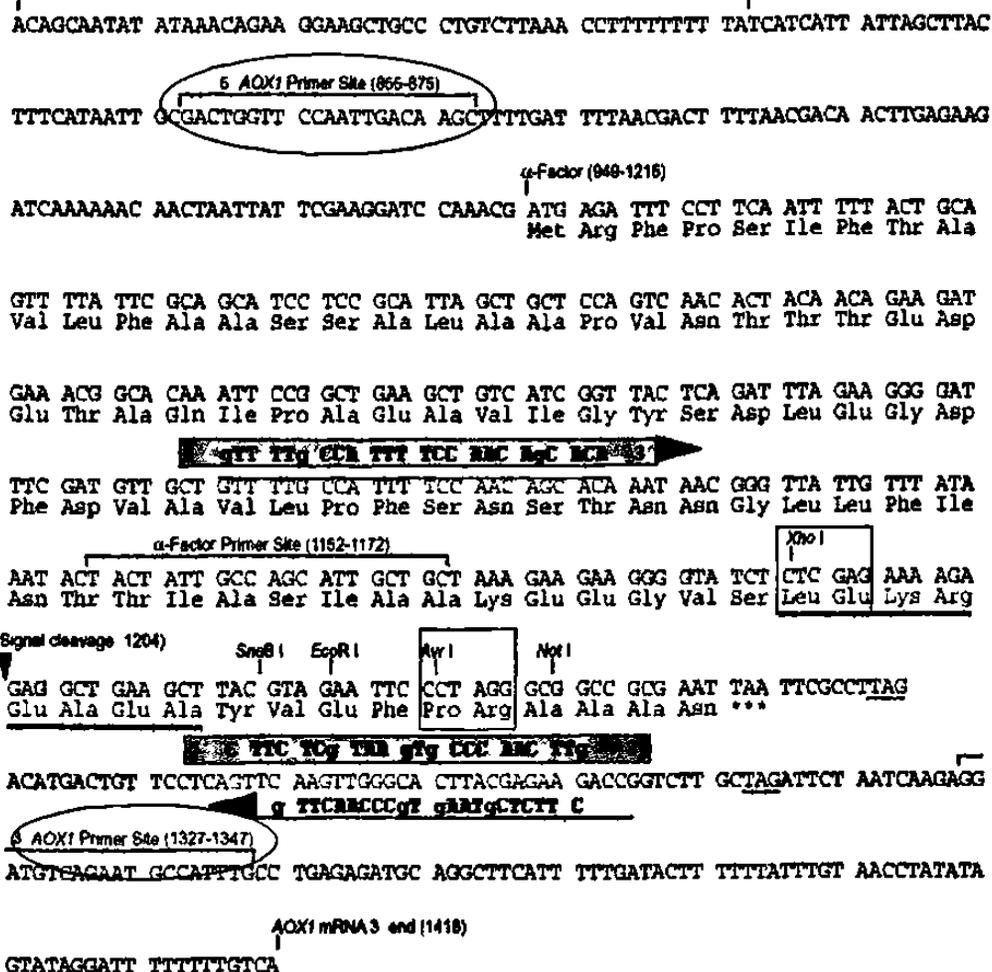


Figura 23. Primers pPIC9FM y pPIC9RM. ○ Primers AOX1 ■ Primers pPIC9FM y pPIC9RM. Entre los sitios □ Xho I y Avr II, fueron insertados los casetes de la BGH.

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.

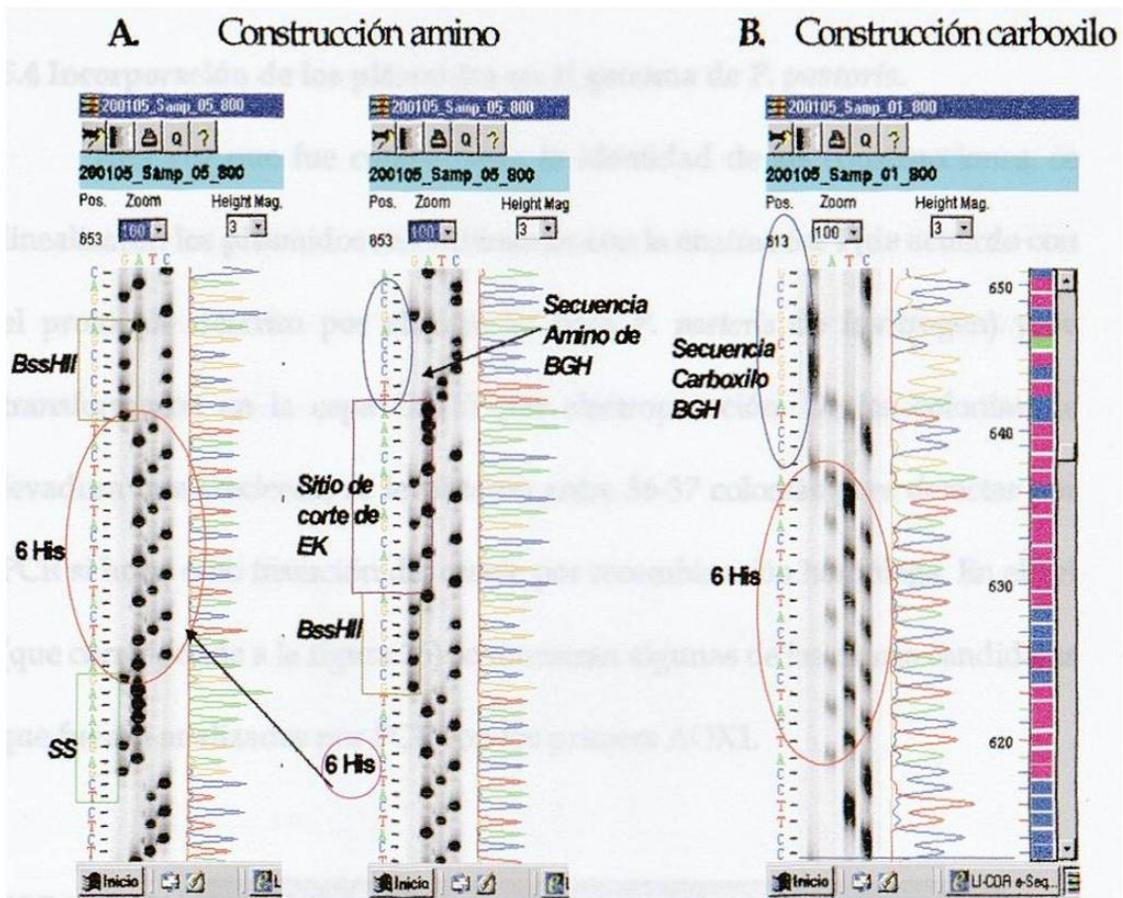


Figura 24. Verificación por secuenciación nucleotídica. Geles analizados por el software de secuenciación. A) Gel para la construcción pPICNH₂-6His-BGH en donde se observan las 6 histidinas en tandem y el nuevo sitio de restricción Bss HII. B) Gel para la construcción pPICBGH-6His-COOH.

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

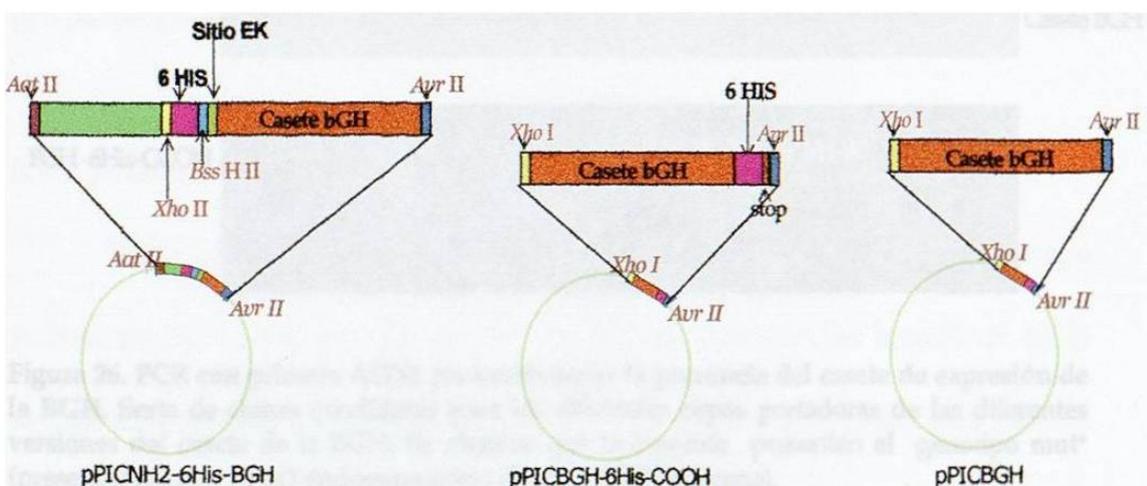


Figura 25. Plásmidos construídos. Se esquematizan los tres plásmidos portadores del casete de la BGH en el vector de recombinación pPIC9.

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.

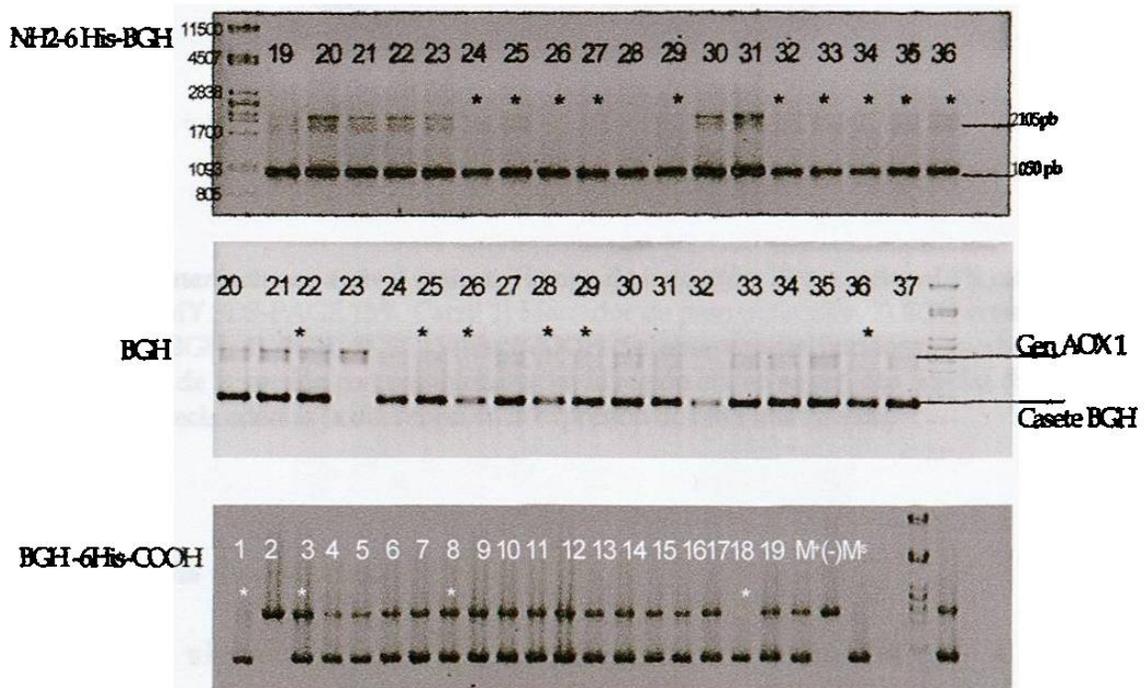


Figura 26. PCR con primers AOX1 para corroborar la presencia del casete de expresión de la BGH. Serie de clonas candidatas para las diferentes cepas portadoras de las diferentes versiones del casete de la BGH. Se observa que la mayoría presentan el genotipo mut⁺ (presencia del gen AOX1 endógeno como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

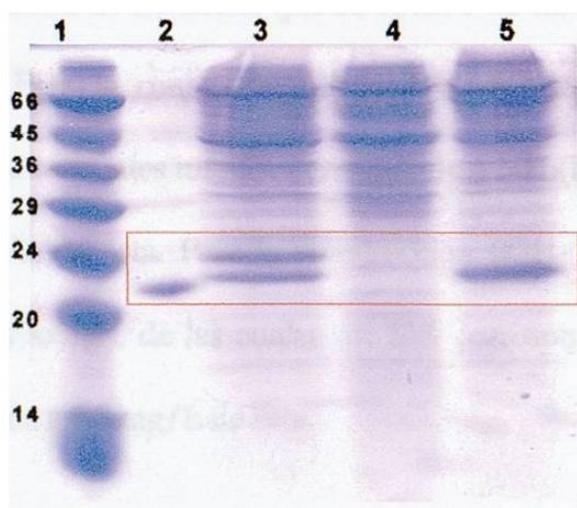


Figura 27. Fermentaciones a nivel matraz. Tiempo de inducción: 72 hrs metanol 1% crecidas en medio BMMY SDS-PAGE 15%. Carril 1) Marcador de peso molecular, 2) BGH comercial, 3) NH₂(His)₆-BGH, 4) BGH, 5) BGH-(His)₆COOH. Se observan las hormonas producidas, que en el caso de la versión con poli-histidina en la región amino se ven dos bandas de 24 y 22 KDa. Se aprecia además la diferencia en la expresión de cada una de ellas.

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.

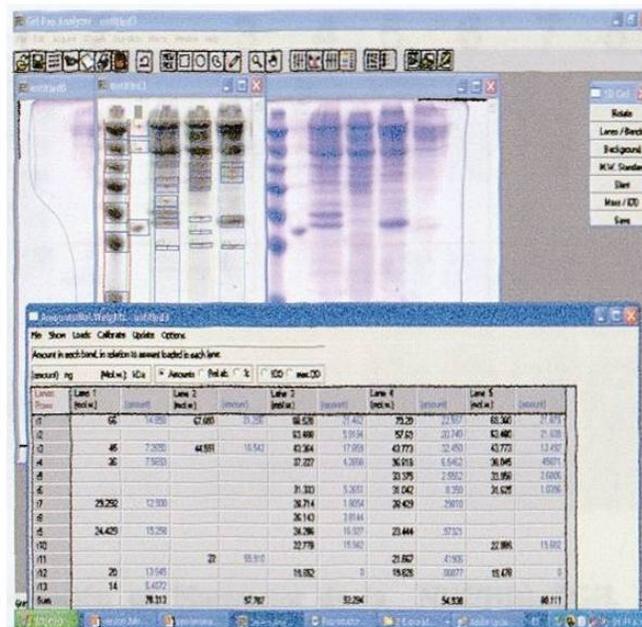


Figura 28. Análisis de los geles. Esquema con una tabla de análisis dada por el programa en donde se muestran los porcentajes de la proteína con respecto a las proteínas totales visualizadas y los pesos moleculares de las mismas. Para $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$ se observan dos bandas de 24 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.

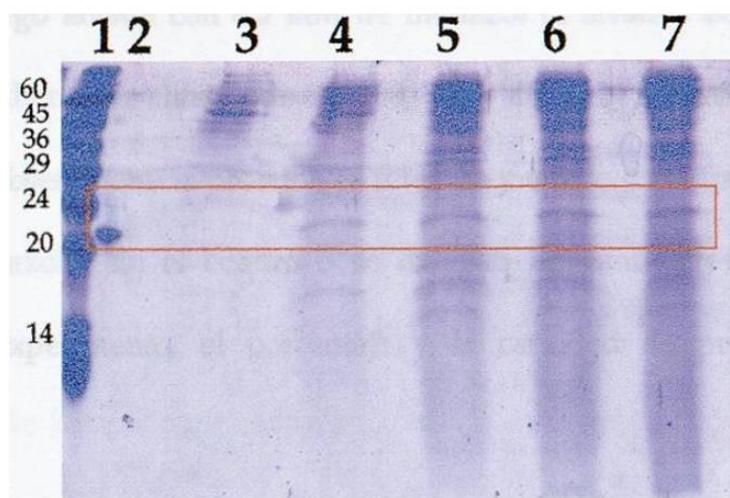


Figura 30. Fermentación en biorreactor de la BGH-(His)₆-COOH. SDS-PAGE 15%. Se tomaron 20 microlitros de muestra directa del medio de fermentación. Carril 1) marcador de peso molecular, 2) BGH comercial, 3) fermentación a tiempo de inducción 0, 4) tiempo de inducción 12 horas, 5) 23 horas 6) 36 horas,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

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 eluida 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.

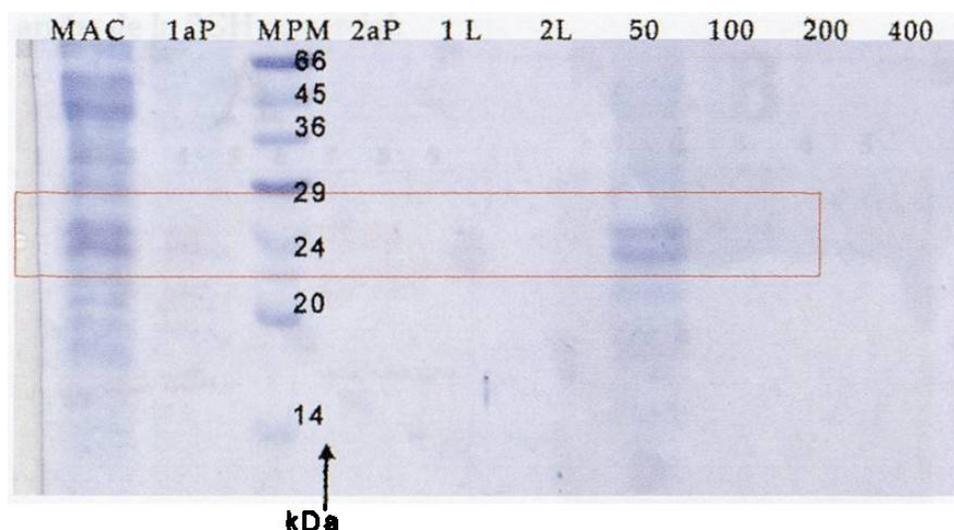


Figura 3L. Semipurificación de la $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$. (MAC) muestra antes de cargar, (1aP) fracción eluida primaria, (MPM) marcador de peso molecular, (2aP) fracción eluida al pasar 10 ml de tris 20 mM pH 8.0, (1L) 1 er. lavado con imidazol 0.5 mM, (2L) 2do. lavado con imidazol 0.5 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.

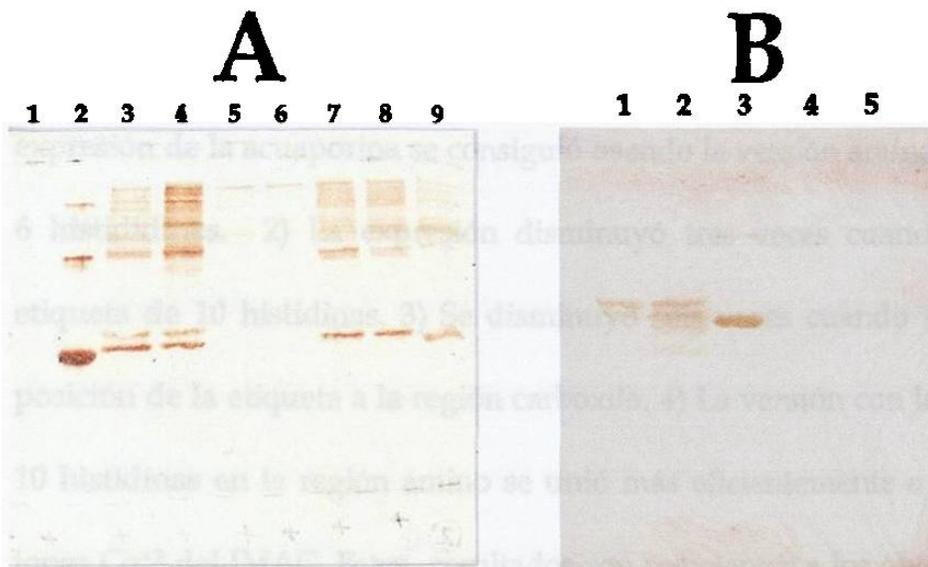


Figura 32 Análisis por Western blot. A) Western blot de fermentación en matraz. Carril 1) Albúmina sérica bovina, 2) BGH comercial, 3 y 4) clonas para $\text{NH}_2(\text{His})_6\text{BGH}$, 5y 6 clonas para BGH, 7 y 8) clonas $\text{BGH}-(\text{His})_6\text{COOH}$, 9) Clona de GH de rata. Las muestras 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. Éstas 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.

pPICBGH	Número de amino ácidos: 190 Peso molecular : 21744.9 KDa pI teórico: 7.83	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>).
pPICBGH6HisCOOH	Número de amino ácidos : 196 Peso molecular : 22567.7 pI teórico : 7.88	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>).
pPICNH26HisBGH	Número de amino ácidos : 203 Peso molecular : 23383.5 pI teórico : 6.82	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>).

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

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.

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 estadíos 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., Wolfenstein C.M., Poskus E., Daurat S.T. y Biscoglioli 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 VIIIth 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., Härd 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 Keinanen 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.

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.



1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900