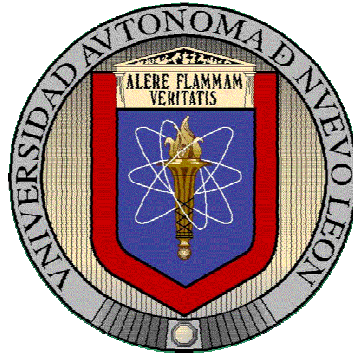


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES *DE Pichia pastoris*  
PRODUCTORAS DE UN TRIPSINÓGENO QUIMÉRICO**

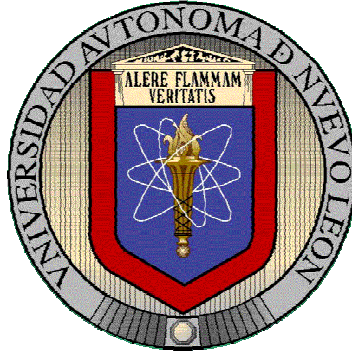
**Por:**

**Q.B.P. José Antonio Fuentes Garibay**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
con Acentuación en Microbiología**

**Marzo, 2011**

**CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES *DE Pichia pastoris*  
PRODUCTORAS DE UN TRIPSINÓGENO QUIMÉRICO**



**Comisión de tesis:**

DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ  
Director de Tesis

DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN  
Secretario

DR. LUIS J. GALÁN WONG  
Vocal 1

DRA. LUCÍA ELIZABETH CRUZ SUÁREZ  
Vocal 2

DR. DENIS RICQUE MARIE  
Vocal 3

DRA. DIANA RESENDEZ PÉREZ  
Subdirectora de Estudios de Posgrado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES *DE Pichia pastoris*  
PRODUCTORAS DE UN TRIPSINÓGENO QUIMÉRICO

Presenta

Q.B.P. José Antonio Fuentes Garibay

DR. JOSE MARÍA VIADER SALVADÓ  
Director de Tesis

DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN  
Co-Director de Tesis

Marzo, 2011

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José María Viader Salvadó. La enseñanza sin duda es su gran virtud. Gracias por su paciencia y ayuda siempre desinteresada. Por sus enseñanzas, su gran apoyo, su ejemplo de tenacidad y constancia. De usted aprendí que la investigación más que una labor es un estilo de vida.

A la Dra. Martha Guerrero Olazarán por su ayuda desinteresada, por mostrarme siempre su apoyo cuando lo he necesitado, por sus consejos, dedicación y las enseñanzas perdurables de fortaleza y dedicación.

Al Dr. Luis J. Galán Wong por los comentarios brindados y por formar parte de la comisión de tesis

A la Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez por sus observaciones y revisiones que fueron de mucha ayuda, por los comentarios brindados y por ser parte de la comisión de tesis.

Al Dr. Denis Ricque Marie por sus observaciones y revisiones que fueron de mucha ayuda. Por los consejos proporcionados y su disponibilidad.

A la Dra. Norma L. Heredia Rojas y a la Dra. Licet Villarreal Treviño por el seguimiento del presente trabajo y sus consejos brindados al mismo como parte del comité tutorial.

Al Dr. Gallegos López por el apoyo técnico, ayuda, consejos y comentarios brindados.

A mis compañeros y ex compañeros de laboratorio: Ramiro, Alberto, Karen, R. Arnulfo, Carlitos, Abraham, Gerardo, José D., Ángel, Eneida, Kike, Alejandra, Mauricio, Eddy, Miguel, por ser grandes compañeros y formar un buen grupo de trabajo. A los nuevos compañeros: David, Diego, Lalo, Mónica, Melissa, Ariel y Noé, por contagiar de esa juventud y energía, por tener disposición y ser buenos compañeros.

A mis compañeras del IB: Dinora, Paula, Vivi, Zule, Adriana y Ana Laura que algún momento aligeraron las cargas de trabajo, por aquellas convivencias y momentos agradables que no se olvidan. A Cynthia Esmeralda, que en alguna parte de este tiempo fue una persona especial y de quien aprendí mucho de ella, por haber sido un motor y una motivación especial.

Al fondo CONACyT-SEP (Registro CB-2005-01-25618) por el apoyo económico al proyecto y la beca otorgada.

Al CONACyT por la beca y el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

## ***DEDICATORIA***

### ***Te agradezco Dios:***

Por darme la fuerza, la salud y sobretodo la vida para llegar a este momento. Por permitirme concluir esta etapa, por ser mi fuerza y motivación diaria. Por enseñarme a comprender mis errores, corregirlos y tratar de ser mejor para mis semejantes en cada momento de mi existencia. Por permitirme estar en compañía de mis seres queridos.

### ***A mis Padres:***

*Manuel Fuentes Fernández y Alicia Garibay Ruiz*

Les debo sus enseñanzas, fortaleza y carácter para enfrentar cada reto en la vida. Por sus esfuerzos, sus sacrificios. Por demostrarme su amor y porque al depositar en mi su confianza me apoyaron día a día, porque siempre estuvieron a mi lado, paso a paso guiando mi camino, compartiendo mis triunfos y ayudándome a levantar de mis caídas. Todo eso y más sin pedir nunca nada a cambio.

### ***A mis hermanos:***

*Alma, Manuel, Verónica, Cristina, Jorge y David*

Con su ayuda incondicional y ejemplo de superación me motivaron a seguir siempre adelante, por ser fuente de apoyo y eternos compañeros de alegrías y tristezas.

### ***A mis traviesos sobrinitos:***

*Elías, Johan, Laura, y Jessica*

Por mostrar siempre una inocente sonrisa y cariño.

Gracias por ser mi familia.

## ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo titulado “Construcción de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de un tripsinógeno químero” se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la Dirección del Dr. José María Viader Salvadó y la Co-dirección de la Dra. Martha Guerrero Olazarán.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÁREA DE TRABAJO.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
NOMENCLATURA.....	xv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 HIPÓTESIS.....	3
3 OBJETIVOS.....	4
3.1. Objetivo general.....	4
3.2. Objetivos específicos.....	4
4 ANTECEDENTES.....	5
4.1. Tripsina y tripsinógeno del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	5
4.2. <i>P. pastoris</i> como hospedero para la producción de proteínas recombinantes.....	7
4.3. Síntesis de tripsinógeno de camarón en cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> .....	9
4.4. Péptidos de activación de tripsinógenos.....	9
5 MÉTODOS.....	11
5.1. Reactivos y material Biológico.....	11
5.2. Equipo.....	11
5.3. Estrategia general.....	12
5.4. Diseño de oligonucleótidos para facilitar la síntesis por PCR y clonación del fragmento <i>TgQ</i> en un vector de expresión.....	14

5.5.	Clonación del fragmento <i>TgQ</i> en el vector pGEM.....	17
5.5.1.	Estrategia de clonación.....	17
5.5.2.	Obtención del plásmido pPIC9 <i>Tg</i> .....	18
5.5.3.	Síntesis por PCR del fragmento <i>TgQ</i> .....	18
5.5.4.	Adenilación del fragmento <i>TgQ</i> .....	21
5.5.5.	Clonación del fragmento <i>TgQ</i> con el vector pGEM.....	21
5.5.6.	Caracterización del vector pGEM <i>TgQ</i> .....	22
5.5.6.1	Preparación del DNA plasmídico de pGEM <i>TgQ</i> .....	22
5.5.6.2	Caracterización del vector pGEM <i>TgQ</i> por PCR.....	24
5.5.6.3	Caracterización mediante digestión con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	25
5.5.6.4	Secuenciación del fragmento <i>TgQ</i> .....	26
5.6	Subclonación del fragmento <i>TgQ</i> en el vector pPIC9.....	26
5.6.1.	Preparación de los plásmidos de pGEM <i>TgQ</i> y pPIC9 <i>FTEII</i> .....	26
5.6.2.	Digestión de los plásmidos pGEM <i>TgQ</i> y pPIC9 <i>FTEII</i> con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	27
5.6.3.	Ligación del fragmento <i>TgQ</i> con el vector pPIC9 y transformación de <i>E. coli</i> .....	29
5.6.4.	Caracterización del plásmido pPIC9 <i>TgQ</i> .....	30
5.6.4.1.	Preparación del plásmido de pPIC9 <i>TgQ</i> ...	30
5.6.4.2.	Caracterización de pPIC9 <i>TgQ</i> por PCR...	30
5.6.4.3.	Caracterización de pPIC9 <i>TgQ</i> con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	31
5.7.	Construcción de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> portadoras del fragmento <i>TgQ</i> (KM71 <i>TgQ</i> ) .....	32
5.7.1.	Preparación a mediana escala del plásmido pPIC9 <i>TgQ</i> .....	33
5.7.2.	Preparación de células de <i>P. pastoris</i> KM71 químicamente competentes.....	34
5.7.3.	Transformación de <i>P. pastoris</i> KM71.....	34
5.7.4.	Caracterización genotípica de las cepas recombinantes KM71 <i>TgQ</i> .....	35
5.7.4.1.	Aislamiento de DNA genómico y análisis de la integración del casete de expresión mediante PCR.....	36
5.7.5.	Caracterización fenotípica de las cepas recombinantes KM71 <i>TgQ</i> .....	37
5.7.5.1.	Cultivo bajo condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71 <i>TgQ</i> y KM71 <i>Tg4</i> .....	38
5.7.5.1.1.	Concentración de proteínas	



	totales en el medio de cultivo..	41
	5.7.5.1.2. Análisis de proteínas por SDS-PAGE.....	42
	5.7.5.1.3. Detección del tripsinógeno quimérico mediante Western blot.....	43
5.8.	Cinéticas de crecimiento comparativas en condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC .....	45
5.8.1.	Análisis estadístico.....	47
6	RESULTADOS.....	49
6.1.	Diseño de oligonucleótidos para facilitar la síntesis por PCR del fragmento <i>TgQ</i> y su clonación en un vector de expresión...	49
6.2.	Clonación del fragmento <i>TgQ</i> en el vector pGEM.....	51
6.2.1.	Síntesis por PCR del fragmento <i>TgQ</i> .....	51
6.2.2.	Construcción y caracterización del vector pGEM <i>TgQ</i> .....	53
6.3.	Subclonación del fragmento <i>TgQ</i> en el vector pPIC9.....	59
6.4.	Construcción de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> portadoras del fragmento <i>TgQ</i> (KM71TgQ) .....	63
6.4.1.	Transformación de la cepas KM71 de <i>P. pastoris</i> con el vector de expresión construido.....	63
6.4.2.	Análisis por PCR del genotipo y fenotipo Mut de las cepas recombinantes obtenidas.....	65
6.4.3.	Caracterización fenotípica de las cepas recombinantes KM71TgQ y KM71Tg4 (fenotipo TgQ y Tg4) .....	66
6.5.	Cinéticas de crecimiento comparativas en condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC.....	69
7	DISCUSIÓN.....	77
8	CONCLUSIONES.....	83
	APÉNDICES.....	84
	LITERATURA CITADA.....	104
	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	109

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
I	Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con <i>GoTaq</i> DNA polimerasa para amplificación de <i>TgQ</i> .....	18
II	Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR con <i>Pfu</i> DNA polimerasa para amplificación de <i>TgQ</i> .....	19
III	Mezcla de reacción de adenilación del producto amplificado...	21
IV	Mezcla de reacción para la ligación con el sistema pGEM-T vector.....	22
V	Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con <i>GoTaq</i> DNA polimerasa para la caracterización de pGEM <i>TgQ</i> .....	24
VI	Mezcla de reacción de la digestión analítica del plásmido pGEM <i>TgQ</i> con <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	25
VII	Tamaños teóricos esperados para la caracterización con <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> de pGEM <i>TgQ</i> .....	25
VIII	Mezcla de reacción de la digestión preparativa de pPIC9 <i>FTEII</i> y pGEM <i>TgQ</i> con <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	28
IX	Fragmentos teóricos esperados en la digestión preparativa de pPIC9 <i>FTEII</i> y pGEM <i>TgQ</i> con <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	28
X	Componentes de la reacción de ligación del fragmento <i>TgQ</i> con el vector pPIC9.....	29
XI	Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR para la caracterización de pPIC9 <i>TgQ</i> .....	30
XII	Mezcla de reacción de la digestión analítica de pPIC9 <i>TgQ</i> con <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	31
XIII	Tamaños teóricos esperados para la caracterización de pPIC9 <i>TgQ</i> con <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	32
XIV	Mezcla de reacción en la digestión preparativa de pPIC9 <i>TgQ</i> con <i>SalI</i> .....	34
XV	Volumenes y reactivos necesarios para el análisis de integración por medio de PCR con iniciadores dirigidos a las regiones de AOX1.....	37
XVI	Composición de los medios de cultivo utilizados.....	40
XVII	Resumen de las condiciones experimentales de los cultivos en	

	matraz de KM71TgQ y KM71Tg4. En todos los casos los cultivos se realizaron a 30°C de temperatura y 250 rpm de agitación.....	40
XVIII	Mezcla de reacción para la determinación de la curva de calibración del método de Bradford.....	42
XIX	Volumenes y concentración final para la realización de los geles de poliacrilamida.....	44
XX	Valores inicial y final de la DO <sub>600</sub> , proteínas totales y pH al final de la etapa de inducción con metanol en los tres diferentes medios de cultivo para las dos cepas en estudio (KM71TgQ y KM71Tg4).....	67
XXI	Valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) de las cinéticas de crecimiento realizadas en tres diferentes medios de inducción. Los valores fueron calculados por turbidimetría y UFC/mL.....	72

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Representación esquemática de la estrategia general.....	13
2	Representación esquemática del tripsinógeno quimérico.....	14
3	Representación esquemática de la estrategia de diseño del oligonucleótido 5' para la amplificación de la secuencia nucleotídica del fragmento <i>TgQ</i> .....	16
4	Representación esquemática de la estrategia de diseño del oligonucleótido 3' para la amplificación de la secuencia nucleotídica del fragmento <i>TgQ</i> .....	16
5	Estrategia utilizada para la construcción del vector pPIC9 <i>TgQ</i> .....	17
6	Representación esquemática del protocolo experimental para los ensayos de fermentación para producción de tripsinógeno quimérico.....	39
7	Casete de transferencia utilizado en Western blot para la detección de Tg4 y TgQ.....	45
8	Esquema general del procedimiento realizado para obtener los valores de DO <sub>600</sub> y UFC/mL a cada tiempo.....	47
9	Secuencia de los iniciadores diseñados.....	50
10	Simulación de la PCR mediante el programa Amplify 1.2.....	50
11	Hibridación de los iniciadores con la secuencia molde.....	51
12	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X del producto amplificado correspondiente a la síntesis del fragmento <i>TgQ</i> empleando <i>GoTaq</i> DNA polimerasa, y etapas de hibridación con una rampa de 35 a 72°C por dos ciclos y 60°C por 30 ciclos.....	52
13	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X del producto amplificado correspondiente a la síntesis del fragmento <i>TgQ</i> empleando <i>Pfu</i> DNA polimerasa de alta fidelidad, y etapas de hibridación con una rampa de 4.0 a 72°C por cinco ciclos y 55°C por 30 ciclos.....	53
14	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la integridad del DNA plasmídico aislado de clonas transformadas con el producto de la ligación del vector pGEM y el fragmento <i>TgQ</i> .....	54
15	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X de la caracterización por PCR del vector pGEM <i>TgQ</i> .....	54

16	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en TBE 1X de la digestión con <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> del vector pGEMTgQ.....	55
17	Alineamiento entre las secuencias nucleotídicas directas o complementarias reversas (CR) obtenidas por secuenciación plásmido pGEMTgQ con los iniciadores universales T7F, SP6R, M13F y M13R, y los oligonucleótidos 5'TgQ y 3'Tr...	57
18	Traducción del fragmento TgQ.....	58
19	Alineamiento entre TgQ y el tripsinógeno II de <i>L. vannamei</i> ..	59
20	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de las etapas experimentales para subclonar el fragmento TgQ en el vector pPIC9.....	60
21	Análisis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de pPIC9TgQ.	61
22	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores 5'Tr y 3'Tr del plásmido pPIC9TgQ construido.....	61
23	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización enzimática del plásmido pPIC9TgQ con <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> .....	62
24	Representación gráfica del vector de expresión pPIC9TgQ....	63
25	Verificación del corte total del vector de expresión pPIC9TgQ con <i>SalI</i> en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X.....	64
26	Verificación de la integridad del DNA genómico aislado de las clonas recombinantes transformadas con el vector pPIC9TgQ (gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X).....	64
27	Representación gráfica del plásmido pPIC9TgQ y los sitios de apareamiento para los iniciadores específicos 5'AOX y 3'AOX o bien los iniciadores específicos para la secuencia nucleotídica tripsina de <i>L. vannamei</i> (5'Tr y 3'Tr).....	65
28	Análisis de PCR del DNAg aislado de las clonas KM71TgQ..	66
29	Análisis por SDS-PAGE al 12% (izquierda) y Western blot (derecha) de medios de cultivo libre de células después de 48 horas de inducción de las cepas KM71TgQ y KM71Tg4 en los medios BMM, BMMS y BMMA.....	68
30	Cinéticas de crecimiento de KM71TgQ (A), KM71Tg4 (B) y KM71PhyC (C) en tres diferentes medios de inducción, BMM(azul), BMMS (rojo) y BMMA (verde), evaluadas por DO <sub>600</sub> .....	69
31	Cinéticas de crecimiento de KM71TgQ (A) KM71Tg4 (B) y KM71PhyC (C) en tres diferentes medios de inducción, BMM(azul), BMMS (rojo) y BMMA (verde), evaluadas por UFC/mL.....	70
32	Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) de una cepa recombinante <i>P. pastoris</i> productora del tripsinógeno	

	quimérico (KM71TgQ) en condiciones de inducción del gen heterólogo.....	72
33	Comparación de las diferencias de las velocidades específicas de crecimiento evaluadas turbidimetría y cuenta viable en placa.....	73
34	Comparación del aumento de las velocidades específicas de crecimiento evaluadas en las tres cepas en estudio.....	74
35	Comparación de la disminución de las velocidades específicas de crecimiento evaluadas en las tres cepas en estudio.....	75

## NOMENCLATURA

Ala	Alanina
AOX	Alcohol oxidasa
<i>AOX1</i>	Gen codificante para la AOX1
<i>AOX2</i>	Gen codificante para la AOX2
ASB	Albúmina sérica Bovina
BMG	Medio mínimo amortiguado, adicionado con glicerol
BMM	Medio mínimo amortiguado, adicionado con metanol
BMMA	Medio mínimo amortiguado, adicionado con metanol y alanina
BMMS	Medio mínimo amortiguado, adicionado con metanol y sorbitol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DO <sub>595 nm</sub>	Densidad óptica a 595 nm
DO <sub>600 nm</sub>	Densidad óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
<i>et al.</i>	Et alii (y otros)
<i>g</i>	Número de veces la fuerza gravitacional
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
GS115Tg2	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de tripsinógeno de <i>Litopenaeus vannamei</i>
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
His <sup>+</sup>	Fenotipo <i>HIS4</i> positivo
<i>HIS4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
<i>his4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa defectuoso o mutado
IPTG	Isopropilthio-β-D-galactósido
kb	Kilobase = Mil pares de bases
kDa	Kilodaltones
Kex2	Serin-proteasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> unida a membrana
KM71FTEII	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de una fitasa termoestable
KM71Tg4	Cepa recombinante de <i>P. pastoris</i> productora y secretora de tripsinógeno de <i>Litopenaeus vannamei</i>
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
<i>L. vannamei</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
ln	Logaritmo natural
M	Marcador de peso molecular o concentración expresada en molar
mA	Miliamperes
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mg/L	Miligramos por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro

min	Minutos
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
Mut <sup>+</sup>	Mutante que posee el gen <i>AOXI</i> funcional
Mut <sup>s</sup>	Mutante que carece del gen <i>AOXI</i> funcional
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	Nanogramos
<i>P. pastoris</i>	<i>P. pastoris</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>Pfu</i> polimerasa	DNA polimerasa obtenida de <i>Pyrococcus furiosus</i> . Enzima encargada de construir nuevas cadenas de DNA
pH	Potencial de iones hidrógeno
PSA	Persulfato de amonio
RDB	Medio de regeneración básico de dextrosa sin histidina
RDHB	Medio de regeneración básico de dextrosa con histidina
<i>RNA'asa</i>	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
s	Segundos
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<i>sp</i>	Especie
Std	Estándares
<i>Taq</i> polimerasa	DNA polimerasa obtenida de <i>Thermophilus aquaticus</i> . Enzima encargada de construir nuevas cadenas de DNA
TE	Amortiguador de pH Tris-EDTA
Tris	Trizma o tris (hidroximetil) aminometano
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-Cl
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Radiación ultravioleta
VIS	Radiación visible
X	Número de veces la concentración
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar

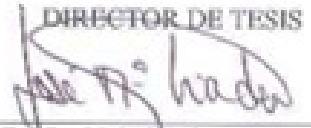


Parte del presente trabajo ha sido presentado en forma de cartel en los siguientes congresos:

- **XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y el VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras (SIPAL).** J.A. Fuentes-Garibay, M. Guerrero-Olazarán, J.M. Viader-Salvadó, “Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico” Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Acapulco, Guerrero, (México). 21-26 de Junio de 2009.
- **2º Congreso Internacional de Biotecnología Genómica AsEBioGen** J.A. Fuentes-Garibay, M. Guerrero-Olazarán, J.M. Viader-Salvadó, “Construcción de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico” 2º Congreso Internacional de Biotecnología Genómica, Asociación de Estudiantes de Biotecnología Genómica, Monterrey, Nuevo León (México). 1, 2 y 3 de Octubre de 2009.

## RESUMEN

En el presente trabajo, se construyeron por primera vez cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico formado por la tripsina del camarón *L. vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno humano. Además, mediante cinéticas de crecimiento comparativas realizadas en condiciones de inducción, se evaluó la toxicidad del tripsinógeno quimérico sobre células de *P. pastoris*, y se correlacionó con el mecanismo de autoactivación de los tripsinógenos. Se sintetizó y clonó en el vector pGEM una secuencia nucleotídica quimérica formada por la secuencia codificante del péptido de activación del tripsinógeno humano y de la tripsina de *L. vannamei* (fragmento *TgQ*). A partir del plásmido pGEM*TgQ*, se obtuvo el fragmento *TgQ* mediante digestión con las enzimas *XhoI* y *AvrII*, y se subclonó en el vector pPIC9. El plásmido obtenido (pPIC9*TgQ*) se linearizó con la enzima *SalI* para posterior transformación de células de *P. pastoris* KM71. Se determinó la velocidad específica de crecimiento de una de las cepas recombinantes construidas (KM71*TgQ*) en los medios BMM y BMM suplementado con sorbitol o alanina (BMMS o BMMA). Estas velocidades específicas de crecimiento se compararon con las correspondientes de dos cepas testigo productoras del tripsinógeno II de *L. vannamei* (KM71*Tg4*) y de una fitasa bacteriana (KM71*PhyC*). La correcta síntesis del fragmento *TgQ* fue confirmada por secuenciación nucleotídica del plásmido pGEM*TgQ*. La integración del fragmento *TgQ* en el genoma de *P. pastoris* y el fenotipo Mut<sup>s</sup> fueron confirmados por PCR. Los análisis de SDS-PAGE y Western blot del medio de cultivo libre de células demostraron la síntesis y secreción del tripsinógeno quimérico en los tres medios de inducción. Los resultados de las cinéticas de crecimiento indicaron que en los medios de cultivo BMM y BMMS, *TgQ* y el tripsinógeno de camarón presentan toxicidad sobre las células hospederas de *P. pastoris*, pero en el medio BMMS, *TgQ* muestra menor toxicidad que el tripsinógeno de camarón sobre las células hospederas. La adición de alanina en el medio de cultivo genera una mayor disminución de la toxicidad de *TgQ* y el tripsinógeno de camarón sobre las células de hospederas que la adición de sorbitol. Estos resultados sugieren que la velocidad de autoactivación del *TgQ* es sólo un poco menor que la del tripsinógeno de camarón. Un análisis de la secuencia aminoacídica de *TgQ* sugiere que el residuo de tirosina en la posición equivalente al Asp<sup>218</sup> de la tripsina humana podría disminuir la repulsión electrostática del péptido de activación de *TgQ* que generaría una autoactivación con una velocidad intermedia entre la correspondiente al tripsinógeno de camarón y la del tripsinógeno de vertebrados.

DIRECTOR DE TESIS  
  
Dr. José María Viader Salvadó

CO-DIRECTOR DE TESIS  
  
Dra. Martha Guerrero Olazarán

## ABSTRACT

In the present work, recombinant *P. pastoris* strains producers of a chimeric trypsinogen from *Litopenaeus vannamei* trypsin and the human trypsinogen activation peptide have been constructed for the first time. In addition, using comparative growth kinetics carried out in induction conditions, the toxicity of the chimeric trypsinogen over the cell host was evaluated and correlated with the trypsinogen autoactivation mechanism. A chimeric nucleotide sequence from the coding sequence of the human trypsinogen activation peptide and the *L. vannamei* trypsin (*TgQ* fragment) was synthesized and cloned into the vector pGEM. The fragment *TgQ* was obtained from the plasmid pGEM*TgQ* by digestion with *Xho*I and *Avr*II, and subcloned into the vector pPIC9. The obtained plasmid (pPIC9*TgQ*) was linearized by *Sal*I to transform *P. pastoris* KM71 cells. Specific growth rates of a constructed recombinant strain (KM71*TgQ*) were determined in the buffered minimal methanol (BMM) medium and BMM medium supplemented with sorbitol (BMMS) or alanine (BMMA). Results were compared with the corresponding specific growth rates from two control strains producers of the *L. vannamei* trypsinogen II (KM71*Tg4*) and a bacterial phytases (KM71*PhyC*). The correct synthesis of the *TgQ* fragment was confirmed by sequence analysis from the plasmid pGEM*TgQ*. The integration of the *TgQ* fragment into the genome of *P. pastoris* and the Mut<sup>s</sup> phenotype was confirmed by PCR. SDS-PAGE and Western blot analysis of the cell-free culture medium demonstrated the synthesis and secretion of the chimeric trypsinogen in the three induction media. Growth kinetics revealed a toxicity of *TgQ* and recombinant shrimp trypsinogen over the cell host in the BMM and BMMS media, but in the BMMS medium, *TgQ* show less toxicity than shrimp trypsinogen over the cell host. The alanine supplementation to the culture medium rendered a higher decrease of *TgQ* and shrimp trypsinogen toxicity than the sorbitol supplementation. These results suggest that the *TgQ* autoactivation rate is only a little less than that of shrimp trypsinogen. An analysis of the *TgQ* amino acid sequence suggests that the tyrosine residue at the equivalent position to the Asp<sup>218</sup> from the human trypsin could decrease the electrostatic repulsion of the *TgQ* activation peptide that would render an autoactivation process with an intermediate rate between the corresponding to the shrimp trypsinogen and that of the vertebrate trypsinogens.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tripsina es una serín proteasa que lleva a cabo la catálisis de reacciones de hidrólisis de enlaces peptídicos que contienen residuos de aminoácidos básicos, tales como lisina y arginina, reduciendo el tamaño de proteínas grandes y haciéndolas accesibles a posterior degradación por otras proteasas. Tradicionalmente, esta proteasa se obtiene del páncreas porcino o bovino para ser usada posteriormente en diversas aplicaciones biotecnológicas o experimentos de proteómica. Sin embargo, la tripsina de páncreas suele estar contaminada de otras proteasas, como la quimotripsina. Además, en muchos casos no se permite el uso de enzimas provenientes de animales debido a una contaminación potencial con agentes infecciosos. Por lo tanto, sería más adecuado la producción de una tripsina como proteína recombinante.

Gracias a los avances de la Ingeniería Genética y de la tecnología del DNA recombinante, actualmente es posible producir proteínas que antes se creía imposible producirlas por su difícil recuperación y/o fácil contaminación con otras proteínas de su fuente de origen. Mediante la alteración genética *in vitro* de microorganismos, se puede llegar a producir de forma recombinante casi cualquier proteína sencilla. De este modo, la compañía Roche Applied Science comercializa una tripsina recombinante porcina producida en la levadura *P. pastoris*.

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica que tiene la capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono y energía, y se emplea como hospedero para la producción de proteínas recombinantes. El sistema de expresión de *P. pastoris* combina muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de los organismos superiores, con una sencilla y menos costosa manipulación con fines biotecnológicos que otros sistemas de expresión de eucariotes superiores, lo que ha generado un incremento en el uso de esta levadura para producir proteínas recombinantes. Además, generalmente con *P. pastoris* se obtienen altos niveles de expresión.

La tripsina del camarón *Litopenaeus vannamei* tiene mayor actividad específica que la tripsina humana, bovina y porcina, lo que la hace una candidata

potencial para su producción en forma recombinante. Una opción sería producir esta proteasa a través de su zimógeno inactivo (tripsinógeno). Además, el tripsinógeno de *L. vannamei* no ha podido ser aislado de su fuente natural, por lo que su producción en un sistema de expresión proporcionaría la posibilidad de hacer estudios funcionales dirigidos a entender su mecanismo de activación y regulación. Sin embargo, su síntesis en *P. pastoris* causa toxicidad sobre su hospedero debido a una rápida autoactivación del tripsinógeno recombinante producido. Un tripsinógeno quimérico de lenta autoactivación facilitaría la síntesis de tripsina de camarón en *P. pastoris*.

En el presente trabajo, se construyeron por primera vez cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico (TgQ) formado por la tripsina del camarón *L. vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno humano. Además, mediante cinéticas de crecimiento comparativas realizadas en condiciones de inducción, se evaluó la toxicidad del tripsinógeno quimérico sobre células de *P. pastoris*, y se correlacionó con el mecanismo de autoactivación de los tripsinógenos. La correcta síntesis del fragmento *TgQ* fue confirmada por secuenciación nucleotídica del plásmido pGEM*TgQ*. La integración del fragmento *TgQ* en el genoma de *P. pastoris* y el fenotipo Mut<sup>s</sup> fueron confirmados por PCR. Los análisis de SDS-PAGE y Western blot del medio de cultivo libre de células demostraron la síntesis y secreción del tripsinógeno quimérico en los tres medios de inducción. Los resultados de las cinéticas de crecimiento indicaron que en los medios de cultivo BMM y BMMS, TgQ y el tripsinógeno de camarón presentan toxicidad sobre las células hospederas de *P. pastoris*, pero en el medio BMMS, TgQ muestra menor toxicidad que el tripsinógeno de camarón sobre las células hospederas. La adición de alanina en el medio de cultivo genera una mayor disminución de la toxicidad de TgQ y el tripsinógeno de camarón sobre las células de hospederas que la adición de sorbitol. Estos resultados sugieren que la velocidad de autoactivación del TgQ es sólo un poco menor que la del tripsinógeno de camarón. Un análisis de la secuencia aminoacídica de TgQ sugiere que el residuo de tirosina en la posición equivalente al Asp<sup>218</sup> de la tripsina humana podría disminuir la repulsión electrostática del péptido de activación de TgQ que generaría una autoactivación con una velocidad intermedia entre la correspondiente al tripsinógeno de camarón y la del tripsinógeno de vertebrados.

## 2. HIPÓTESIS

El tripsinógeno quimérico portador de la secuencia de la tripsina del camarón *Litopenaeus vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno humano será menos tóxico que el tripsinógeno de *L. vannamei* sobre cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de estas proteínas, facilitando así la producción del tripsinopogeno quimérico como proteína recombinante en el sistema de expresión de *P. pastoris*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Construir cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico y evaluar la toxicidad del producto recombinante sobre su hospedero.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Diseñar un par de oligonucleótidos para facilitar la síntesis por PCR y la clonación en un vector de expresión de una secuencia nucleotídica que codifique para un tripsinógeno quimérico (fragmento *TgQ*).
2. Clonar el fragmento *TgQ* en un vector de clonación y caracterizar el vector construido.
3. Subclonar el fragmento *TgQ* en un vector del sistema de expresión de *P. pastoris* y caracterizar el vector construido.
4. Construir cepas recombinantes de *Pichia pastoris* portadoras del fragmento *TgQ* (KM71TgQ) capaces de producir y secretar un tripsinógeno quimérico.
5. Realizar cinéticas de crecimiento comparativas en condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC.

## 4.- ANTECEDENTES

### 4.1. Tripsina y tripsinógeno del camarón *Litopenaeus vannamei*

La tripsina (EC 3.4.21.4) es un miembro de una grande y diversa familia de proteasas denominada serin-proteasas. Esta proteasa cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos que contienen residuos de aminoácidos básicos, tales como lisina y arginina, mediante un mecanismo que involucra a una triada catálitica compuesta de tres residuos específicos de serina, histidina y ácido aspártico. La tripsina juega un papel central en la digestión, debido a que ésta actúa como una enzima de cascada para la activación de otros zimógenos digestivos, así como de su mismo precursor, el tripsinógeno (Halfon and Craick 1998).

Los habitats acuáticos contienen una amplia variedad de organismos y por consiguiente tienen un enorme potencial para el descubrimiento de diferentes enzimas. Las vísceras de los pescados son conocidas por ser un sitio rico de enzimas incluyendo la tripsina. Además, las enzimas digestivas de animales marinos exhiben una actividad óptima a temperaturas más altas que su temperatura ambiental (Fereidoon *et al.*, 2001).

En los crustáceos, el hepatopáncreas es un órgano que combina las funciones del hígado y el páncreas de los mamíferos y produce una gran cantidad de proteasas digestivas (Tsai *et al.*, 1991). La tripsina de camarón fue aislada y caracterizada por primera vez en las glándulas digestivas de *Penaeus setiferus* (Gates *et al.*, 1969) y más tarde en otras especies de *Penaeus* (Lee *et al.*, 1982, Honjo *et al.*, 1990, Galgani *et al.*, 1985). En la glándula digestiva de *Litopenaeus japonicus*, la tripsina constituye aproximadamente el 6% de las proteínas totales solubles, siendo la tripsina una de las proteasas más importantes en este organismo (Galgani *et al.*, 1985). Es importante remarcar la ausencia de pepsina en el tracto digestivo del camarón, éstos carecen de estómago verdadero y no cuentan con células secretoras



de ácido, por lo que su digestión se lleva a cabo a un pH básico o neutro. Extractos enzimáticos de hepatopáncreas del Camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* presentan tres isoformas de tripsina (Klein *et al.*, 1996, Le Moullac *et al.*, 1996). Dos de estas isoformas (Le Moullac, 1994) y las tres isoformas de la tripsina de *L. vannamei* (Sainz *et al.*, 2004) han sido aisladas y caracterizadas sus propiedades físico-químicas. Al igual que en otros camarones y especies marinas (Lu *et al.*, 1990; Martínez *et al.*, 1988), las tres isoformas de tripsina de *L. vannamei* presentan un punto isoeléctrico ácido. Las tripsinas de *L. vannamei* presentan prácticamente máxima actividad en un amplio intervalo de temperatura (40-70°C) (Le Moullac, 1994; Sainz *et al.*, 2004) estando el máximo a 50-55°C (Le Moullac, 1994), a diferencia de la temperatura de máxima actividad de tripsina en otros organismos que suele ser en un intervalo estrecho (Jiang *et al.*, 1991). En general, las tripsinas aisladas de animales marinos son aniónicas a pH neutro y tienen una actividad óptima a temperaturas más altas que la temperatura del animal o de su hábitat natural (Shahidi *et al.*, 2001). Además la tripsina del *L. vannamei* presenta actividad en un intervalo amplio de pH de 6 a 11 (Le Moullac, 1994, Sainz *et al.*, 2004) mientras que en otros organismos e incluso otros camarones el intervalo de pH de máxima actividad es mucho más estrecho (Jiang *et al.*, 1991). Las tripsinas de otros organismos diferentes de crustáceos también tienen un máximo de actividad a pH alcalino como la tripsina de pollo cuyo pH óptimo es 8 (Guyonnet *et al.*, 1999). Por otro lado, la actividad específica de las tripsinas de *L. vannamei* utilizando BAPNA como sustrato es 6 veces mayor que la de *P. indicus* (Le Moullac 1994, Honjo *et al.*, 1990) y no tiene actividad exopeptidasa (Le Moullac, 1994). Además, la tripsina de camarón tiene mayor actividad específica que la tripsina humana y bovina (Klein *et al.*, 1996). Todas estas propiedades físico-químicas de la tripsina de camarón diferentes a la tripsina humana y bovina la hacen una candidata potencial para su producción en forma recombinante.

En 1996 Klein *et al.*, describieron la secuencia de los DNAC de cinco isoformas de tripsina de la glándula digestiva del camarón *L. vannamei* (Klein *et al.*, 1996). Además, clonaron y caracterizaron una secuencia de DNAC que propusieron codifica para un polipéptido de 255 aminoácidos correspondiente a una proenzima de tripsina (tripsinógeno). A pesar de la descripción de esta secuencia nucleotídica, durante mucho tiempo no se pudo detectar o aislar el tripsinógeno de *L. vannamei* por lo que algunos autores sugirieron que en los camarones el tripsinógeno se activa

muy rápido a tripsina en lugar de almacenarse como precursor inactivo como en los mamíferos, o bien que en los camarones no se sintetizaba el tripsinógeno sino que la síntesis es directamente a tripsina (Gates *et al.*, 1969). Sin embargo, Gallegos-López., 2004 detectaron la presencia de transcritos de tripsinógeno empleando ensayos de retrotranscripción acoplados a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con RNA extraído de hepatopáncreas de *L. vannamei* y oligonucleótidos específicos para tripsinógeno diseñados a partir de la secuencia de DNAc descrita por Klein *et al.* (Gallegos-López., 2004, Klein *et al.*, 1996). Además ya se ha podido detectar el tripsinógeno en el hepatopáncreas de *L. vannamei* mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos para tripsinógeno obtenidos a partir de un péptido sintético diseñado con la secuencia de DNAc descrita por Klein *et al.* (Sainz *et al.*, 2004b, Klein *et al.*, 1996). Con estos resultados queda demostrada la presencia y síntesis de tripsinógeno de *L. vannamei*.

#### **4.2. *P. pastoris* como hospedero para la producción de proteínas recombinantes**

En los últimos años se ha incrementado el uso de *P. pastoris* en sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes, gracias a una serie de características favorables que posee dicha levadura. Como microorganismo eucariote, *P. pastoris* ofrece muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de los organismos superiores, ya que es capaz de realizar modificaciones postraduccionales y generalmente conduce al plegamiento correcto de las proteínas. Además, su manipulación con fines biotecnológicos es más sencilla y menos costosa que otros sistemas de expresión de eucariotes superiores y generalmente se obtienen niveles de expresión más altos que en estos últimos (Romanos, 1995; Escamilla *et al.*, 1999).

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica que tiene la capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono y energía, el cual es metabolizado por una ruta metabólica que involucra a la enzima alcohol oxidasa (AOX), la cual se sintetiza en grandes cantidades (hasta el 35% de las proteínas celulares) cuando se cultiva en metanol como única fuente de carbono (Digan *et al.*, 1989).

Se han desarrollado sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes, en los cuales se introduce a *P. pastoris* un vector que porta el gen heterólogo bajo el control del promotor del gen *AOX1*, y por recombinación

homóloga se integra a su genoma, siendo posible inducir la expresión de dicho gen heterólogo al emplear metanol como única fuente de carbono (Clare *et al.*, 1991).

Muchos de los vectores empleados para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* son vectores plasmídicos de integración que se caracterizan por tener un promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5'*AOX1* y 3'*AOX1* TT, respectivamente), y una secuencia señal tal como la del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* que favorece la secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo.

A pesar de que se han producido altos niveles de proteínas recombinantes en cultivos de *P. pastoris* realizados en matraces agitados, generalmente los niveles de producción en este tipo de cultivos son bajos en comparación con los niveles obtenidos en biorreactores de tanque agitado. Esto es debido fundamentalmente a que sólo es posible crecer el organismo a elevadas densidades celulares (> 100 g/L peso seco ó 500 DO<sub>600</sub>) en el ambiente controlado de un biorreactor. Especialmente para el caso de proteínas secretadas al medio de cultivo, la concentración de producto recombinante en el medio es aproximadamente proporcional a la concentración de células en el cultivo. Por otro lado, el nivel de transcripción del gen heterólogo a través del promotor *AOX1* puede ser 3-5 veces mayor en células de *P. pastoris* alimentadas con metanol a velocidades limitantes en comparación con células cultivadas en presencia de exceso de metanol. Todas las cepas empleadas para la producción de proteínas heterólogas son derivadas de la cepa silvestre de *P. pastoris* NRRL Y-11430: GS115 (*his4*), KM71 (*aox1*, *his4*), PPF1 (*his4*, *arg4*), SMD1163 (*his4*, *pep4*, *prB1*), SMD1165 (*his4*, *prB1*), y SMD1168 (*his4*, *pep4*). La cepa GS115 es la más comúnmente utilizada, tiene un defecto en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*his4*) lo cual le impide sintetizar histidina. Los plásmidos de expresión que contienen el gen *HIS4* complementan el *his4* del hospedero, de modo que las transformantes se seleccionan por su habilidad de crecer en un medio deficiente de histidina. La reversión espontánea de GS115 al prototipo His<sup>+</sup> ocurre con una frecuencia de 10<sup>-8</sup> (Cregg *et al.*, 1985).

La cepa KM71 se emplea para obtener fácilmente células recombinantes que tienen el gen *AOX2* no funcional, por lo que crecen lentamente en Metanol como fuente de carbono y se les denomina Mut<sup>S</sup>. La cepa PPF1 se emplea cuando se necesita realizar la transformación con dos plásmidos, mientras que las cepas

SMD1168, SMD1165 y SMD1163 tienen interrumpidos los genes que codifican para la proteasa A (*PEP4*) y/o proteasa B (*PRB1*), que en algunas proteínas ha ayudado a disminuir la degradación proteolítica y por lo tanto aumentar la producción (Cregg *et al.*, 1985).

#### **4.3. Síntesis de tripsinógeno de camarón en cepas recombinantes de *P. pastoris***

Con el fin de producir tripsinógeno recombinante de camarón, en el laboratorio de Biotecnología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* que contienen en su genoma el DNAC del tripsinógeno II del camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Cinéticas de crecimiento, evaluadas mediante unidades formadoras de colonias, de estas cepas recombinantes en un medio de cultivo inductor del gen heterólogo mostraron claramente un descenso de la viabilidad a lo largo del cultivo (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2009). Cultivos a nivel biorreactor de 5 L de estas mismas cepas recombinantes, mostraron un aumento del oxígeno disuelto en el medio de cultivo al suministrar el inductor (metanol) del gen heterólogo (Fuentes-Garibay, 2005). Ambos resultados sugieren una toxicidad del tripsinógeno de camarón o de su forma activa (tripsina) sobre su hospedero (*P. pastoris*).

#### **4.4. Péptidos de activación de tripsinógenos**

Recientemente se ha reportado la producción de tripsinógenos humano, porcino y de un pescado adaptado al frío (*Tautoglabrus adspersus*) en *P. pastoris* (Mattanovich *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2004; Macouzet *et al.*, 2005). Comparando las secuencias aminoacídicas de los tres tripsinógenos producidos en *P. pastoris* con la secuencia aminoacídica del tripsinógeno de camarón, se puede observar claramente la presencia de cuatro (humano y porcino) o tres (*T. adspersus*) aspartatos en la secuencia aminoacídica correspondiente al péptido activación del tripsinógeno, mientras que el tripsinógeno de camarón carece de estos aspartatos en dicha secuencia. Realizando una comparación exhaustiva de setenta péptidos de activación de tripsinógenos de diversas especies y mutaciones en el péptido de activación del tripsinógeno humano, se ha propuesto que la presencia de aspartatos en el péptido de activación inhibe la activación del tripsinógeno a tripsina (Chen *et al.*, 2003). Una conclusión similar ha

sido propuesta al observar una rápida autoactivación en un tripsinógeno recombinante catiónico humano mutado, donde fueron remplazados los cuatro aspartatos por cuatro alaninas (Nemoda and Sahin-Tóth., 2005). Además, estudios recientes en nuestro laboratorio (Castillo-Galván., 2007) han mostrado una rápida autoactivación del tripsinógeno recombinante en comparación con el tripsinógeno bovino. Estos resultados hacen pensar en una activación del tripsinógeno recombinante de camarón durante el proceso de su producción en cepas recombinantes de *P. pastoris* causando toxicidad sobre su hospedero, así como una baja producción de la proteína recombinante. Además, el hecho que haya sido posible producir en *P. pastoris* tripsinógenos de otras especies que tienen péptidos de activación con aspartatos de los que se ha propuesto una lenta autoactivación, induce a pensar que un tripsinógeno quimérico portador de la secuencia de la tripsina del camarón *L. vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno catiónico humano podrá ser producido en el sistema de expresión de *P. pastoris* y mostrará menor toxicidad que el tripsinógeno de *L. vannamei* sobre cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de estas proteínas.

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Reactivos y Material Biológico

El trabajo experimental se desarrolló principalmente en el laboratorio de Biotecnología Biomolecular (L5) perteneciente al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

Los reactivos para las diferentes soluciones provienen de Sigma Chemical Co. (*St Louis Mo, EUA*), y Productos Químicos Monterrey (*Monterrey, N.L. Méx.*). Los medios de cultivo provienen de Difco (Detroit, MI, EUA) y Becton Dickinson de México, S.A. de C.V. (*Edo. de México, Méx.*). El estuche de "GeneClean" se adquirió de Promega. El sistema de expresión de *P. pastoris* se adquirió de Invitrogen Corporation (*San Diego Ca, EUA*). El plásmido portador del DNAc de tripsina-tripsinógeno fue donado por el grupo de investigación del Dr. Alain Van Wormhoudt (Marine Biology Laboratory, College de France, Concarneau, Cedex, Francia).

### 5.2. Equipo

Los equipos utilizados para el desarrollo de este trabajo se describen a continuación: una centrífuga J2-21 M (*Beckman*), campana microbiológica de flujo laminar (*labconco Co. Inc.*), potenciómetro (*Beckman*), estufa (*131 Felisa*), 3 refrigeradores (*Torrey*), balanza granataria (*WM Ainsworth And Sons Inc.*), balanza analítica (*AMD*), placa calentadora con agitación (*Termolyne*), placa de agitación (*Termolyne*), agitador magnético (*PC103 Corning*), bomba de vacío (*0322-V4B-G180X General Electric*), olla de presión 21 litros (*Presto*), gradillas (*Glasser*), baño de agua (*Precisión, Termo EC*), termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*PCR Sprint Hybaid*), campana para PCR (*CBS, CBP-048*), equipo de captura de imágenes (*EDAS 40 kodak*), congelador a -20°C (*Torrey*), cámara de electroforesis horizontal y fuente de poder (*494 ISCO*), microcentrífuga (*Beckman Coulter TM22R*), agitadores magnéticos (*Thermoline*), cámara de electroforesis vertical (*Termo EC*), placa de calentamiento 17600 modelo DB17615 (*Thermoline*),

espectrofotómetro modelo SmartSpect™ 3000 (*Bio-Rad*), micropipetas (Labnet Co.), centrífuga Allegra™ 21R (*Beckman Coulter*), concentrador a vacío (Labconco Corporation), autoclave (*Aesa*), balanza granataria (Mettler, Toledo), mini vortex (*VWRbrand 58816-121*), cubetas desechables de poliestireno (Plastibrand), incubadora (Yamato), filtros para ultrafiltración de muestras biológicas de 0.05-0.5 mL (*Millipore*), espectrofotómetro DU-650 región ultravioleta-visible (*Beckman Coulter*), una incubadora con agitación (*Lab-Line Instruments Inc.*). Para el análisis de proteínas se utilizó un equipo de electroforesis equipado con una fuente de poder (*Termo EC570-90*), jeringa para descarga capacidad 50 µL para geles de poliacrilamida, (*Hamilton*), sistema de análisis de imagen (*Kodak EDAS-290*) plataforma de lavado (*VWR Scientific Products*), cámara de electroforesis de proteínas, cristales de 10 x 10 cm.

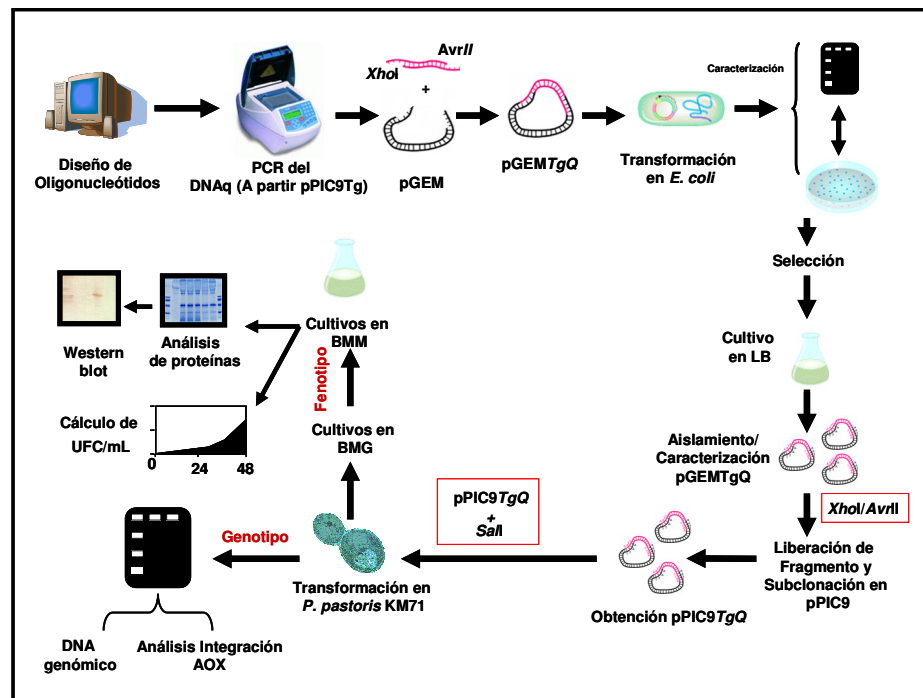
Para el procesamiento de datos y esquemas gráficos se empleó una computadora COMPAQ PRESARIO V3417LA (*Compaq*), el procesador de texto Microsoft Word XP (*Microsoft Corporation, 2002*), el procesador de gráficos Microsoft Power Point XP (*Microsoft Corporation, 2002*) y la hoja de cálculo Microsoft Excel XP (*Microsoft Corporation, 2002*). Para el análisis estadístico se empleo una ANOVA y la prueba de Tuckey (SPSS 15.0 Windows).

Las bases de datos y programas computacionales de biología molecular empleados fueron: GenBank del NCBI (*National Center of Biotechnology Information, Bethesda MD, USA*), Amplify versión 1.2 (© 1992 *University of Wisconsin Genetics M. Madison Wi. USA*), BioEdit y NebCutter.

### **5.3. Estrategia general**

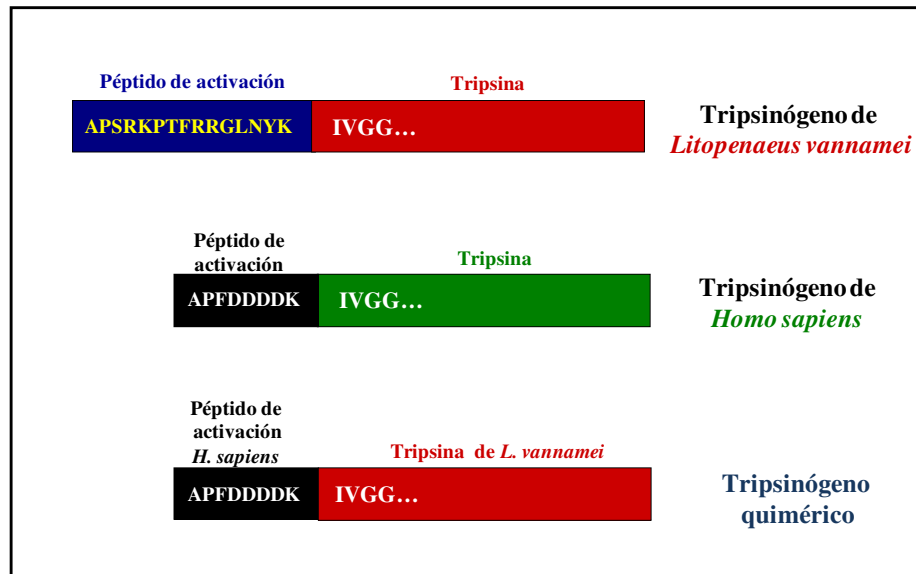
Para la construcción y caracterización de cepas recombinantes de cepas de *P.pastoris* KM71 portadoras del fragmento *TgQ* que codifica para un tripsinógeno quimérico con la secuencia de la tripsina de camarón *Litopenaeus vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno humano, primero se diseñaron oligonucleótidos que presentaban dichas regiones hacia el extremo 5' y una región específica hacia la región 3' de la secuencia codificante para la tripsina de camarón, y se amplificó el fragmento *TgQ* por PCR. La secuencia amplificada se clonó en un vector pGEM, posteriormente se subclonó en el vector de expresión pPIC9, y se construyó el plásmido pPIC9*TgQ*. Con el plásmido pPIC9*TgQ* construido, se transformó la cepa

KM71 de *P. pastoris* mediante el método químico. La cepa construída se caracterizó por su genotipo y fenotipo, posteriormente, se evaluó la expresión de la secuencia clonada. Se realizaron cinéticas de crecimiento de una cepa portadora del fragmento *TgQ*, una cepa portadora de la secuencia codificante del tripsinógeno de camarón sin la mutación en su péptido de activación y una cepa productora de una fitasa bacteriana, con el fin de evaluar si la producción de la proteína recombinante afecta el crecimiento y la viabilidad del hospedero. En la figura 1 se muestra un esquema de la estrategia general experimental que se realizó en este trabajo.



**Figura 1. Representación esquemática de la estrategia general.** Se muestran cada una de las etapas realizadas para la construcción y caracterización de cepas recombinantes de *P. pastoris* KM71 portadoras del fragmento *TgQ* que codifica para la tripsina de camarón *Litopenaeus vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno humano.





**Figura 2. Representación esquemática del tripsinógeno quimérico.** Se muestra la secuencia aminoacídica quimérica formada por la secuencia codificante del péptido de activación del tripsinógeno humano y de la tripsina del camarón *L. vannamei* (*TgQ*).

#### 5.4. Diseño de oligonucleótidos para facilitar la síntesis por PCR y clonación del fragmento *TgQ* en un vector de expresión

La secuencia nucleotídica de la región de tripsina de camarón *Litopenaeus vannamei* fue obtenida mediante la búsqueda en el GenBank del NCBI (clave de acceso X86369). Así mismo también se realizó una búsqueda específica de la secuencia nucleotídica correspondiente al péptido de activación del tripsinógeno humano. Una vez obtenidas ambas secuencias nucleotídicas y fusionada a la secuencia del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* para facilitar su secreción al medio de cultivo, se añadieron sitios de restricción al inicio y al final de la secuencia, se diseñaron los iniciadores 5' del fragmento de *TgQ* (sitio de corte *XhoI*, factor alfa, región de activación del tripsinógeno humano y 14 nucleótidos correspondientes al extremo 5' de la secuencia nucleotídica que codifica para la tripsina de camarón) y 3' (14 nucleótidos del extremo de 3' de la secuencia que codifica para la tripsina de camarón y sitio de corte *AvrII*). Adicionalmente se analizó la secuencia nucleotídica del promotor *AOX1*, las regiones de hibridación de los iniciadores 5' y 3' de *AOX1*, además se localizó en este vector la región nucleotídica del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y el sitio de corte proteolítico de *Kex2*; entre los elementos importantes para el diseño de iniciadores y poder dirigir así la clonación y

expresión de la secuencia quimérica *TgQ* en forma eficiente. En base a esta información, el oligonucleótido 5' se diseñó con las siguientes condiciones:

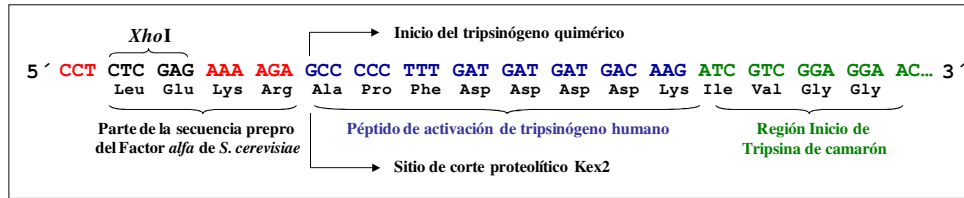
- 1) Que parte de su secuencia fuera complementaria al extremo 5' de la secuencia nucleotídica del gen de tripsina de camarón *Litopenaeus vannamei*.
- 2) Que contara con la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido de activación del tripsinógeno humano.
- 3) Que contara con el sitio de restricción *XhoI*, requerido para su clonación adecuada, además de tres nucleótidos de anclaje en el extremo 5' de dicha secuencia.
- 4) Que contara con parte de la secuencia nucleotídica del factor  $\alpha$  (péptido señal) de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual posee el sitio de corte proteolítico de *KEX2*, de manera que al clonarse en el vector pPIC9 se encuentren en el mismo marco de lectura y así asegurar la secreción apropiada de la proteína madura hacia el medio de cultivo.

Así mismo para el diseño del oligonucleótido 3', se tomaron las siguientes condiciones:

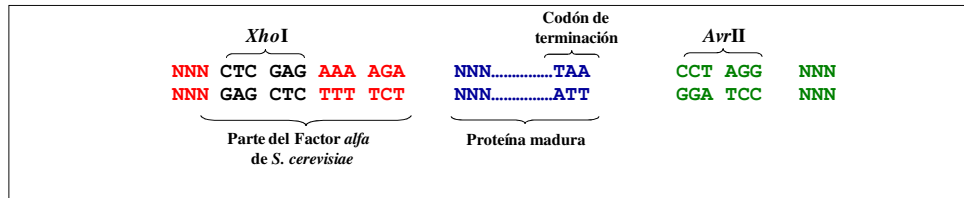
- 1) Que parte de su secuencia fuera complementaria al extremo 3' de la secuencia nucleotídica del gen de la tripsina de camarón *Litopenaeus vannamei*.
- 2) Que además contara con el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *AvrII*, requerido para su clonación adecuada, más tres nucleótidos de anclaje en el extremo 5' de dicho sitio.
- 3) Que además el codón de terminación de la traducción propio de la secuencia nucleotídica del fragmento *TgQ* estuviera incluido en la secuencia del iniciador *TgQ* 3' (figura 3).

Los oligonucleótidos iniciadores diseñados se verificaron mediante el programa computacional Amplify 1.0 (Engels., 1993), el cual fue alimentado con la secuencia que codifica para la isoforma II del tripsinógeno de *Litopenaeus vannamei* y la secuencia de los iniciadores diseñados. Una vez obtenido el diseño de los iniciadores (Figuras 3 y 4) y con el fin de obtener múltiples copias se realizó la amplificación del fragmento *TgQ* por PCR.

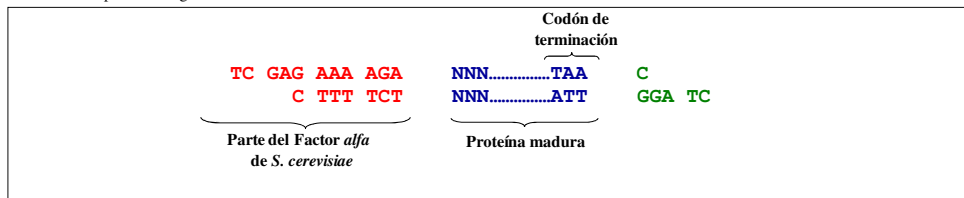
Condición inicial para oligonucleótido 5' quimérico



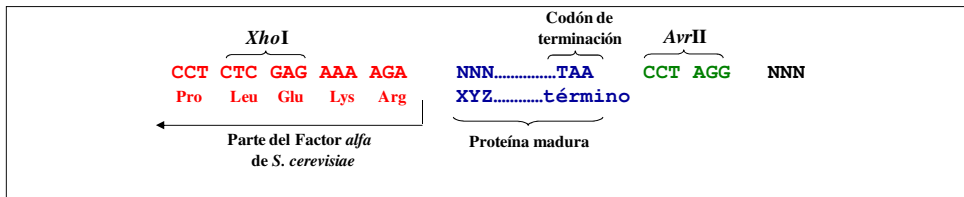
Producto amplificado planeado



Producto amplificado digerido

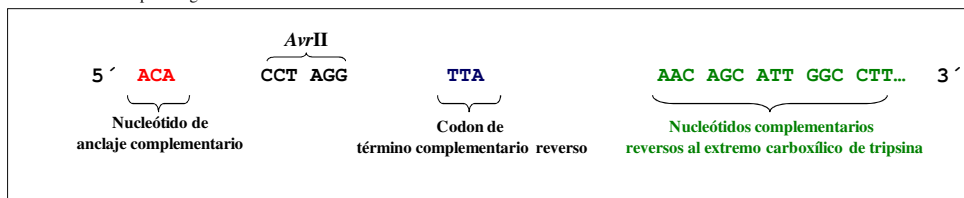


Plásmido construido



**Figura 3. Representación esquemática de la estrategia de diseño del oligonucleótido 5' para la amplificación de la secuencia nucleotídica del fragmento *TgQ*.** Las letras en rojo representan parte de la secuencia nucleotídica y aminoacídica del factor  $\alpha$  (que contiene a su vez el sitio de restricción *XhoI*); en color azul la secuencia nucleotídica de la proteína madura y en verde el sitio de restricción *AvrII* introducido por el oligonucleótido 3'.

Condición inicial para oligonucleótido 3'

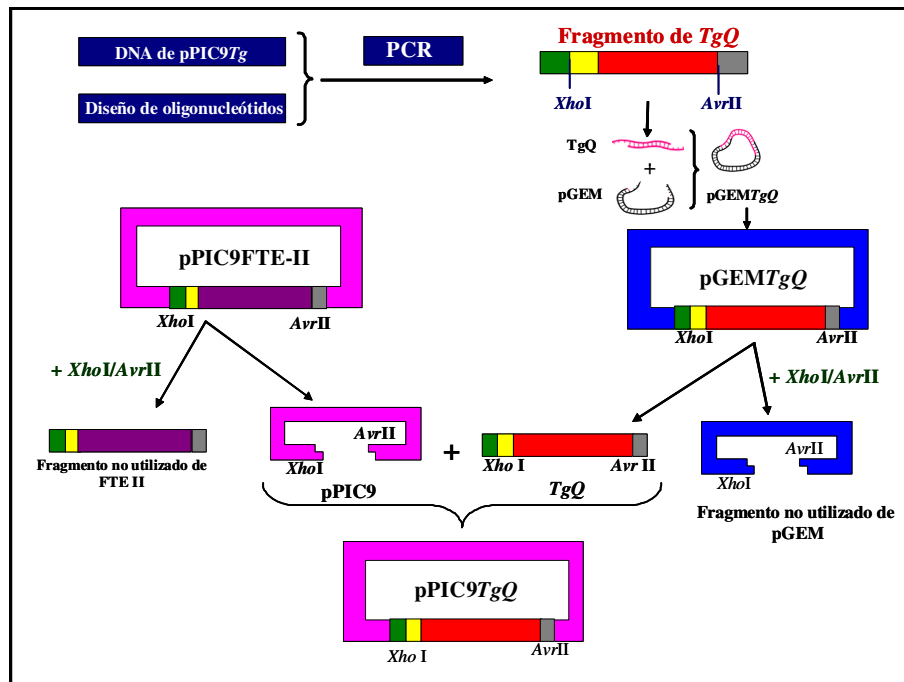


**Figura 4. Representación esquemática de la estrategia de diseño del oligonucleótido 3' para la amplificación de la secuencia nucleotídica del fragmento *TgQ*.** Las letras en rojo representan parte de la secuencia nucleótidos de anclaje complementario así como el sitio de corte *AvrII*, en azul representa el codón de termino reverso. Las letras en verde representan nucleótidos complementarios reversos a tripsina.

## 5.5. Clonación del fragmento *TgQ* en el vector pGEM

### 5.5.1. Estrategia de clonación

El fragmento *TgQ* conteniendo la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido de activación del tripsinógeno humano y la región codificante de la tripsina de camarón de *Litopenaeus vannamei* se amplificó por PCR empleando como templado el plásmido pPIC9*Tg* (Guerrero Olazarán *et al.*, 2009) e iniciadores específicos diseñados para introducir los sitios de restricción *Xho*I y *Avr*II en los extremos 5' y 3' respectivamente. El producto amplificado se clonó en el vector pGEM-T y posteriormente se digirió con las enzimas *Xho*I y *Avr*II para facilitar su obtención en cantidades suficientes para la subclonación posterior en el vector de expresión pPIC9. Para la subclonación del fragmento *TgQ* en pPIC9, se empleó el plásmido pPIC9*FTEII* previamente construido, el cual fue digerido igualmente con las enzimas *Xho*I y *Avr*II reemplazando el fragmento liberado con el fragmento de *TgQ*, dando lugar al nuevo plásmido construido pPIC9*TgQ* de 8737 pb.



**Figura 5. Estrategia utilizada para la construcción del vector pPIC9*TgQ*.** El vector pPIC9*FTEII*, fue digerido con *Xho*I y *Avr*II, el producto amplificado (rojo) fue clonado en el vector pGEM, liberado de éste mediante la digestión con las mismas enzimas y posteriormente subclonado en el vector pPIC9 (fucsia), obteniéndose el vector pPIC9*TgQ*.

### 5.5.2. Obtención del plásmido pPIC9Tg

El vector de expresión pPIC9Tg, previamente construido (Guerrero Olazarán *et al.*, 2009), conteniendo la secuencia que codifica para la isoforma II del tripsinógeno de camarón (*Litopenaeus vannamei*) se obtuvo por lisis alcalina y fue empleado como secuencia blanco para realizar la mutación en la región del péptido de activación. De la preparación obtenida, se realizó una dilución 1:100 y a partir de ésta se utilizó para realizar la PCR y los posteriores ensayos para su clonación en el vector de clonación (pGEM) y de expresión (pPIC9).

### 5.5.3 Síntesis por PCR del fragmento TgQ

El fragmento *TgQ* se amplificó empleando los iniciadores previamente diseñados (Figuras 4 y 5) y sintetizados por Invitrogen: 5'TgQ: (5'- CCT CTC GAG AAA AGA GCT CCA TTC GAC GAC GAC GAC AAG ATC GTC GGA GGA AC- 3') y 3'Tr (5'-ACA CCT AGG TTA AAC AGC ATT GGC CTT- 3'). Se utilizó como molde la preparación del DNA plasmídico descrita en la sección 5.5.2 Inicialmente se probaron los iniciadores en la estandarización de la PCR, empleando la enzima *GoTaq* DNA polimerasa de Promega Corporation (Promega Num. Cat. M3005), se varió principalmente la temperatura y el tiempo de las etapas. En la tabla I se muestra la composición de los reactivos usados para la PCR estandarizada.

**Tabla I.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con *GoTaq* DNA polimerasa para amplificación de *TgQ*

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (µL)	Concentración final
Green Buffer	5X	5.0	1X
dNTP's	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer 5'TgQ	5 µM	2.5	0.5 µM
Primer 3'Tr	5 µM	7.5	1.5 µM
<i>GoTaq</i>	5 U/µL	0.2	0.04 U/µL
Polimerasa	1.07 ng/µL*	1.0	0.04 ng/µL
DNA molde	-----	8.3	-----
Agua ultrapura			
Volumen final	-----	25.0	-----

\* La muestra proviene de un Stock que tiene 107 ng/µL diluída 1:100 resultando una concentración de 1.07 ng/µL.

El programa que se empleó para la amplificación del fragmento quimérico con *GoTaq* DNA polimerasa, se desarrolló tomando en cuenta la longitud del oligonucleótido 5', el número de residuos del oligonucleotido que hibridan con el DNA blanco y la formación de estructuras secundarias del oligonucleotido 5' consigo mismo y consistió en lo siguiente: etapa 1, 94°C (1 min) 1 ciclo; etapa 2, 94°C (1 min), 35°C (1 min), una rampa de 35 a 72°C a una velocidad de 0.25°C/s, 72°C (1 min) 2 ciclos; etapa 3, 94°C (1 min), 60°C (1 min), 72°C (1 min) y etapa 4, 72°C (10 min) 1 ciclo.

Posteriormente, se probó con la enzima *Pfu* DNA polimerasa (tabla II) de BioTools tomando en cuenta las especificaciones del fabricante. Esta enzima se empleó por su alta fidelidad, debido a que incorpora un número menor de nucleótidos erróneos al producto amplificado, aspecto importante para la clonación de productos de PCR.

**Tabla II.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR con *Pfu* DNA polimerasa para amplificación de *TgQ*

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer	10 X	2.5	1X
dNTP's	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer 5'TgQ	5 μM	2.5	0.5 μM
Primer 3'Tr	5 μM	7.5	1.5 μM
<i>Pfu</i> DNA Polimerasa	1 U/μL	2.0	0.08 U/μL
DNA molde	1.07 ng/μL	1.0	0.04 ng/μL
Agua ultrapura	-----	9.0	-----
Volumen final	-----	25.0	-----

\* La muestra proviene de un Stock que tiene 107 ng/μL diluída 1:100 resultando una concentración de 1.07 ng/μL.

El programa que se empleó para la amplificación del gen quimérico con *Pfu* DNA polimerasa consistió en la siguientes etapas: etapa 1, 94°C (1 min) 1 ciclo; etapa 2, 94 °C (1 min), 4°C (1 min), una rampa de 4 a 72°C a una velocidad de 0.25°C/s, 72°C (1 min) 5 ciclos; etapa 3, 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (1 min) y etapa 4, 72°C (10 min) 1 ciclo.

Una alícuota de 5 μL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en buffer de tris-boratos-EDTA (TBE 1X,

Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñidos luego con bromuro de etidio (2 µg/mL en TBE 1X) por 30 min, enjuagados luego con agua libre de nucleasas y analizados a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290.

El primer paso para llevar a cabo la clonación del producto de PCR en un vector de clonación una vez obtenido el producto amplificado fue la purificación de dicho producto. Para llevar a cabo el procedimiento de purificación, se utilizó el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Num Cat. A9281), el cual está diseñado para extraer y purificar fragmentos de DNA y productos de PCR a partir de un gel de agarosa y/o preparaciones directas de PCR. Este consiste de una columna que tiene una membrana de sílica, la cual tiene la habilidad de unirse al DNA de interés y a través de centrifugación es recuperado el producto libre de exceso de nucleótidos, primers y sales. La preparación se llevó a cabo como sigue: después de terminada y analizada una alícuota de producto de PCR a través de electroforesis en gel de agarosa para verificar la amplificación del DNAc quimérico, se añadió un volumen equivalente de solución de unión a membrana a la reacción de PCR, por otro lado para llevar a cabo la unión al DNA se insertó la minicolumna con su tubo colector, y la mezcla anterior previamente realizada se transfirió a la minicolumna ensamblada. Se incubó por un min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 16000 g por 1 min y se descartó el flujo cosechado en el tubo colector, y se reinsertó nuevamente la minicolumna con su respectivo tubo colector. Luego se añadieron 700 microlitros de solución de lavado. Se centrifugó a 16000 g por un min y nuevamente se descartó el colectado y se reinsertó la minicolumna con su respectivo tubo colector y se repitió este procedimiento con 500 µL de solución de lavado, se centrifugó a 16000 g por 5 min. La columna de ensamblado se centrifugó por un min con la tapa de la microcentrifuga abierta para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol. Finalmente se transfirió y se ensambló la minicolumna a un tubo estéril de 1.5 mL y se añadieron 50 µL de agua libre de nucleasas a la minicolumna, se incubó a temperatura ambiente por un min. Posteriormente se centrifugó a 16000 g por 1 min y el volumen colectado correspondió al producto de PCR purificado, éste se almacenó a 4°C hasta ser analizado y cuantificado.

Como el volumen obtenido del producto purificado de PCR fue mayor que el volumen de reacción final de adenilación necesario total, el producto de PCR se cuantificó y se concentró a través de un sistema de vacío (SAVANT) a una

temperatura media de calor, la muestra se llevó de 50  $\mu\text{L}$  iniciales hasta 20  $\mu\text{L}$  (tiempo aproximado 15 min). Una vez concluido este procedimiento, se cuantificó nuevamente el producto amplificado en un gel de agarosa al 0.8%, para poder llevar a cabo la reacción de adenilación y posteriormente ligarlo en el vector de clonación pGEM.

#### 5.5.4. Adenilación del fragmento *TgQ*

Para la clonación del fragmento *TgQ* en el vector pGEM-T (Promega), el producto amplificado con *Pfu* DNA polimerasa, purificado y concentrado (5.5.3) se sometió a una reacción de adenilación con *GoTaq* DNA polimerasa (Promega Corporation). En la tabla III se indican las concentraciones y volúmenes de los reactivos empleados en la reacción de adenilación, esta mezcla se incubó a 72°C por 1 h.

**Tabla III.** Mezcla de reacción de adenilación del producto amplificado.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer Colorless 5X	2.0
dATPs 10 mM	0.2
<i>GoTaq</i> DNA polimerasa 5 U/ $\mu\text{L}$	1.0
Agua	0.0
DNAc (59.35 ng/ $\mu\text{L}$ )	6.8
Volumen final	10.0

#### 5.5.5 Clonación del fragmento *TgQ* con el vector pGEM

Para llevar a cabo la clonación del fragmento *TgQ* en el vector de clonación pGEM, se estimó la cantidad de nanogramos (ng) del fragmento de 762 pb (inserto) requeridos para tener una relación equimolar vector:inserto de 1:3, considerando 3000 pb para el tamaño del vector pGEM. Para realizar dicho cálculo, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vector} \times \text{Tamaño inserto (kb)}}{\text{Tamaño vector (kb)}} \times \text{relación molar (inserto/vector)}$$

Aplicando la ecuación anterior, se obtuvo que para obtener una relación vector:inserto de 1:3 se requirieron 38.2 ng del fragmento *TgQ* adenilado y 50 ng del



vector pGEM. La reacción de ligación se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante y los reactivos proporcionados por el sistema pGEM. En la tabla IV, se presenta la mezcla de reacción que se realizó para la ligación en el vector pGEM-T. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C.

**Tabla IV.** Mezcla de reacción para la ligación con el Sistema pGEM-T vector.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (μL)</b>
pGEM T Vector	1.0
Producto PCR adenilado	0.6
DNA T4 Ligasa	1.0
2X Rapid Ligation Buffer	5.0
Agua ultrapura	2.4
Volumen total	10.0

Con el producto de la reacción de ligación, se llevó a cabo la transformación de células *Escherichia coli* XL10 GOLD químicamente competentes, para lo que se realizó el siguiente procedimiento: a 50 μL de células se le agregaron 2.0 μL de la mezcla de reacción de ligación con el vector pGEM. La suspensión celular se mezcló suavemente, esta mezcla se incubó en hielo por 10 min, luego se sometió a un choque térmico por 42°C por 45 s y se transfirió inmediatamente a hielo por 2 min. A continuación a esta suspensión celular se le agregaron 250 μL de medio SOC (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó durante una 1 h a 37°C a 250 rpm. Por ultimo, 100 μL de la suspensión celular se sembraron en placas de LB con ampicilina [(Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina (100 μg/mL) y agar (15 g/L)] más 100 μL de IPTG (IPTG 10 mM) y 40 μL de X-Gal (50 mg/mL, Promega, Num. Cat. V394A), para la selección de cepas recombinantes de *Escherichia coli* portadoras del plásmido pGEMTgQ (colonias blancas), las placas se incubaron en una incubadora estática a 37°C de 16-24 h.

### **5.5.6. Caracterización del vector pGEMTgQ**

#### **5.5.6.1. Preparación de DNA plasmídico de pGEMTgQ**

Al final de la incubación y aparición de colonias transformantes (blancas), se aislaron las cepas transformantes y se inocularon en caldo LB suplementado con ampicilina

(Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina 100 µg/mL), se incubaron a 37°C, una agitación de 250 rpm durante 14-18 h para su propagación y luego obtener el DNA plasmídico (DNAP) necesario para su caracterización.

Para llevar a cabo el procedimiento de extracción se utilizó el sistema de purificación de DNA Wizard (Wizard *Plus* SV Minipreps, Promega Num. Cat. A1330) el cual está diseñado para purificar DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina y purificación en una membrana de sílica. La extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) se realizó a partir de 3 mL de cada cultivo de las cepas transformantes crecidas en medio LB con ampicilina. Cada paquete celular se obtuvo por centrifugación a 8000 rpm por 5 min el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió con la solución de resuspensión presente en el kit (Tris HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, RNAasa A 100 µg/mL). Posteriormente se añadieron 250 µL de solución de lisis celular (NaOH 200 mM, SDS 1%) y la mezcla se agitó 4 veces por inversión para lograr un mezclado adecuado. Posteriormente se añadieron 10 µL de solución alcalina de proteasas, se agitó la mezcla por inversión 4 veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 350 µL de solución neutralizante (Hidrocloruro de guanidina 4.09 M, acetato de potasio 759 mM, ácido acético glacial 2.12 M, pH 4.2), la mezcla se agitó por 4 veces y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente en una microcentrifuga Beckman 22R, el sobrenadante se decantó en una de las columnas del sistema Wizard Plus SV DNA y se centrifugó a 13000 rpm por 1 min a temperatura ambiente. Enseguida se añadieron 750 µL de solución de lavado (Acetato de potasio 60 mM, Tris-HCl 8.3 mM pH 7.5, EDTA 0.04 mM pH 8.0, etanol 60%), se centrifugó a 13000 rpm por un min y repitiéndose una vez más la centrifugación con 250 µL de la solución de lavado a 13000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. Enseguida la columna se transfirió a un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL y se centrifugó a 13000 rpm por un min, luego se añadieron 100 µL de agua libre de nucleasas y se centrifugó a una velocidad de 13000 rpm por un min a temperatura ambiente. De la preparación recuperada se analizaron 5 µL en un gel de agarosa al 0.8% y tinción con bromuro de etidio. El resto de la preparación obtenida se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

### 5.5.6.2. Caracterización del vector pGEMTgQ por PCR

La caracterización del vector pGEMTgQ, se llevó a cabo por PCR utilizando los iniciadores específicos para la región de tripsina (5'Tr y 3'Tr) y el protocolo estandarizado con la enzima GoTaq Polimerasa (Tabla V), en donde se esperaba la amplificación de una banda de 738 pb, correspondiente a la secuencia codificante la isoforma II de la tripsina. Las cepas conteniendo el plásmido que dieron positiva la PCR se conservaron en LB suplementado con glicerol 50% y se almacenarán a -20°C hasta su uso.

**Tabla V.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con GoTaq DNA polimerasa para la caracterización de pGEMTgQ

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (µL)	Concentración final
Green Buffer	5X	5.0	1X
dNTP's	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer 5'Tr	5 µM	2.5	0.5 µM
Primer 3'Tr	5 µM	2.5	0.5 µM
GoTaq DNA Polimerasa	5 U/µL	0.2	0.04 U/µL
DNA molde	1.12 ng/µL*	1.0	0.04 ng/µL
Agua ultrapura	-----	13.3	-----
Volumen final	-----	25.0	-----

\* La muestra proviene de un Stock que tiene 112.78 ng/µL diluída 1:100 resultando una concentración de 1.12 ng/µL.

El programa para la PCR que se empleó para la confirmación de la inserción del fragmento TgQ en pGEM con la GoTaq DNA polimerasa fue el siguiente: etapa 1, 94°C (2 min) 1 ciclo; etapa 2, 94 °C (2 min), 50°C (1 min), 72°C (2 min) 30 ciclos; etapa 3, 72°C (10 min) 1 ciclo.

Una alícuota de 5 µL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en buffer de tris-boratos-EDTA (TBE 1X, Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñidos luego con bromuro de etidio (2 µg/mL en TBE 1X) por 30 min, enjuagados luego por 30-45 s con agua libre de nucleasas y analizados a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290.

### 5.5.6.3. Caracterización mediante digestión con las enzimas *XhoI* y *AvrII*.

Una vez caracterizado el plásmido pGEMTgQ por PCR, la secuencia del fragmento amplificado se sometió a un análisis *in silico* con el programa computacional (Nebcutter, New England Biolabs, Vincze *et al.*, 2003) para seleccionar las enzimas adecuadas para su caracterización, *XhoI* y *AvrII* de NEB y se llevó a cabo la reacción con estas enzimas de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En la tabla VI, se muestran los volúmenes de la mezcla de reacción utilizada para la digestión del DNA plasmídico pGEMTgQ.

**Tabla VI.** Mezcla de reacción de la digestión analítica del plásmido pGEMTgQ con *XhoI* y *AvrII*.

Reactivo	Negativo <i>XhoI</i> o <i>AvrII</i> ( $\mu\text{L}$ )	Positivo <i>XhoI</i> ( $\mu\text{L}$ )	Positivo <i>AvrII</i> ( $\mu\text{L}$ )	Positivo <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> ( $\mu\text{L}$ )
Agua ultrapura	15.0	14.0	13.0	12.0
Buffer 2	2.0	2.0	2.0	2.0
BSA acetilada 100X	0.5	0.5	0.5	0.5
DNA (112.78 ng/ $\mu\text{L}$ )	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>XhoI</i> (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0.0	1.0	0.0	1.0
<i>AvrII</i> (4 U/ $\mu\text{L}$ )	0.0	0.0	2.0	2.0
Volumen total ( $\mu\text{L}$ )	25.0	25.0	25.0	25.0

En la tabla VII se muestra los tamaños teóricos esperados para la caracterización con *XhoI* y *AvrII* de pGEMTgQ.

**Tabla VII.** Tamaños teóricos esperados para la caracterización con *XhoI* y *AvrII* de pGEMTgQ.

	<i>XhoI</i> (pb)	<i>AvrII</i> (pb)	<i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> (pb)
pGEMTgQ	3767	3767	3016 750

La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 16 h. Para corroborar la presencia de los fragmentos esperados en la digestión de pGEMTgQ, una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de la reacción enzimática fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en TBE 1X) y analizado a través del sistema de imagen Kodak EDAS-290. Después de corroborada

la liberación del fragmento químero (Tabla VII), las mezclas se sometieron a una digestión preparativa (sección 5.6.2) de acuerdo a los volúmenes de algunos reactivos que son similares y que se presentan en la tabla VIII.

#### **5.5.6.4. Secuenciación de fragmento *TgQ***

Para la secuenciación *TgQ* se tomaron 20  $\mu$ L de pGEM*TgQ* a una concentración aproximada de 114.22 ng/ $\mu$ L y se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación utilizando los primers universales T7, SP6 y M13 de pGEM. Con la secuencia reportada se realizó un alineamiento entre la secuencia forward y complementary-reverse obteniéndose una secuencia consenso la cual se alineó con la región de tripsina de *Litopenaeus vannamei* original y para corroborar la presencia de la mutación en la región del péptido de activación en el vector construido (pGEM*TgQ*), se realizó un alinamiento con la secuencia de pPIC9*Tg4*. Para su interpretación, el servicio de secuenciación proporcionó los electroferogramas correspondientes y con la ayuda del programa BioEdit (Hall., 2003) se logró comparar la secuencia consenso final obtenida.

### **5.6. Subclonación del fragmento *TgQ* en el vector pPIC9**

#### **5.6.1. Preparación de los plásmidos de pGEM*TgQ* y pPIC9*FTEII***

Para la preparación de pGEM*TgQ* a mediana escala se utilizaron unidades de filtración y purificación de DNA a mediana escala (Pure Yield<sup>TM</sup> Midiprep System, Promega Num. Cat. A2492). Estas columnas consisten en lo siguiente: una columna de limpieza y una columna de unión a membrana, montadas una sobre otra (unión a membrana parte inferior, limpieza parte superior) y conectadas a través de un colector múltiple de vacío (Promega Num cat A7231). Para la preparación ambos plásmidos, se propagaron las cepas *E. coli* XL10 GOLD portadora de pPIC9*FTEII*, y *E. coli* XL10 GOLD portadora de pGEM*TgQ* en 100 mL de LB con ampicilina y se incubaron a 37°C, 250 rpm durante 18 h. El paquete celular se obtuvo por centrifugación a 4000 rpm por 10 min a 4°C. Mediante el sistema previamente descrito se obtuvo la purificación del DNA por vacío como sigue: una vez obtenido el paquete celular y removido el exceso de medio de cultivo, se resuspendió en 3 mL de solución de resuspensión celular. Luego se añadieron 3 mL de solución de lisis

celular y se mezcló cuidadosamente por inversión de 3 a 5 veces, posteriormente la mezcla se incubó a temperatura ambiente por un tiempo de 3 a 5 min, se añadió solución neutralizante y se mezcló cuidadosamente de 3-5 veces. Con la columna ensamblada sobre el colector de vacío, se vertió la mezcla sobre la columna de limpieza (parte superior) y se incubó el lisado de 2 a 3 min para permitir que los restos celulares permanezcan en la parte superior de la columna. Posteriormente se aplicó vacío para filtrar través de la membrana de limpieza (columna superior) y la columna de unión (columna inferior) donde el DNA se queda unido. El vacío se continuó por 5 min hasta que el líquido hubo pasado por ambas columnas. Al término la de elución, la columna de limpieza (superior) se desensambló, dejando ensamblada la columna de unión (inferior) en el colector múltiple de vacío y se agregaron 5 mL de la solución removedora de endotoxinas y se aplicó vacío. Una vez que pasó la solución removedora de endotoxinas a través de la columna se añadieron 20 mL de solución de lavado de columna y se aplicó vacío hasta sequedad, posteriormente se aplicó vacío por 30 s para evaporar el etanol residual. La columna de unión se desensambló del colector de vacío y se colocó en un tubo de centrifuga de 50 mL (Corning), y se añadieron 600 µL de agua libre de nucleasas para eluir el DNA. El tubo se centrifugó en un rotor de columpio (Beckman, Rotor S4180C) a 2000 g por 5 min, se colectó el filtrado y transfirió a un tubo de 1.5 mL (de cada preparación respectiva) y se guardó a 4°C hasta su uso.

### **5.6.2. Digestión de los plásmidos pGEMTgQ y pPIC9FTEII con las enzimas *XhoI* y *AvrII***

El plásmido pGEMTgQ se caracterizó por PCR con oligonucleótidos específicos para tripsina (5'Tr y 3'Tr) y por digestión con las enzimas *XhoI* y *AvrII* de NEB en un volumen de reacción de 25 µL como se muestra en la tabla VIII. El vector precursor pPIC9FTEII se sometió también a la digestión con *XhoI* y *AvrII*. Ambas reacciones se incubaron por 16 h a 37°C y se aplicaron 3 µL de cada mezcla de reacción en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X, el cual fue teñido con bromuro de etidio (2 µg/mL en TBE 1X) y analizado a través del sistema de imagen Kodak EDAS-290. El resto de la mezcla de reacción se sometió a una electroforesis preparativa para poder obtener los fragmentos de pPIC9 y el fragmento quimérico de TgQ.

**Tabla VIII.** Mezcla de reacción de la digestión preparativa de pPIC9FTEII y pGEMTgQ con XhoI y AvrII.

Reactivo	pGEMTgQ ( $\mu\text{L}$ )	pPIC9FTEII ( $\mu\text{L}$ )
Agua ultrapura	8.5	8.5
Buffer 2	2.0	2.0
BSA acetilada 100X	0.5	0.5
DNA plasmídico (181.38 ng/ $\mu\text{L}$ )	10.0	10.0
XhoI (10 U/ $\mu\text{L}$ )	1.5	1.5
AvrII (4 U/ $\mu\text{L}$ )	2.5	2.5
Volumen total	25.0	25.0

La purificación preparativa de los fragmentos a clonar se realizó como sigue: al depósito de la cámara de electroforesis se transfirió SDS 0.1% y se dejó reposar durante 1 h, cuidadosamente éste fue retirado de la cámara, y la cámara se enjuagó tres a cinco veces con agua estéril, se decantó el agua y se vertió TBE 1X libre de nucleasas (estéril) posteriormente se realizó una electroforesis en agarosa 0.8 % en TBE 1X libre de nucleasas (estéril). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se colocó sobre una película de parafilm fino y este a su vez sobre el transiluminador, con la intensidad de luz UV más baja, y con la ayuda de una navaja estéril, se cortaron los fragmentos de interés (el correspondiente a pPIC9 y el fragmento TgQ). Cada uno de los fragmentos obtenidos se colocaron en un tubo eppendorf nuevo estéril previamente pesado y por diferencia de pesos se obtuvo el peso total de la agarosa contenida en el tubo. Los fragmentos del gel de agarosa recuperados fueron purificados con el Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, #cat. A9281) (sección 5.3.3).

**Tabla IX.** Fragmentos teóricos esperados en la digestión preparativa de pPIC9FTEII y pGEMTgQ con XhoI y AvrII

pGEMTgQ (pb)	pPIC9FTEII (pb)
3016	7987
750	1080

La concentración de DNA de los fragmentos purificados (4 preparaciones, 2 para pPIC9 y 2 para TgQ) se estimaron mediante el análisis con el marcador

HyperLadder I (Bioline), de acuerdo al tamaño del fragmento en pares de bases y a la masa correspondiente del fragmento (ng). De cada par de preparaciones se obtuvo un volumen final aproximado de 60  $\mu\text{L}$ , el cual fue concentrado mediante un sistema de centrifugación por calor-vacio (SAVANT) a un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  y se estimó la cantidad de nanogramos necesarios para llevar a cabo la ligación. El DNA purificado del vector (pPIC9) y del inserto (*TgQ*) fueron guardados a 4°C hasta su ligación.

### 5.6.3. Ligación del fragmento *TgQ* con el vector pPIC9 y transformación en *E. coli*

La mezcla de reacción se realizó (Tabla X) en tubos de 0.2 mL, conteniendo 200 ng de *TgQ* y 200 ng de pPIC9, así como los componentes necesarios para su ligación (agua libre de nucleasas y buffer) excepto la enzima T4 DNA ligasa. Se preparó un cóctel de 17  $\mu\text{L}$ , el control negativo se preparó con 5  $\mu\text{L}$  del cóctel y no se agregó enzima. El resto del cóctel se transfirió a otro tubo y se agregaron 3  $\mu\text{L}$  de DNA T4 ligasa. La mezcla de reacción (15  $\mu\text{L}$ ) se incubó a 4°C por 48 h. Para el análisis por electroforesis de ligación se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y el resto se empleó para la transformación de *E. coli* JM109 (Promega Num. Cat. L1001) calciocompetentes. En la tabla X se muestran los componentes de la reacción de ligación del fragmento *TgQ* con el vector pPIC9.

**Tabla X.** Componentes de la reacción de ligación del fragmento *TgQ* con el vector pPIC9.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer de ligación 10X	2.0
Vector pPIC9 (200 ng)	6.1
DNAc quimérico (200 ng)	5.9
Agua ultrapura	3.0
Volumen parcial de ligación	17.0
Mezcla del volumen parcial de ligación	12.0
T4 DNA Ligasa (3 U/ $\mu\text{L}$ )	3.0
Volumen total de ligación	15.0



La transformación de células *Escherichia coli* JM109 con el el vector pPIC9TgQ contruido se realizó con una mezcla de 50 µL de células calciocompetentes y 10 µL de la mezcla de reacción de ligación con el vector pPIC9TgQ y el protocolo a continuación se realizó tal como se describe en el apartado 5.5.5.

#### 5.6.4. Caracterización del plásmido pPIC9TgQ

##### 5.6.4.1. Preparación del plásmido de pPIC9TgQ

Las cepas transformantes que crecieron en placas de LB con ampicilina se inocularon en medio LB líquido con ampicilina (Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, ampicilina 100 µg/mL), se incubaron a 37°C, 250 rpm durante 14-18 h para obtener el DNA plasmídico necesario para su caracterización, la preparación obtenida se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

##### 5.6.4.2. Caracterización de pPIC9TgQ por PCR

La caracterización de pPIC9TgQ se llevó a cabo por PCR utilizando los iniciadores específicos para la región de tripsina (5'Tr y 3'Tr), para obtener la banda de 738 pb correspondiente de a la secuencia de TgQ clonada. Las cepas conteniendo el plásmido caracterizado por PCR, se conservaron en LB suplementado con glicerol a una concentración final del 50% y se almacenarán a -20°C hasta su uso. La mezcla de reacción para caracterización del plásmido pPIC9TgQ se resume en la siguiente tabla (Tabla XI):

**Tabla XI.** Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR para la caracterización de pPIC9TgQ

Reactivo	Concentración Stock	Volumen (µL)	Concentración final
Green Buffer	5X	5.0	1X
dNTP's	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer 5'Tr	5 µM	2.5	0.5 µM
Primer 3'Tr	5 µM	2.5	0.5 µM
GoTaq DNA Polimerasa	5 U/µL	0.2	0.04 U/µL
DNAmolde (pPIC9TgQ)	2.95 ng/µL*	1.0	0.12 ng/µL
Agua ultrapura	-----	13.3	-----
Volumen final	-----	25.0	-----

\* La muestra proviene de un Stock que tiene 29.5 ng/µL diluída 1:10 resultando una concentración de en 2.95 ng/µL.

El programa que se empleó para la caracterización del fragmento *TgQ* por PCR con *GoTaq* DNA polimerasa consistió en lo siguiente: etapa 1, 94°C (2 min) 1 ciclo; etapa 2, 94°C (1 min), etapa 2, 94°C (1 min), 50°C (1 min), 72°C (2 min) y etapa 3, 72°C (10 min) 1 ciclo. Una alícuota de 5 µL de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de tris-boratos-EDTA (TBE 1X, Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM), teñido luego con bromuro de etidio (2 µg/mL en TBE 1X) por 30 min, enjuagados luego con agua libre de nucleasas por 30-45 s y analizados a través del sistema de toma de imagen Kodak EDAS-290.

#### 5.6.4.3. Caracterización de pPIC9*TgQ* con las enzimas *XhoI* y *AvrII*

Una vez caracterizado el plásmido pPIC9*TgQ* por PCR con oligonucleótidos específicos para tripsina (5'Tr y 3'Tr), este se sometió a un análisis teórico con el programa computacional (Nebcutter) para seleccionar las enzimas adecuadas para su caracterización, en este caso *XhoI* y *AvrII* de NEB, posteriormente se llevó a cabo la reacción enzimática de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En la tabla XII, se presentan los volúmenes de la mezcla de reacción utilizada para la digestión de pPIC9*TgQ*.

**Tabla XII.** Mezcla de reacción de la digestión analítica de pPIC9*TgQ* con *XhoI* y *AvrII*.

Reactivo	Negativo <i>XhoI</i> o <i>AvrII</i> (µL)	Positivo <i>XhoI</i> (µL)	Positivo <i>AvrII</i> (µL)	Positivo <i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> (µL)
Agua ultrapura	15.0	14.0	13.0	12.0
Buffer 2	2.0	2.0	2.0	2.0
BSA acetilada 100X	0.5	0.5	0.5	0.5
DNA (29.5 ng/µL)	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>XhoI</i> (10 U/µL)	0.0	1.0	0.0	1.0
<i>AvrII</i> (4 U/µL)	0.0	0.0	2.0	2.0
Volumen total	25.0	25.0	25.0	25.0

En la tabla XIII se muestra los tamaños teóricos esperados para la caracterización con *XhoI* y *AvrII* de pPIC9*TgQ*.

**Tabla XIII.** Tamaños teóricos esperados para la caracterización de pPIC9TgQ con *XhoI* y *AvrII*.

Plásmido	<i>XhoI</i> (pb)	<i>AvrII</i> (pb)	<i>XhoI</i> y <i>AvrII</i> (pb)
pPIC9TgQ	8737	8737	7987 750

La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 16 h. Para corroborar la presencia de los fragmentos esperados en la digestión de pPIC9TgQ, una alícuota de 5 µL de la reacción enzimática fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio (2 µg/mL en TBE 1X) y analizado a través del sistema de imagen Kodak EDAS-290.

### 5.7. Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del fragmento TgQ (KM71TgQ)

Los vectores de integración del sistema de *P. pastoris* como el pPIC9, presentan dos regiones susceptibles para la recombinación con el genoma de la levadura: la región HIS4 y el extremo 5' que incluye al promotor de *AOX1* y el extremo 3' del mismo gen, en donde se pueden llevar a cabo eventos de integración sitio dirigida por recombinación homóloga, generándose cepas genéticamente estables. Por lo que dependiendo de la estrategia experimental diseñada, se selecciona la región de integración y por consiguiente la enzima requerida para la preparación del plásmido. En cepas de *P. pastoris his4* como KM71, los eventos de inserción génica en el *locus his4* dan lugar a un evento de entrecruzamiento simple entre el *locus his4* en el cromosoma y la región *his4* del vector. Debido a que el *locus AOX1* no está involucrado en este evento de recombinación, el fenotipo de las transformantes es His<sup>+</sup> y continúa siendo Mut<sup>s</sup>. Para llevar a cabo la transformación de células de *P. pastoris* se recomienda usar vectores linearizados que expongan las regiones susceptibles a recombinación seleccionadas. La digestión con *SalI* del plásmido a integrar, favorece que se lleve a cabo un evento de entrecruzamiento simple en el *locus his4* del genoma de *P. pastoris*, para generar cepas His<sup>+</sup>, Mut<sup>s</sup> que conservan intacto y funcional el gen *AOX1*.

Por consiguiente, el vector pPIC9TgQ fue digerido con *SalI*, confirmada su linearización fue utilizado para transformar la cepa KM71 de *P. pastoris*, por la

técnica de transformación química. La cepa de *P. pastoris* KM71 utilizada, posee un defecto en el gen que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa, el cual se reconstituyó al combinarse el genoma de *P. pastoris* con el vector, lo cual permite seleccionar las levaduras transformadas en un medio selectivo carente de histidina. Las colonias transformantes se aislaron y propagaron en un medio complejo para levaduras, para llevar a cabo la extracción del DNA genómico y poder realizar la caracterización genotípica y fenotípica.

#### **5.7.1. Preparación a mediana escala del plásmido pPIC9TgQ**

De dos preparaciones de DNA plásmidico a mediana escala se obtuvieron 17.89 y 13.63  $\mu\text{g}$  totales del plásmido pPIC9TgQ a una concentración de 76.14  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (preparación A) y 61.98  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (preparación B) y éstas se colocaron en unidades de filtración-concentración Microcon YM-3 (Millipore Cat. No. 42404), el volumen colectado obtenido en 2 preparaciones obtenidas mediante el Pure Yield<sup>TM</sup> Plasmid Midiprep System (Promega Num. Cat. A2492), (preparación A: 235  $\mu\text{L}$ , preparación B: 220  $\mu\text{L}$ ) se virtieron sobre el filtro y éste se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente por 30 min, el filtrado fue desechado a través del tubo colector. Transcurrido este tiempo, se invirtió el filtro y se colocó en un nuevo tubo colector, éste fue luego centrifugado por 10 min a 4°C a 3000 g, el volumen recuperado fue de 13.5  $\mu\text{L}$  (preparación A) y de 3  $\mu\text{L}$  (preparación B), con 3  $\mu\text{L}$  de los concentrados obtenidos, se realizó la reacción de digestión con la enzima *SalI* (New England Biolabs), de acuerdo a los reactivos y volúmenes que se presentan en la tabla XIV. La reacción se incubó a 16 h a 37°C, y posteriormente a 60°C por 20 min. Terminada la incubación se tomaron 0.5  $\mu\text{L}$  para su análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en TBE 1X). Confirmada la linearización del plásmido pPIC9TgQ, se llevó a su volumen indicado previo a la transformación de cepas KM71 de *P. pastoris*.

**Tabla XIV.** Mezcla de reacción en la digestión preparativa de pPIC9TgQ con *SalI*

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) (Preparación A)	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) (Preparación B)
Agua ultrapura	3.0	15.7
Buffer D	2.0	2.0
BSA 100X (10 mg/mL)	0.5	0.5
DNA (0.66 ó 2.26 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	13.5	1.3
<i>SalI</i> *	1.0	0.5
Volumen Total	20.0	20.0

\*Para la preparación A se empleo *SalI* con una concentración de 10 U/ $\mu\text{L}$  y en el caso de la preparación B se empleo *SalI* con una concentración de 80 U/ $\mu\text{L}$ .

### 5.7.2. Preparación de células de *P. pastoris* KM71 químicamente competentes

Para la preparación de células de *P. pastoris* KM71 químicamente competentes se llevó a cabo el siguiente procedimiento: A partir del vial de células KM71 (Invitrogen No. Cat. K1730-01) se tomó una alícuota con una micropuntilla amarilla estéril y se inóculo en un tubo cónico de 50 mL con 10 mL de caldo YPD, se creció toda la noche a 30°C con agitación constante a 250 rpm. Con las células reactivadas se inocularon 10 mL de caldo YPD fresco de tal manera que su  $\text{DO}_{600}$  inicial fue de 0.1 y se cultivaron a 30°C a 250 rpm hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0.6-1.0 (tiempo aproximado de 4-6 h). El cultivo se centrifugó por a 500 g por un tiempo de 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de la solución I (en esta etapa las células están ahora competentes y listas para su uso). Se realizarón alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de células competentes y se colocaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL estériles, en esta etapa, las células pueden ser mantenidas a temperatura ambiente y ser usadas directamente para transformación y/o ser congeladas para usos posteriores. Las alícuotas de células preparadas fueron envueltas en varias capas de papel secante y posteriormente congeladas lentamente a -70°C y almacenadas hasta su uso.

### 5.7.3. Transformación de *P. pastoris* KM71

Previo a la transformación de *P. pastoris*, el PEG presente en la solución II provisto en el kit de expresión de Invitrogen puede precipitar si se encuentra por debajo de

temperaturas a 27°C, por lo que el primer paso para la transformación fue incubar a 37°C la solución PEG (solución II) hasta que el precipitado se disuelva y equilibrar la solución III a temperatura ambiente, antes de la transformación.

Para la transformación, se descongeló lentamente uno de los tubos previamente congelados conteniendo células competentes. A las células descongeladas se añadieron 20 µL (8.9 ó 2.9 µg) del vector de expresión previamente linearizado pPIC9TgQ (Sección 5.7.1, preparación A y B). Se añadió 1 mL de solución II a la mezcla de células-DNA y se mezcló mediante pipeteo hasta que la mezcla quedara homogénea. La reacción de transformación se incubó por 1 h a 30°C en una incubadora (mezclando la reacción de transformación cada 15 min mediante vortex hasta completar 1 h). Posteriormente se realizó un choque de temperatura en un bloque de calentamiento a 42°C por 10 min, las células se colectaron mediante centrifugación a 3000 g por 5 min a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron y homogenizaron cuidadosamente en 1 mL de solución III, se centrifugó a 3000 g por 5 min y se decantó el sobrenadante, el paquete obtenido se resuspendió nuevamente en 150 µL de la solución III. Esta mezcla se homogenizó cuidadosamente y se inoculó con todo el volumen en placas Petri conteniendo medio sólido RBD carentes de histidina, mediante la técnica de extensión en placa con un asa de extensión (cada preparación en una placa distinta). Una vez extendidas se incubaron a 30°C por 48-120 h hasta observar la aparición de colonias blancas y redondas.

#### **5.7.4. Caracterización genotípica de las cepas recombinantes KM71TgQ**

La caracterización genotípica de las colonias transformantes His<sup>+</sup>, se realizó determinando la presencia del gen *AOX1* y la del gen heterólogo en el genoma de cada una de las cepas mediante PCR, empleando un par de iniciadores funcionales (de integración). Para el análisis de integración por PCR del DNA genómico de cada una de las colonias, se empleó un iniciador 5'AOX (5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'), el cual hibrida con la región 5'AOX1 y el iniciador 3'AOX (5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'), este último se hibrida en la región 3'AOX1 TT. Estos mismos iniciadores se hibridan en las mismas regiones al casete de expresión (vector) conteniendo el gen heterólogo e integrado en el genoma de la levadura. La PCR del DNA genómico de cepas recombinantes que conservan el gen

*AOX1* (Mut<sup>s</sup>), da por resultado el producto del gen *AOX1* de 1212 pb, en este tamaño contiene las secuencias propias del vector más la secuencia codificante del tripsinógeno quimérico integrado.

#### **5.7.4.1. Aislamiento de DNA genómico y análisis de la integración del casete de expresión mediante PCR**

Para la extracción del DNA genómico de cada una de las colonias transformantes de *P. pastoris*, se empleó una modificación a la técnica de TSNT (Martínez-Soriano *et al.*, 1993). Cada una de las colonias obtenidas se inoculó en 10 mL de YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2%) e incubó a 30°C a 250 rpm durante 24-48 h, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 6-10. El paquete celular se obtuvo de 6 mL de cultivo, mediante centrifugación a 16000 g (22R Beckman Coulter) durante 5 min a temperatura ambiente. El paquete celular se resuspendió en 200 µL de solución amortiguadora de lisis TSNT (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0), se agitó por inversión 20 veces y en un vortex por 5 min, posteriormente se agregaron 500 µL de fenol saturado con Tris-HCl pH 8.0, la mezcla se agitó por inversión 20 veces. Posteriormente se agregaron 500 µL de SEVAG (Cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1) y se mezcló en vortex por 5 min. A la suspensión generada se le adicionaron 200 µL de TE 1X pH 8.0, se agitó por inversión cinco veces y se centrifugó a 16000 g (22R Beckman Coulter) durante 10 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se recuperó con una pipeta y se depositó en un tubo de microcentrifuga de 2 mL, se agregó 1 mL de etanol absoluto frío se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 60 min para precipitar el DNA. El DNA se recuperó por centrifugación a 16000 g (22R Beckman Coulter) a 4°C, durante 30 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente la pastilla de DNA se lavó con 1000 µL de etanol al 70%, la mezcla se centrifugó a 16000 g (22R Beckman Coulter) a 4°C, durante 15 min, para posteriormente resuspenderla en 48 µL de TE 1X y 2 µL de una solución de RNA'asa (2 µg/µL) y se incubó a 37°C por 15 min para eliminar RNA de las preparaciones. Para eliminar DNA'asas, la suspensión de DNA se calentó a 60°C durante 20 min.

Para corroborar la integración del plásmido pPIC9TgQ de las cepas KM71 de *P. pastoris*, el DNA genómico de las cepas aisladas fue analizado por PCR empleando los pares de iniciadores descritos previamente (sección 5.7.5). Las

reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25  $\mu$ L, de acuerdo a los reactivos y volúmenes de la tabla XV, utilizando la *GoTaq* DNA polimerasa en buffer green de Promega Corporation y cada uno de los dos pares de iniciadores específicos para *AOX1*.

**Tabla XV.** Volúmenes y reactivos necesarios para el análisis de integración por medio de PCR con iniciadores dirigidos a las regiones de *AOX1*.

Reactivo	Concentración Stock	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final
Green Buffer	5X	5.0	1X
dNTP's	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer 5' AOX	5 $\mu$ M	2.5	0.5 $\mu$ M
Primer 3' AOX	5 $\mu$ M	2.5	0.5 $\mu$ M
<i>GoTaq</i> DNA Polimerasa	5 U/ $\mu$ L	0.2	0.04 U/ $\mu$ L
DNA molde	6.5–18.0 ng/ $\mu$ L	1.0	0.26 – 0.71 ng/ $\mu$ L
Agua ultrapura	-----	13.3	-----
Volumen final	-----	25.0	-----

El programa empleado para el análisis de integración por PCR en el DNA genómico de *P. pastoris* fue el siguiente: etapa 1, 94°C (2 min) 1 ciclo; etapa 2, 94°C (1 min), 50°C (1 min) y 72°C (2 min) por 30 ciclos; etapa 3, 72°C (10 min) 1 ciclo. Una alícuota de 5  $\mu$ L de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer de tris-boratos-EDTA (TBE 1X), teñidos luego con bromuro de etidio (2  $\mu$ g/mL en TBE 1X) y analizados a través del sistema de imagen Kodak EDAS-290.

#### 5.7.5. Caracterización fenotípica de las cepas recombinantes KM71TgQ

Para la determinación del fenotipo *TgQ*<sup>+</sup> se realizaron cultivos bajo condiciones de inducción del gen heterólogo de una de las cepas obtenidas y mediante SDS-PAGE y Western blot se detectó la secreción de la proteína quimérica en los medios de cultivos libres de células.

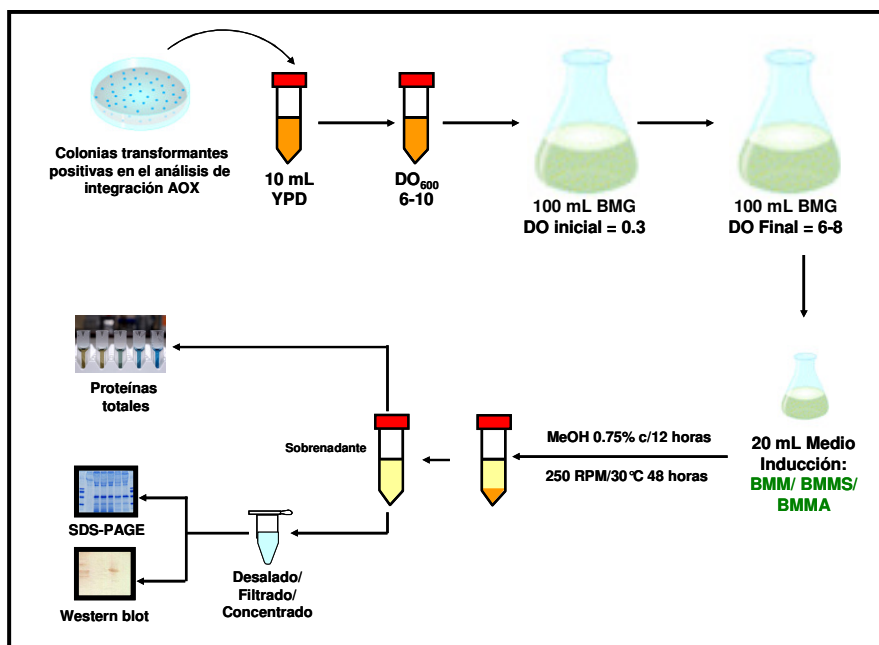


#### **5.7.5.1 Cultivo bajo condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71TgQ y KM71Tg4**

Para la inducción de la cepa recombinante de *P. pastoris* conteniendo el DNAc que codifica para el tripsinógeno quimérico se realizaron fermentaciones a nivel matraz como se muestra en la figura 6 y se describen posteriormente. Para determinar las condiciones de cultivo que favorecieran la producción de tripsinógeno recombinante, se realizaron cultivos a nivel matraz en tres fases: fase de activación, fase de crecimiento o producción de biomasa y fase de inducción. En la fase de activación el medio y las condiciones del cultivo empleadas fueron constantes en todos los ensayos. En la fase de la producción de biomasa la composición del medio y las condiciones del cultivo fueron constantes, por último en la fase de inducción se variaron parámetros de formulación de los medios de inducción. La evaluación de los cultivos se realizó mediante el análisis en el medio de cultivo libre de células para detectar la producción y secreción de tripsinógeno recombinante por medio de electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12% y se determinaron proteínas totales. La identidad del tripsinógeno recombinante producido se confirmó mediante inmunodetección con anticuerpos específicos. En la figura 6 se presenta un esquema general del la estrategia experimental realizada.

Los cultivos en matraz fueron realizados en tres fases descritas a continuación. La composición de los medios y las condiciones de cultivo se describen en las tablas XVI y XVII. Los cultivos se realizaron con la cepa KM71TgQ y KM71Tg4.

**Fase de activación:** Esta fase fue constante para todos los ensayos realizados en la cual cada una de las cepas se reactivó en un medio rico (YPD) a partir de las cepas conservadas en YPD suplementado con glicerol a una concentración final de 15 %. En un tubo Falcon o Corning de 50 mL de capacidad conteniendo 10 mL de YPD se inocularon 100 µL del cultivo en conserva y se incubaron a 30°C durante 24 h con agitación constante de 250 rpm en una incubadora de agitación Environ Shaker de *Lab-Line*.



**Figura 6. Representación esquemática del protocolo experimental para los ensayos de fermentación para producción de tripsinógeno quimérico.**

**Fase de crecimiento:** Los cultivos activados en YPD se utilizaron posteriormente como inóculos para realizar cultivos en BMG (Buffer de Fosfatos 100 mM, YNB 1.34% Glicerol 1%, Biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ ) estos cultivos se realizaron en matraces de 1000 mL conteniendo 100 mL de BMG (Tabla XVI). Cada cultivo se ajustó a una  $DO_{600}$  inicial de 0.3 y se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación constante de 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 6-8 (aproximadamente 12 h).

**Fase de inducción:** La biomasa obtenida de los cultivos en BMG fue recuperada por centrifugación a 4000 rpm y resuspendida en 20 mL de medio BMM (Buffer de Fosfatos 100 mM, YNB 1.34%, Biotina  $4 \times 10^{-5}\%$ ) con metanol al 0.75% (cada 12 h), BMM suplementado con sorbitol y/o Alanina. Los cultivos fueron incubados a  $30^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm. Las condiciones de cultivo fueron constantes y la composición de los medios de inducción fueron variables, tal como se describen en las tablas XVI y XVII.

De todos los cultivos se tomaron muestras al final de la fase de inducción, los cultivos se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 min y al medio de cultivo libre de células se le determinó proteínas totales (sección 5.7.5.1.1, Tabla XVIII) y detección del producto recombinante por geles de SDS poliacrilamida (ver sección 5.7.5.1.2, Tabla XIX). También se realizó la detección de tripsinógeno recombinante por

Western blot (5.7.5.1.3), para todos los ensayos con ambas cepas, así como también los valores finales de pH.

**Tabla XVI.** Composición de los medios de cultivo utilizados.

Medio de cultivo	Composición Final
BMG	Buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, glicerol 1%, base de nitrógeno de levadura (YNB) 0.34%, biotina $4 \times 10^{-5}$ %
BMM	Buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, metanol 0.75%, base nitrogenada de levadura (YNB) 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}$ %
BMMA	Buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, metanol 0.75%, base nitrogenada de levadura (YNB) 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}$ %, alanina 0.8%
BMMS	Buffer de fosfatos 100 mM pH 6.0, metanol 0.75%, base nitrogenada de levadura (YNB) 1.34%, biotina $4 \times 10^{-5}$ %, sorbitol 2%

**Tabla XVII.** Resumen de las condiciones experimentales de los cultivos en matraz de KM71TgQ y KM71Tg4. En todos los casos los cultivos se realizaron a 30°C de temperatura y 250 rpm de agitación.

Ensayo	Fase de Crecimiento	Fase de Inducción
1	- BMG 100 mL - DO <sub>600</sub> inicial: 0.3 - DO <sub>600</sub> final: 6-8	20 mL de BMM DO <sub>600</sub> inicial: 25-30 Tiempo de inducción: 48 h Metanol: 0.75% cada 12 h
2	- BMG 100 mL - DO <sub>600</sub> inicial: 0.3 - DO <sub>600</sub> final: 6-8	20 mL de BMMS DO <sub>600</sub> inicial: 25-30 Tiempo de inducción: 48 h Metanol: 0.75% cada 12 h
3	- BMG 100 mL - DO <sub>600</sub> inicial: 0.3 - DO <sub>600</sub> final: 6-8	20 mL de BMMA DO <sub>600</sub> inicial: 25-30 Tiempo de inducción: 48 h Metanol: 0.75% cada 12 h

#### **5.7.5.1.1. Concentración de proteínas totales en el medio de cultivo**

Los plásmidos fueron diseñados y construidos de tal manera que el producto deseado fuera secretado al medio de cultivo. En la determinación de las proteínas totales extracelulares, se utilizaron las muestras del cultivo inducido por 48 h (sección 5.7.5.1) de las clonas obtenidas, crecidas en BMM, BMMS y BMMA, bajo las condiciones de cultivo realizadas de acuerdo al procedimiento descrito (Tabla XVII).

La concentración de proteínas extracelulares totales se determinó en el sobrenadante del cultivo inducido por 48 h de las cepas obtenidas, para lo cual se midió en un espectrofotómetro (Beckman Coulter) la absorbancia a 595 nm que se presenta por la formación de un complejo azul entre proteínas y el azul brillante de Coomassie G-250 y empleando ASB (Albúmina Sérica Bovina) como estándar de concentración en un intervalo de 0-45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Bradford, 1976). A continuación se describe el método empleado: se pesaron 5 mg de ASB en un matraz de aforación de 5 mL y se aforó con agua destilada (ASB 1 mg/mL); se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de esta solución en un matraz de aforación de 5 mL y se aforó a 5 mL con agua destilada (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para el caso del reactivo de Coomassie se disolvieron 10 mg del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en 5 mL de etanol al 95%. Se agitó vigorosamente y se agregaron 10 mL de ácido fosfórico al 85%. Se mezcló vigorosamente por 20-30 min, se llevó a 100 mL con agua destilada, se agitó por 20-30 min y se filtró con papel Whatman No. 1 para eliminar el colorante no disuelto.

Se realizó la curva de calibración por triplicado mezclando un volumen determinado de la solución de ASB 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , otro volumen determinado de agua destilada y 800  $\mu\text{L}$  de solución de reactivo de Coomassie, tal como se describe en la tabla XVIII y determinando la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 595 nm. Se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de muestra y 800  $\mu\text{L}$  de solución de reactivo de Coomassie y se determinó la absorbancia a 595 nm de la mezcla.

El cálculo de la concentración de proteínas en el medio de cultivo se realizó por interpolación matemática del valor de absorbancia de la muestra en la recta de calibración y teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra.

**Tabla XVIII.** Mezcla de reacción para la determinación de la curva de calibración del método de Bradford.

<b>Estándar (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>ASB 50 <math>\mu\text{g/mL}</math> (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Agua destilada (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Blanco	0	200
5.0	20	180
7.5	30	170
15.0	60	140
22.5	90	110
30.0	120	80
45.0	180	20

#### **5.7.5.1.2. Análisis de proteínas por SDS-PAGE**

El primer paso para la determinación del tripsinógeno quimérico en el medio de cultivo libre de células consistió en un desalado y concentrado. Una vez obtenidos los sobrenadantes de las clonas construidas, estos fueron ultrafiltrados con cartuchos Centricon Plus-20, mediante centrifugaciones sucesivas en un rotor de ángulo fijo bajo las siguientes condiciones: 5000 g, 15 min y una temperatura de 4°C. Bajo estas condiciones de ultrafiltración se colocó la muestra (un volumen aproximado de 20 mL) y se centrifugó hasta llegar a un volumen de 4 mL (factor de concentración 1 de 5X). Al concentrado se agregó un buffer A (Tris-HCl 20 mM pH 7.6) hasta completar volumen de 15 mL y se centrifugó bajo las condiciones descritas previamente hasta obtener un concentrado de 4.0 mL repitiéndose este proceso 2 veces. El concentrado de 4.0 mL obtenido del paso anterior se sometió a un cambio de buffer mediante la adición del buffer B (Tris-HCl 20 mM CaCl<sub>2</sub> 1 mM pH 7.6) hasta completar un volumen de 15 mL y se repitió el proceso de concentrado (obtener 4.0 mL, resuspender y centrifugar) 2 veces hasta obtener un volumen final de 4.0 mL correspondiente al sobrenadante concentrado y desalado. A partir del concentrado, se tomaron 1000  $\mu\text{L}$  y se colocaron en un cartucho MICROCON y mediante centrifugaciones sucesivas se obtuvo un volumen de 50  $\mu\text{L}$  (factor de concentración 2 de 20X, obteniéndose un factor final total de concentración de 100X) y repitiéndose el proceso de lavado de manera similar con ambos buffers (A y B) hasta obtener el volumen de 50  $\mu\text{L}$ .

Para el análisis de proteínas se utilizó un gel de poliacrilamida al 12% (como gel separador) (Ver tabla XIX). Una vez colocadas las muestras en el gel se aplicó una corriente eléctrica de 10 mA (para la parte concentradora) hasta que el colorante

azul penetró en el gel separador (20-30 min). Se cambió la corriente eléctrica a 15 mA y se continuó la electroelución por 1 h. Posteriormente el gel fue desensamblado y colocado en un recipiente de plástico conteniendo solución fijadora (metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v en agua ultrapura) y permaneció en este durante 1 h, se retiró de la solución fijadora y el gel fue teñido con una solución colorante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie 0.5 % w/v, metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v, en agua ultrapura) durante 30 min y posteriormente se transfirió a la solución decolorante (metanol 5% v/v, ácido acético 7% v/v, en agua ultrapura). Permaneció en esta solución toda la noche hasta la observación de las bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel y se tomó una fotografía digital con un sistema de fotodocumentación Kodak EDAS 290 3UV Transiluminator: El tiempo de exposición fue de 1/0.8 s.

#### **5.7.5.1.3. Detección del tripsinógeno quimérico mediante Western blot**

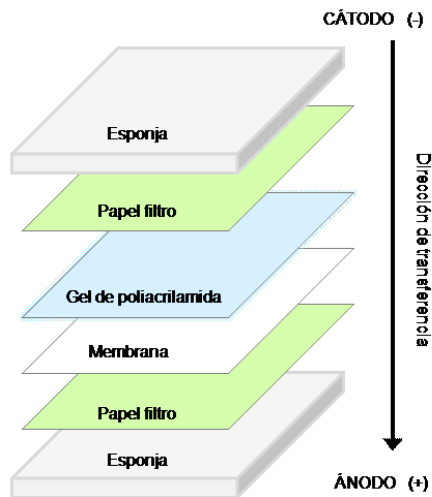
Para la detección tanto de tripsinógeno de camarón y tripsinógeno quimérico (Tg y TgQ, respectivamente) recombinantes producidos por las cepas KM71 de *P. pastoris* se estandarizaron métodos de inmunodetección que permitieron la identificación específica de ambas proteínas. Para la detección se emplearon los anticuerpos monoclonales (mAb) específicos para la región de tripsina como primer anticuerpo. Un mAb anti-IgG conejo conjugado con fosfatasa alcalina (molécula completa producida en cabra, Sigma Num. Cat. A 3812) fue utilizado como un anticuerpo secundario. Para la inmunodetección por Western blot de los tripsinógenos recombinantes presentes en el sobrenadante de los cultivos inducidos, se realizó la separación de proteínas por SDS-PAGE al 12% (Tabla XIX) de los sobrenadantes concentrados 100X tal como se describe en la sección 5.7.5.1.2. Posteriormente se llevó a cabo una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de 0.45  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich Num. Cat. Z3611380). Se preparó un casete de transferencia colocando 2 esponjas (BIO RAD, Num. Cat. 1703966), 2 hojas de papel filtro de poro abierto (sin marca, Proveedor: Reactivos y Equipos) previamente cortadas al tamaño del gel.

**Tabla XIX.** Volúmenes y concentración final para la realización de los geles de poliacrilamida

<b>Solución stock</b>	<b>Gel concentrador (µL)</b>	<b>Gel separador 12% (µL)</b>
Agua destilada	1220.0	2190.0
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	260.0	3120.0
Tris-Cl/SDS pH 6.8	500.0	-----
Tris-Cl/SDS pH 8.8	-----	1990.0
PSA 10%	10.0	80.0
TEMED	2.0	5.0
Volumen final (mL)	2.0	8.0

El gel de poliacrilamida con las muestras a transferir y la membrana de nitrocelulosa fueron acomodados en el orden que se muestra en la figura 7. Los componentes del sándwich fueron previamente humedecidos con buffer de transferencia Towbin (Tris-Base 25 mM, glicina 186 mM, metanol 20%). Se colocó el casete de transferencia en la cámara Trans-Blot® SD BIO RAD, y se le aplicó una corriente de 300 mA por 4 h. Al término de la transferencia se tiñó la membrana de nitrocelulosa con colorante rojo Ponceau (Sigma # Cat. P3504) (Rojo Ponceau 0.1%, ácido acético 5%) de 1 a 5 min para facilitar la localización del marcador de peso molecular y así poder por lo tanto detectar la proteína de interés, posteriormente la membrana aun teñida con rojo Ponceau se enjuagó con agua bidestilada y se colocó en un recipiente limpio (de 5 x 11 cm de base y 3 cm de altura), una vez que se enjuagó se llevó a cabo el bloqueo de la membrana con 20 mL de solución bloqueadora (TBS Tween 2%) por 20 min. Después se decantó la solución bloqueadora y en ese recipiente conteniendo la membrana se agregaron 20 mL TBS Tween 0.2% (TTBS 0.2%, Solución de Lavado), luego se decantó el contenido y se realizó un segundo lavado con esta solución. Una vez que se decantó la solución de lavado en el mismo recipiente se dejó incubando con el primer mAb Antitripsina diluido 1:1000 en 20 mL de TBS 1X, durante toda la noche a 4°C. Al término de la incubación, se vertió el contenido (anticuerpo diluido) y la membrana fue lavada con TTBS 0.2% de la misma manera que para enjuagar membrana con la solución de bloqueo (2 lavados de 5 min). Y en el mismo recipiente una vez finalizado el segundo lavado y vertida la solución de lavado se agregaron 20 mL de TBS 1X conteniendo el segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa (Anti-Rabbit IgG, Sigma A3812-.5ML) diluido 1:5000 durante 1 h a temperatura ambiente. Se procedió a

lavar la membrana con 2 lavados con TTBS 0.2% por 5 min cada uno, se decantó el contenido y en el mismo recipiente se hizo un último lavado con TBS 1X por 5 min; una vez transcurrido este tiempo, se decantó la solución TBS y la membrana cuidadosamente se colocó en un recipiente de fondo plano y transparente, se utilizó como agente revelador una mezcla 1:1 de componente A de substrato de fosfatasa alcalina (Sigma Num. Cat. A-0477) de membrana y el componente B (Sigma Num. Cat. A-0727), se aplicó sobre la membrana un volumen final de 1 mL y se detuvo la reacción con agua bidestilada al chorro una vez que se observó la aparición de las bandas esperadas.



**Figura 7. Casete de transferencia utilizado en Western blot para la detección de Tg4 y TgQ.**

### **5.8. Cinéticas de crecimiento comparativas en condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC**

Con el objetivo de evaluar el crecimiento celular en tres medios de cultivo durante la etapa de inducción del gen heterólogo, se llevarón a cabo cinéticas de crecimiento de 12 h en matraz con agitación constante empleando las cepas KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC empleando diferentes formulaciones del medio de inducción (Tabla XVI) y se determinarán las velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación.

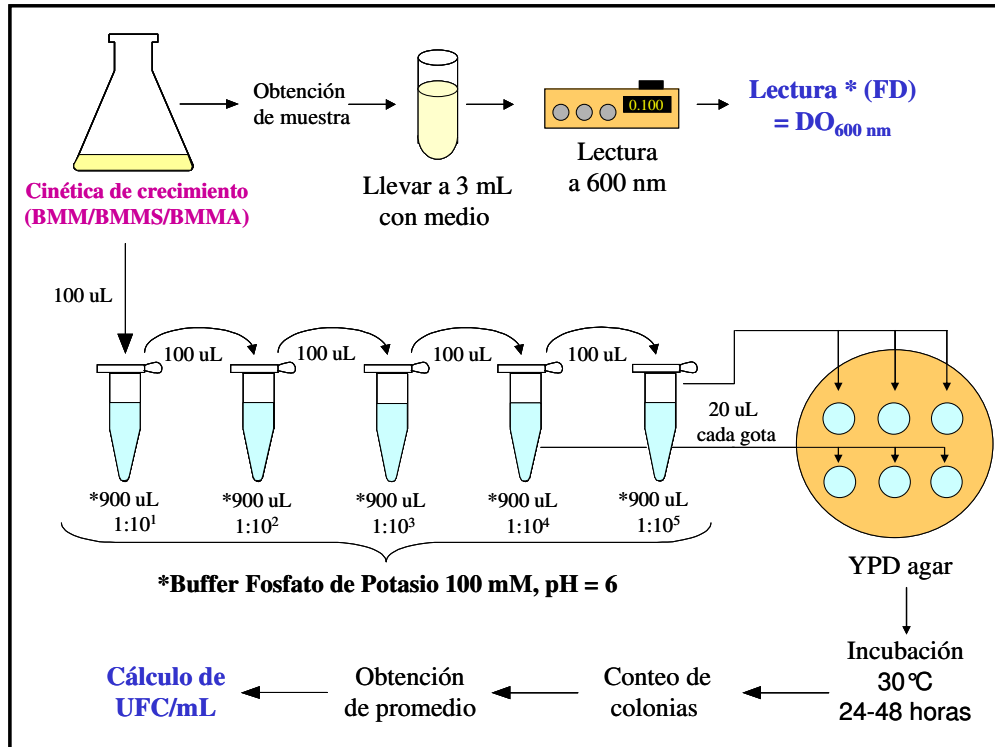


Las formulaciones empleadas para evaluar las cinéticas de crecimiento de las 3 cepas en estudio fueron iguales a las formulaciones empleadas para la detección del tripsinógeno quimérico en los cultivos de producción, tanto para la etapa de obtención de biomasa, como en la etapa de inducción, excepto en la densidad celular inicial empleada, que en las cinéticas comparativas empleadas, las densidades celulares iniciales fueron menores.

La cepa fue reactivada previamente en 10 mL de caldo YPD (peptona 2%, extracto de levadura 1%, dextrosa 2%) contenidos en tubos cónicos de 50 mL a 30°C/250 rpm durante 24 h. Este cultivo posteriormente se utilizó de inóculo para realizar una etapa de crecimiento previo en 25 mL de medio amortiguado de buffer de fosfatos con glicerol (BMG) a 30°C/250 rpm en un matraz Erlenmeyer de 250 con una DO<sub>600</sub> inicial de 0.3. El cultivo se dejó crecer en estas condiciones hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 1.4 (5.5 h). Posteriormente, el cultivo se centrifugó en un tubo cónico de 50 mL a 4000 rpm/10 min para recuperar las células, se reajustó la densidad óptica inicial a 1.0 y obtener un volumen final de 25 mL de cada uno de los tres medios amortiguados, conteniendo metanol como fuente de carbono e inductor (BMM), o bien además del metanol conteniendo sorbitol 2% (BMMS) o alanina 0.8% (BMMA). Las suspensiones obtenidas se cultivarán a 30°C/250 rpm durante 12 h de inducción. De cada cultivo se tomó una muestra de 300 µL cada 2 h (2, 4, 6, 8, 10 y 12 h) para determinar la biomasa celular por turbidimetría tal como se describe en la figura 8. Así mismo, se tomaron muestras de 100 µL del cultivo cada 2 h y se mezclaron con buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 para realizar diluciones seriadas, 20 µL de estas diluciones se colocaron en placas de YPD-agar y se incubaron a 30°C durante 24 a 48 h, se contó el número de colonias tomando en cuenta las diluciones que tuvieran entre 20 y 50 colonias. Se determinó en número de unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (UFC/mL), con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \# \text{col} \cdot 50 \cdot \text{FD}$$

Donde #col es el número de colonias contadas y FD es el factor de dilución utilizado.



**Figura 8. Esquema general del procedimiento realizado para obtener los valores de  $DO_{600}$  y UFC/mL a cada tiempo.** Con los valores obtenidos se construyeron las gráficas  $DO_{600}$  vs Tiempo y UFC/mL vs Tiempo.

Para calcular las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) se construyeron gráficas semilogarítmicas de  $DO_{600}$  y UFC/mL (Se determinó el logaritmo natural de cada  $DO_{600}$  y UFC corregida por el factor de dilución vs tiempo y se determinaron las pendientes de dichas curvas de crecimiento en la fase exponencial mediante el método de mínimos cuadrados. Las pendientes de cada curva correspondieron a los valores de cada velocidad específica de crecimiento en  $h^{-1}$ . Para calcular los tiempos de duplicación (TD) se aplicó la siguiente ecuación:

$$TD = \frac{\ln 2}{\mu}$$

### 5.8.1. Análisis estadístico

El procesamiento de datos para el cálculo de velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación así como la construcción de las gráficas de las cinéticas de crecimiento se realizó con el programa Microsoft Excel Office 2003.

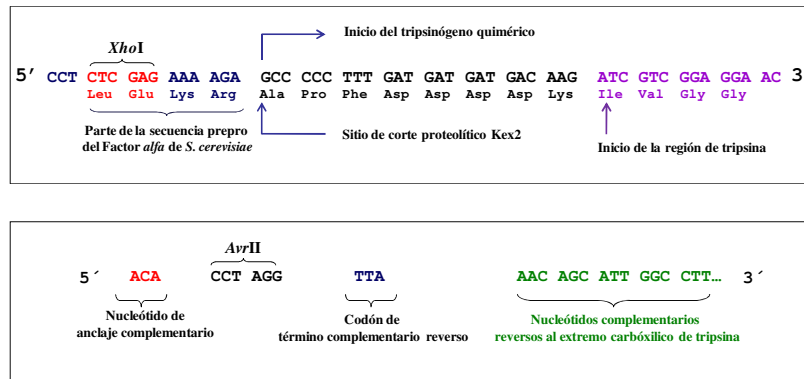
Cada una de las cinéticas de crecimiento se realizaron por triplicado para cada cepa, los tres valores de velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación para cada cinética se promediaron y se calcularon la desviación estándar y los coeficientes de variación para cada caso. Los valores de velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación de las diferentes cepas cultivadas en un mismo medio y evaluado con una misma técnica se compararon realizando un análisis de varianza (ANOVA) con comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey con la ayuda el programa SPSS 15.0.

## 6. RESULTADOS

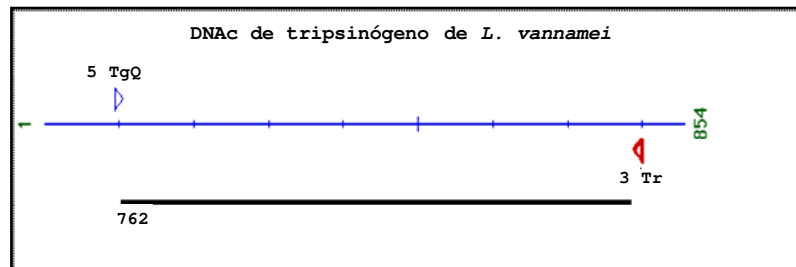
### 6.1. Diseño de oligonucleótidos para facilitar la síntesis por PCR del fragmento *TgQ* y su clonación en un vector de expresión

La secuencia de los iniciadores diseñados así como los diferentes elementos de éstos, se muestran en la figura 9. En la parte superior se presenta la secuencia del iniciador 5'TgQ de 53 nucleótidos, donde se indica en color rojo el sitio de reconocimiento para la enzima *XhoI*, en color rojo y azul la región correspondiente a un fragmento de 12 nucleótidos de la secuencia prepro del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* que codifica para los aminoácidos Leu, Glu, Lys, y Arg, previos al primer codón de inicio del tripsinógeno quimérico (GCC), destacado en negro, y que corresponde a una alanina. Se resalta también el sitio de corte proteolítico Kex2 entre la arginina y la alanina. En la parte inferior se muestra el iniciador 3'Tr de 27 nucleótidos, iniciando con 3 nucleótidos de anclaje en color rojo, el sitio de reconocimiento para la enzima *AvrII* en color negro, el complementario reverso de un codón de terminación en color azul, y la secuencia complementaria reversa de la secuencia nucleotídica que codifica para el extremo carboxilo terminal de la tripsina de camarón en color verde.

La verificación de los iniciadores diseñados se realizó mediante una simulación de la PCR con el programa Amplify 1.2 (figura 10), teniendo como secuencia molde la secuencia del DNAc del tripsinógeno de *L. vannamei* de 854 pb (No. acceso GenBank X86369). Esta simulación de la PCR con los oligonucleótidos 5'TgQ y 3'Tr dio lugar a una única banda de 762 pb correspondiente a la secuencia nucleotídica del tripsinógeno quimérico (738 pb) más la secuencia nucleotídica de los extremos añadidos por los iniciadores para dirigir la clonación (iniciador 5'TgQ 15 pb e iniciador 3'Tr 9 pb). El programa no señaló la presencia de bandas inespecíficas.



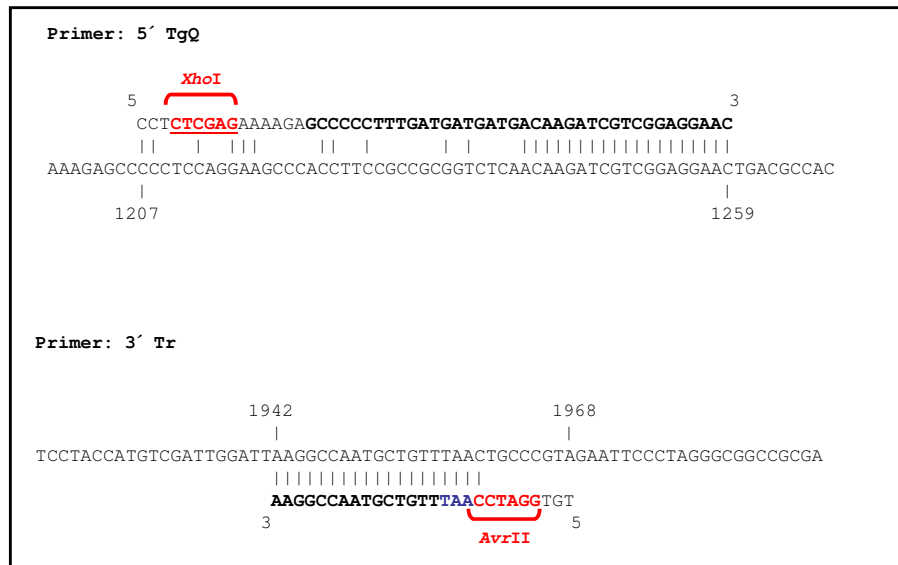
**Figura 9. Secuencia de los iniciadores diseñados.** En la parte superior se muestra la secuencia del iniciador 5'TgQ , donde se indica en color rojo el sitio para *XhoI*, en color rojo y azul la porción correspondiente a una parte de la secuencia prepro del factor alfa de *S. cerevisiae*, así como el sitio de corte proteolítico para el factor Kex2. Se destaca también el inicio del tripsinógeno quimérico (en color negro) marcado por su primer codón (GCC). En la parte inferior se muestra el iniciador 3'Tr indicándose en color negro el sitio para *AvrII*, la secuencia complementaria reversa de la secuencia nucleotídica que codifica para el extremo carboxilo terminal de la tripsina de camarón (color verde) y en azul se indica el complementario reverso de un codón de terminación.



**Figura 10. Simulación de la PCR mediante el programa Amplify 1.2.** Como datos de entrada se emplearon los iniciadores diseñados y la secuencia del DNAC del tripsinógeno de *L. vannamei* de 854 pb obtenida del GenBank (No. de acceso X86369). Los triángulos de color azul y rojo representan los iniciadores 5'TgQ y 3'Tr, respectivamente, y el grosor de los mismos representa el grado de complementariedad al DNA molde (azul). La línea en negro representa el producto amplificado perteneciente al fragmento *TgQ* de 762 pb.

Otros parámetros que se obtuvieron en la simulación virtual para los iniciadores diseñados fueron: una alta capacidad de iniciación (primability) del 84% para el iniciador 5'TgQ, parámetro relacionado con la capacidad de unión del

extremo 3' del iniciador con el DNA blanco. Amplify sugiere una capacidad de iniciación mayor del 80%. En relación a la capacidad de unión total del oligonucleótido a la secuencia blanco (stability), se obtuvo un valor de 51%. Amplify recomienda una estabilidad mayor del 40%. Para el iniciador 3'Tr se obtuvo una alta capacidad de iniciación (93%) y una alta estabilidad de hibridación (50%). Como resultado del estudio realizado, se obtuvo la figura 11 donde se muestra que 14 nucleótidos del iniciador 5'TgQ hibridan con la secuencia blanco (figura 11 superior), y 15 nucleótidos del iniciador 3'Tr hibridan con la secuencia blanco (figura 11, inferior). Los nucleótidos sin complementariedad, correspondieron a sitios de restricción y parte de la secuencia prepro del factor alfa de *S. cerevisiae*.



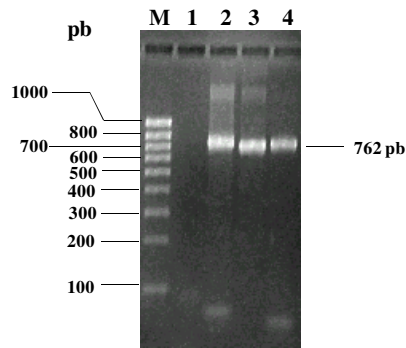
**Figura 11. Hibridación de los iniciadores con la secuencia molde.** El esquema de estas hibridaciones se obtuvo al realizar el análisis de los iniciadores mediante el programa Amplify 1.2. En la parte superior se muestra la hibridación del iniciador 5'TgQ con la secuencia molde. Se destaca en rojo el sitio para *XhoI*. En la parte inferior se muestra el iniciador 3'Tr (complementario y reverso). Se destaca el sitio para *AvrII* (en rojo) y el codón de terminación en azul. En ambos casos se presenta la secuencia blanco en la que hibridan los iniciadores.

## 6.2. Clonación del fragmento *TgQ* en el vector pGEM

### 6.2.1. Síntesis por PCR del fragmento *TgQ*

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando como secuencia blanco el plásmido pPIC9*Tg*, los iniciadores 5'TgQ y 3'Tr, *GoTaq* DNA polimerasa y una

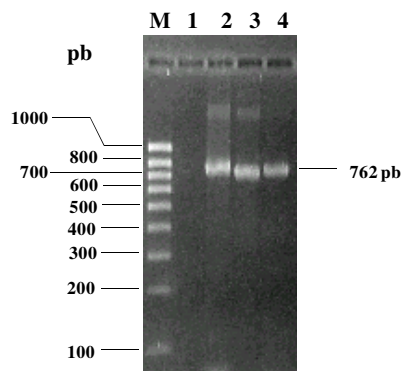
rampa de 35 a 72°C en la etapa de hibridación por dos ciclos, generó una única banda de 762 pb en un gel de agarosa al 2.5% (figura 12), corroborando el diseño correcto de los iniciadores y las condiciones del programa térmico establecidas para la síntesis del fragmento *TgQ*.



**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X del producto amplificado correspondiente a la síntesis del fragmento *TgQ* empleando *GoTaq* DNA polimerasa, y etapas de hibridación con una rampa de 35 a 72°C por dos ciclos y 60°C por 30 ciclos. M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder IV); Carril 1: Control negativo de la PCR (sin DNA); Carril 2: Control positivo de la PCR (DNAC de pPIC9*Tg* amplificado con iniciadores de tripsinógeno); Carril 3: Control positivo II de la PCR (DNAC de pPIC9*Tg* amplificado con iniciadores de tripsina), Carril 4: Producto amplificado de 762 pb correspondiente al fragmento *TgQ* (738 pb), más las secuencias nucleotídica de 15 y 9 pb añadidas por los iniciadores en los extremos 5' y 3', respectivamente.**

En la figura 12 Se puede observar que la posición de la banda de 762 pb se encontró entre las bandas de 780 pb, correspondiente al DNAC de tripsinógeno de *L. vannamei* (carril 1), y 738 pb correspondiente al DNAC de tripsina de *L. vannamei* (carril 2).

La síntesis del fragmento *TgQ* por PCR utilizando la enzima de alta fidelidad *Pfu* DNA polimerasa, plásmido pPIC9*Tg*, los iniciadores 5'*TgQ* y 3'*Tr* y una rampa de 4 a 72°C en la etapa de hibridación por cinco ciclos, también generó una única banda de 762 pb en un gel de agarosa (figura 13).



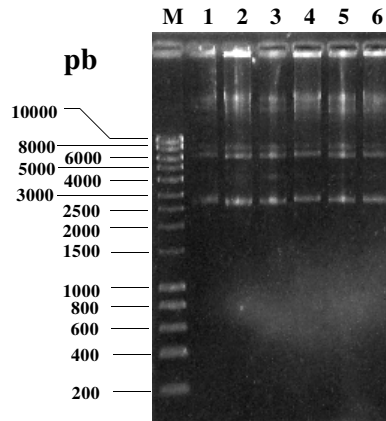
**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X del producto amplificado correspondiente a la síntesis del fragmento *TgQ* empleando *Pfu* DNA polimerasa de alta fidelidad, y etapas de hibridación con una rampa de 4.0 a 72°C por cinco ciclos y 55°C por 30 ciclos. M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder IV); Carril 1: Control negativo de la PCR (sin DNA); Carril 2: Control positivo de la PCR (DNAP de pPIC9*Tg* amplificado con iniciadores de tripsinógeno); Carril 3: Control positivo II de la PCR (DNAP de pPIC9*Tg* amplificado con iniciadores de tripsina), Carril 4: Producto amplificado de 762 pb correspondiente al fragmento *TgQ* (738 pb), más las secuencias nucleotídica de 15 y 9 pb añadidas por los iniciadores en los extremos 5' y 3', respectivamente.**

Al igual que en el caso anterior (amplificación con *GoTaq* DNA polimerasa, figura 12), amplificando con una DNA polimerasa de alta fidelidad (*Pfu* DNA polimerasa), también se observó la posición esperada para la banda correspondiente al producto amplificado del fragmento *TgQ* (762 pb, carril 3) respecto a 780 pb de DNAC de tripsinógeno y 738 pb de DNAC de tripsina.

### **6.2.2. Construcción y caracterización del vector pGEM*TgQ***

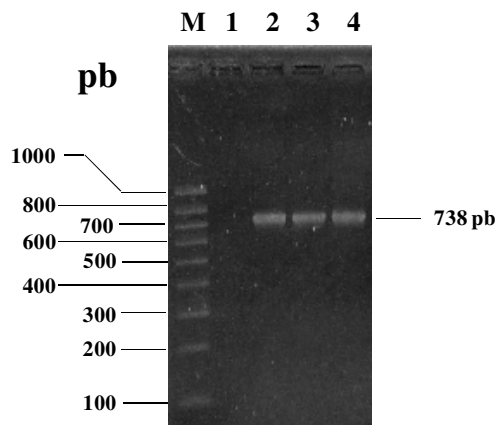
En la figura 14 se muestra un gel de agarosa de los DNA's plasmídicos de 6 colonias provenientes de la transformación con el producto de ligación de pGEM con el fragmento *TgQ* sintetizado con *Pfu* DNA polimerasa. Claramente se pudo observar las distintas conformaciones características de los DNA's plasmídicos (pGEM*TgQ*) que corresponden a formas relajadas, enrolladas y superenrolladas. Así mismo también se observó su pureza en las preparaciones y la ausencia de RNA. Con una de estas preparaciones se llevó a cabo la caracterización mediante PCR, digestión con *XhoI* y *AvrII* y mediante secuenciación.





**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la integridad del DNA plasmídico aislado de clonas transformadas con el producto de la ligación de el vector pGEM y el fragmento *TgQ*.** Carril M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder I); Carriles 1-6: DNA plasmídico de 6 clonas obtenidas durante la transformación en *E. coli* XL10 GOLD

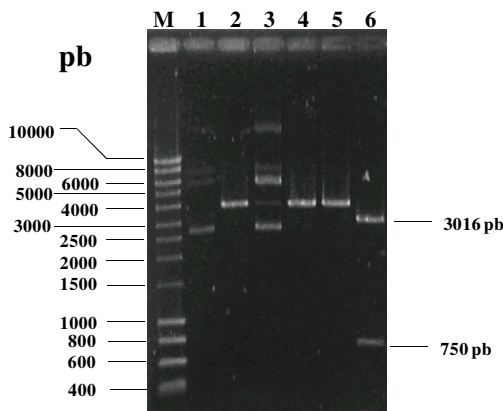
En la figura 15 se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % de los resultados de la caracterización por PCR del DNA plasmídico de dos colonias transformadas que deberían contener el vector pGEM*TgQ*, empleando los oligonucleótidos específicos para el DNAc de tripsina de camarón (carriles 3 y 4). La presencia de una banda de 738 pb el mismo tamaño que el control positivo del ensayo de PCR (vector pPIC9*Tg*, carril 2), confirmó la presencia del fragmento *TgQ* en los plásmidos de las dos transformantes.



**Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X de la caracterización por PCR del vector pGEM*TgQ*.** Carril M: Marcador de tamaño molecular (Hipper Ladder I); Carril 1: Control negativo; Carril 2: Control positivo (PCR de DNAp de pPIC9*Tg*); Carriles 3 y 4: DNA plasmídico de 2 colonias transformantes, donde se observan las 2 cepas positivas para la amplificación del DNAc quimérico.

Las colonias que resultaron positivas para la amplificación del fragmento *TgQ* se propagaron y a partir de éstas se realizaron preparaciones de DNA plasmídico en cantidad suficiente para llevar a cabo los ensayos de caracterización enzimática y posterior subclonación en el vector pPIC9. El rendimiento de recuperación del DNA del plásmido pGEM*TgQ* fue de 6766 ng totales a una concentración de 112.78 ng/ $\mu$ L.

La caracterización con las enzimas de restricción *Xho*I y *Avr*II del DNA plasmídico pGEM*TgQ* de una de las cepas, caracterizado previamente por PCR, se muestra en en la figura 16. La presencia de un fragmento de 3016 pb que corresponde al vector pGEM, y el fragmento de 750 pb correspondiente al fragmento *TgQ* (738 pb) más 13 pb extras, confirmó la correcta construcción del plásmido pGEM*TgQ*. En el mismo gel de agarosa se incluyeron como controles el vector pGEM*TgQ* linearizado con *Xho*I (carril 2), linearizado con *Avr*II (carril 3), y en el carril 1 el plásmido pGEM*TgQ* sin linearizar. El fragmento de 750 pb liberado del vector fue empleado para la clonación en pPIC9.



**Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en TBE 1X de la digestión con *Xho*I y *Avr*II del vector pGEM*TgQ*.** Carril M: Marcador de tamaño molecular (Hipperladder I); Carril 1: vector pGEM*TgQ* sin digerir con *Xho*I; Carril 2: vector pGEM*TgQ* linearizado con *Xho*I; Carril 3: vector pGEM *TgQ* sin digerir con *Avr*II, carril 4: vector pGEM*TgQ* linearizado con *Avr*II; carril 6: vector pGEM*TgQ* digerido con *Xho*I y *Avr*II, donde se observan los fragmentos esperados de 750 pb y 3016 pb correspondientes al fragmento *TgQ* y al vector pGEM, respectivamente.

En la figura 17 se muestra el alineamiento realizado con el programa *BioEdit* entre las secuencias nucleotídicas directas o complementarias reversas (CR) obtenidas por secuenciación del plásmido pGEM*TgQ* con los iniciadores universales T7F, SP6R, M13F y M13R, y los oligonucleótidos 5'TgQ y 3'Tr, empleados para la síntesis del fragmento *TgQ*. Además se muestra la secuencia consenso de este alineamiento que corresponde a la secuencia nucleotídica de *TgQ*.

Sorprendentemente, las cuatro secuenciaciones no mostraron la presencia del sitio *XhoI* en pGEM*TgQ*. Sin embargo, este plásmido se cortó eficientemente con *XhoI* y *AvrII*, obteniéndose el fragmento del tamaño esperado (figura 16), lo cual confirma la presencia del sitio *XhoI* en pGEM*TgQ*. La traducción del fragmento *TgQ* (figura 18) claramente mostró que los 8 primeros aminoácidos de TgQ (APFDDDDK) corresponden al péptido de activación del tripsinógeno humano.

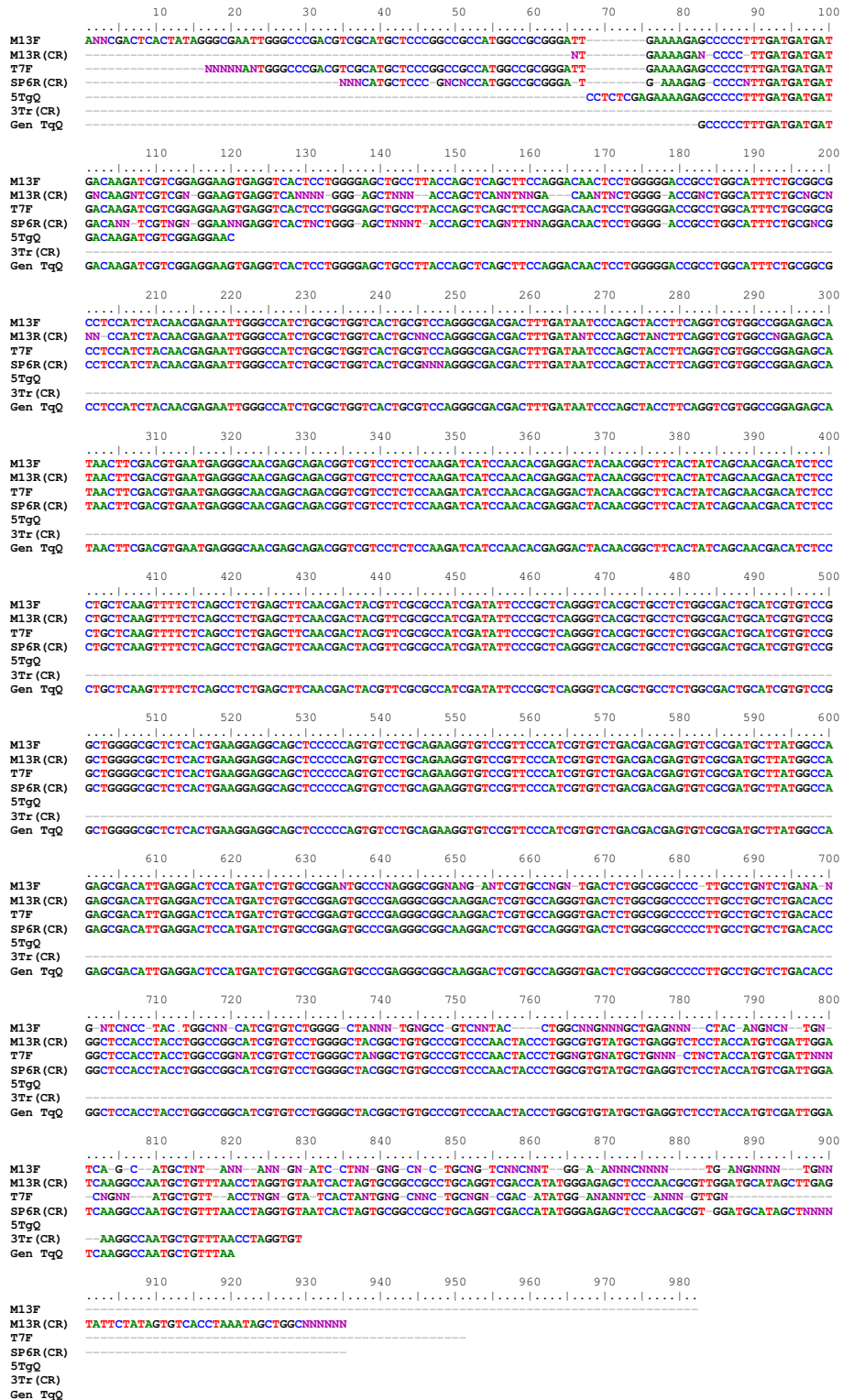


Figura 17. Alineamiento entre las secuencias nucleotídicas directas o complementarias reversas (CR) obtenidas por secuenciación plásmido pGEMTgQ con los iniciadores universales T7F, SP6R, M13F y M13R, y los oligonucleótidos 5'TgQ y 3'Tr. También se muestra la secuencia consenso de este alineamiento que corresponde a la secuencia nucleotídica de TgQ.

1	GCC	CCC	TTT	GAT	GAT	GAT	GAC	AAG	ATC	GTC	GGA	GGA	AGT	GAG	GTC	45
1	A	P	F	D	D	D	D	K	I	V	G	G	S	E	V	15
46	ACT	CCT	GGG	GAG	CTG	CCT	TAC	CAG	CTC	AGC	TTC	CAG	GAC	AAC	TCC	90
16	T	P	G	E	L	P	Y	Q	L	S	F	Q	D	N	S	30
91	TGG	GGG	ACC	GCC	TGG	CAT	TTC	TGC	GGC	GCC	TCC	ATC	TAC	AAC	GAG	135
31	W	G	T	A	W	H	F	C	G	A	S	I	Y	N	E	45
136	AAT	TGG	GCC	ATC	TGC	GCT	GGT	CAC	TGC	GTC	CAG	GGC	GAC	GAC	TTT	180
46	N	W	A	I	C	A	G	H	C	V	Q	G	D	D	F	60
181	GAT	AAT	CCC	AGC	TAC	CTT	CAG	GTC	GTG	GCC	GGA	GAG	CAT	AAC	TTC	225
61	D	N	P	S	Y	L	Q	V	V	A	G	E	H	N	F	75
226	GAC	GTG	AAT	GAG	GGC	AAC	GAG	CAG	ACG	GTC	GTC	CTC	TCC	AAG	ATC	270
76	D	V	N	E	G	N	E	Q	T	V	V	L	S	K	I	90
271	ATC	CAA	CAC	GAG	GAC	TAC	AAC	GGC	TTC	ACT	ATC	AGC	AAC	GAC	ATC	315
91	I	Q	H	E	D	Y	N	G	F	T	I	S	N	D	I	105
316	TCC	CTG	CTC	AAG	TTT	TCT	CAG	CCT	CTG	AGC	TTC	AAC	GAC	TAC	GTT	360
106	S	L	L	K	F	S	Q	P	L	S	F	N	D	Y	V	120
361	CGC	GCC	ATC	GAT	ATT	CCC	GCT	CAG	GGT	CAC	GCT	GCC	TCT	GGC	GAC	405
121	R	A	I	D	I	P	A	Q	G	H	A	A	S	G	D	135
406	TGC	ATC	GTG	TCC	GGC	TGG	GGC	GCT	CTC	ACT	GAA	GGA	GGC	AGC	TCC	450
136	C	I	V	S	G	W	G	A	L	T	E	G	G	S	S	150
451	CCC	AGT	GTC	CTG	CAG	AAG	GTG	TCC	GTT	CCC	ATC	GTG	TCT	GAC	GAC	495
151	P	S	V	L	Q	K	V	S	V	P	I	V	S	D	D	165
496	GAG	TGT	CGC	GAT	GCT	TAT	GGC	CAG	AGC	GAC	ATT	GAG	GAC	TCC	ATG	540
166	E	C	R	D	A	Y	G	Q	S	D	I	E	D	S	M	180
541	ATC	TGT	GCC	GGA	GTG	CCC	GAG	GGC	GGC	AAG	GAC	TCG	TGC	CAG	GGT	585
181	I	C	A	G	V	P	E	G	G	K	D	S	C	Q	G	195
586	GAC	TCT	GGC	GGC	CCC	CTT	GCC	TGC	TCT	GAC	ACC	GGC	TCC	ACC	TAC	630
196	D	S	G	G	P	L	A	C	S	D	T	G	S	T	Y	210
631	CTG	GCC	GGC	ATC	GTG	TCC	TGG	GGC	TAC	GGC	TGT	GCC	CGT	CCC	AAC	675
211	L	A	G	I	V	S	W	G	Y	G	C	A	R	P	N	225
676	TAC	CCT	GGC	GTG	TAT	GCT	GAG	GTC	TCC	TAC	CAT	GTC	GAT	TGG	ATC	720
226	Y	P	G	V	Y	A	E	V	S	Y	H	V	D	W	I	240
721	AAG	GCC	AAT	GCT	GTT	TAA										738
241	K	A	N	A	V	*										

**Figura 18. Traducción del fragmento *TgQ*.** Los 8 primeros aminoácidos (APFDDDDK) corresponden al péptido de activación del tripsinógeno humano.

El análisis con Blastp de *TgQ* (figura 19) mostró que a partir del noveno aminoácido (inicio de la secuencia de tripsina) *TgQ* tiene una total identidad con la tripsina II de *L. vannamei* (GenBank No. CAA75310) a excepción del aminoácido en la posición 153 que *TgQ* tiene una valina y en la tripsina II de *L. vannamei* está reportada una alanina.

```

>emb|CAA75310.1| trypsin [Litopenaeus vannamei]
Length=264

Score = 484 bits (1247), Expect = 3e-135, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 236/238 (99%), Positives = 237/238 (99%), Gaps = 0/238 (0%)

Query 7 DKIVGGSEVTPGELPYQLSFQDNSWGTAWHFCGASIYENWAICAGHCVQGGDDFDNPSYL 66
+KIVGGSEVTPGELPYQLSFQDNSWGTAWHFCGASIYENWAICAGHCVQGGDDFDNPSYL
Sbjct 27 NKIVGGSEVTPGELPYQLSFQDNSWGTAWHFCGASIYENWAICAGHCVQGGDDFDNPSYL 86

Query 67 QVVAGEHNFDVNEGNEQTVVLSKIIQHEDYNGFTISNDISLLKFSQPLSFNDYVRAIDIP 126
QVVAGEHNFDVNEGNEQTVVLSKIIQHEDYNGFTISNDISLLKFSQPLSFNDYVRAIDIP
Sbjct 87 QVVAGEHNFDVNEGNEQTVVLSKIIQHEDYNGFTISNDISLLKFSQPLSFNDYVRAIDIP 146

Query 127 AQQHAASGDCIVSGWGALTEGGSSPSVLQKVSVPVIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVP 186
AQQHAASGDCIVSGWGALTEGGSSPS LQKVSVPVIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVP
Sbjct 147 AQQHAASGDCIVSGWGALTEGGSSPSALQKVSVPVIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVP 206

Query 187 EGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSTYLAGIVSWGYGCARPNYPGVYAEVSYHVDWIKANA 244
EGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSTYLAGIVSWGYGCARPNYPGVYAEVSYHVDWIKANA
Sbjct 207 EGGKDSQCQDSSGGPLACSDTGSTYLAGIVSWGYGCARPNYPGVYAEVSYHVDWIKANA 264

```

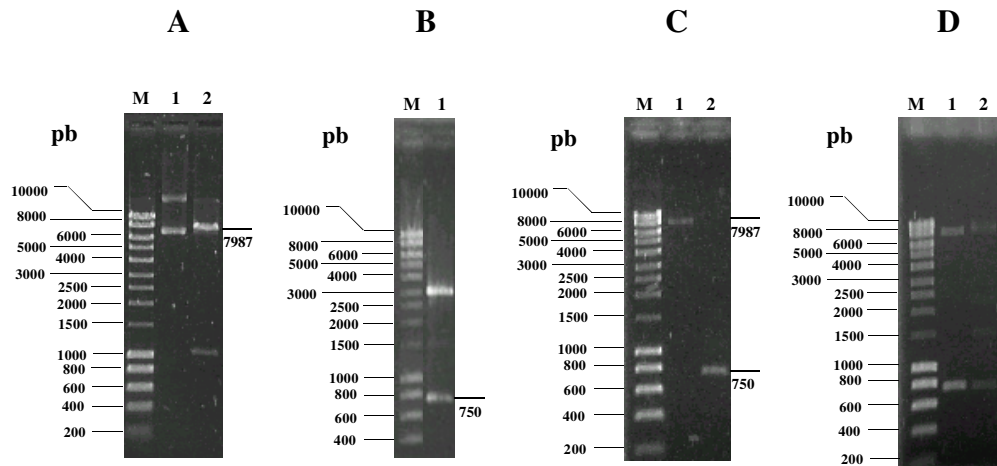
**Figura 19. Alineamiento entre TgQ y el tripsinógeno II de *L. vannamei*.**

La traducción del fragmento *TgQ* (figura 18) y el análisis con Blastp de la secuencia aminoacídica obtenida (figura 19) confirmaron la correcta síntesis del fragmento *TgQ* y su clonación en el vector pGEM. Es de remarcar que el primer nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido 5'TgQ es una C, sin embargo en la posición equivalente del fragmento *TgQ* (posición 28) claramente se detectó una G (figura 17). Esto es debido a que la secuencia molde empleada para la síntesis del fragmento *TgQ* (DNAC del tripsinógeno II de *L. vanamei* en pPIC9*Tg*) tiene una G en esta posición, lo que indujo a que la *Pfu* DNA polimerasa, con su actividad exonucleasa 3'-5', removiera el primer nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido 5'TgQ y continuara de forma correcta la síntesis de *TgQ* a partir del segundo nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido 5'TgQ.

### 6.3. Subclonación del fragmento *TgQ* en el vector pPIC9

La figura 20 muestra cuatro geles de agarosa al 0.8% realizados para dar seguimiento a las etapas experimentales para subclonar el fragmento *TgQ* en el vector pPIC9. La digestión preparativa de pPIC9*FTEII* con *XhoI* y *AvrII* (panel A) generó dos fragmentos, uno de 7987 pb (figura 20, panel A, carril 2), correspondiente al vector pPIC9, y otro de 1080 pb correspondiente al gen *FTEII*. La purificación de la banda de 7987 pb (panel C, carril 1) condujo a obtener 200 ng que se emplearon para llevar a cabo la ligación con el fragmento *TgQ* (panel D). La digestión preparativa de

pGEM*TgQ* con *Xho*I y *Avr*II (panel B) también generó dos fragmentos de 3016 y 750 pb (carril 1). La purificación de la banda de 750 pb (panel C, carril 2) condujo a obtener 200 ng que se emplearon para llevar a cabo la ligación del fragmento *TgQ* con el vector pPIC9 (panel D).

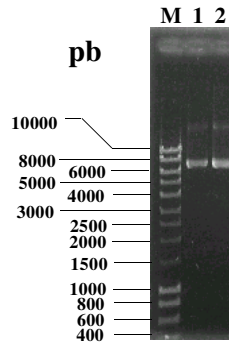


**Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de las etapas experimentales para subclonar el fragmento *TgQ* en el vector pPIC9. **Panel A**, digestión preparativa de pPIC9*FTEII* con *Xho*I y *Avr*II. Carril 1: pPIC9*FTEII* sin digerir. Carril 2: pPIC9*FTEII* digerido con *Xho*I y *Avr*II. **Panel B**, digestión preparativa de pGEM*TgQ* con *Xho*I y *Avr*II. Carril 1: pGEM*TgQ* digerido con *Xho*I y *Avr*II. **Panel C**. Fragmentos purificados para llevar a cabo la ligación. Carril 1: Fragmento de 7987 pb del vector pPIC9. Carril 2: Fragmento de 750 pb del fragmento *TgQ*. **Panel D**. Ligación del vector pPIC9 con el fragmento *TgQ*. Carril 1: vector pPIC9 y fragmento de *TgQ* sin DNA ligasa T4 (testigo negativo de ligación). Carril 2: vector pPIC9 y fragmento de *TgQ* con DNA ligasa T4 después de 48 h de incubación a 4°C. Carriles M (paneles A, B, C y D): marcador de tamaño molecular HyperLadder I.

En el ensayo de ligación del vector pPIC9 con el fragmento *TgQ* (panel D, carril 2) se observó la presencia de bandas que no se encontraban en el testigo negativo de ligación (fragmentos a ligar sin ligasa, Panel D, carril 1), lo cual indicó que se llevó a cabo la ligación.

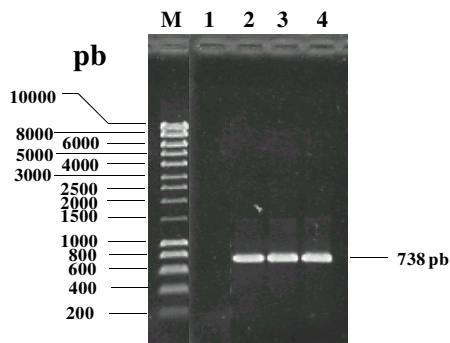
Confirmada la ligación del vector pPIC9 con el fragmento *TgQ*, se utilizaron 10 µL del producto de ligación para la transformación de células de *E. coli* JM109 químicamente competentes y se obtuvieron 20 colonias transformantes. De esas 20, seis colonias se aislaron y propagaron, y de dos de ellas se extrajo el DNA plásmidico que se analizó en gel de agarosa (figura 21). La obtención de bandas intensas sin degradación confirmó la integridad del DNA plasmídico aislado

(llamados pPIC9*TgQ*). Además, se observaron claramente las distintas conformaciones características de los plásmidos que corresponden al DNA relajado, enrollado y superenrollado. Asimismo también se observó la ausencia de RNA.



**Figura 21. Análisis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de pPIC9*TgQ*.** Carril M. Marcador de tamaño molecular. Carriles 1 y 2. DNA plasmídico de dos colonias obtenidas durante la transformación de *E. coli* JM109 con el producto de ligación de pPIC9 y el fragmento *TgQ*.

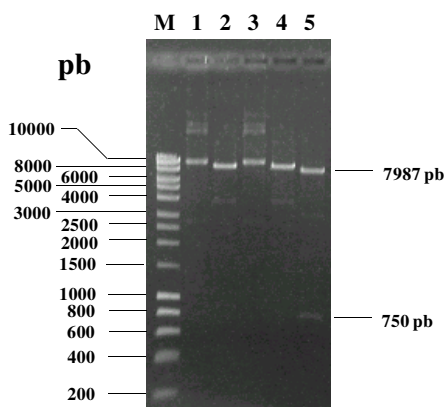
La caracterización de dos plásmidos pPIC9*TgQ* por PCR con los iniciadores 5'Tr y 3'Tr que hibridan en los extremos 5' y 3' del DNAC de la tripsina de *L. vanamei*, respectivamente, se muestra en la figura 22. La obtención de una banda de 738 pb confirmó la presencia del DNAC de la tripsina de *L. vanamei* en el plásmido pPIC9*TgQ*.



**Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización por PCR con los iniciadores 5'Tr y 3'Tr del plásmido pPIC9*TgQ* construido.** Carril M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder I); Carril 1: Control (-) de la PCR; Carril 2: Control positivo (DNAP pPIC9*Tg*); Carriles 3 y 4: DNA plasmídico pPIC9*TgQ* de dos colonias de *E. coli* transformadas. La banda de 738 pb corresponde a la secuencia nucleotídica del DNAC de la tripsina II de *L. vannamei* que contiene el fragmento *TgQ* clonado en pPIC9.



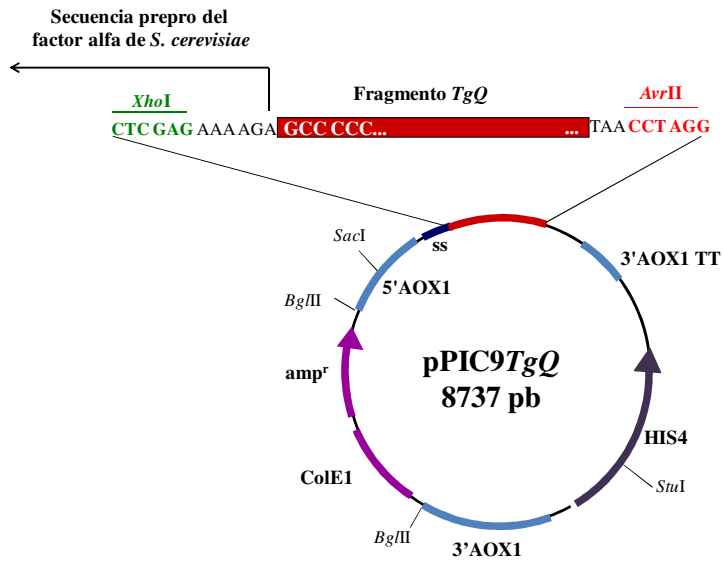
Además, se realizó una caracterización de los plásmidos pPIC9*TgQ* mediante restricción con las enzimas *XhoI* y *AvrII* (figura 23).



**Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X de la caracterización enzimática del plásmido pPIC9*TgQ* con *XhoI* y *AvrII*.** Carril M: Marcador de tamaño molecular (HyperLadder I); carriles 1 y 3: Testigos negativos de corte (pPIC9*TgQ* sin *XhoI* o *AvrII*); carril 2: pPIC9*TgQ* digerido con *XhoI*, carril 4: pPIC9*TgQ* digerido con *AvrII*, carril 5: pPIC9*TgQ* digerido con *XhoI* y *AvrII*.

En los carriles 1 y 3 (figura 23) se muestra el patrón de bandas del testigo negativo de corte, pPIC9*TgQ* sin una u otra enzima. La linearización de pPIC9*TgQ* con las enzimas *XhoI* (carril 2) o *AvrII* (carril 4) condujo a una banda de 8737 pb, tamaño correspondiente al tamaño teórico esperado. En el carril 5 se muestra la digestión de pPIC9*TgQ* mediante el empleo de las dos enzimas (*XhoI* y *AvrII*), lo cual generó dos fragmentos, uno de 7987 pb correspondiente al vector pPIC9 y otro de 751 pb correspondiente al fragmento de *TgQ*.

Con estos resultados se comprobó la identidad del plásmido pPIC9*TgQ* construido. En la figura 24 se muestra un esquema del plásmido pPIC9*TgQ* de 8737 pb y sus regiones más importantes: el promotor de *AOX1* (5'AOX1), la secuencia prepro del factor alfa de *S. cerevisiae*, el fragmento *TgQ*, el terminador de la transcripción de *AOX1* (3'AOX1 TT), el gen de la histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris* (HIS4), el fragmento 3' de *AOX1*, el origen de replicación ColE1 y el gen de resistencia a ampicilina ( $amp^r$ ).

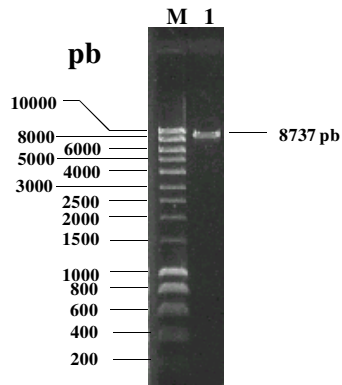


**Figura 24. Representación gráfica del vector de expresión pPIC9TgQ.** Se indica el sitio de inserción del fragmento *XhoI/AvrII* del fragmento *TgQ* de 750 pb que va desde el nucleótido xx al xx en el vector pPIC9TgQ. Se muestran también las diferentes regiones que componen el plásmido de expresión: Promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 TT respectivamente), región 3' del mismo gen (3'AOX1), gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) de *P. pastoris*, y la secuencia señal (*SS*). También contiene secuencias necesarias para propagación del plásmido en *E. coli* tales como el gen de resistencia a ampicilina (*amp<sup>r</sup>*) y el origen de replicación (*ColE1*). Contiene además los sitios de restricción necesarios para la integración eficiente en *P. pastoris*, que favorecen la generación de cepas Mut<sup>+</sup> His<sup>+</sup> o Mut<sup>s</sup> His<sup>+</sup> (*SacI*, *BglIII*, *SalI* y *StuI*).

#### 6.4. Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del fragmento *TgQ* (KM71TgQ)

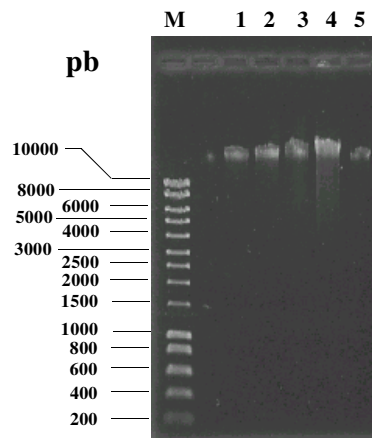
##### 6.4.1. Transformación de la cepas KM71 de *P. pastoris* con el vector de expresión construido

En la figura 25 se muestra el análisis en gel de agarosa del vector pPIC9TgQ linealizado con la enzima de restricción *SalI*, para verificar el corte total del vector. Este vector se empleó para transformar células químicamente competentes de *P. pastoris*. La obtención de una banda bien definida de 8737 pb demostró el corte total del vector.



**Figura 25. Verificación del corte total del vector de expresión pPIC9TgQ con *SalI* en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X.** Carril M: marcador de tamaño molecular HyperLadder I. Carril 1: pPIC9TgQ linearizado con la enzima *SalI*.

En la figura se 26 muestra el análisis en gel de agarosa para verificar la integridad de los DNA genómicos aislados de células de *P. pastoris* cepa KM71 transformadas con el vector pPIC9TgQ linearizado previamente con *SalI*. La obtención de bandas intensas y definidas demostró la integridad de todos los DNA genómicos aislados.

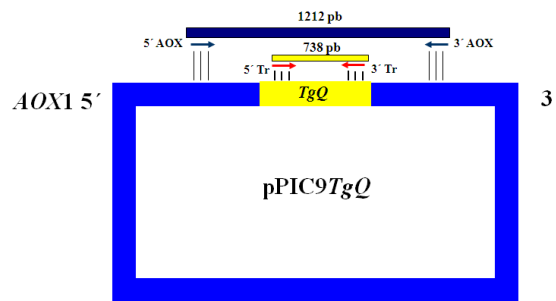


**Figura 26. Verificación de la integridad del DNA genómico aislado de cepas de *P. pastoris* KM71 transformadas con el vector pPIC9TgQ (gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X).** Carril M: marcador de tamaño molecular HyperLadder I. Carriles 1-5: DNA genómico aislado de cepas KM71 transformadas con el vector pPIC9TgQ linearizado con *SalI*.

Con estos DNA genómicos obtenidos se procedió a realizar el análisis por PCR del genotipo y fenotipo de las cepas KM71TgQ His<sup>+</sup> obtenidas.

#### 6.4.2. Análisis por PCR del genotipo y fenotipo Mut de las cepas recombinantes obtenidas

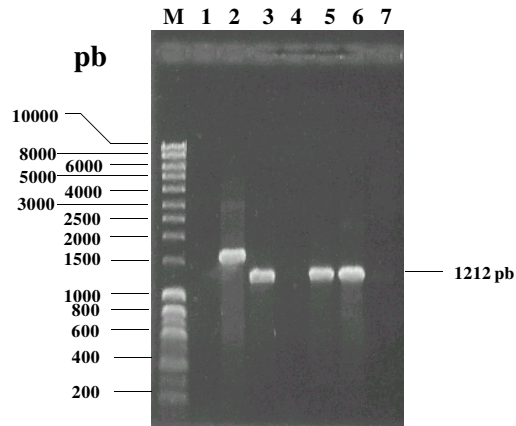
La caracterización genotípica del DNA genómico de las colonias transformadas con el plásmido pPIC9*TgQ*, se llevó a cabo mediante la confirmación por PCR de la presencia del casete de expresión conteniendo el fragmento *TgQ*, empleando dos pares de iniciadores específicos, dirigidos a las regiones *AOX* (5' *AOX* y 3' *AOX*) o bien al inicio y fin de la secuencia nucleotídica codificante para la tripsina de *L. vannamei* (5' *Tr* y 3' *Tr*). En la figura 27 se presenta un esquema ilustrativo del plásmido pPIC9*TgQ* indicando los sitios de apareamiento en el DNA plasmídico de lo iniciadores 5' *AOX* y 3' *AOX* o bien 5' *Tr* y 3' *Tr*. Para una PCR con iniciadores 5' *AOX* y 3' *AOX* se genera un fragmento de 1212 pb correspondiente al fragmento *TgQ* más parte de las regiones 5' y 3' de *AOX1*.



**Figura 27. Representación gráfica del plásmido pPIC9*TgQ* y los sitios de apareamiento de los iniciadores específicos 5' *AOX* y 3' *AOX* o bien los iniciadores específicos para la secuencia nucleotídica de la tripsina de *L. vannamei* (5' *Tr* y 3' *Tr*). Se muestra el tamaño de los fragmentos amplificados mediante PCR.**

La transformación de *P. pastoris* cepa KM71 con el plásmido pPIC9*TgQ*, previamente digerido con *SalI*, generó 5 transformantes His<sup>+</sup>. El análisis mediante PCR con los oligonucleótidos 5' *AOX* y 3' *AOX* del DNA genómico aislado de las cepas recombinantes de *P. pastoris* KM71*TgQ* (transformantes His<sup>+</sup>) mostró una única banda de 1212 pb en el carril 3, 5 y 6 (Figura 28) correspondiente al fragmento *TgQ* (762 pb), un fragmento del promotor *AOX1* (338 pb más SS), al terminador de la transcripción (118 pb) y 8 pb menos correspondiente a los sitios de restricción *XhoI* y *AvrII*. Este resultado indicó la ausencia del gen estructural *AOX1* y la correcta integración de los casetes de expresión en el genoma de *P. pastoris*, por lo tanto

confirmó los fenotipos Mut<sup>s</sup>. En el segundo carril se obtuvo una banda de 1537 pb correspondiente al testigo positivo de integración (DNA genómico de KM71FTEII).



**Figura 28. Análisis de PCR del DNAg aislado de las colonias de cepas KM71TgQ.** Carril M: marcador de tamaño molecular HyperLadder I. Carril 1: Control (-) de PCR (sin DNA). Carril 2: control (+) de PCR con pPIC9FTEII. Carriles 3-7: DNA genómico de las colonias transformantes His<sup>+</sup> de *P. pastoris* KM71TgQ mostrando la banda esperada de 1212 pb (solo carriles 3, 5 y 6).

El análisis por PCR, utilizando los iniciadores de *AOX* en las 5 muestras de DNA genómico analizado, mostró que el 60% (3) de las colonias recombinantes resultaron ser positivas para el análisis de la integración del casete de expresión en el genoma de *P. pastoris*, ya que se obtuvo la banda de 1212pb, corroborando que estas 3 cepas de KM71 transformadas con el vector pPIC9TgQ integraron en su genoma el casete de expresión (carriles 3, 5 y 6). Los carriles 4 y 7 no muestran amplificación con iniciadores específicos de *AOX*, lo que indica que estas 2 cepas no integraron el plásmido en su genoma. Así mismo, la ausencia de una banda de 2103 pb confirmó el fenotipo Mut<sup>s</sup> de las cepas construidas.

#### **6.4.3. Caracterización fenotípica de las cepas recombinantes KM71TgQ y KM71Tg4 (fenotipo TgQ y Tg4)**

El fenotipo TgQ<sup>+</sup> se evaluó realizando cultivos de una cepa KM71TgQ en tres medios de inducción (BMM, BMMS y BMMA), comparado con cultivos de la cepa KM71Tg4, y analizando las proteínas secretadas al medio de cultivo mediante el método de Bradford, SDS-PAGE y Western Blot. Los valores de proteínas totales

después de 48 h de inducción, así como los valores de pH, y DO<sub>600</sub> al inicio y final de cada cultivo se resumen en la tabla XX.

**Tabla XX.** Valores inicial y final de la DO<sub>600</sub>, proteínas totales y pH al final de la etapa de inducción con metanol en los tres diferentes medios de cultivo para las dos cepas en estudio (KM71TgQ y KM71Tg4).

Medio-Cepa	DO <sub>600</sub> Inicial		DO <sub>600</sub> Final	
	KM71TgQ	KM71Tg4	KM71TgQ	KM71Tg4
<b>BMM</b>	29.8	31.2	39.6	40.0
<b>BMMS</b>	30.2	30.4	44.6	45.0
<b>BMMA</b>	31.3	31.9	51.1	50.8

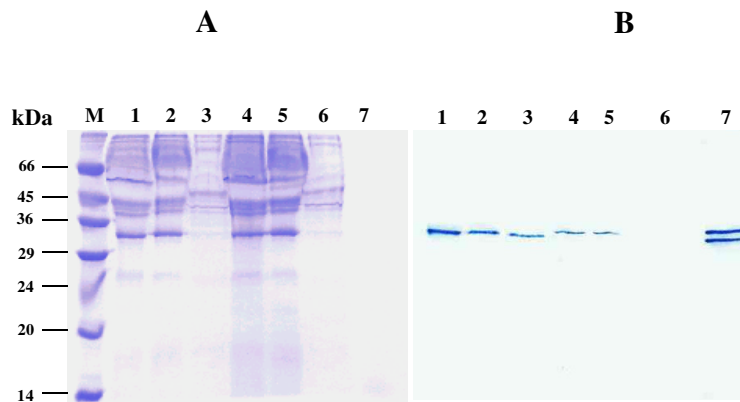
**Tabla XX.** (Continuación)

Medio-Cepa	Proteínas totales (mg/L)		pH final de la etapa	
	KM71TgQ	KM71Tg4	KM71TgQ	KM71Tg4
<b>BMM</b>	31.1	31.9	3.30	3.10
<b>BMMS</b>	39.2	38.8	2.60	2.40
<b>BMMA</b>	18.66	19.73	6.91	6.94

Ambas cepas recombinantes presentaron un comportamiento similar en todos los parámetros evaluados. Los valores de densidad óptica al inicio de los cultivos fueron muy similares en los tres medios (promedio 30). Sin embargo, al final de los cultivos fueron similares entre cepas, pero diferentes entre los tres medios. A pesar que el crecimiento celular fue mayor en el medio BMMA, la cantidad de proteínas extracelulares fue mayor en el medio BMMS. El pH final del cultivo llegó a valores bajos tanto en el medio BMMS como en el medio BMM, mientras que en el medio BMMA subió ligeramente a valores próximos a 7.

La producción de tripsinógeno quimérico y tripsinógeno de camarón por las cepas KM71TgQ y KM71Tg4, respectivamente, fue evaluada mediante el análisis de las proteínas extracelulares por SDS-PAGE y Western blot de los medios de cultivos libres de células concentrados 100 veces (figura 29). La evidente presencia

de una banda de 29-32 kDa en el análisis de Western blot, no distinguidas claramente en el gel SDS-PAGE, que también la presentó el testigo positivo (extracto de hepatopáncreas de camarón), corroboró la capacidad de las dos cepas (KM71TgQ y KM71Tg4) de producir y secretar el tripsinógeno quimérico y el tripsinógeno de *L. vannamei*, respetivamente. La presencia de varias bandas en el análisis de Western blot del extracto de hepatopáncreas de *L. vannamei* podría ser debido a la presencia de varias isoformas de la tripsina de *L. vannamei*.



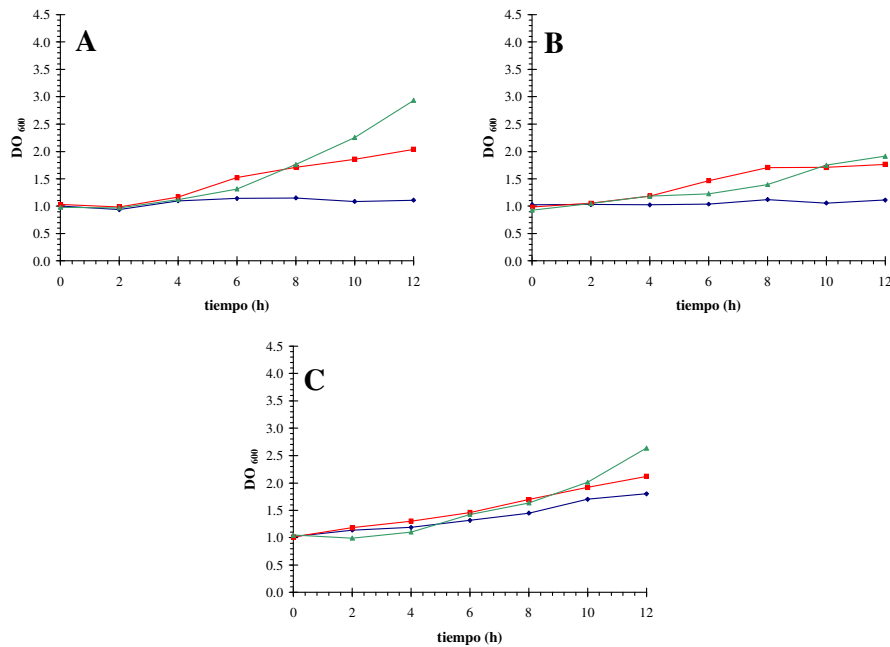
**Figura 29.** Análisis por SDS-PAGE al 12% (izquierda) y Western blot (derecha) de medios de cultivo libre de células después de 48 h de inducción de las cepas KM71TgQ y KM71Tg4 en los medios BMM, BMMS y BMMA. Carril M: Marcador de peso molecular. Carril 1: cepa KM71Tg4, medio BMM. Carril 2: cepa KM71Tg4 en medio BMMS. Carril 3 cepa KM71Tg4 en medio BMMA: Carriles 4: cepa KM71TgQ en medio BMM, Carril 5: cepa KM71TgQ en medio BMMS. Carril 6 cepa KM71TgQ en medio BMMA. Carril 7: Extracto de hepatopáncreas de *L. vannamei* como control positivo del Western blot. A la derecha Western blot donde se muestra la señal positiva para cada uno de los medios y cepas.

Los resultados obtenidos por SDS-PAGE (Figura 29, A) para la detección del tripsinógeno recombinante no fueron concluyentes, debido a la presencia de múltiples bandas presentes por arriba y por debajo del peso molecular esperado de 29 kDa. Sin embargo, el análisis por Western blot fue muy claro para detectar la presencia de los dos tripsinógenos recombinantes en los medios de cultivo libres de células (Figura 29, B).

Cabe resaltar que la cepa KM71Tg4 en el medio BMM presentó la señal positiva de Western blot más intensa, no así para KM71TgQ que mostró señales prácticamente de la misma intensidad en los tres medios evaluados.

### 6.5. Cinéticas de crecimiento comparativas en condiciones de inducción del gen heterólogo de las cepas KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC

En las figuras 30 y 31 se muestran las cinéticas de crecimiento de las cepas KM71TgQ (Fig 30 y 31 A), KM71Tg4 (Fig 30 y 31 B) y KM71PhyC (Fig 30 y 31 C) en tres diferentes medios de cultivo [BMM (azul), BMMS (rojo) y BMMA (verde)] en la etapa de inducción, evaluadas mediante turbidimetría ( $DO_{600}$ ) y UFC/mL, respectivamente. Se empleó la cepa KM71PhyC (productora de la fitasa C de *Bacillus subtilis*) como testigo positivo de crecimiento celular en los tres medios de inducción evaluados.

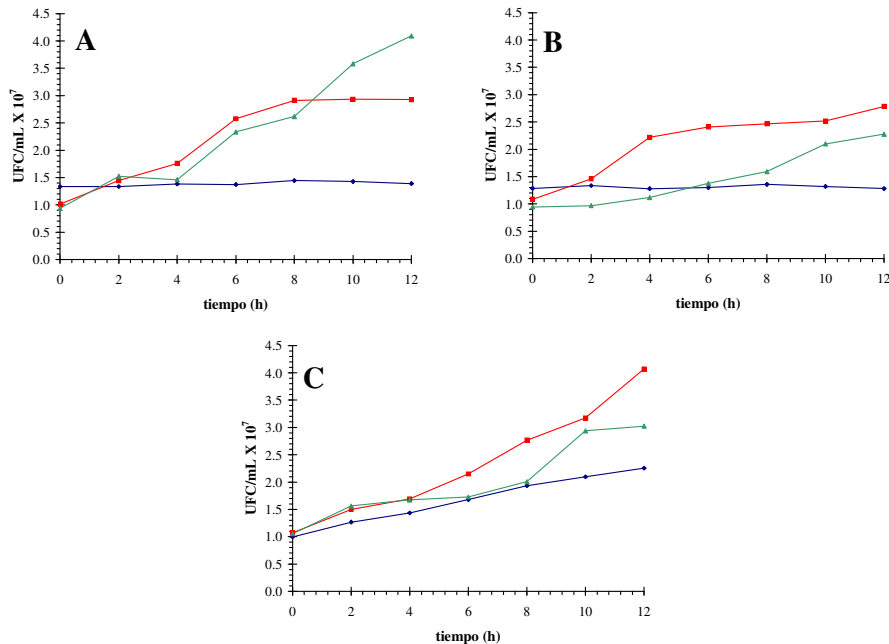


**Figura 30. Cinéticas de crecimiento de KM71TgQ (A) KM71Tg4 (B) y KM71PhyC (C) en tres diferentes medios de inducción, BMM(azul), BMMS (rojo) y BMMA (verde), evaluadas por  $DO_{600}$ . Cada punto fue realizado por triplicado (coeficiente de variación menor al 12%).**

En las cinéticas de crecimiento evaluadas por turbidimetría ( $DO_{600}$ ) en el medio BMM de las cepas KM71TgQ y KM71Tg4 no se observó crecimiento celular durante todo el cultivo (12 h), por lo que las velocidades específicas de crecimiento fueron prácticamente cero. Sin embargo, en la cepa KM71PhyC mediante esta misma técnica y en el medio BMM, presentó hasta el final del cultivo una fase de crecimiento exponencial con una velocidad específica de crecimiento de  $0.050 \text{ h}^{-1}$



(tiempo de duplicación 13.9 h). Las mismas cinéticas de crecimiento evaluadas por UFC/mL (medio BMM) mostraron un comportamiento muy similar entre las dos cepas KM71TgQ y KM71Tg4 sin presentarse un incremento significativo en el número de células viables a través del tiempo (velocidad específica de crecimiento de 0.005 y 0.001 h<sup>-1</sup> para KM71TgQ y KM71Tg4, respectivamente). Sin embargo, la cinética de crecimiento de la cepa testigo (KM71PhyC) evaluada por UFC/mL mostró un incremento de células viables desde el inicio y hasta el final del cultivo, con una velocidad específica de crecimiento de 0.060 h<sup>-1</sup> y un tiempo de duplicación de 11.6 h, valores similares a los obtenidos mediante turbidimetría (DO<sub>600</sub>).



**Figura 31. Cinéticas de crecimiento de KM71TgQ (A) KM71Tg4 (B) y KM71PhyC (C) en tres diferentes medios de inducción, BMM(azul), BMMS (rojo) y BMMA (verde), evaluadas por UFC/mL. Cada punto fue realizado por triplicado (coeficiente de variación menor al 25%).**

En el medio BMMS y evaluando la cinética de crecimiento por turbidimetría, la cepa KM71TgQ presentó una fase de latencia desde las 0 a las 2 h, posteriormente presentó un crecimiento exponencial con una velocidad específica de crecimiento de 0.073 h<sup>-1</sup> (tiempo de duplicación de 9.4 h). Sin embargo, evaluando esta cinética de crecimiento por UFC/mL, se observó una exponencial desde el inicio del cultivo hasta las 8 h, y posteriormente hasta el final una fase estacionaria. Se estimó una velocidad específica de crecimiento de 0.074 h<sup>-1</sup> (tiempo de duplicación de 9.3 h). A

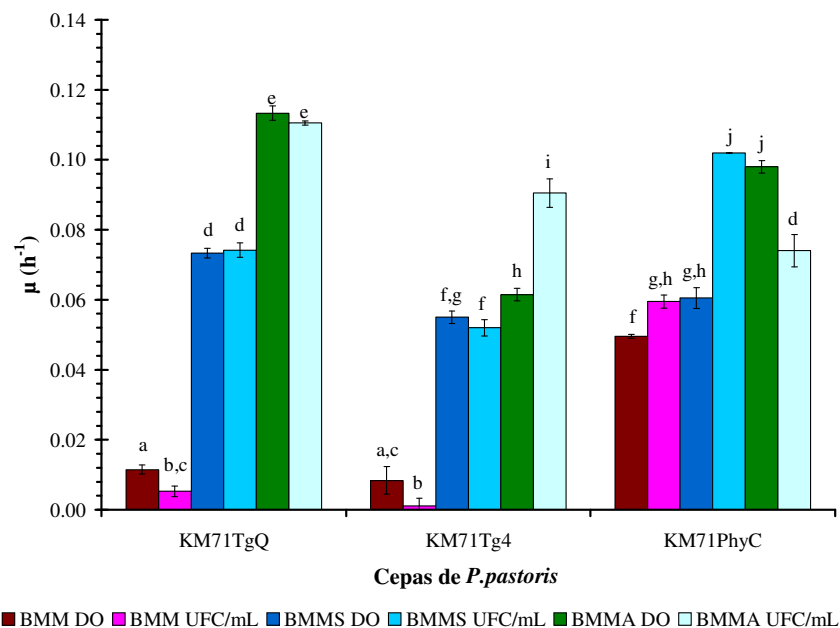
pesar que las velocidades específicas de crecimiento para la cepa KM71TgQ en BMMS fueron similares mediante las dos técnicas de evaluación, el comportamiento global de estas cinéticas de crecimiento fue un poco distinto ya que en BMMS determinado por  $DO_{600}$  no se observó la fase estacionaria. En la cepa KM71Tg4 mediante turbidimetría se observó una fase crecimiento exponencial 0-8 h, y posteriormente una fase estacionaria. La velocidad específica de crecimiento determinada mediante esta técnica para KM71Tg4 en BMMS por  $DO_{600}$  fue de  $0.055 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de duplicación de 12.6 h). Sin embargo, la cinética de crecimiento evaluada por UFC/mL con este medio de cultivo presentó una fase estacionaria a partir de las 4 h y hasta el final del cultivo. La velocidad específica de crecimiento mediante UFC/mL para KM71Tg4 en BMMS fue de  $0.052 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de duplicación 13.3 h). En la cepa KM71PhyC presentó una fase de crecimiento exponencial desde el inicio hasta el final del cultivo con una velocidad específica de crecimiento de  $0.061 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de duplicación de 11.4 h) mediante  $DO_{600}$ . Mediante la técnica de UFC/mL se observó claramente que la fase exponencial se presentó a desde el inicio y hasta el final del cultivo. La velocidad específica de crecimiento fue de  $0.102 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de duplicación de 6.7 h).

En el medio BMMA para la cepa KM71TgQ y evaluando la cinética de crecimiento por  $DO_{600}$ , se observó una fase de latencia de las 0-2 h, posteriormente a partir de las 2 h y hasta el final del cultivo se presentó una fase exponencial de crecimiento. Mediante UFC/mL se observó un crecimiento exponencial desde el inicio hasta el final del cultivo. Por ninguna de las dos técnicas evaluadas se observó una fase estacionaria definida. Las velocidades específicas de crecimiento determinadas fueron de  $0.113 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de duplicación de 6.1 h) mediante  $DO_{600}$  y  $0.111 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de duplicación de 6.2 h) mediante UFC/mL. En la cepa KM71Tg4 evaluada por turbidimetría, se observó un crecimiento exponencial desde el inicio hasta el final del cultivo. Mediante UFC/mL se observó una fase de crecimiento exponencial hasta el final del cultivo. Las velocidades específicas de crecimiento obtenidas fueron de  $0.062 \text{ h}^{-1}$  ( $DO_{600}$ ), y de  $0.091 \text{ h}^{-1}$  (UFC/mL), así como los tiempos de duplicación de 11.2 y 7.6 h para  $DO_{600}$  y UFC/mL, respectivamente. En cuanto a la cepa KM71PhyC evaluada en el medio BMMA por  $DO_{600}$ , se observó una fase de latencia de las 0-2 h, posteriormente y hasta el final del cultivo se observó una fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, mediante UFC/mL se observó crecimiento celular desde el inicio del cultivo sin ser posible definir fases de

crecimiento. Las velocidades específicas de crecimiento obtenidas fueron de  $0.098 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{DO}_{600}$ ), y  $0.074 \text{ h}^{-1}$  (UFC/mL), así como los tiempos de duplicación de 7.0 y 9.3 h, para  $\text{DO}_{600}$  y UFC/mL, respectivamente. En la tabla XXI se muestra un resumen de las velocidades específicas de crecimiento de las tres cepas evaluadas en los tres medios de cultivo, y determinadas mediante  $\text{DO}_{600}$  o UFC/mL.

**Tabla XXI.** Valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) de las cinéticas de crecimiento realizadas en tres diferentes medios de inducción. Los valores fueron calculados por turbidimetría y UFC/mL.

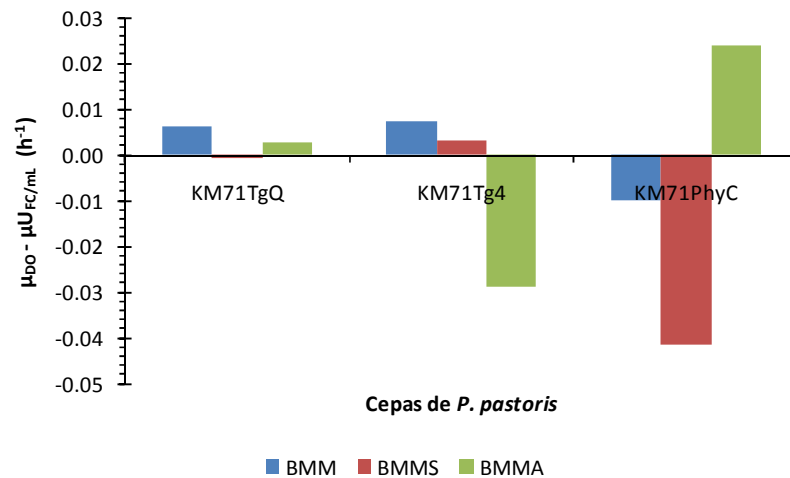
Medio de cultivo	Técnica de determinación	KM71TgQ $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	KM71Tg4 $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	KM71PhyC $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )
BMM	$\text{DO}_{600}$	0.0012	0.008	0.050
	UFC/mL	0.005	0.001	0.060
BMMS	$\text{DO}_{600}$	0.073	0.055	0.061
	UFC/mL	0.074	0.052	0.102
BMMA	$\text{DO}_{600}$	0.113	0.062	0.098
	UFC/mL	0.111	0.091	0.074



**Figura 32.** Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) de una cepa recombinante *P. pastoris* productora del tripsinógeno quimérico (KM71TgQ) en condiciones de inducción del gen heterólogo. Se emplearon tres medios de cultivo BMM, BMMS y BMMA y determinadas por turbidimetría ( $\text{DO}_{600}$ ) y mediante cuenta viable en placa (UFC/mL) y comparadas con las correspondientes velocidades específicas de crecimiento de

dos cepas testigo productoras del tripsinógeno de *L. vannamei* (KM71Tg4) y de una fitasa bacteriana (KM71PhyC). Literales diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

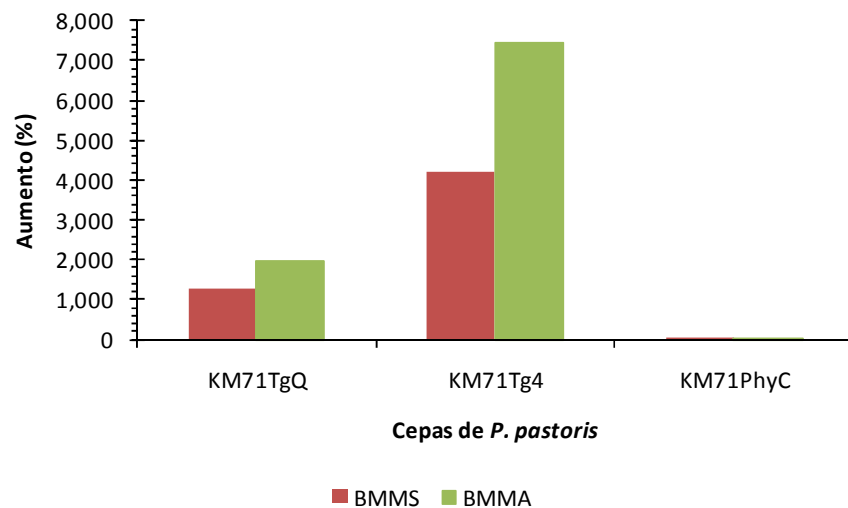
En la Figura 31 se muestra la comparación de las velocidades específicas de crecimiento de las tres cepas evaluadas (KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC) en los tres medios de inducción (BMM, BMMS y BMMA) y mediante las dos técnicas empleados para determinar el crecimiento celular (turbidimetría y cuenta viable en placa). Debido a la variación obtenida en algunos de los experimentos, todos los cultivos se repitieron seis veces en dos bloques de tres matraces cada uno. En algunos casos se descartaron los resultados de alguno de los matraces que se alejaron del promedio de los otros matraces. De este modo quedaron dos experimentos con tres matraces, siete experimentos con cuatro matraces, cuatro experimentos con cinco matraces y cinco experimentos con seis matraces (ver apéndice J). Esto permitió hacer el análisis estadístico correspondiente (ANOVA de un factor y comparación de medias de Tukey) de cada uno de los experimentos, cuyo resultado se expresa con literales en la parte superior de cada barra.



**Figura 33. Comparación de las diferencias de las velocidades específicas de crecimiento evaluadas turbidimetría y cuenta viable en placa**

Para una mejor comprensión de los resultados de las velocidades específicas de crecimiento, se realizaron tres gráficos adicionales mostrados en las Figuras 33, 34 y 35. En la Figura 33 se muestra la comparación de las diferencias de las velocidades específicas de crecimiento evaluadas turbidimetría y cuenta viable en placa. Las dos cepas productoras de tripsinógenos (KM71TgQ y KM71Tg4) en

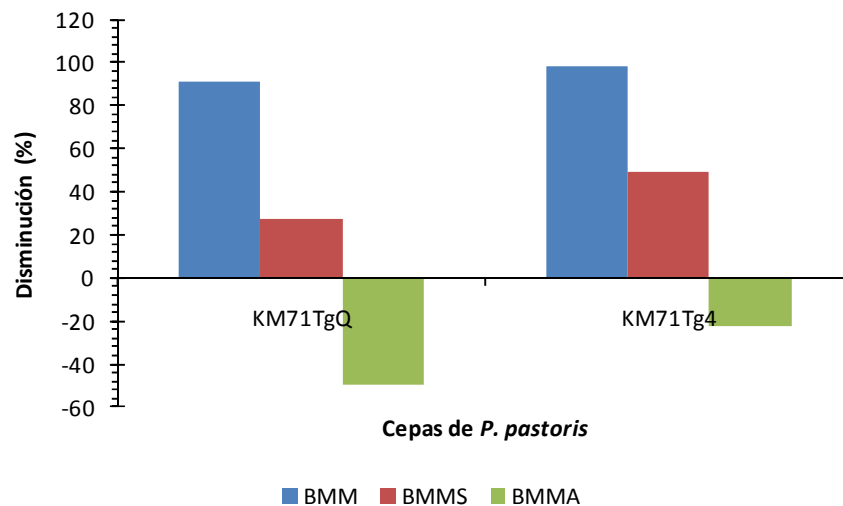
medio BMM mostraron una velocidad específica de crecimiento mayor evaluando la cinética de crecimiento por turbimetría que por cuenta viable ( $p < 0.05$ ). Sin embargo para la cepa control (KM71PhyC) se observó un comportamiento al revés (una velocidad específica menor por turbimetría que por cuenta viable,  $p < 0.05$ ). Esto podría ser debido a una posible toxicidad de TgQ y el tripsinógeno de camarón, o sus formas activadas, sobre las células hospederas que genere un aumento de la  $DO_{600}$  no atribuible al aumento de células, fenómeno que no se vería reflejado en las UFC/mL. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las velocidades específicas de crecimiento en el medio BMMS evaluando las cinéticas de crecimientos por turbimetría o por cuenta viable ( $p > 0.05$ ), tanto para la cepa KM71TgQ como para la cepa KM71Tg4. Esto indica que la adición de sorbitol en el medio de cultivo mejora la viabilidad celular y compensa el efecto tóxico de TgQ y el tripsinógeno de camarón, o sus formas activadas, sobre las células hospederas. Por tal motivo, sólo se tomaron en cuenta los valores de las velocidades específicas de crecimiento de las cinéticas evaluadas por cuenta viable en las siguientes comparaciones, por considerarse a las UFC/mL un valor más representativo del crecimiento celular que la  $DO_{600}$ .



**Figura 34. Comparación del aumento de las velocidades específicas de crecimiento evaluadas en las tres cepas en estudio**

La adición de sorbitol o alanina al medio BMM mejoró la viabilidad celular de las tres cepas evaluadas, aumentando las velocidades específicas de crecimiento

respecto a las obtenidas en el medio BMM (Figura 33). Aunque las velocidades específicas de crecimiento en BMMS y BMMA de la cepa KM71TgQ fueron mayores que los correspondientes de la cepa KM71Tg4, el porcentaje de aumento fue mayor para la cepa KM71Tg4 que para la cepa KM71TgQ. Para la cepa control (KM71PhyC), la adición de sorbitol o alanina al medio BMM aumentó las velocidades específicas de crecimiento en un 71 y 24%. Para las dos cepas productoras de tripsinógenos (KM71TgQ y KM71Tg4), el aumento de las velocidades específicas de crecimiento fue mayor en el medio BMMA que en BMMS, en la cepa control ocurrió al revés. Esto indica que probablemente el sorbitol es mejor fuente de carbono para *P. pastoris* que la alanina, tal como se ha sugerido en la literatura (Inan *et al.*, 2001), sin embargo en las dos cepas productoras de tripsinógenos (KM71TgQ y KM71Tg4), la alanina además de ser fuente de carbono adicional para *P. pastoris* disminuye más la toxicidad de los tripsinógenos sobre las células hospederas que el sorbitol.



**Figura 35. Comparación de la disminución de las velocidades específicas de crecimiento evaluadas en las tres cepas en estudio**

Las velocidades específicas de crecimiento de las dos cepas productoras de tripsinógenos (KM71TgQ y KM71Tg4) en los medios BMM y BMMS fueron menores que los correspondientes a la cepa control, siendo la disminución mayor en BMM que en BMMS (Figura 34). Esta disminución de la velocidad específica de crecimiento respecto a la cepa control fue similar para las dos cepas productoras de

tripsinógeno en el medio BMMS, pero en el medio BMMS fue mayor en la cepa KM71Tg4 que en la cepa KM71TgQ. Esto indica que en los medios BMM y BMMS, los dos tripsinógenos presentaron toxicidad sobre las células hospederas, siendo menor la toxicidad en el medio BMMS que en BMM. Adicionalmente, la toxicidad de los tripsinógenos en BMMS fue algo menor en la cepa KM71TgQ que en la cepa KM71Tg4.

Sorprendentemente, en el medio BMMA, las velocidades específicas de crecimiento de las dos cepas productoras de tripsinógenos (KM71TgQ y KM71Tg4) fueron mayores que en el de la cepa control, siendo el porcentaje de aumento respecto a la cepa control mayor en la cepa KM71TgQ que en la cepa KM71Tg4. Esto indica que la adición de alanina en el medio de cultivo induce a un mayor crecimiento celular en las cepas productoras de tripsinógeno que en la cepa control, probablemente por una mayor disminución de la toxicidad sobre las células del hospedero en el medio BMMA respecto al medio BMMS, que contrarresta la menor capacidad como fuente de carbono de la alanina frente al sorbitol para *P. pastoris*. Por lo tanto se esperaría que las velocidades específicas de crecimiento de las dos cepas productoras de tripsinógenos (KM71TgQ y KM71Tg4) en medio BMMA fueran similares al de la cepa control. Sin embargo, estas velocidades específicas de crecimiento fueron mayores que las de la cepa control, indicando que la alanina presentó un factor adicional que estimuló el crecimiento celular en las cepas KM71TgQ y KM71Tg4 que no tuvo efecto en la cepa control. Este factor resultó ser mayor en la cepa KM71TgQ que en la cepa KM71Tg4.

## 7. DISCUSIÓN

Debido a que la tripsina de camarón tiene una actividad específica 30 veces mayor que la tripsina bovina y junto con sus propiedades bioquímicas, hacen a esta tripsina una candidata potencial para su producción en forma recombinante. Sin embargo, su síntesis en *P. pastoris* como zimógeno ha mostrado toxicidad por parte del tripsinógeno, o su forma activada, sobre las células hospederas, obteniéndose sólo 14 µg/mL después de 96 h de inducción en matraz empleando un medio suplementado con alanina (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2009). En la literatura se ha sugerido la inhibición del proceso de autoactivación de los tripsinógenos cuando se encuentra presente una secuencia de cuatro aspartatos en el péptido de activación precediendo el enlace peptídico Lys-Ile que se rompe durante la activación del tripsinógeno a tripsina (Chen *et al.*, 2003; Nemoda and Sahin-Tóth., 2005). Por tal motivo, se pensó en producir un tripsinógeno quimérico formado por el péptido de activación del tripsinógeno humano y la tripsina de camarón, debido a que el péptido de activación del tripsinógeno humano contiene la secuencia de tetra-aspartato. Si este tripsinógeno quimérico presentara una autoactivación más lenta que el tripsinógeno de camarón, se podría producir en *P. pastoris* y posteriormente activarlo para que se genere la tripsina de camarón.

El sistema de expresión de *P. pastoris* tiene la habilidad de sintetizar proteínas biológicamente activas y secretarlas al medio de cultivo. El promotor empleado para transcribir genes heterólogos en *P. pastoris* provienen del gen de la alcohol oxidasa 1 de *P. pastoris* cuya expresión está regulada por metanol. Esta capacidad para mantener los cultivos con la expresión heteróloga apagada en ausencia de metanol es un factor importante para minimizar el efecto tóxico que presentan algunas proteínas heterólogas sobre el hospedero (Cerenghino and Cregg., 1999), ya que el gen heterólogo se puede inducir después de alcanzar una densidad celular deseada (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004). Por este motivo, se decidió emplear el sistema de expresión de *P. pastoris* para producir un tripsinógeno quimérico. Así, en este trabajo



construimos por primera vez cepas de *P. pastoris* para producir y secretar al medio de cultivo un tripsinógeno quimérico. La correcta síntesis del fragmento *TgQ* fue confirmada por secuenciación nucleotídica del plásmido pGEM*TgQ*. La integración del fragmento *TgQ* en el genoma de *P. pastoris* y el fenotipo Mut<sup>s</sup> fueron confirmados por PCR. Siguiendo los lineamientos descritos para la producción de tripsinógeno de camarón en *P. pastoris* (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2009), se evaluó el uso de la suplementación al medio inductor BMM con una fuente de carbono (sorbitol o alanina) que no reprima la síntesis de enzimas de la ruta metabólica del metanol. Los análisis de SDS-PAGE y Western blot del medio de cultivo libre de células demuestran la síntesis y secreción del tripsinógeno quimérico en los tres medios de inducción BMM, BMMS y BMMA.

Las cinéticas de crecimiento comparativas realizadas en condiciones de inducción son un buen método indirecto para evaluar la toxicidad de una proteína heteróloga sobre su hospedero (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2009). Por tal motivo, en el presente trabajo se evaluaron cinéticas de crecimiento en tres medios de inducción (BMM, BMMS y BMMA) de la cepa de *P. pastoris* productora del tripsinógeno quimérico (KM71*TgQ*). Estas cinéticas se compararon con las correspondientes obtenidas con una cepa de *P. pastoris* productora del tripsinógeno de camarón (KM71*Tg4*), como testigo de cepa que produce una proteína heteróloga tóxica, y una cepa de *P. pastoris* productora de la fitasa C de *Bacillus subtilis* (KM71*PhyC*), como testigo de cepa de *P. pastoris* que produce una proteína heteróloga no tóxica.

El sorbitol ha sido reportado como una buena fuente de carbono para los cultivos de inducción con metanol de *P. pastoris* (Inan and Meagher, 2001), sin embargo, en cultivos a nivel matraz agitado empleando el medio BMMS, el pH disminuye durante el cultivo, pudiendo afectar la estabilidad de la proteína recombinante. La tripsina de camarón nativa se desactiva de forma irreversible a pH ácido (Sainz *et al.*, 2004), por lo tanto, este medio de cultivo podría no ser el adecuado para producir tripsinógeno recombinante de camarón o bien *TgQ* a nivel matraz. La alanina también se ha reportado como una fuente de carbono para cultivos de inducción con metanol de *P. pastoris* (Inan and Meagher, 2001). Aunque su efecto en el crecimiento celular es menor en comparación con el del sorbitol, se ha reportado que la alanina le confiere al medio de cultivo una mejor amortiguación del pH a lo largo del cultivo (O'Callaghan *et al.*, 2002).

Una velocidad específica de crecimiento mayor evaluando la cinética de crecimiento por turbimetría que por cuenta viable para las dos cepas productoras de tripsinógenos, así como velocidades específicas de crecimiento en los medios BMM y BMMS menores que los correspondientes de la cepa control, indican que tanto TgQ como el tripsinógeno de camarón presentan toxicidad sobre las células hospederas. Adicionalmente, una velocidad específicas de crecimiento en BMMS de la cepa KM71TgQ mayor que la correspondiente de la cepa KM71Tg4, así como una disminución de la velocidad específica de crecimiento respecto a la cepa control en el medio BMMS mayor en la cepa KM71Tg4 que en la cepa KM71TgQ, indica que en el medio BMMS TgQ presenta menor toxicidad que el tripsinógeno de camarón sobre las células hospederas.

La adición de alanina en el medio de cultivo probablemente genera una mayor disminución de la toxicidad de TgQ y el tripsinógeno de camarón sobre las células del hospedero que la adición de sorbitol. Además, la alanina tiene un efecto adicional que estimula el crecimiento celular en las cepas KM71TgQ y KM71Tg4 que no tiene efecto en la cepa control (KM71PhyC), siendo este efecto adicional mayor en la cepa KM71TgQ que en la cepa KM71Tg4.

A lo largo del presente trabajo se presentaron algunos problemas técnicos que tuvieron que ser resueltos para la buena marcha del proyecto. En primer lugar, fue difícil llevar a cabo la síntesis por PCR del fragmento *TgQ* empleando como DNA molde el plásmido pPIC9*Tg* y los iniciadores 5'TgQ y 3'Tr. Esta dificultad fue inicialmente atribuida a que el iniciador 5'TgQ de 50 nucleótidos solamente tiene 14 nucleótidos que hibridan con la secuencia blanco. Por lo tanto, fue necesario el empleo de un programa térmico especial que contiene una etapa de hibridación con una rampa desde 4°C hasta 72°C. Este tipo de programas ha sido sugerido en la literatura (Rychlik, 1995) cuando uno de los iniciadores tiene en su extremo 3' una secuencia pequeña de nucleótidos complementaria a la secuencia blanco. Sin embargo, después de hacer la secuenciación del fragmento *TgQ* a partir del plásmido pGEM*TgQ*, observamos que el primer nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido 5'TgQ era una C, sin embargo en la posición equivalente del fragmento *TgQ* (posición 28) se detectó una G (figura 17), generando la dificultad de la síntesis del fragmento *TgQ*. La *Pfu* DNA polimerasa empleada para la síntesis del fragmento *TgQ* jugó un papel importante, ya que con su actividad exonucleasa 3'-5', removió el primer nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido 5'TgQ y continuó de forma

correcta la síntesis de *TgQ* a partir del segundo nucleótido del extremo 3' del oligonucleótido 5'TgQ.

Inicialmente la adenilación del fragmento *TgQ* previa a la clonación en el vector pGEM se hizo con *GoTaq* DNA polimerasa y dNTP's. Sin embargo, los DNA plasmídicos obtenidos de las colonias blancas resultantes de la transformación de células de *E. coli* calciocompetentes resultaron negativas mediante el análisis por PCR empleando los oligonucleótidos 5'TgQ y 3'Tr, 5'Tr y 3'Tr, y mediante análisis por restricción con las enzimas *XhoI* y *AvrII*. El análisis de restricción con la enzima *PstI* confirmó la ausencia del fragmento *TgQ* en estos plásmidos. Por tal motivo se repitió la clonación del fragmento *TgQ* en pGEM pero adenilando el fragmento *TgQ* con *GoTaq* DNA polimerasa y dATP, consiguiendo obtener plásmidos con el fragmento *TgQ*, tal como lo confirmaron los análisis por PCR y enzimas de restricción.

Para disminuir la variabilidad en las determinaciones de cuenta viable mediante UFC/mL es muy importante tener especial precaución en la realización de la dilución y siembra en placa, además de averiguar previamente la dilución adecuada para poder llevar a cabo con mayor exactitud la cuenta de las colonias. A pesar de estas precauciones, al realizar las cinéticas de crecimiento por triplicado se obtuvo una alta variación en los resultados de algunos de los experimentos, por lo que se repitieron de nuevo tres veces todas las cinéticas de crecimiento. De este modo, todos los cultivos se repitieron seis veces en dos bloques de tres matraces cada uno, y se descartaron los resultados de alguno de los matraces que se alejaron del promedio de los otros matraces. Así, quedaron experimentos con baja variación entre sus repeticiones (matraces) que permitió hacer el análisis estadístico correspondiente.

En la construcción de la cepa KM71TgQ se empleó el plásmido pPIC9, los sitios *XhoI* y *AvrII*, y no se incluyeron las repeticiones Glu-Ala después del sitio de corte para la remoción de la secuencia pre-pro del factor alfa. Esta estrategia es la que tradicionalmente hace nuestro grupo de trabajo (Escamilla *et al.*, 2000; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2009, López *et al.*, 2010; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2010; Viader-Salvadó *et al.*, 2010). Además, otros autores han empleado una estrategia de clonación similar (Ascacio-Martínez *et al.*, 2004).

Una toxicidad sobre células de *P. pastoris* ha sido reportada en la producción del tripsinógeno bovino (Hanquier *et al.*, 2003). Por lo tanto estos autores necesitaron realizar una mutación puntual en el sitio de activación eliminando el enlace peptídico

Lys-Ile para poder obtener la acumulación de este tripsinógeno en el medio de cultivo (Hanquier *et al.*, 2003). Además, un descenso de la viabilidad en la etapa de inducción por debajo del 70% ha sido descrito durante la producción y secreción del tripsinógeno humano en *P. pastoris* (Hohenblum *et al.*, 2003). También un tripsinógeno proveniente de un pez adaptado al frío ha sido producido en *P. pastoris* en bajos niveles detectando la proteína recombinante sólo por Western blot (Macouzet *et al.*, 2005).

La producción de un tripsinógeno quimérico podría permitir la producción de tripsina recombinante de camarón. Debido a que la tripsina es usada frecuentemente en estudios de proteómica, sería de utilidad la disponibilidad de una tripsina recombinante ya que estaría libre de otras proteasas como la quimotripsina.

Por otro lado, el tripsinógeno de camarón no tiene secuencia de reconocimiento para la enteropeptidasa (Klein *et al.*, 1996), como lo tiene el péptido de activación de tripsinógenos de vertebrados. Por lo tanto, en la activación del tripsinógeno de camarón juega un papel muy importante el proceso de autoactivación. En la literatura se ha sugerido que la presencia de cuatro aspartatos en el péptido de activación disminuye la velocidad del proceso de autoactivación de los tripsinógenos (Chen *et al.*, 2003; Nemoda and Sahin-Tóth, 2005). El tripsinógeno quimérico TgQ contiene los cuatro aspartatos en su péptido de activación, sin embargo la toxicidad de TgQ sobre *P. pastoris* es sólo un poco menor que la que tiene el tripsinógeno de camarón, indicando que probablemente la velocidad de autoactivación del TgQ es sólo un poco menor que la del tripsinógeno de camarón. La inhibición de la autoactivación por los cuatro aspartatos del péptido de activación se ha correlacionado con una interacción desfavorable de estos aspartatos con la cavidad hidrofóbica que presenta la tripsina en su sitio activo, además de una repulsión electrostática de uno de los aspartatos del péptido de activación y el Asp<sup>218</sup> (numeración tripsina humana) de la tripsina que se encuentra en su sitio activo (Nemoda and Sahin-Tóth., 2005). Un estudio detallado de la secuencia aminoacídica del tripsinógeno II del camarón *L. vannamei* muestra que este tripsinógeno tiene un residuo de tirosina en la posición equivalente al Asp<sup>218</sup> de la tripsina humana, lo cual disminuiría la repulsión electrostática del péptido de activación de TgQ y por lo tanto pudiera mostrar un proceso de autoactivación con una velocidad intermedia entre la correspondiente al tripsinógeno de camarón y la del tripsinógeno de vertebrados. Esta hipótesis está en concordancia con los

resultados de este trabajo que muestran una menor toxicidad de TgQ que el tripsinógeno de camarón sobre las células hospederas de *P. pastoris*.

Para terminar de comprobar esta hipótesis, se podría hacer una mutación puntual en TgQ de tal forma que se reemplace el residuo de tirosina del sitio activo por una aspártico y posteriormente hacer ensayos de toxicidad comparativos sobre *P. pastoris* o bien ensayos de autoactivación del TgQ mutado. Además, este TgQ mutado podría ser más estable que TgQ, lo cual facilitaría su producción en *P. pastoris* y su posterior autoactivación controlada para producir tripsina de camarón recombinante.

En el presente trabajo se ha conseguido construir por primera vez cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico formado por la tripsina del camarón *L. vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno humano. Además, mediante cinéticas de crecimiento comparativas realizadas en condiciones de inducción, se evaluó la toxicidad del tripsinógeno quimérico sobre células de *P. pastoris*, y se correlacionó con el mecanismo de autoactivación de los tripsinógenos.

## 8. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se han construido por primera vez cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico formado por la tripsina del camarón *L. vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno humano.
2. Mediante cinéticas de crecimiento comparativas realizadas en condiciones de inducción, se evaluó la toxicidad del tripsinógeno quimérico sobre células de *P. pastoris*, y se correlacionó con el mecanismo de autoactivación de los tripsinógenos.
3. En los medios de cultivo BMM y BMMS, TgQ y el tripsinógeno de camarón presentan toxicidad sobre las células hospederas de *P. pastoris*.
4. En el medio de cultivo BMMS, TgQ presenta menor toxicidad que el tripsinógeno de camarón sobre las células hospederas de *P. pastoris*.
5. La adición de alanina en el medio de cultivo inductor genera una mayor disminución de la toxicidad de TgQ y el tripsinógeno de camarón sobre las células del hospedero que la adición de sorbitol.
6. La alanina tiene un efecto adicional que estimula el crecimiento celular en las cepas KM71TgQ y KM71Tg4 y no tiene efecto en la cepa control (KM71PhyC), siendo este efecto adicional mayor en la cepa KM71TgQ.
7. Probablemente la velocidad de autoactivación del TgQ es ligeramente menor que la del tripsinógeno de camarón.
8. El residuo de tirosina de TgQ en la posición equivalente al Asp<sup>218</sup> de la tripsina humana podría disminuir la repulsión electrostática del péptido de activación de TgQ que generaría un proceso de autoactivación con una velocidad intermedia entre la correspondiente al tripsinógeno de camarón y la del tripsinógeno de vertebrados.
9. TgQ presenta menor toxicidad que el tripsinógeno de camarón sobre células de *P. pastoris* y se podría producir en un medio inductor adicionado con sorbitol o alanina.
10. Los niveles de producción de TgQ en *P. pastoris* aumentarían realizando una mutación puntual de una tirosina a ácido aspártico en la posición equivalente a la posición 218 de la tripsina humana, la cual disminuiría la autoactivación del tripsinógeno quimérico y por lo tanto su toxicidad sobre *P. pastoris*.

# APÉNDICES

## APÉNDICE A

### Preparación de medios, soluciones y reactivos

#### **YPD/ YPD agar. (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 1%)**

Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa en 1000 mL de agua bidestilada. Esterilizar en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup>. Almacenar a temperatura ambiente o a 4°C. La vida media de esta solución es de varios meses. Cuando se requiera YPD agar, la mezcla anterior y además 20 g de agar, mezclar bien y esterilizar por autoclave. Dejar enfriar y vertir cuidadosamente en placas Petri. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

#### **10 XD (Glucosa 20%)**

Disolver 20 g de glucosa en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

#### **Buffer de fosfatos 1M, pH 6**

Disolver 1.03 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 12.8 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 80 mL de agua destilada, ajustar el pH con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o con KOH, aforar a 100 mL y esterilizar 20 min a 15 lb/pulg<sup>2</sup> a 121°C. Almacenar a temperatura ambiente.

#### **500X B. (Biotina 0.02%)**

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada, esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

#### **Glicerol 10%**

Mezclar 100 mL de glicerol absoluto y aforar a 1000 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C.

#### **10X YNB. (Base de levadura nitrogenada con sulfato de amonio y sin aminoácidos 13.4%)**

Disolver 134 g de YNB en 1000 mL de agua destilada, esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C

#### **Azul brillante de Coomassie (Proteínas totales)**

Disolver 100 mg del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol al 95%. Agitar vigorosamente. Agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85%. Mezclar vigorosamente por 20-30 min. Llevar a 1 L con agua destilada, agitar por 20-30 min y filtrar con papel Whatman no. 1 para eliminar el colorante no disuelto. Guardar el reactivo en un frasco oscuro a 4°C.

#### **Solución de albúmina sérica bovina (50 µg/µL)**

Pesar 5 mg de ASB en un matraz de aforación de 5 mL y aforar con agua destilada (ASB 1 µg/µL). Colocar 250 µL de esta solución en un matraz de aforación de 5 mL y aforar con agua destilada.

**EDTA 500 mM pH 8.0**

Disolver 18.6 g de EDTA en 80 mL de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10N (o lentejas de NaOH). Aforar a 100 mL. Esterilizar por autoclave, almacenar a temperatura ambiente. Nota: El EDTA no se disolverá hasta que la solución alcance el pH 8.0

**IPTG (10 mM)**

Disolver 238 mg de IPTG (Promega Num. Cat V395A) en 10 mL de agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

**Medio Luria-Bertani (LB)**

Disolver 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 1 Litro de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 10 M. Cuando se requiera LB-agar, adicionar a la mezcla anterior 15 g de agar. Esterilizar por autoclave. Enfriar, agregar la ampicilina (100 ug/mL), homogenizar y vaciar 4 mL en tubos corning capacidad 15 mL, o en cajas de Petri. Almacenar a 4°C o temperatura ambiente.

**Persulfato de amonio (10%)**

Disolver 200 mg de persulfato de amonio en 2 mL de agua bidestilada. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es aproximadamente 2 semanas.

**X-Gal (50 mg/mL)**

Se empleó una solución preparada por Promega (Promega Num. Cat. V3941). Esta solución se empleó directamente del frasco botella. Esta solución es almacenada a -20°C hasta su uso.

**Medio RDB y RDBH (Sorbitol 1M, agar 2%, glucosa 2%, YNB 1.34%, biotina 4 x 10<sup>-5</sup>%, aminoácidos 0.005%, ± histidina 0.004%)**

Disolver 93 g de sorbitol y 10 g de agar bacteriológico en 350 mL de agua bidestilada. Esterilizar en autoclave, enfriar y mantener a 60°C. Esterilizar en autoclave 44 mL de agua bidestilada, enfriar y agregar 50 mL de dextrosa 20%, 50 mL YNB 10X, 1 mL de biotina 500X, 5 mL de aminoácidos 100X y precalentar a 45°C. \*Agregar 5 mL de Histidina 100X a la mezcla precalentada, para el crecimiento de cepas his4 (prueba de viabilidad). Adicionar la mezcla precalentada a 45°C, al sorbitol y agar mantenidos a 60°C (345 mL de agua estéril más sorbitol y agar). Homogenizar, vaciar en cajas de Petri, y sellar una vez que solidifica el medio. Almacenar a 4°C o temperatura ambiente.

**Buffer TBE, 10X**

Solución Stock 10X. Disolver 108 g de Trizma base, 55 g de ácido bórico y 9.3 g de EDTA en 600 mL de agua bidestilada, aforar a 1000 mL con agua bidestilada y esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

**Buffer TBE, 1X**

Solución de trabajo 1X: Mezclar 100 mL de TBE 10X y agregar 900 mL de agua bidestilada (Volumen final 1 litro). Almacenar a temperatura ambiente.



**Solución Fijadora (metanol 50%, ácido acético 10%)**

Mezclar 250 mL de metanol, con 50 mL de ácido acético y aforar con agua destilada a 500 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

**Solución decolorante (metanol 5%, ácido acético 7%)**

Mezclar 50 mL de metanol con 70 mL de ácido acético, y aforar con agua destilada a 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

**SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sodio)**

Disolver 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Calentar a 68°C para facilitar su disolución.

**Histidina 100X Histidina (0.4%)**

Disolver 400 mg de L-histidina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de aproximadamente 1 año.

**Buffer Tris-EDTA (TE pH 8.0, 1X) (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0)**

Mezclar 2 mL de EDTA 0.5 mM pH 8.0 con 10 mL de Tris-HCl pH 8.0). Aforar a 1L con agua destilada. Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente

**CaCl<sub>2</sub> 1 M**

Disolver 11.1 g de CaCl<sub>2</sub> en 80 mL de agua bidestilada. Aforar a 100 mL, esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente o en frío.

**Buffer de primer lavado (Purificación de proteínas) (Tris-HCl 20 mM pH 7.6)**

Disolver 484 mg de Tris en 100 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.6 con HCl. Aforar a 200 mL. Esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C.

**Buffer de segundo lavado (Purificación de proteínas) (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, CaCl<sub>2</sub> 1 mM)**

Disolver 1.214 g de Tris en 250 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.6 con HCl. Agregar 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Mezclar bien. Aforar a 500 mL con agua bidestilada. Esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C

**Buffer de electroforesis SDS-PAGE 5X**

Pesar 3.8 g de Trizma base, 18.0 g de glicina, 1.3 g de SDS y disolver cuidadosamente en 150 mL de agua bidestilada. Aforar a 250 mL con agua bidestilada. Guardar en refrigeración. Diluir a 1X con agua bidestilada justo antes de usarse.

**Buffer Tris-HCl/SDS pH 8.8 4X (Solución tampón concentrada para SDS-PAGE)**

Disolver 9.1 g de Trizma base en 30 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 50 mL con agua bidestilada. Agregar 0.2 g de SDS sólido y disolver. Almacenar a 4°C hasta un mes.

**Buffer Tris-Cl/SDS pH 6.8 4X (Solución tampón concentrada para SDS-PAGE)**

Disolver 0.605 g de Trizma base en 5 mL de agua. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 10 mL con agua destilada. Agregar 0.04 g de SDS sólido y disolver. Almacenar a 4°C hasta un mes.

**Bromuro de etidio (10 mg/mL)**

Disolver 1.0 g de bromuro de etidio en 100 mL de agua bidestilada. Mezclar cuidadosamente con una barra magnética durante varias horas, hasta asegurarse que el colorante se haya disuelto. Cubrir el frasco que lo contiene con papel aluminio o transferirlo a un bote oscuro y almacenar a 4°C. Para la solución de trabajo, preparar bromuro de etidio 2 µg/mL en TBE 1X. Nota: el bromuro de etidio es un poderoso mutágeno, use guantes y cubrebocas cuando lo prepare.

**Azul brillante de Coomassie (SDS-PAGE) (Azul brillante de Coomassie R250 0.05%, metanol 50%, ácido acético 10%)**

Disolver 0.05 g de azul brillante de Coomassie R250 en 30 mL de agua bidestilada. Agregar 50 mL de metanol y 10 mL de ácido acético. Aforar a 100 mL. Almacenar a 4°C en un frasco ámbar o cubierto de la luz.

**Alanina 8%**

Disolver 8 g de L-Alanina, en 80 mL de agua bidestilada. Aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

**Acrilamida-bisacrilamida**

Se empleó una solución preparada por BIORAD (BIORAD Num. Cat. 161-0154) que contiene los siguientes componentes: Acrilamida 28.5%, N,N'-metilen-bisacrilamida 1.5% (Radio 19:1). Esta solución se empleó directamente de la botella. Esta solución es almacenada a 4°C hasta su uso sin desgasificar para geles SDS-PAGE 12 o 15%.

**Agarosa 0.8%**

Mezclar 0.8 g de agarosa con 100 mL de TBE 1X. Calentar de 1-2 min. Vaciar en el molde. Dejar solidificar.

**Agarosa 2.5%**

Mezclar 2.5 g de agarosa con 100 mL de TBE 1X. Calentar de 1-2 min. Vaciar en el molde. Dejar solidificar.

**Aminoácidos (AA 100X) (0.5% de cada Aminoácido)**

Disolver 500 mg de los siguientes aminoácidos: ácido L-glutámico, L-Metionina, L-Lisina, L-Leucina e Isoleucina en 100 mL de agua. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es aproximadamente 1 año.

**Jugo azul (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)**

Mezclar 25 mg de azul de bromofenol y 25 mg de xilencianol con 3 mL de glicerol. Aforar con agua bidestilada a 10 mL. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

**Méδιο SOC**

Disolver 2 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 mL de NaCl 1M y KCl 1M en 97 mL de agua bidestilada. Agitar hasta disolver. Autoclavear y enfriar a

temperatura ambiente. Añadir stock de  $Mg^{2+}$  y glucosa 2M, cada uno de estos 2 últimos hasta alcanzar la concentración final de 20 mM. Aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente

**NaCl (1 M) (Medio SOC)**

Disolver 5.84 g de NaCl y aforar a 50 mL con agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente

**KCl (1 M) (Medio SOC)**

Disolver 3.72 g de KCL y aforar a 50 mL con agua bidestilada. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente

**Glucosa 2 M (Medio SOC)**

Disolver 36.04 g de D-glucosa en 50 mL de agua bidestilada estéril. Aforar a 100 mL con agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

**Stock de  $Mg^{2+}$  2M (Medio SOC)**

Disolver 9.52 g de  $MgCl_2$  y 24.65 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  en 100 mL de agua bidestilada estéril. Esterilizar por filtración.

**BMG (Medio mínimo glicerol amortiguado). (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 YNB 1.34%, glicerol 1%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ %)**

Para 100 mL de BMG, mezclar 10 mL de buffer de fosfato de potasio 1M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 mL de biotina 500X, 10 mL de glicerol 10% y 70 mL de agua destilada estéril. Distribuir en alícuotas y poner de 48-72 h a prueba de esterilidad (30°C), antes de su uso.

**BMM (Medio mínimo metanol amortiguado) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 YNB 1.34%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ %)**

Para 100 mL de BMM, mezclar 10 mL de buffer de fosfato de potasio 1M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 0.2 ml de B500X, y 80 mL de agua destilada estéril. Distribuir en alícuotas y poner de 48 -72 h a prueba de esterilidad (30°C), antes de su uso.

**BMMS (Medio mínimo con metanol amortiguado y suplementado con sorbitol) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 YNB 1.34%, sorbitol 2%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ %)**

Para 100 mL de BMMS, mezclar 10 mL de buffer de fosfato de potasio 1M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 10 mL de sorbitol 20%, 0.2 ml de B500X, y 70 mL de agua destilada estéril. Distribuir en alícuotas y poner de 48 -72 h a prueba de esterilidad (30°C), antes de su uso.

**BMMA (Medio mínimo con metanol amortiguado y suplementado con alanina) (Fosfato de potasio 100 mM pH 6.0 YNB 1.34%, alanina 0.8%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ %)**

Para 100 mL de BMM, mezclar 10 mL de buffer de fosfato de potasio 1M pH 6.0, 10 mL de YNB 10X, 10 mL de alanina 8%, 0.2 ml de B500X, y 70 mL de agua destilada estéril. Distribuir en alícuotas y poner de 48 -72 h a prueba de esterilidad (30°C), antes de su uso.

**Buffer de electrotransferencia Towbin (Tris-Base 25 mM, Glicina 186 mM, metanol 20%)**

Para 1 litro, pesar 3.02 g de Trizma Base, 14.71 g de glicina y 200 mL de metanol al 20%, disolverlos en 1 L de agua destilada, sin ajustar el pH. Almacenar a 4°C.

**Buffer PBS 10X**

Pesar 80 g de cloruro de sodio (NaCl), 2 g de cloruro de potasio (KCl), 11.5 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) y 2 g de fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Agregar 1 L de agua miliQ y se agita hasta disolver bien. Antes de verter en el recipiente que lo contendrá, éste debe enjuagarse bien con agua destilada y miliQ para evitar contaminación. Almacenar a 4°C.

**Buffer TBS (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 0.9%)**

Pesar 12.1 g de Trizma Base, 9 g de cloruro de sodio (NaCl). Agregar 500 mL de agua destilada y disolver bien, ajustar el pH a 7.5 con ácido clorhídrico (HCl) 1 M, aforar a 1 L con agua destilada. Almacenar a 4°C.

**Buffer TTBS (TBS, 0.1% Tween 20)**

Seguir el procedimiento normal para preparar TBS y agregar 1 mL de Tween 20. Disolver agitando. Almacenar a 4°C.

**SEVAG (Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1)**

Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico. No esterilizar.

**NaOH (10 N)**

Disolver 10 g de NaOH anhidro en agua ultrapura a 25 mL. Esterilizar por autoclave.

**Solución amortiguadora de lisis (TSNT) (Triton 100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-Cl 100 mM pH 8.8, EDTA 1 mM)**

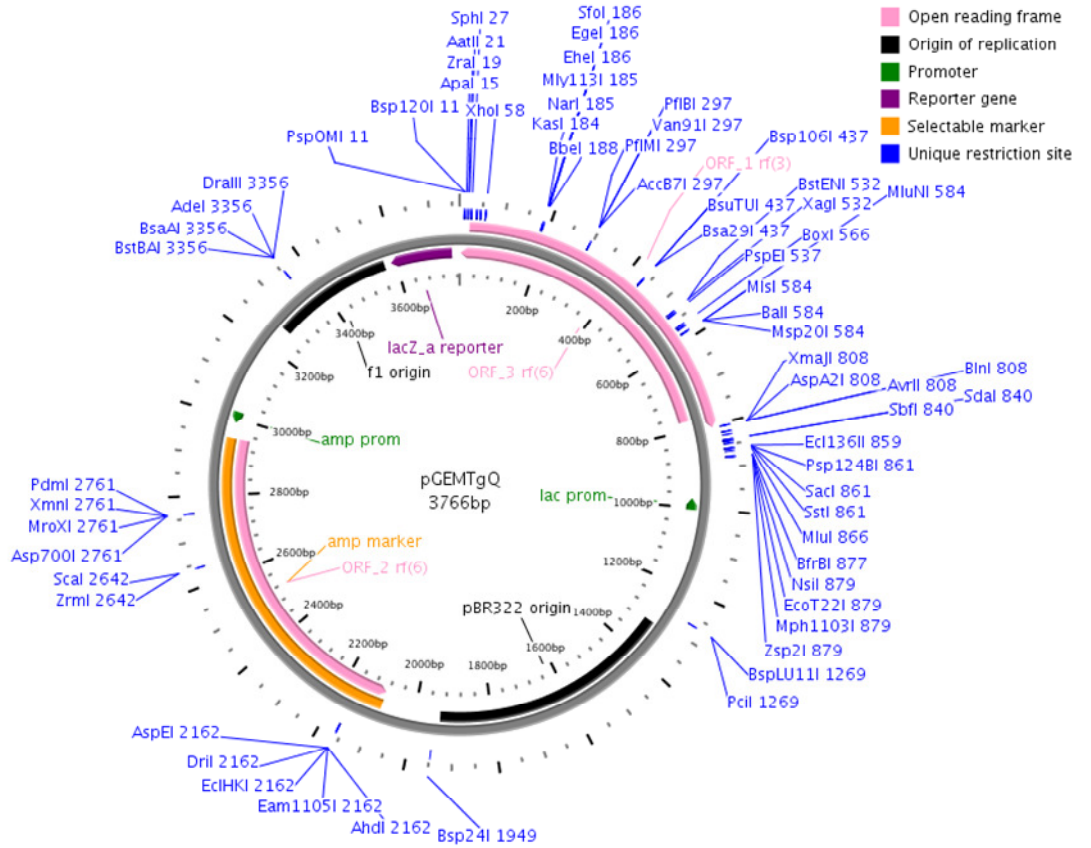
Disolver 500 microlitros de Triton 100 en 15 mL de agua destilada, posteriormente disolver 146.25 mg de NaCl, agregar 2.5 mL de SDS al 10%, agregar 500 µL de Tris-Cl 500 mM pH 8 y 50 µL de EDTA 500 mM. Aforar a 25 mL. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

**Tris-Cl 500 mM pH 8**

Disolver 6.05 g de Tris en 50 mL. Ajustar el pH a 8 con HCl. Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Esterilizar por autoclave. Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente.

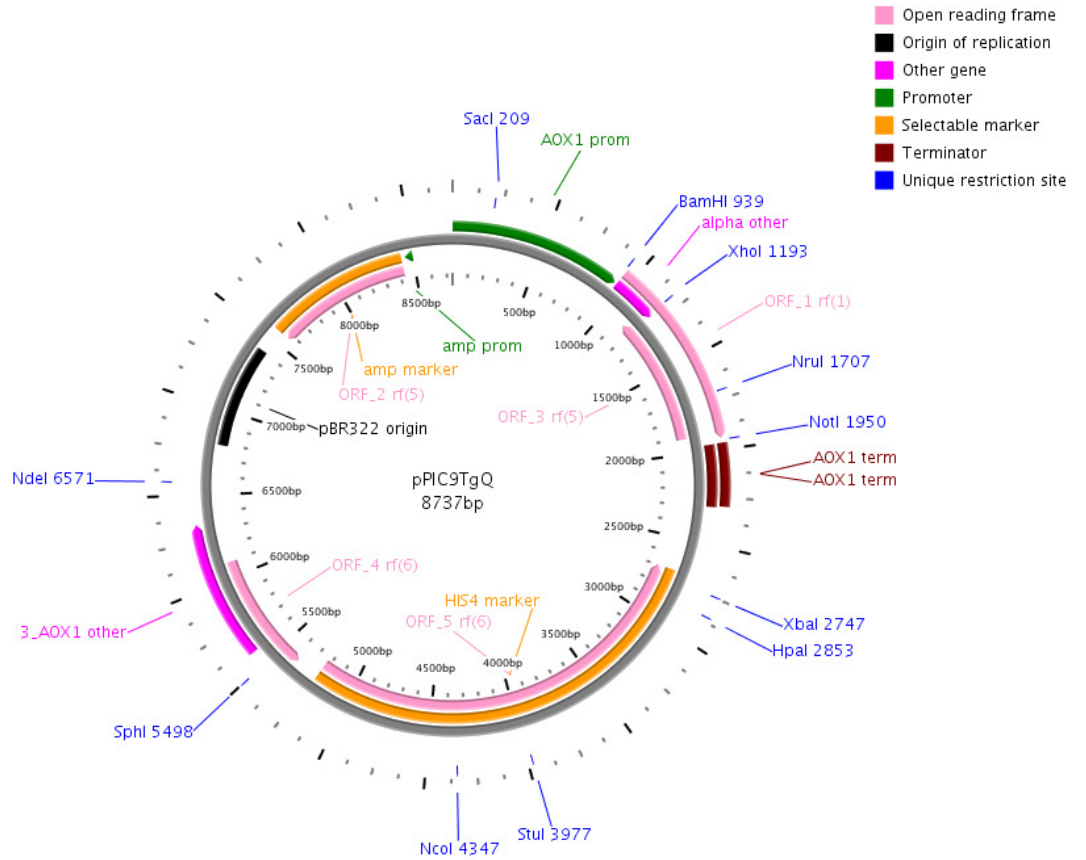
# APÉNDICE B

## Plásmido pGEMTgQ



# APÉNDICE C

## Plásmido pPIC9TgQ



## APÉNDICE D

### Secuencia nucleotídica de la tripsina de camarón *Litopenaeus vannamei*

LOCUS X86369 854 bp mRNA linear INV  
18-APR-2005  
DEFINITION P.vannamei mRNA for trypsin.  
ACCESSION X86369  
VERSION X86369.1 GI:785034  
KEYWORDS trypsin.  
SOURCE Litopenaeus vannamei (Pacific white shrimp)  
ORGANISM [Litopenaeus vannamei](#)  
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;  
Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Dendrobranchiata;  
Penaeoidea;  
Penaeidae; Litopenaeus.  
REFERENCE 1  
AUTHORS Klein,B., Le Moullac,G., Sellos,D. and Van Wormhoudt,A.  
TITLE Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from  
Penaeus  
vannamei (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene  
expression  
during the moult cycle  
JOURNAL Int. J. Biochem. Cell Biol. 28 (5), 551-563 (1996)  
PUBMED [8697100](#)  
REFERENCE 2 (bases 1 to 854)  
AUTHORS Van Wormhoudt,A.E.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (18-APR<sup>-1995</sup>) A.E. Van Wormhoudt, College de  
France /  
CNRS, Laboratoire de Biologie Marine, BP 225, 29182  
Concarneau,  
FRANCE  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..854  
/organism="Litopenaeus vannamei"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:[6689](#)"  
/tissue\_type="hepatopancreas"  
/dev\_stage="adult"  
[CDS](#) 3..803  
/EC\_number="[3.4.21.4](#)"  
/codon\_start=1  
/product="trypsin"  
/protein\_id="[CAA60129.1](#)"  
/db\_xref="GI:785035"  
/db\_xref="GOA:[Q27761](#)"  
/db\_xref="HSSP:[P00760](#)"  
/db\_xref="InterPro:[IPR001254](#)"  
/db\_xref="InterPro:[IPR001314](#)"  
/db\_xref="InterPro:[IPR009003](#)"  
/db\_xref="UniProtKB/TrEMBL:[Q27761](#)"  
/translation="MKTLILCVLLAGAFAPSRKPTFRRGLNKIVGGTDTATPGELPYQ  
LSFQDISFGFAWHFCGASIYNENWAICAGHCVQGEDMNNPDYLVVAGELNQDVDEGT  
EQTIVLSKIIQHEDYNGFTISNDISLLKLSQPLSFNDNVRAIDIPAQGHASGDCIVS  
GWGTTSEGGSTPSVLQKVTVPIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGGKDCSQGDS  
GGPLACSDTASTYLAGIVSWGYGARPGYPGVYAEVSYHVDWIKANAV"  
[sig\\_peptide](#) 3..41  
ORIGIN  
1 ccatgaagac cctcatcctc tgtgtgctcc ttgctggagc ttttgccgcc cctccagga

```
61 agccacctt cgcgcggt ctcaacaaga tcgtcggagg aactgacgcc actccggag
121 agctgcctta ccagtcagt ttccaggaca tctccttcgg ctttgctgg cacttctgcg
181 gcgcctccat ctacaacgag aactgggcca tctgcgcggg ccaactgcgtc cagggcgagg
241 acatgaacaa ccccgattac cttcaggctc ttgccggaga acttaaccag gatgtggatg
301 agggcaccga gcagacggtc atcctctcca agatcatcca acacgaggac tacaacggct
361 tcaccatcag caacgacatc tccctgtcga agctgtctca gcctctgagc ttcaatgaca
421 acgttcgcgc catcgatatt cccgctcagg gtcacgctgc ctctggcgac tgcacgtct
481 ccggctgggg caccacctcc gagggaggaa gcaccccagc tgtcctgcag aaggtgaccg
541 ttcccatcgt gtctgacgac gagtgtcgcg atgcttatgg ccagagcgac attgaggact
601 ccatgatctg tgcggagtgc cccgagggcg gcaaggactc gtgccagggt gactctggcg
661 gcccccttgc ctgctctgac acggcctcca cctacctggc cggcatcgtg tcctggggct
721 acggctgtgc ccgtcccgc taccctggcg tgtacgctga ggtctctac catgtcgatt
781 ggattaaggc caatgctgtt taatcaagtt gtttaacatg tacttacctt gaaagcaata
841 aagaaaaaaa tata
```



## APÉNDICE E

### Secuencia nucleotídica de la Tripsinógeno de *Homo sapiens*

LOCUS HUMTRPSGNA 800 bp mRNA linear PRI  
14-JAN-1995

DEFINITION Human pancreatic trypsin 1 (TRY1) mRNA, complete cds.  
ACCESSION M22612  
VERSION M22612.1 GI:521215  
KEYWORDS trypsinogen.  
SOURCE Homo sapiens (human)  
ORGANISM [Homo sapiens](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;  
Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 800)  
AUTHORS Emi,M., Nakamura,Y., Ogawa,M., Yamamoto,T., Nishide,T.,  
Mori,T. and Matsubara,K.  
TITLE Cloning, characterization and nucleotide sequences of two  
cDNAs  
encoding human pancreatic trypsinogens  
JOURNAL Gene 41 (2-3), 305-310 (1986)  
PUBMED [3011602](#)  
COMMENT On Aug 4, 1994 this sequence version replaced gi:[340723](#).  
Original source text: Homo sapiens pancreas cDNA to  
mRNA.

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..800 /organism="Homo sapiens" /mol_type="mRNA" /db_xref="taxon: <a href="#">9606</a> " /map="7q32-qter" /tissue_type="pancreas"
<a href="#">gene</a>	1..800 /gene="TRY1"
<a href="#">CDS</a>	7..750 /gene="TRY1" /codon_start=1 /product="trypsinogen" /protein_id=" <a href="#">AAA61231.1</a> " /db_xref="GI:521216" /db_xref="GDB:G00-119-620"

/translation="MNPLLILTFVAAALAAPFDDDDKIVGGYNCEENSVPYQVSLNSG  
YHFCGGSLINEQWVVSAGHCYKSRIQVRLGEHNIIEVLEGNEQFINAAKIIIRHPQYDRK  
TLNNDIMLIKLSRAVINARVSTISLPTAPPATGKCLISGWGNTASSGADYPDELQC  
LDAPVLSQAKCEASYPGKITSNMFVGVFLEGGKDCQGDSSGGPVCVNGQLQGVVSWG  
GCAQKNKPGVYTKVYNYVKWIKNTIAANS"

<a href="#">sig_peptide</a>	7..51 /gene="TRY1" /note="G00-119-620"
<a href="#">mat_peptide</a>	76..747 /gene="TRY1" /product="trypsinogen" /note="G00-119-620"
<a href="#">polyA_signal</a>	781..786 /gene="TRY1" /note="G00-119-620"

[polyA\\_site](#)

800

/gene="TRY1"

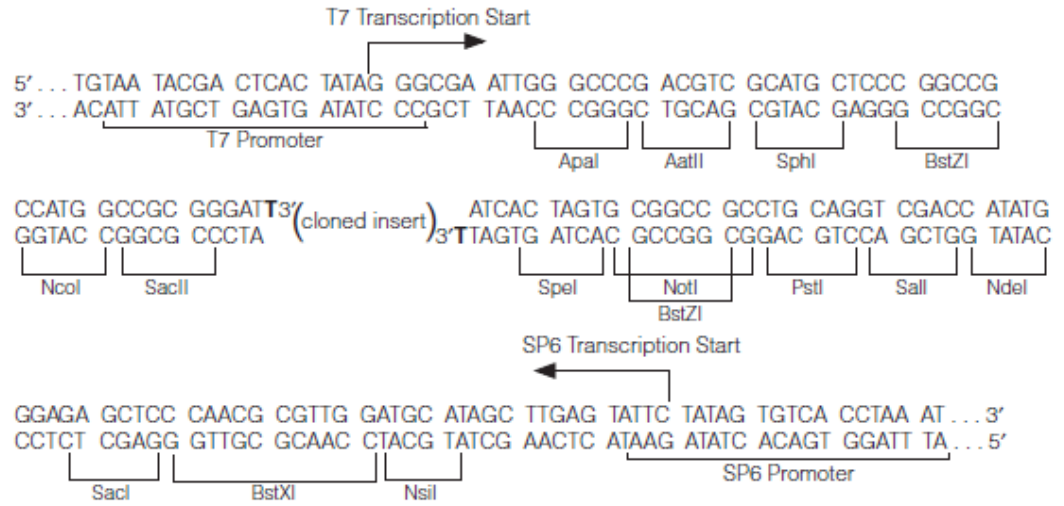
/note="G00-119-620"

ORIGIN

```
1 accaccatga atccactcct gatccttacc tttgtggcag ctgctcttgc tgcccccttt
61 gatgatgatg acaagatcgt tgggggctac aactgtgagg agaattctgt ccctaccag
121 gtgtccctga attctggcta ccacttctgt ggtggctccc tcatcaacga acagtgggtg
181 gtatcagcag gccactgcta caagtcccgc atccaggta gactgggaga gcacaacatc
241 gaagtcctgg aggggaatga gcagttcatc aatgcagcca agatcatccg ccacccccaa
301 tacgacagga agactctgaa caatgacatc atgttaatca agctctcctc acgtgcagta
361 atcaacgccc gcgtgtccac catctctctg cccaccgccc ctccagccac tggcacgaag
421 tgctcatct ctggctgggg caacactgcg agctctggcg ccgactaccg agacgagctg
481 cagtgcctgg atgctcctgt gctgagccag gctaagtgtg aagcctccta ccctggaaag
541 attaccagca acatgttctg tgtgggcttc cttgaggag gcaaggattc atgtcagggt
601 gattctggtg gccctgtggt ctgcaatgga cagctccaag gagttgtctc ctggggtgat
661 ggctgtgccc agaagaacaa gcctggagtc tacaccaagg tctacaacta cgtgaaatgg
721 attaagaaca ccatagctgc caatagctaa agccccagc atctcttcag tctctatacc
781 aataaagtga ccctgttctc
```

# APÉNDICE F

## MCS del Vector pGEM



## APÉNDICE G

### Secuencia nucleotídica de pPIC9

LOCUS Z46233 8020 bp DNA linear PLN  
14-NOV-2006  
DEFINITION P.pastoris DNA for pPIC9 expression vector.  
ACCESSION Z46233  
VERSION Z46233.1 GI:559514  
KEYWORDS beta-lactamase.  
SOURCE Pichia pastoris  
ORGANISM [Pichia pastoris](#)  
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomyceta;  
Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales;  
Saccharomycetaceae; Pichia.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 7757)  
AUTHORS Scorer,C.A., Clare,J.J., McCombie,W.R., Romanos,M.A. and  
Sreerishna,K.  
TITLE Rapid selection using G418 of high copy number  
transformants of  
Pichia pastoris for high-level foreign gene expression  
JOURNAL Biotechnology (N.Y.) 12 (2), 181-184 (1994)  
PUBMED [7764433](#)  
REFERENCE 2 (bases 1 to 8020)  
AUTHORS Romanos,M.A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (18-OCT-1994) Romanos M. A., Wellcome Research  
Laboratories, Biology Division, Langley Court,  
Beckenham, Kent, UK,  
BR3 3BS  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..8020  
/organism="Pichia pastoris"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:[4922](#)"  
/clone="pPIC3"  
[misc\\_feature](#) 1..8020  
/standard\_name="pPIC9"  
/function="Pichia alpha-factor secretion  
vector"  
/label=pPIC9  
[terminator](#) 1..354  
/standard\_name="AOX1"  
[CDS](#) complement (1250..3280)  
/standard\_name="HIS4"  
/codon\_start=1  
/protein\_id="[CAA86304.1](#)"  
/db\_xref="GI:559515"  
/db\_xref="GOA:[Q12201](#)"  
/db\_xref="HSSP:[P06988](#)"  
/db\_xref="InterPro:[IPR001692](#)"  
/db\_xref="InterPro:[IPR002496](#)"  
/db\_xref="InterPro:[IPR008179](#)"  
/db\_xref="UniProtKB/TrEMBL:[Q12201](#)"  
/translation="MTFPLLPAYASVAEFDNSLSLVGKAVFPYAADQLHNLIKFTQST  
ELQVNVQVESSVTEDQFEELIDNLLKLYNNGINEVILDLDLAERVVQRMIPGARVIYR  
TLVDKVASLPANASIAVPFSSPLGDLKSFNNGSRTVYAFSETAKLVDVSTVSAAGII  
PIIDARQLTTEYELSEDVKKFPVSEILLASLTTDRPDGLFTTLVADSSNYSGLVYSS

KKSIPEAIRTQTGVYQSRRHGLWYKGGTSGRTQKLLGIELDCDGDCLKFVVEQTVGVF  
 CHLERTSCFGQSKGLRAMEAPCGIVRAMLQKVLIPNGYLTTFKFLNAKIREEDELAE  
 AKSKEDIWECADLFYFALVRCAYKVTLEVERNLDMKSLKVRTRKGDAPGYTKEQ  
 PKESKPKEVPSEGRIELCKIDVSKASSQEI EDALRRPIQKTEQIMELVKPIVDNVRQ  
 NGDKALLELTAKFDGVALKTPVLEAPFPEELMQLPDNVKRAIDLSDNVRKFHEAQLT  
 ETLQVETCPGVVCSRFRARPIEKVGLYIPGGTALPSTSLMLGVPKAVAGCKEIVFASP  
 PKKDGTLTPEVIYVAHKVGAACIVLAGGAQAVAAAMAYGTETVPKCKDIFGPGNQFVTA  
 AKMMVQNDTSALCSIDMPAGPSEVLVIADKYADPDFVASDLLLKLNMVLIPIR"

[misc\\_feature](#) 3589..4036  
 /standard\_name="3' AOX1"  
[mRNA](#) complement (5606..6466)  
 /product="beta-lactamase"  
 /standard\_name="AmpR"  
[promoter](#) 6766..7703  
 /standard\_name="AOX1"  
[sig\\_peptide](#) 7727..7979  
 /standard\_name="alpha factor leader"

ORIGIN

```

1 ggggcccga attaatcgc cttagacatg actgttcctc agttcaagtt gggcacttac
61 gagaagaccg gtcttgctag attctaatac agaggatgct agaatgcoat ttgcttgaga
121 gatgcaggct tcatttttga tactttttta tttgtaacct ataatagata ggattttttt
181 tgtcattttg tttcttctcg tacgagcttg ctcctgatca gcctatctcg cagctgatga
241 atactctgtg gtagggggtt gggaaaatca ttcgagtttg atgttttctc tggatattcc
301 cactcctctt cagagtacag aagattaagt gagaagttcg tttgtgcaag cttatcgata
361 agctttaatg cggtagttta tcacagttaa attgctaacg cagtcaggca ccgtgtatga
421 aatctaaca tgcgctcctc gtcatcctcg gcaccgtcac cctggatgct gtaggcatag
481 gcttggttat gccggctact cgggacctc tgcgggatat cgtccatctc gacagcatcg
541 ccagtcacta tggcgtgctg ctagcgtat atgcgttgat gcaatttcta tgcgcacccg
601 ttctcggagc actgtccgac cgctttggcc gccgcccagt cctgctcgtc tcgctacttg
661 gagccactat cgactacgcg atcatggcga ccacaccgt cctgtggatc tatcgaatct
721 aaatgtaagt taaaatctct aaataattaa ataagtccca gtttctcctc acgaacctta
781 acagcattgc ggtgagcctc tagaccttca acagcagcca gatccatcac tgcctggcca
841 atatgtttca gtcctcagg agttacgtct tgtgaagtga tgaactctcg gaaggttgca
901 gtgttaactc cgctgtattg acgggcatac ccgtacgttg gcaaatgtgt gttggtaccg
961 gaggagtta cccacaact ctctggagag taggcaccaa caaacacaga tccagcgtgt
1021 tgtacttgat caacataaga agaagcattc tcgatttgca ggatcaagtg ttcaggagcg
1081 tactgattgg acatttccaa agcctgctcg taggttgcaa ccgatagggt tgtagagtgt
1141 gcaatacact tgcgtacaat ttcaacctt ggcaactgca cagcttggtt gtgaacagca
1201 tcttcaattc tggcaagctc cttgtctgtc atactgacag ccaacagaat cacctgggaa
1261 tcaataccat gttcagcttg agcagaaggt ctgaggcaac gaaatctgga tcagcgtatt
1321 tatcagcaat aactagaact tcagaaggcc cagcaggcat gtcaatacta cacagggctg
1381 atgtgtcatt ttgaacctc atcttggcag cagtaacgaa ctggttctct ggaccaaata
1441 ttttgtcaca cttaggaaca gtttctgttc cgtaagccat agcagctact gcctgggccc
1501 ctctgcttag cacgatacac ttagcaccaa ccttgtgggc aacgtagatg acttctgggg
1561 taagggtacc atccttctta ggtggagatg caaaaacaat ttctttgcaa ccagcaactt
1621 tggcaggaac acccagcctc agggaggtgg aaggcagaat tgcggttcca ccaggaatat
1681 agaggccaac tttctcaata ggtcttgcaa aacgagagca gactacaca gggcaagtct
1741 caacttgcaa cgtctccgtt agttgagctt catggaattt cctgacgcta tctatagaga
1801 gatcaatggc tctcttaacg ttatctggca attgcataag ttctctggg aaaggagctt
1861 ctaacacagg tgtcttcaaa gcgactccat caaacttggc agttagttct aaaagggctt
1921 tgtcaccatt ttgacgaaca ttgtcgacaa ttggtttgac taattccata atctgttccg
1981 ttttctggat aggacgaca agggcatctt caatttcttg tgaggaggcg ttagaacctt
2041 caattttgca caattcaata cgacctcag aagggaactt tttaggtttg gattcttctt
2101 taggttggtc cttggtgtat cctggcttgg catctcctt ccttctagtg accttaggg
2161 acttcatatc caggtttctc tccacctcgt ccaactcctc accgacttg gcacatctaa
2221 ctaatgcaaa ataaaaataag tcagcacatt cccaggctat atcttctctg gatttagctt
2281 ctgcaagttc atcagcttcc tccctaattt tagcgttcaa acaaaacttc gtcgtcaaat
2341 aaccgtttgg tataagaacc ttctggagca ttgctcttac gatcccaca ggtgcttcca
2401 tggctctaag accctttgat tggccaaaac aggaagtgcg ttccaagtga cagaaccaa
2461 cacctgtttg ttcaaccaca aattcaagc agtctccatc acaatccaat tcgataccca
2521 gcaacttttg agttcgtcca gatgtagcac ctttatacca caaacctgta cgacgagatt
2581 ggtagactcc agtttgtgtc cttatagcct ccggaataga ctttttggag gattacacca
2641 ggcccaacga gtaattagaa gagtacgcca ccaaatagat gaatagacca tccggggcgt
2701 cagtagtcaa agacgccaac aaaatctcac tgacagggaa ctttttgaca tcttcagaaa
2761 gttcgtatcc agtagtcaat tgccgagcat caataatggg gattatacca gaagcaacag
2821 tggaggtcac atctaccaac tttgcggctc cagaaaaagc ataaacagtt ctactaccgc
2881 cattagtgaa acttttcaaa tcgcccagtg gagaagaaaa aggcacagcg atactagcat
2941 tagcgggcaa ggtgcaact ttatcaacca gggctctata gataacccta gcgctggga

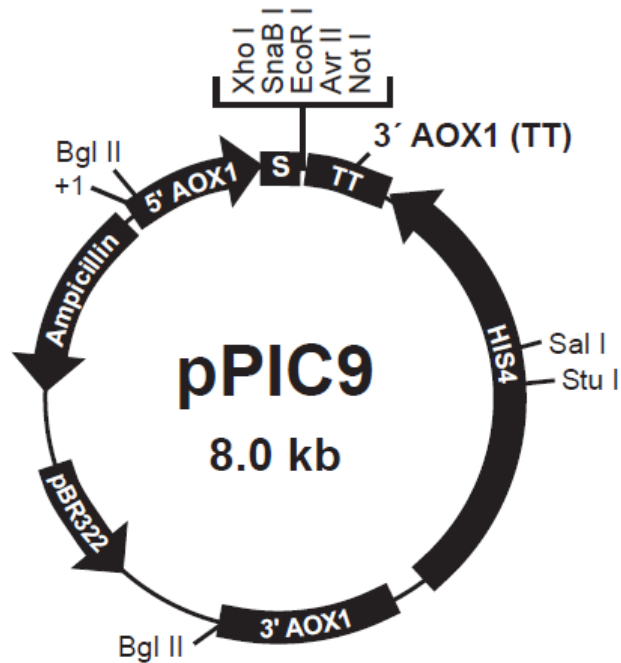
```

3001 tcatcctttg gacaactctt tctgccaat ctaggtccaa aatcacttca ttgataccat  
3061 tattgtacaa cttgagcaag ttgtcgatca gctcctcaaa ttggctcctc gtaacggatg  
3121 actcaacttg cacattaact tgaagctcag tcgattgagt gaacttgatc aggttgtgca  
3181 gctggtcagc agcatagga aacacggctt ttcctaccaa actcaaggaa ttatcaaact  
3241 ctgcaacact tgcgtatgca ggtagcaagg gaaatgtcat acttgaagtc ggacagtgg  
3301 tgtagtcttg agaaattctg aagccgtatt tttattatca gtgagtcagt catcaggaga  
3361 tcctctacgc cggacgcac cgtggccggca tcaccggcgc cacaggtgcg gttgctggcg  
3421 cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg ccacttcggg ctcatgagcg  
3481 cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc cgtggcggg gggactgttg ggcgccatct  
3541 ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg cctcaaccta ctactgggct  
3601 gcttcctaat gcaggagtgc cataagggag agcgtcgagt atctatgatt ggaagtatgg  
3661 gaatggtgat accgcattc ttcagtgtct tgaggctccc tatcagatta tgcccaacta  
3721 aagcaaccgg aggaggagat ttcattgtaa atttctctga cttttgtgca tcagtagact  
3781 cgaactgtga gactatctcg gttatgacag cagaaatgtc cttcttgag acagtaaagt  
3841 aagtcccacc aataaagaaa tccttgttat caggaacaaa cttcttgttt cgaacttttt  
3901 cgggtgccttg aactataaaa tgtagagtg atatgtcggg taggaatgga gcgggcaaat  
3961 gcttaccttc tggaccctta agaggtatgt agggtttcta gatactgat ccaacttcag  
4021 tgacaacggt gctatttctg tcaaaccatt ccgaatccag agaaatcaaa gttgtttgtc  
4081 tactattgat ccaagccagt gcggtcttga aactgacaat agtgtgctcg tgttttgagg  
4141 tcatcctttg atgaataaat ctagtctttg atctaataa tcttgacgag ccaagggcgt  
4201 aaatacccaa atctaaaact cttttaaacc gttaaaaagg caagtatgtc tgctctgatt  
4261 aaaccccaaa tcagctccta cgtctgatcc catcaacttg aggggcacta tcttgtttta  
4321 gagaaatttg cggagatgcg atatcgagaa aaaggtacgc tgattttaa cgtgaaattt  
4381 atctcaagat ctctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca  
4441 gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca  
4501 gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccagt cacgtagcga  
4561 tagcggagtg tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgact gagagtgcac  
4621 catatgctgt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgtctc  
4681 tccgcttct cgtcactga ctcgctgccc tcggctgctt ggctgcggcg agcgtatca  
4741 gctcactcaa agcgggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac  
4801 atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgttt  
4861 ttccataggg tccgcccccc cagcagagcat cacaataatc gacgtcaag tcagagttgg  
4921 cgaacccgca caggactata aagataccag gcggttcccc ctggaagctc cctcgtgccc  
4981 tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc ttcgggaagc  
5041 gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagt cgttcgctcc  
5101 aagctgggct gtgtgcacga acccccgctt cagcccgacc gctgcgctt atccggtaac  
5161 tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcact agccactggt  
5221 aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct  
5281 aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc  
5341 ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt  
5401 ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg  
5461 atcttttcta cggggctcga cgctcagttg aacgaaaact caggttaagc gattttgtc  
5521 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa  
5581 tcaatctaaa gtatatatga gtaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag  
5641 gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgctgact ccccgtcgtg  
5701 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgtgcaat gataccgcga  
5761 gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagcgg aagggcggag  
5821 cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgcccggaa  
5881 gctagagtaa gtatgctgcc agttaatagt ttgcccagc ttggtgcoat tgctgcaggc  
5941 atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtt ccaacgatca  
6001 aggcgagtta catgatcccc catgttctgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg  
6061 atcgttgtca gaagtaagt ggcgcgagt ttatcactca tgggtatggc agcactgcat  
6121 aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc  
6181 aagtcattct gagaatagt tatcgggcga ccgagttgct cttgcccggc gtaacacgg  
6241 gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg  
6301 gggcgaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatga tccactcgt  
6361 gaccccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa  
6421 ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaatgttg aatactcata  
6481 ctcttccttt tcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt atgtctcat gagcggatac  
6541 atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacat tccccgaaaa  
6601 gtgccacctg acgtctaaga accattatt atcatgacat taacctata aataggcgt  
6661 atcacgagc ccttctctc tcaagaatta attctcatgt ttgacagctt atcatogata  
6721 agctgactca tgttggtatt gtgaaataga cgcagatcgg gaacactgaa aaataacagt  
6781 tattattcga gatctaacat ccaagacga aaggttgaat gaaaccttt tgccatccga  
6841 catccacag tccattctca cacataagt ccaaacgcaa caggagggga tacactagca  
6901 gcagaccgtt gcaaacgcag gacctccact cctcttctc tcaacacca ctttgccat  
6961 cgaaaaacca gccagttat tggcctgtat tggagctcgc tcatccaat tcttctatt  
7021 aggtactaa caccatgact ttattagcct gtctatcctg gccccctgg cgaggttcat

7081 gtttgtttat ttccgaatgc aacaagctcc gcattacacc cgaacatcac tccagatgag  
7141 ggcttttctga gtgtggggtc aaatagtttc atggtcccca aatggcccaa aactgacagt  
7201 ttaaacgctg tcttgaacc taatatgaca aaagcgtgat ctcatccaag atgaactaag  
7261 tttggttcgt tgaatgcta acggccagtt ggtcaaaaag aaacttccaa aagtcgccat  
7321 accgtttgtc ttgtttgta ttgattgacg aatgctcaaa aataatctca ttaatgctta  
7381 gcgcagtctc tctatcgctt ctgaaccccg gtgcacctgt gccgaaacgc aaatggggaa  
7441 acaccgctt tttggatgat tatgcattgt ctccacattg tatgcttcca agattctggt  
7501 gggaatactg ctgatagcct aacgttcatg atcaaaattt aactgttcta acccctactt  
7561 gacagcaata tataaacaga aggaagctgc cctgtcttaa accttttttt ttatcatcat  
7621 tattagctta ctttcataat tgcgactggg tccaattgac aagcttttga ttttaacgac  
7681 ttttaacgac aacttgagaa gatcaaaaaa caactaatta ttcgaaggat ccaaacgatg  
7741 agatttcctt caatttttac tgcagtttta ttcgcagcat cctcgcatt agctgctcca  
7801 gtcaacacta caacagaaga tgaacggca caaattccgg ctgaagctgt catcggttac  
7861 tcagatttag aaggggattt cgatgttgct gttttgccat tttccaacag cacaaataac  
7921 gggttattgt ttataaatc tactattgcc agcattgctg ctaaagaaga aggggatct  
7981 cgagaaaaga gaggctgaag cttacgtaga attccctagg

## APÉNDICE H

### Vector pPIC9



**Comments for pPIC9:  
8023 nucleotides**

5' AOX1 promoter fragment: bases 1-948  
5' AOX1 primer site: bases 855-875  
 $\alpha$ -Factor secretion signal(s): bases 949-1215  
 $\alpha$ -Factor primer site: bases 1152-1172  
Multiple Cloning Site: bases 1192-1241  
3' AOX1 primer site: bases 1327-1347  
3' AOX1 transcription  
    termination (TT): bases 1253-1586  
HIS4 ORF: bases 4514-1980  
3' AOX1 fragment: bases 4870-5626  
pBR322 origin: bases 6708-6034  
Ampicillin resistance gene: bases 7713-6853



# APÉNDICE I

## MSC de pPIC9

773 | AOX1 mRNA 5' end (824)  
ACAGCAATAT ATAAACAGAA GGAAGCTGCC CTGTCTTAAA CCTTTTTTTT TATCATCATT ATTAGCTTAC

5' AOX1 Primer Site (855-875)  
TTTCATAATT GCGACTGGTT CCAATTGACA AGCTTTTGAT TTTAACGACT TTTAACGACA ACTTGAGAAG

α-Factor (949-1215)  
ATCAAAAAAC AACTAATTAT TCGAAGGATC CAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA  
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala

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

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

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

α-Factor Primer Site (1152-1172) Xho I  
AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA  
Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg

Signal cleavage (1204) SnaBI EcpRI AvrII NotI  
GAG GCT GAA GCT TAC GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG AAT TAA TTCGCCTTAG  
Glu Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala Asn \*\*\*

ACATGACTGT TCCTCAGTTC AAGTTGGGCA CTTACGAGAA GACCGGTCTT GCTAGATTCT AATCAAGAGG

3' AOX1 Primer Site (1327-1347)  
ATGTCAGAAT GCCATTTGCC TGAGAGATGC AGGCTTCATT TTTGATACTT TTTTATTTGT AACCTATATA

AOX1 mRNA 3' end (1418)  
GTATAGGATT TTTTTGTCA

\* If cloning into the *Xho* I site, the sequence between the *Xho* I site and *Sna*B I site (underlined) must be recreated in order for efficient cleavage of the fusion protein to occur.

## APÉNDICE J

**Tabla de valores descriptivo-estadísticos de las cinéticas de crecimiento de KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC en los medios BMM, BMMS y BMMA.**

		Descriptives								
		MU	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
							Lower Bound	Upper Bound		
BMM TgQ	DO	1	4	0.012	0.0013	0.0006	0.009	0.014	0.010	0.013
	UFC	2	3	0.005	0.0015	0.0009	0.002	0.009	0.004	0.007
BMMS TgQ	DO	3	6	0.073	0.0014	0.0006	0.072	0.075	0.072	0.075
	UFC	4	5	0.074	0.0020	0.0009	0.072	0.077	0.072	0.076
BMMA TgQ	DO	5	6	0.113	0.0021	0.0008	0.111	0.116	0.112	0.116
	UFC	6	4	0.111	0.0006	0.0003	0.110	0.111	0.110	0.111
BMM Tg4	DO	7	5	0.008	0.0039	0.0017	0.004	0.013	0.002	0.012
	UFC	8	5	0.001	0.0022	0.0010	-0.001	0.004	-0.001	0.004
BMMS Tg4	DO	9	6	0.055	0.0018	0.0007	0.053	0.057	0.053	0.057
	UFC	10	4	0.052	0.0023	0.0012	0.048	0.056	0.050	0.054
BMMA Tg4	DO	11	4	0.062	0.0017	0.0009	0.059	0.064	0.060	0.063
	UFC	12	4	0.091	0.0040	0.0020	0.084	0.097	0.087	0.094
BMM phyC	DO	13	5	0.050	0.0005	0.0002	0.049	0.050	0.049	0.050
	UFC	14	4	0.060	0.0019	0.0010	0.056	0.063	0.057	0.061
BMMS phyC	DO	15	4	0.061	0.0030	0.0015	0.056	0.065	0.057	0.063
	UFC	16	3	0.102	0.0000	0.0000	0.102	0.102	0.102	0.102
BMMA phyC	DO	17	6	0.098	0.0018	0.0007	0.096	0.100	0.096	0.100
	UFC	18	6	0.074	0.0046	0.0019	0.069	0.079	0.071	0.080
Total			84	0.063	0.034356161	0.003748565	0.05510378	0.070015268	-0.001	0.116

## LITERATURA CITADA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Ascacio-Martínez JA, Barrera-Saldaña HA. 2004. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene*. 340 (2004) 261-266.
- Bradford MA. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72.
- Castillo-Galván M. 2008. Producción y caracterización bioquímica de tripsinógeno recombinante del camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura de la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, N.L. (México).
- Cereghino JL, Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:45-66.
- Chen J., Kukor Z, Le Maréchal C, Tóth M, Tsakiris L, Raguénes O, Férec C, Sahin-Tóth M. 2003. Evolution of trypsinogen activation peptides. *Mol. Biol. Evol.* 20(11): 1767-1777.
- Clare JJ, Rayment FB, Bollantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA. 1991. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology* 9: 455-460.
- Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5(12): 3376-85.
- Digan ME, Laair SV, Brierly RA, Siegel RS, Williams ME, Ellis SB, Kellaris PA, Prorow SA, Craig WS, Velicelebi G, Harpold MM, Thill GP. 1989. Continuous production of a novel lisozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 7:160-164.

- Engels WR. 1993. Contributing software to the internet: the Amplify program. Trends Biochem. Sci. 18(11): 448-450.
- Escamilla-Treviño LL, Viader-Salvadó JM, Guerrero-Olazarán M, Van-Wormhoudt A, Sepúlveda-Saavedra J. 2001. Efecto de la expresión en *Pichia pastoris* de una serinproteasa sobre enzimas peroxisomales. CIENCIA UANL 4(4):448-453.
- Escamilla-Treviño LL, Viader-Salvadó JM, Guerrero-Olazarán M. 1999. Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. CIENCIA UANL 2(2):27-33.
- Escamilla-Treviño LL. 2002. Producción de tripsina de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.
- Fereidoon S, Janak-Kamil YVA. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. Trends Food Scien. Tech. 12: 435-464.
- Fuentes-Garibay JA. 2005. Evaluación de la producción de tripsinógeno de camarón *Litopenaeus vannamei* en cepas recombinantes de *Pichia pastoris* a nivel biorreactor. Tesis de Licenciatura de la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, N.L. (México).
- Galgani FG, Benyamin Y, Van Wormhoudt A. 1985. Purification, properties and immunoassay of trypsin from the shrimp *Penaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. 81B: 447-452.
- Gallegos-López JA. 2004. Síntesis y clonación molecular del DNAc de  $\alpha$ -glucosidasa de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura de la carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, N.L. (México).
- Gates BJ, Travis J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin (*Penaeus setiferus*). Biochemistry-U.S. 8:4483-4489.
- Guerrero-Olazarán M, Escamilla-Treviño LL, Castillo-Galván M, Gallegos-López JA, and Viader-Salvadó J.M. 2009. Recombinant Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Trypsinogen Production in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Prog. 25:1310-1316.
- Guerrero-Olazarán M, Rodríguez-Blanco L, Carreon-Treviño JG, Gallegos-López JA, Viader-Salvadó JM. 2010. Expression of *Bacillus* phytase C gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 76(16): 5601-5608.
- Guyonnet V, Thuscik F, Long PL, Polanowski LA, Travis J. 1999. Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, chymotrypsin and elastase from the chicken. J. Chromatogr. A 852: 217-225.

- Halfon S, Craik CS. 1998. Trypsin. In Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF. eds. Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, London. pp 12-21.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hanquier J, Sorlet Y, Desplancq D, Baroche L, Ebtinger M, Lefèvre JF, Pattus F, Hersberger CL, Vertès AA. 2003. A single mutation in the activation site of bovine trypsinogen enhances its accumulation in the fermentation broth of the yeast *Pichia pastoris*. Appl. Environ. Microb. 69:1108–1113.
- Hohenblum H, Borth N, Mattanovich D. 2003. Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry, Journal of Biotechnology, Vol. 102, 281-290.
- Honjo I, Kimura S, Nonaka M. 1990. Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. Nippon Suisan Gakkaishi. 56(10): 1627-34.
- Inan M, Chiruvolu V, Eskridge KM, Vlasuk GP, Dickerson K, Brown S, Meagher MM. 1999. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. Enzyme Microb. Technol. 24:438-445.
- Jiang ST, Moody M, Chen HC. 1991 Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). J Food Sci. 56: 322–326.
- Klein B, Le Moullac G, Sellos D, Van Wormhoudt A. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 28:551-563.
- Le Moullac GL. 1994 Adaptation des enzymes digestives à l'alimentation chez la crevette *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Memoire pour l'optention du diplôme de l'Ecole Practique des Hautes Etudes. Montpellier (France).
- Lee PG, Lawrence AL. 1982. A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp: influence of diet, age and species. Physiologist 25, 241.
- López M, Guerrero-Olazarán M, Viader-Salvadó JM, Gallegos-López JA, Favela-Torres E, Fernández FJ, Loera O, Viniestra-González G. 2010. Cell growth and *Trametes versicolor* laccase production in transformed *Pichia pastoris* cultured by solid-state or submerged fermentations. J. Chem. Technol. Biotechnol. 85(4): 435-440.

- Lu PJ, Liu C, Tsai IH. 1990. The midgut trypsin of shrimp (*Penaeus monodon*). High efficiency toward native protein substrates including collagens. *Biol. Chem.* 371: 851-859.
- Macouzet M, Simpson BK, Lee BH. 2005. Expression of a cold-adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 5: 851-857.
- Martínez A, Olsen RL, Serra JL. 1988. Purification and characterization of two trypsin like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. *Comp. Biochem. Phys. A* 91 :677-684.
- Martínez-Soriano JP, Cab-Barrera EL, Tamez-González R, Leal-Klezevas DS. 1993. Detección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en Cadena de la Polimerasa. *Bioquímica.* 18: 10-16.
- Mattanovich D, Katinger H, Hohenblum H, Naschberger S, Weik R. 2003. Method for the manufacture of recombinant trypsin. US Patent Appl 20030157634 A1.
- Müller R, Glaser S, Geipel F, Thalhoffer JP, Rexer B, Schneider C, Ratka M, Ronning S, Eckstein H, Giessel C. 2004. Method for producing recombinant trypsin. US Patent Appl 20040203095 A1.
- Nemoda Z, Sahin-Tóth M. 2005, The tetra-aspartate motif in the activation peptide of human cationic trypsinogen is essential for autoactivation control but not for enteropeptidase recognition, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, No. 33, 29645-29652.
- O'Callaghan J, O'Brien MM, McClean K, Dobson AD. 2002. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* lacase gene in *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 29: 55-59.
- Romanos MA. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Curr. Opin. Biotech.* 6:527-533.
- Rychlik W. 1995. Priming efficiency in PCR. *Biotechniques.* 18(1):84-6, 88-90.
- Sainz JC, García-Carreño F, Hernández-Cortés P. 2004 *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 138: 155–162.
- Sainz JC, García-Carreño F, Sierra-Beltrán A, Hernández-Cortés P. 2004b. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Crustacean Biol.* 24:266–273.
- Shahidi F., Janak Kamil YVA. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Tech.* 12: 435-464.

- Tsai IH, Chuang KL, Chuang JL. 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of Crustacea Decapoda (shrimps). *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 235-239.
- Viader-Salvadó JM, Gallegos-Lopez JA, Carreón-Treviño JG, Castillo-Galván M, Rojo-Domínguez A, Guerrero-Olazarán M. 2010. Design of Thermostable Beta-Propeller Phytases with Activity over a Broad Range of pHs and Their Overproduction by *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microb.* Vol. 79 No. 19: 6423-6430.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31: 3688-3691.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**José Antonio Fuentes Garibay**

Candidato para el Título Profesional de

Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología

**Tesis:** Construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico

**Campo de estudio:** Biología Molecular y Microbiana

### **Biografía:**

**Datos personales:** Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 02 de Octubre de 1980, hijo de Manuel Fuentes Fernández y Alicia Garibay Ruiz.

**Educación:** Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo (cédula 4725537).

### **Experiencia Profesional:**

Realización de tesis de Licenciatura en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de La Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.) desde Enero del 2003.

Realización de tesis de Maestría en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de La Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.) desde Enero del 2007.