

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



CONSTRUCCION DE CEPAS DE *Pichia pastoris*  
PRODUCTORAS DE HORMONA DEL  
CRECIMIENTO HUMANA  
RECOMBINANTE Y EVALUACION DE ESQUEMAS  
DE PURIFICACION

POR

Q.C.B. CELIA NOHEMI SANCHEZ DOMINGUEZ

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

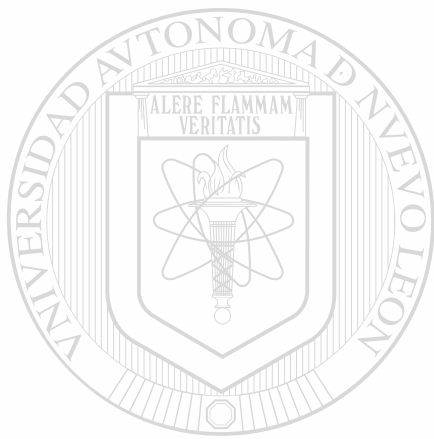
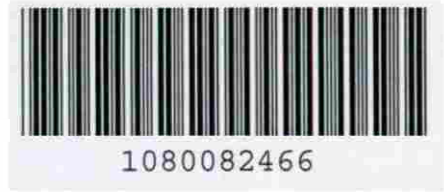
Noviembre, 1998

TM

QH445

S2

C.1



# UANL

---

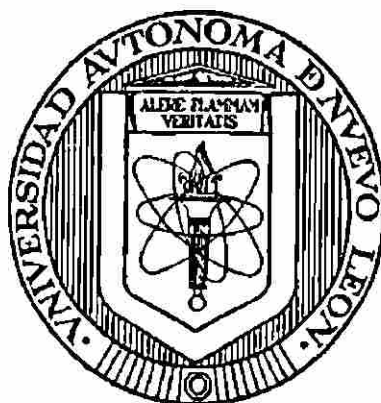
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pichia pastoris*  
PRODUCTORAS DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA  
RECOMBINANTE Y EVALUACIÓN DE ESQUEMAS DE  
PURIFICACIÓN**

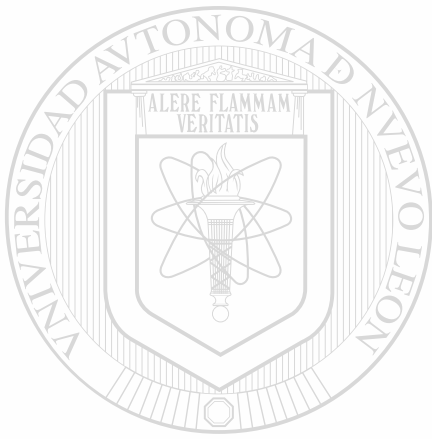
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
Por  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Q. C. B. Celia Nohemí Sánchez Domínguez**

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

**Noviembre, 1998**

TM  
Q11445  
52



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

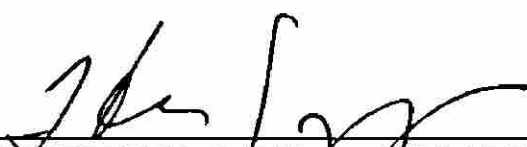
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**CONSTRUCCION DE CEPAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE Y EVALUACION DE ESQUEMAS DE PURIFICACION.**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ**  
Presidente



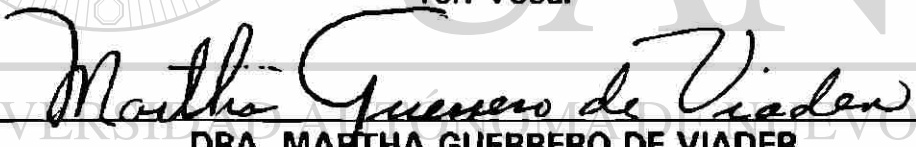
---

**DR. JOSE MA. VIADER SALVADO**  
Secretario



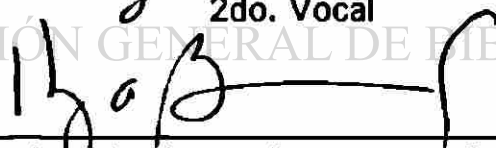
---

**DR. LUIS GALAN WONG**  
1er. Vocal



---

**DRA. MARTHA GUERRERO DE VIADER**  
2do. Vocal



---

**DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**  
3er. Vocal



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
De Investigación y Estudios de Posgrado

## AGRADECIMIENTOS

A la generación Six Monkeys: Carmen, Ana Laura, Claudio, Mario-pollo y Hugo. Gracias por hacer de la maestría algo más que estudio y trabajo.

A todos los Doctores de la ULIEG que contribuyeron en mi formación, especialmente a los Doctores Viader, quienes me inspiraron a seguir superándome. Al Dr. Barrera, gracias por brindarme la oportunidad de realizar la maestría.

A todos los ulieguitos, especialmente a Normita, a las secretarias y en general a los trabajadores de la ULIEG.

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

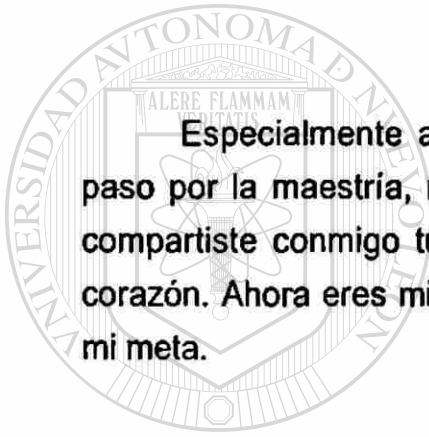
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza para salir adelante en mi vida.

Con cariño a mis padres Juan Manuel y Margarita. A mis hermanos Lily, Maggie y Juan Carlos. Gracias por su apoyo, su amor y su confianza. Dios los bendiga.

Especialmente a Hugo Leonid. Te conocí realmente durante nuestro paso por la maestría, me apoyaste en los momentos más difíciles y tristes, compartiste conmigo tu experiencia desinteresadamente, y conquistaste mi corazón. Ahora eres mi esposo y contigo quiero compartir el haber alcanzado mi meta.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN G



OTECAS

Y a la clonita



*La biotecnología promete la revolución más grande de la historia humana. Para fines de esta década habrá dejado muy atrás la energía atómica y las computadoras en cuanto al efecto que habrá de ejercer sobre nuestra vida cotidiana. Tal como lo expresó un observador "la biotecnología va a transformar todos los aspectos de la vida humana: nuestros servicios médicos, nuestra alimentación, nuestra salud, nuestras diversiones, nuestro mismo cuerpo. Nada volverá a ser lo mismo. Literalmente, va a cambiar la faz del planeta".*

(Michael Crichton, El Parque Jurásico. 1990. Ed. Reverté).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1	Características de la Hormona del Crecimiento Humana (HGH)	1
1.1.1	Generalidades de la HGH	1
1.1.2	Usos de la HGH	2
1.1.3	Producción de HGH	5
1.2	Características de <i>Pichia pastoris</i>	5
1.2.1	Generalidades	5
1.2.2	El metabolismo del metanol	7
1.2.3	Ventajas de <i>Pichia pastoris</i>	8
1.2.4	Vectores de expresión	9
1.2.5	La cepa GS115 de <i>Pichia pastoris</i>	10
1.2.6	Dosis génica	10
1.3	Justificación del trabajo	12
1.4	Objetivos del trabajo	13

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Area de trabajo, reactivos y equipo	14
2.2	Estrategia general experimental	17
2.3.	Métodos	19
2.3.1	Construcción del vector pPIC9KhGH22K	19
2.3.1.1	Propagación y caracterización de los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K	19
2.3.1.2	Cortes preparativos de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K	21
2.3.1.3	Purificación del fragmento de 1567 pb	22
2.3.1.4	Reacción de ligación	22
2.3.1.5	Transformación de bacterias calcio-competentes con la reacción de ligación, obtención del ADN y caracterización.	23
2.3.2	Construcción de la cepa recombinante de <i>Pichia pastoris</i>	24
2.3.2.1	Preparación del plásmido pPIC9KhGH22K para la transformación en <i>Pichia pastoris</i>	24
2.3.2.2	Transformación de <i>Pichia pastoris</i> mediante la técnica de esferoplastos	24

2.3.2.3	Verificación de la integración por PCR	27
2.3.3	Selección de la cepa sobreproductora	29
2.3.3.1	Tamizaje con G418	29
2.3.3.2	Estimación semicuantitativa del número de copias por PCR	30
2.3.3.3	Ensayos de fermentación	33
2.3.3.4	Análisis de las proteínas del medio de cultivo por Bradford y SDS-PAGE	34
2.4	Sistemas de purificación	36
2.4.1	Precipitación con sulfato de amonio	36
2.4.2	Cromatografía de intercambio iónico	37

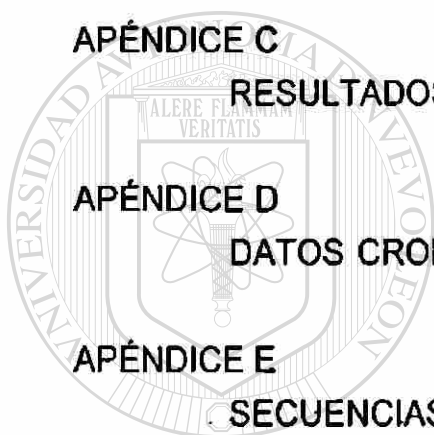
### CAPÍTULO 3

RESULTADOS		39
3.1	Construcción del vector pPIC9KhGH22K	39
3.1.1	Caracterización de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K	39
3.1.2	Transformación de bacterias calcio-competentes con la reacción de ligación, obtención del ADN y caracterización	39
3.2	Construcción de la cepa recombinante de <i>Pichia pastoris</i>	45
3.2.1	Transformantes de <i>Pichia pastoris</i> obtenidas mediante la técnica de esferoplastos	45
3.2.2	Verificación de la integración por PCR	46
3.3	Selección de la cepa sobreproductora	47
3.3.1	Tamizaje con G418.	47
3.3.2	Estimación semicuantitativa del número de copias por PCR	47
3.3.3	Evaluación de la producción de HGHR	48
3.3.4	Correlación del PCR y la producción de HGHR	50
3.4	Sistemas de purificación	52
3.4.1	Precipitación con sulfato de amonio	52
3.4.2	Cromatografía de intercambio iónico	54
3.4.2.1	Ensayo A	54
3.4.2.2	Ensayo B	56
3.4.2.3	Ensayo C	58

### CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS		60
-------------------------	--	----

<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>REFERENCIAS</b>	<b>66</b>
<b>APÉNDICE A</b>	
<b>REACTIVOS</b>	<b>76</b>
<b>APÉNDICE B</b>	
<b>GRÁFICAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS DURANTE EL</b>	
<b>DESARROLLO DE LA TESIS</b>	<b>84</b>
<b>APÉNDICE C</b>	
<b>RESULTADOS DEL TAMIZAJE CON G418</b>	<b>87</b>
<b>APÉNDICE D</b>	
<b>DATOS CROMATOGRÁFICOS</b>	<b>89</b>
<b>APÉNDICE E</b>	
<b>SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS</b>	
<b>DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS</b>	<b>90</b>
<b>APÉNDICE F</b>	
<b>SECUENCIA AMINOACÍDICA DE HGH MADURA</b>	<b>96</b>



UANI

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

APÉNDICE F

DIRI SECUENCIA AMINOACÍDICA DE HGH MADURA CAS

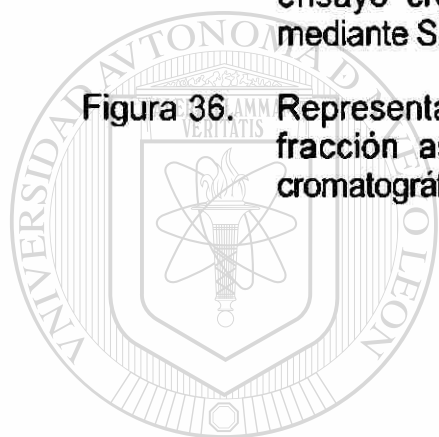
®

TABLA 1	ALGUNAS PROTEÍNAS PRODUCIDAS EN <i>Pichia pastoris</i> .....	7
TABLA 2	REFERENCIAS SOBRE LA PRODUCCIÓN CON MULTICOPIAS EN <i>Pichia pastoris</i> .....	11
TABLA 3	RESULTADOS DE LA TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS CALCIO-COMPETENTES, ASÍ COMO EL NÚMERO DE COLONIAS OBTENIDAS EN CADA EXPERIMENTO.....	39
TABLA 4	PATRONES DE DIGESTIÓN EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pPIC9K, pPIC9KhGH22K Y pPIC9hGH22K.....	40
TABLA 5	ANÁLISIS LA PRODUCCIÓN DE HGH <sub>r</sub> EN LAS CEPAS GS115hGH22KG418-1, GS115hGH22KG418-19, GS115hGH22KG418-76 y GS115hGH22K-UNICOPIA DE <i>Pichia pastoris</i> , ASÍ COMO EL ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO POR PCR.....	48
TABLA 6	RESULTADOS DE LA PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO.....	52

Figura 1.	Modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcino.....	1
Figura 2.	Esquema del metabolismo del metanol.....	8
Figura 3.	Plásmido pPIC9K.....	12
Figura 4.	Representación de la estrategia general planteada para cumplir con los objetivos del presente trabajo.....	18
Figura 5.	Estrategia efectuada para la construcción del vector pPIC9KhGH22K.....	21
Figura 6.	Proceso seguido para obtener un 70 % de formación de esferoplastos, empleando la cepa GS115 de <i>Pichia pastoris</i> .....	25
Figura 7.	Verificación de genotipos de las transformantes de <i>Pichia pastoris</i> mediante PCR.....	28
Figura 8.	Tamizaje con G418 de la cepas de <i>Pichia pastoris</i> obtenidas.....	30
Figura 9.	Secuencia de pasos requeridos para el análisis de los geles en el sistema Gel Doc de Bio Rad.....	33
Figura 10.	Secuencia que se sigue para el análisis de los geles en el sistema Gel Doc de Bio Rad.....	35
Figura 11.	Esquema general de la purificación de HGhr.....	36
Figura 12.	Gel de agarosa al 0.6 % de los ADNs plasmídicos de las 36 colonias de <i>Escherichia coli</i> XL1- Blue, provenientes de la transformación con la reacción de ligación.....	41
Figura 13.	Gel de agarosa al 1 % de la caracterización enzimática con <i>Bgl II</i> de los ADN plasmídicos.....	42
Figura 14.	Gel de agarosa al 1 % de la caracterización de los plásmidos pPIC9K, pPIC9KhGH22K y pPIC9hGH22K.....	43
Figura 15.	Gel de agarosa al 1 % de la caracterización de los plásmidos pPIC9K, pPIC9KhGH22K y pPIC9hGH22K.....	44
Figura 16.	Gráfica de la cinética de formación de esferoplastos.....	45

Figura 17.	Gel de agarosa al 1 % para la verificación de la integración del cassette de expresión por PCR de cepas transformantes de <i>Pichia pastoris</i> .	46
Figura 18.	Gel de agarosa al 1 % del PCR semicuantitativo.	48
Figura 19.	Gel SDS-PAGE de los medios de cultivo dializados y concentrados al vacío provenientes de las cepas unicopia, 1, 19 y 76.	49
Figura 20.	Densitograma del perfil de pureza de HGhr correspondiente a la cepa GS115hGH22KG418-1	50
Figura 21.	Gráfica del incremento en la producción de HGhr vs el cociente de las intensidades de las bandas 1060/2200 del PCR	51
Figura 22.	Gráfica del porcentaje relativo de HGhr de las cepas construídas (1, 19 y 76) respecto a la cepa unicopia (u).	51
Figura 23.	Gel SDS-PAGE en el que se evaluó la precipitación con sulfato de amonio.	53
Figura 24.	Gráfica de los resultados de la evaluación de la precipitación con sulfato de amonio por SDS-PAGE	53
Figura 25.	Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico A, así como las fracciones recolectadas.	54
Figura 26.	Gel SDS-PAGE de las 5 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico A.	55
Figura 27.	Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm <sup>2</sup> para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico A.	55
Figura 28.	Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico A.	55
Figura 29.	Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico B, así como las fracciones recolectadas.	56
Figura 30.	Gel SDS-PAGE de las 10 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico B.	57
Figura 31.	Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm <sup>2</sup> para cada fracción recolectada en el	

	ensayo cromatográfico B, en las que se detecta HGHR mediante SDS-PAGE.....	57
Figura 32.	Representación del porcentaje de HGHR presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico B.....	57
Figura 33.	Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico C, la velocidad del flujo de fase móvil, así como las fracciones recolectadas. ....	58
Figura 34.	Gel SDS-PAGE de las 12 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico C. ....	59
Figura 35.	Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm <sup>2</sup> para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico C, en las que se detecta HGHR mediante SDS-PAGE.....	59
Figura 36.	Representación del porcentaje de HGHR presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico C.....	59



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



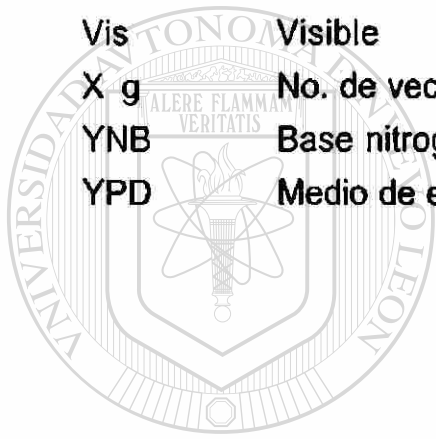
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucléico
ADNc	ADN complementario
AOX 1	Alcohol Oxidasa 1
BMG	Medio mínimo amortiguado con glicerol
BMM	Medio mínimo amortiguado con metanol
°C	Grados centigrados
C.I.A.	Cromatografía de Intercambio Aniónico
CaS	CaCl-Sorbitol
CaT	Tris-HCl-CaCl <sub>2</sub>
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad óptica
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
G418	Geneticina
h	horas
HGHr	Hormona del crecimiento humana recombinante (la proteína)
hGH	Gen de la Hormona del crecimiento humana recombinante
His <sup>+</sup>	Histidina <sup>+</sup> . Capaz de crecer en medio deficiente de histidina
<i>HIS4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
<i>His4</i>	Deficiente del gen <i>HIS4</i>
Kan	Kanamicina
kDa	Kilodaltones
LB	Luria-Bertani, medio líquido
M	Molar
μl	Microlitros
min	min
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RDB	Medio de regeneración dextrosa

RDBH	Medio de regeneración dextrosa-histidina
SCE	Sorbitol-Citrato de sodio-EDTA
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida denaturalizante
SE	Sorbitol-EDTA
SED	Sorbitol-EDTA-Ditiotreitol
Seg	Segundos
SOS	Sorbitol-YPD-CaCl <sub>2</sub>
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-HCl
TT	Terminador de la transcripción
UV	Ultravioleta
V	Volts
Vis	Visible
X g	No. de veces la fuerza gravitacional
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de extracto de levadura y peptona



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Celia Nohemí Sánchez Domínguez  
1998

Fecha de Graduación: Noviembre,

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Título del Estudio:** Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de Hormona del Crecimiento Humana Recombinante y evaluación de esquemas de purificación.

**Número de páginas:** 96

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

**Area de Estudio:** Biotecnología

**Propósito y Método del Estudio:** La hormona del crecimiento humana (HGH) es un péptido globular de cadena única de 191 aminoácidos unidos por dos puentes disulfuro, su masa molecular aproximada es de 22 kDa y no posee residuos de azúcares. La HGH es necesaria para el crecimiento postnatal y para el metabolismo normal de carbohidratos, lípidos, nitrógeno y minerales. Se dice que sus efectos son anabólicos, diabéticos y lipolíticos, actuando a través de mecanismos directos e indirectos. Escamilla en 1996 realizó la construcción de un vector portador del DNAc de HGH con el que obtuvo cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras y secretoras de HGHr madura alcanzando un 82% de las proteínas totales secretadas al medio de cultivo (equivalente a 12 mg/L).

El objetivo del presente estudio fue construir cepas de *Pichia pastoris* conteniendo más de una copia del ADNc de HGH integrado en el genoma de la levadura, capaces de producir y secretar HGHr con mejores niveles de producción que la cepa previamente construida y evaluar esquemas de purificación para el mismo producto recombinante.

Se obtuvieron clones de *E. coli* conteniendo el vector construido (pPIC9KhGH22K). Posteriormente se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* (cepa GS115) mediante su transformación por la técnica de esferoplastos con el vector recombinante pPIC9KhGH22K linearizado con *Sac I*. Después de verificar la integración del cassette de expresión por PCR, se seleccionaron las cepas con más de una copia del cassette de expresión por tamizaje con el antibiótico G418. Se ensayó la producción de HGHr en el medio de cultivo en fermentaciones a nivel matraz empleando las cepas de *Pichia pastoris* GS115hGH22KG418-1, GS115hGH22KG418-19 y GS115hGH22KG418-76, con una sobreproducción del 44, 22 y 25 % respectivamente, respecto a la cepa GS115hGH22K-unicopia previamente construida. El PCR semicuantitativo de dichas cepas mostró que el cociente de las intensidades de las bandas de 1060/2200 es mayor en las cepas construidas que en la cepa unicopia, sugiriendo la presencia de más de una copia integrada del cassette de expresión. La evaluación de la producción de HGHr mostró que la cepa GS115hGH22KG418-1 presentó mayores niveles de producción. Al evaluar los esquemas de purificación, no se obtuvo precipitación selectiva con sulfato de amonio al 20 % de saturación ni buena recuperación en las condiciones trabajadas. Es necesario evaluar las variables involucradas en el proceso. Aunque no se lograron obtener buenos resultados con la cromatografía de intercambio aniónico, el primero de los tres ensayos efectuados sugiere que puede ser una buena opción para purificar HGHr, sin embargo se requiere optimar las condiciones experimentales.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se logró la construcción de una cepa de *Pichia pastoris* sobreproductora de HGHr, obteniendo hasta un 44% de sobreproducción que la cepa de *Pichia pastoris* previamente construida. El PCR semicuantitativo permitió estudiar la relación de las intensidades de las bandas de 1060 y 2200 pb. Se logró implementar en el laboratorio la técnica de esferoplastos como opción para la transformación de *Pichia pastoris*, así como la técnica de tamizaje con G418 para la selección de posibles cepas multicopias. No se obtuvo precipitación selectiva con sulfato de amonio al 20 % de saturación ni buena recuperación en las condiciones trabajadas, y aunque los resultados de la cromatografía de intercambio aniónico no fueron satisfactorios, sugieren que puede ser una buena opción para purificar HGHr, sin embargo se requiere optimar las condiciones.

FIRMA DEL ASESOR:

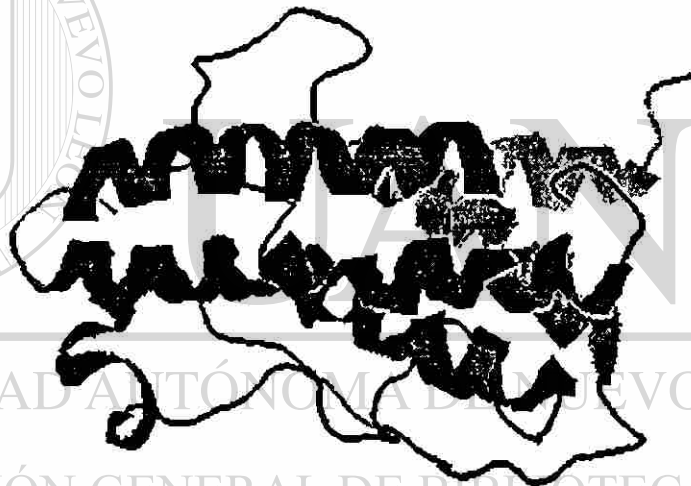
## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Características de la Hormona del Crecimiento Humana (HGH)

##### 1.1.1 Generalidades de la HGH

La hormona del crecimiento humana se sintetiza en los somatotropos, subclase de células acidófilas de la hipófisis que son las más abundantes en esa glándula. Es un péptido globular de cadena única de 191 aminoácidos unidos por dos puentes disulfuro. Su masa molecular aproximada es de 22 kDa y no posee residuos de azúcares (Figura 1) (1).



**Figura 1.** Modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcino. Se muestran las cuatro hélices alfa que constituyen la proteína y los enlaces que las unen.

La HGH es necesaria para el crecimiento postnatal y para el metabolismo normal de carbohidratos, lípidos, nitrógeno y minerales. Se dice que sus efectos son anabólicos, diabetogénicos y lipolíticos, actuando a través de mecanismos directos e indirectos, e influye en el metabolismo de:

- Proteínas, incrementando su síntesis y disminuyendo los valores plasmáticos y urinarios de aminoácidos y urea (1).

- Lípidos, favoreciendo la liberación de ácidos grasos libres y glicerol del tejido adiposo, así como la oxidación de los ácidos grasos en el hepatocito (1).
- Nitrógeno, incrementando su retención (2).
- Minerales, promoviendo un equilibrio positivo de calcio, magnesio y fosfato y causando retención de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (1).

Los efectos en el metabolismo de carbohidratos y grasas están mediados directamente a través de receptores específicos, mientras que los efectos en las proteínas y en el crecimiento son mediados a través del IGF-1 (factor de crecimiento semejante a insulina-1) (1, 3).

Al unirse a los receptores de lactógeno estimula las glándulas mamarias y la lactogénesis (1). Además, provoca niveles elevados de insulina y cambios en el empleo de sustrato. Actualmente se estudian sus efectos en la producción de IGF-1 y la inducción de proteínas de unión a IGF, en un esfuerzo por entender mejor el mecanismo de las acciones de las HGH durante el estrés (3).

### 1.1.2 Usos de la HGH

La HGH ha sido utilizada exitosamente en el tratamiento del enanismo hipofisiario, para la remoción de ácidos grasos en obesos, para mejorar la vascularización y promover la ganancia de masa muscular en los ancianos, en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas y para acelerar la regeneración de tejidos (4). En los últimos años se ha investigado su efecto en un gran número de padecimientos, como en niños con insuficiencia renal crónica, retardo en el crecimiento intrauterino, artritis reumatoide, hipocondroplasia y osteogénesis imperfecta, entre muchos otros (5, 6, 7, 8, 9).

Crecimiento, densidad ósea y metabolismo del hueso.

Un estudio en el que se empleó la HGH recombinante (HGHr) en niños con raquitismo familiar hipofosfatémico mostró un efecto positivo en el crecimiento, sin embargo se puede agravar la tendencia ya existente al crecimiento desproporcionado (6). Uno de los efectos en falla renal crónica es el síndrome de insensibilidad secundaria a HGH, provocando que los niños

posean corta estatura. Su administración en prepúberes aumenta la velocidad del crecimiento (7). El tratamiento con HGHR en niños con artritis reumatoide juvenil activa puede rectificar la deficiencia de IGF-1, pero su efecto está adversamente influenciado por la respuesta de fase aguda, lo que se refleja en un nivel elevado de proteína C reactiva (8). El tratamiento con HGH en osteogénesis imperfecta moderada incrementa significativamente la velocidad de crecimiento lineal así como el contenido mineral en hueso trabecular de la espina lumbar, y no incrementa el riesgo de fractura en pacientes en el corto plazo (9). Se sabe que los niños de corta estatura con talasemia tienen niveles reducidos de HGH e IGF-1 circulante, y se ha observado que las células eritroides en cultivo responden de modo normal al estímulo con HGH e IGF-1 (10).

### La respuesta inmune

Aunque existe un reporte de que la HGH no ejerce influencia en las subpoblaciones de las células encargadas de la respuesta inmune, en la respuesta proliferativa, así como en la producción de interleucinas, TNF e interferón gamma (11), existe un estudio más reciente que sugiere interacciones entre los sistemas inmune y endócrino a diferentes niveles, pues muestra que la HGH puede influenciar al sistema inmune mediante la estimulación en la proliferación de células secretoras de interferón gamma así como la estimulación de su producción (12).

### Trauma severo

Una terapia prometedora en trauma severo, donde se necesita un estímulo anabólico además del soporte nutricional en la fase de flujo catabólico, parece ser la infusión con HGHR (13). Un estudio muestra que la administración de HGHR atenúa la oxidación de  $^{13}\text{C}$ -Leucina (que es administrada para estudiar la degradación de proteínas) que se observa en pacientes quirúrgicos (14,15). En otros estudios, se ha observado un balance de nitrógeno menos negativo y un aumento de los siguientes parámetros: la eficiencia de la síntesis proteica, la velocidad de lipólisis, la reesterificación de ácidos grasos libres, los niveles plasmáticos de GH anabólica, de IGF-1, de IGFBP-3 y de insulina. La glucosa plasmática es significativamente mayor sin

afectar la salida de glucosa hepática, ni la oxidación de la glucosa ni las velocidades de reciclaje. No altera el nivel de hormonas inducidas por trauma (cortisol, glucagon, catecolaminas); se normaliza la hipoaminoacidemia inducida por trauma y la excreción de 3-metilhistidina es significativamente baja. La mejoría en los niveles de IGF-1 observada explica los efectos anabólicos sobre proteínas que ayudan a la reparación del tejido y la recuperación temprana (13, 16).

### Sistema reproductivo

La HGH tiene efectos importantes en el sistema reproductivo. Numerosos experimentos proporcionan evidencia de acción local de la HGH en los ovarios. Se ha demostrado la presencia de receptores para HGH en las células de la granulosa humana, así como la habilidad de la HGH para aumentar la producción de estradiol (E2) en estas células en la fase folicular tardía. La HGH también provoca un incremento en la biosíntesis de la progesterona por las células lúteas humanas. Siendo la HGH el principal regulador de los niveles plasmáticos de IGF-1, es posible su efecto indirecto por medio de la producción de IGF-1 hepática u ovárica (17).

Un estudio en que se administró HGH a mujeres con ciclos ovulatorios normales y un factor de infertilidad tubal, mostró que la HGH es un sinérgico en la esteroidogénesis folicular inducida por FSH (18). Otro estudio muestra que la HGH incrementa la secreción de oestradiol y promueve el desarrollo del oocito en mujeres con el síndrome de ovario poliquístico (19).

La administración de HGH a madres de infantes prematuros con lactación inadecuada, puede mejorar el volumen de leche materna sin presentar efectos adversos (20).

### Cardiomiopatía

La HGH se ha empleado en el tratamiento de la cardiomiopatía dilatada. Su administración por tres meses en pacientes incrementa la masa miocárdica y reduce el tamaño de la cámara ventricular izquierda, dando como resultado una mejora en la hemodinamia, en el metabolismo energético del miocardio y en el estatus clínico (21).

### 1.1.3 Producción de HGH

La HGH fue sintetizada en *Escherichia coli* por primera vez por Goodel y cols. en 1979 bajo el control del operón Lac, recuperándola del citoplasma (22). Investigaciones posteriores permitieron obtenerla a partir del periplasma y medio de cultivo, pero para este último, se requiere de estrategias complicadas (23-28). La HGH se ha sintetizado en otros hospederos: *Bacillus subtilis* (29) y *Saccharomyces cerevisiae* (30) a nivel de mg/mL, y células de mamífero (31, 32) a nivel de µg/mL.

Escamilla en 1996 (33) logró producir HGHr empleando a *Pichia pastoris* como hospedero. Realizó la construcción de un vector portador del ADNc de HGH con el que obtuvo cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras y secretoras de HGHr madura alcanzando alrededor de un 82 % de las proteínas totales secretadas al medio de cultivo (equivalente a 12 mg/L).

## 1.2 Características de *Pichia pastoris*

### 1.2.1 Generalidades

Las levaduras combinan la facilidad, simplicidad y economía de los sistemas de expresión bacteriana con la autenticidad de los sistemas de cultivo de tejido animal, los cuales son más costosos y menos convenientes. Al igual que las bacterias, las levaduras son fáciles de crecer en medios de cultivo económicos, y existen muchas herramientas para la manipulación e introducción de genes externos de interés. Las levaduras, como organismos eucariotes, proveen un medio ambiente apto para el procesamiento postraduccional y posterior secreción de proteínas, resultando en un producto biológicamente activo que es idéntico o muy similar a la proteína nativa.

*Saccharomyces cerevisiae* tiene una larga historia de uso en la producción de pan y bebidas alcohólicas. Como resultado, hay confianza en que el organismo es seguro, y la experiencia en fermentaciones industriales facilita el escalamiento de la producción. La primera levadura empleada para



la producción de proteínas recombinantes fue precisamente *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo tiene algunas desventajas. Durante la secreción proteica, tiene lugar el plegamiento, formación de enlaces disulfuro y glicosilación. La N-glicosilación ocurre en los sitios correctos pero frecuentemente difiere del patrón nativo en que las cadenas de carbohidratos son frecuentemente de longitud excesiva y del tipo ricos en manosa. La proteína resultante puede ser inmunogénica limitando el uso de proteínas glicosiladas como agentes terapéuticos humanos. Además, *Saccharomyces cerevisiae* está limitada como sistema de expresión debido a su baja producción (34).

El interés en el estudio de levaduras no convencionales, distintas a *Saccharomyces cerevisiae* se ha incrementado considerablemente en los últimos años. En esta categoría se encuentran las levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* y otras, las cuales poseen las ventajas de *Saccharomyces cerevisiae* pero son confiables para alcanzar producciones elevadas (35, 36).

*Pichia pastoris* fue inicialmente desarrollada por la compañía Phillips Petroleum para la producción de proteína unicelular para alimento de ganado. Se desarrollaron procesos fermentativos con alta productividad de biomasa (mayor a 10 g/L-hora) (37). Sin embargo, no resultó económicamente rentable. Esta compañía invirtió sus esfuerzos en desarrollar con ésta levadura un sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes, al igual que muchos otros investigadores (38) (TABLA 1).

TABLA 1

**ALGUNAS PROTEÍNAS PRODUCIDAS EN *Pichia pastoris***  
(Sreekrishna y Kropp 1996).

Proteína	Autor
Antígeno de superficie VHB	Cregg y cols. 1987 (39)
Invertasa	Tschopp y cols. 1987 (40)
Factor de necrosis tumoral	Shreekrishna y cols. 1988 (41)
Lisozima	Digan y cols. 1989 (42)
Fragmento C de la toxina tetánica	Clare y cols. 1991 (43)
Proteína de envoltura del HIV-1	Scorer y cols. 1993 (44)
D-alanina carboxipeptidasa	Despereaux y cols. 1993 (45)
Péptido anticoagulante de garrapata	Laroche y cols. 1994 (46)
CD-38 humana	Fryxell y cols. 1995 (47)
$\alpha$ -Galactosidasa del grano de café	Zhu y cols. 1995 (48)
Anticuerpos monoclonales de conejo	Ridder y cols. 1995 (49)
Pectato liasa	Guo y cols. 1995 (50)
Factor de crecimiento endotelial vascular humano	Mohanraj y cols. 1995 (51)
Proteína anticoagulante antimetastásica	Brankamp y cols. 1995 (52)
Transferrina	Steinlein y cols. 1995 (53)
Fosfatasa ácida	Payne y cols. 1995 (54)
Enterocinasa bovina	Vozza y cols. 1996 (55)
Glicolato oxidasa y catalasa	Payne y cols. 1997 (56)
c-Kit receptor cinasa	Lam y cols. 1997 (57)
Proteína ORF3 del VHE	Lai y cols. 1997 (58)
Inhibidor de la anhidrasa carbónica porcina	Wuebbens y cols. 1997 (59)
Ligando trimérico CD40	McGrew y cols. 1997 (60)
Hexosa oxidasa del alga <i>Chondrus crispus</i>	Hansen y cols. 1997 (61)
Proteína HMG1	Mistry y cols. 1997 (62)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 1.2.2 El metabolismo del metanol

Las levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris*, utilizan el metanol como única fuente de carbono y energía. La primera enzima para la vía de utilización del metanol es la alcohol oxidasa, conocida como AOX, que cataliza la oxidación del metanol a formaldehído (Figura 2).

Existen dos genes que codifican para la AOX, que son AOX 1 y AOX 2. El primero es el responsable de la mayor parte de la actividad en la célula. La producción de AOX está altamente regulada, ya que la enzima es reprimida en presencia de otra fuente de carbono como glucosa o etanol. El poderoso

promotor regulable que programa la expresión de AOX ha sido aislado y empleado dentro de un plásmido para dirigir la producción de proteínas recombinantes (63, 64).

Durante el crecimiento en metanol, la AOX constituye aproximadamente el 30 % de la proteína celular total, secuestrada en los peroxisomas que pueden ocupar el 80 % del volumen celular (64).

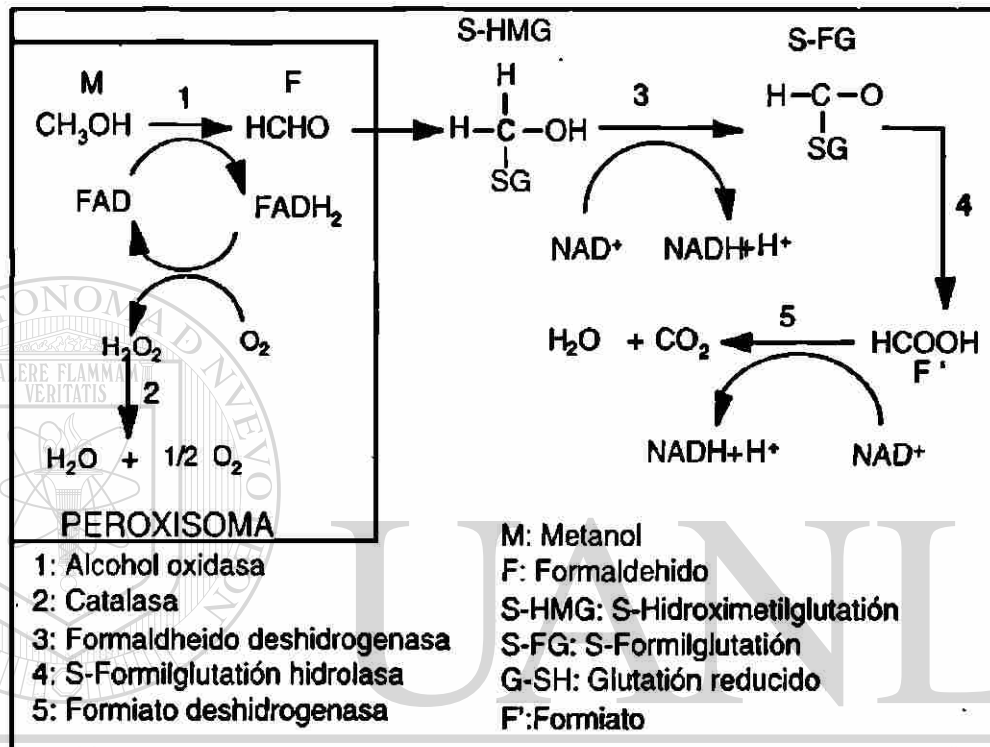


Figura 2. Esquema del metabolismo del metanol (21). Dentro del peroxisoma, el primer paso de oxidación a formaldehído es catalizado por la enzima alcohol oxidasa, empleando oxígeno como aceptor de electrones. El catabolismo posterior a bióxido de carbono y agua se lleva a cabo en el citoplasma.

### 1.2.3 Ventajas de *Pichia pastoris*

la mayor ventaja de producir proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* es la secreción de niveles muy bajos de proteínas nativas. La mayor parte del medio de cultivo comprenderá a la proteína de interés y esto facilita su purificación (65).

Como ya se ha mencionado, a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* tiene la ventaja de que sus proteínas no sufren hiperglicosilación. Ambas levaduras producen una N-glicosilación del tipo rico en manosa, pero la longitud de las cadenas del oligosacárido añadidas a las proteínas postraduccionalmente es más corta en *Pichia pastoris* (8-14 residuos de manosa por cadena) que en *Saccharomyces cerevisiae* (50-150 residuos de manosa) (40). El oligosacárido de *Saccharomyces cerevisiae* tiene enlaces glicosos  $\alpha$ -1,3 terminales, mientras que *Pichia pastoris* no. Se cree que estos enlaces son los responsables de la naturaleza hiperantigénica de estas proteínas dificultando su uso terapéutico.

#### 1.2.4 Vectores de expresión

Los vectores de expresión de *Pichia pastoris* poseen los siguientes elementos genéticos.

1. Las secuencias regulatorias 5'AOX1 (940 pb) y un segmento 3'AOX1 (256 pb), derivadas del gen altamente expresable AOX1 para la expresión regulada de los genes de interés (63).
2. *P. pastoris* HIS4 (gen de la histidinol deshidrogenasa) contenido en un fragmento de 2.8 kb puede servir como un marcador de selección en la transformación de huéspedes de *P. pastoris* His<sup>-</sup> como GS115 (66).
3. La región 3'AOX1 es de 650 pb. Junto con la región 5'AOX1 es necesaria para la inserción sitio-dirigida al gen estructural cuando se emplea un plásmido digerido con la enzima apropiada para la transformación (64).
4. El gen de la beta-lactamasa y el origen de replicación proporciona a los vectores la característica de ser utilizables tanto por *Escherichia coli* como por *Pichia pastoris*.
5. Una secuencia señal que codifica para una señal n-terminal de secreción de la proteína.
6. Sitio de clonación múltiple que permite la inserción del gen de interés dentro del vector de expresión.

7. Señal de terminación de la transcripción y poliadenilación nativa para el gen *AOX1* (~260 pb).
8. Un origen de replicación f1 de bacteriófago (~458 pb) que permite la generación de ADN de cadena sencilla para mutagénesis.
9. Sitios de restricción únicos que permiten la linearización del vector para la integración eficiente dentro del genoma de *Pichia pastoris* (64).

### 1.2.5 La cepa GS115 de *Pichia pastoris*

La cepa GS115 de *Pichia pastoris* 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 huésped, 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  $His^+$  ocurre con una frecuencia de  $10^{-8}$  (64).

### 1.2.6 Dosis génica

Se ha demostrado que es posible obtener una mayor producción de la proteína recombinante si se integra más de una copia del gen que codifica para ésta en el genoma de *Pichia pastoris*, y algunos estudios muestran que existe una correlación entre el número de copias y la producción de la proteína recombinante (TABLA 2). Clare y cols. (43) encontraron que el factor más importante para obtener altos niveles del fragmento C de la toxina tetánica es la integración de múltiples copias del cassette de expresión del fragmento C. En otro estudio (67), con la finalidad de incrementar los niveles de Factor de Crecimiento Epidérmico de ratón (mEGF) se desarrolló un método para efectuar un tamizaje rápido de un gran número de transformantes de *Pichia pastoris* con la presencia de muchas copias del gen foráneo. Scorer y cols. (68) observaron una alta correlación entre el número de copias con la resistencia a drogas, así como un incremento progresivo en el RNA mensajero de HIV-1 ENV.

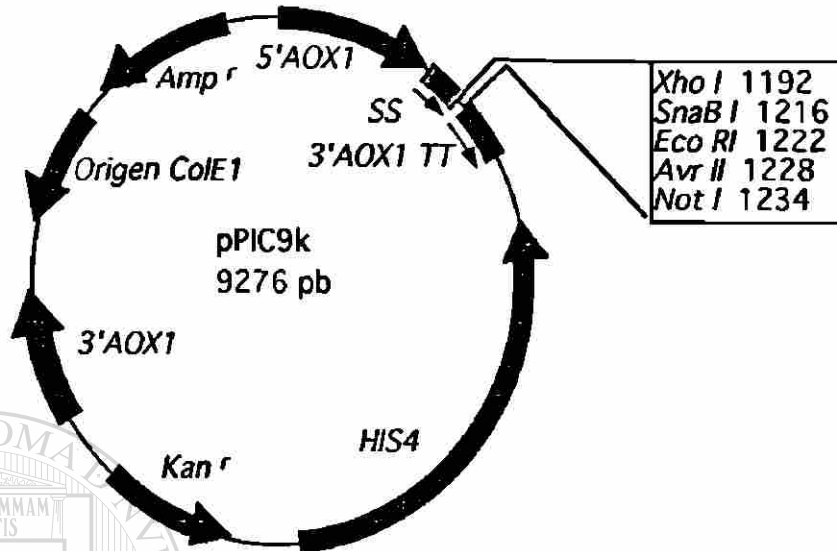
TABLA 2

REFERENCIAS SOBRE LA PRODUCCIÓN CON MULTICOPIAS EN *Pichia pastoris*.

Proteína	Nivel de expresión	Referencia
TNF humano	10 g/L (> 20 copias)	41
Proteína de 51.4 KD de <i>B. sphaericus</i>	Rango de < 1 a > 20 de la proteína soluble (multicopia, número no determinado)	69
Fragmento C de la toxina tetánica	12 g/L (14 copias)	43
Hormona de crecimiento de salmón	0.3 g/L (18 copias)	70
Pertactina P69 de <i>Bordetella pertussis</i>	> 3 g/L (>10 copias)	71
Aprotinina	0.9 g/L (5 copias)	72
mEGF	0.45 g/L (19 copias)	67

Sin embargo, se ha encontrado que para ciertas proteínas como LacZ (73) y el Antígeno de Superficie del Virus de la Hepatitis B (39) sólo fue necesaria una copia para la producción de la proteína a altos niveles, ya que a mayor dosis génica no hubo aumento en el nivel de producción. Esto implica que es necesario evaluar para cada proteína el nivel de producción respecto a la presencia de múltiples copias, si se desea aumentar por esta vía la producción de la proteína recombinante.

Gracias al empleo del vector pPIC9K (figura 3), el cual posee el gen que provee de resistencia a Geneticina en levaduras, es posible tamizar la integración de más de una copia del cassette de expresión al genoma de la levadura, al conferirle la capacidad de crecer en concentraciones progresivamente mayores de Geneticina (64, 68).



**Figura 3.** Plásmido pPIC9K. Posee los siguientes genes: región 5' de la alcohol oxidasa (5' AOX1), secuencia señal de *Saccharomyces cerevisiae* (SS), señal de terminación de la transcripción (3'AOX1 TT), gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4), gen de resistencia a kanamicina o Geneticina (*Kan<sup>r</sup>*), región 3' de la alcohol oxidasa (3' AOX1), origen de replicación de *Escherichia coli* (*ColE1*) y el gen de resistencia a ampicilina (*Amp<sup>r</sup>*).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 1.3 Justificación del trabajo

Se ha logrado la expresión de hGH en diversos sistemas procarióticos y eucarióticos, siendo el antecedente más reciente y novedoso la producción de HGHr en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Debido a que se desea construir una cepa con características mejores que la cepa de *Pichia pastoris* previamente construida, y la posibilidad de seleccionar cepas que han integrado más de una copia del ADNc de HGH y sobreproductoras, a través del tamizaje con el antibiótico Geneticina, se planteó el presente trabajo.

## 1.4 Objetivos del trabajo

Objetivo general:

Construir cepas de *Pichia pastoris* productoras de Hormona del Crecimiento Humano recombinante y evaluar esquemas de purificación.

Objetivos específicos:

1. Producir HGhr.

a) Construir el vector de integración pPIC9KhGH22K.

b) Obtener cepas recombinantes de *Pichia pastoris* mediante su transformación con el vector pPIC9KhGH22K y caracterizar sus genotipos y fenotipos.

c) Seleccionar cepas multicopias del cassette de expresión productoras de HGhr.

2. Evaluar esquemas de purificación de HGhr.



## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Area de trabajo, reactivos y equipo

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG), del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.

Las enzimas de restricción, así como las enzimas ADN Ligasa de T4 fueron obtenidas de New England Biolabs (NEB, Beverly Ma, EUA) y Bethesda Research Laboratories (BRL, Gaithersburg MD, EUA), la enzima liticosa fue adquirida de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo, EUA). Para las reacciones enzimáticas se siguieron las recomendaciones dadas por los proveedores.

Los reactivos para las diferentes soluciones proceden de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo, EUA), Merck de México (Monterrey, N.L.) y Reactivos Monterrey (Monterrey, N.L.). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa se sintetizaron y cuantificaron en el Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.

La cepa de *E. coli* XL1-Blue y los marcadores de peso molecular provienen de la bacterioteca y genoteca de la U.L.I.E.G. El sistema de expresión de *Pichia pastoris*, el cual incluye la cepa GS115, el vector pPIC9, el vector pPIC9K, catálogos y otros, así como el Estuche de expresión de *Pichia pastoris* (cat. No. K1710-01), se adquirieron de Invitrogen Corporation (San Diego Ca, EUA).

Se utilizó un horno de microondas GoldStar modelo MA-857M (Seul, Corea), microcentrifugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, una fuente de poder Biorad 200/2.0 (Nebraska, EUA), un agitador de tubos Orbit Lab line modelo 0993-33061, una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un ultracongelador marca So-Low Environmental Equipment (Cincinnati, Ohio, EUA), una campana Clase II

marca Labconco Corporation (K. C., Missouri, EUA), una báscula digital marca Sartorius modelo 1206MP (Camibh Göttingen Germany), una balanza analítica Mettler modelo AE 163, un evaporador y concentrador marca Labonco Corporation modelo 78100-00 (K. C., Missouri, EUA), un bloque de calentamiento Thermoline Tipo 16600 Modelo OB17615, una cámara de electroforesis horizontal Fotodyne, centrifugas Beckman Mod.TJ-6 y J2-MI, una plataforma agitadora Shaker Orbit Mod Lab Line mod 3520, una plataforma orbital Labline Modelo 3520, una cámara de electroforesis vertical Miniprotean II de Bio Rad, una incubadora con agitación Orbit Lab line Catálogo No. 3526 y un espectrofotómetro UV/Vis DU50 Beckman. Además, un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución System Gold de Beckman y una columna de intercambio aniónico Protein Pak DEAE 8HR, cat. no. PN35650, AP-1, de dimensiones 10 X 100 mm, 8  $\mu$ m, 1000 °A (Waters, Chromatography Division Millipore).

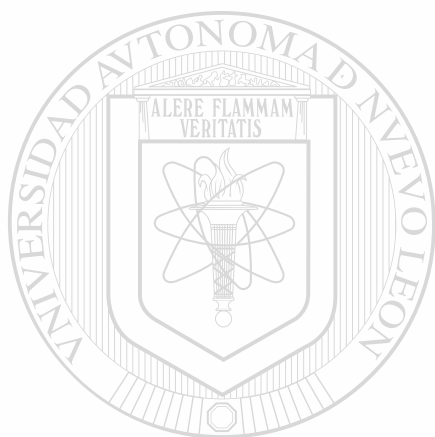
El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo Power Macintosh 5260/100 (Apple Computer, Inc.; Cupertino California. EUA) y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO-RAD). Los periféricos compatibles para Macintosh utilizados fueron: Modem Global Village Communication Inc. modelo Teleport/Silver A801 (East Middlefield Road Mountain View Ca. EUA); digitalizador de imágenes de cama plana UMAX data System Inc. modelo UC630 MaxColor (Industrial Park Hsinchu Taiwan, R.O.I.).

El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word* versión 5.1a (1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft Power Point* Versión 3.0 (1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1* (1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y *UMAX Scan* (1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.). El programa utilizado para comunicación en la red fue el Netscape 2.0.

Los programas computacionales de Biología Molecular empleados fueron: *Amplify* versión 1.2b (Bill Engels 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, Wi. EUA), *ADN Strider*™ 1.1 (Ch. Marck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Départemet de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *Oligo* versión 4.0 (1992, Plymouth, Mn, EUA), *Molecular Analyst* 1997 (BIO-RAD). *RASMac v2.5*, Molecular Graphics Program (1994, Roger Sayle, Biomolecular Structure, Glaxo Research and

Development, Greenford, Middlesex, UK., EUA). *Graphic Converter V2.7 (US)* (1997, Shareware, Thorsten Lemke, E-Mail: 100102.1304@compuserve.com, lemkesoft@aol.com). *CLUSTAL W* Multiple Sequence Alignment Program version 1.6, Marzo 1996 (Des Higgins; E-mail: Higgins@EBI.ac.uk. Toby Gibson; E-mail: Gibson@EMBL-Heidelberg.DE).

Los programas utilizados por vía Internet en un servidor remoto fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); *BLAST Network Service* (Blaster) y *Retrieve* [National Center for Biotechnology Information (NCBI)], *GENEBANK* (ICEGEB, Trieste, Italia).



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

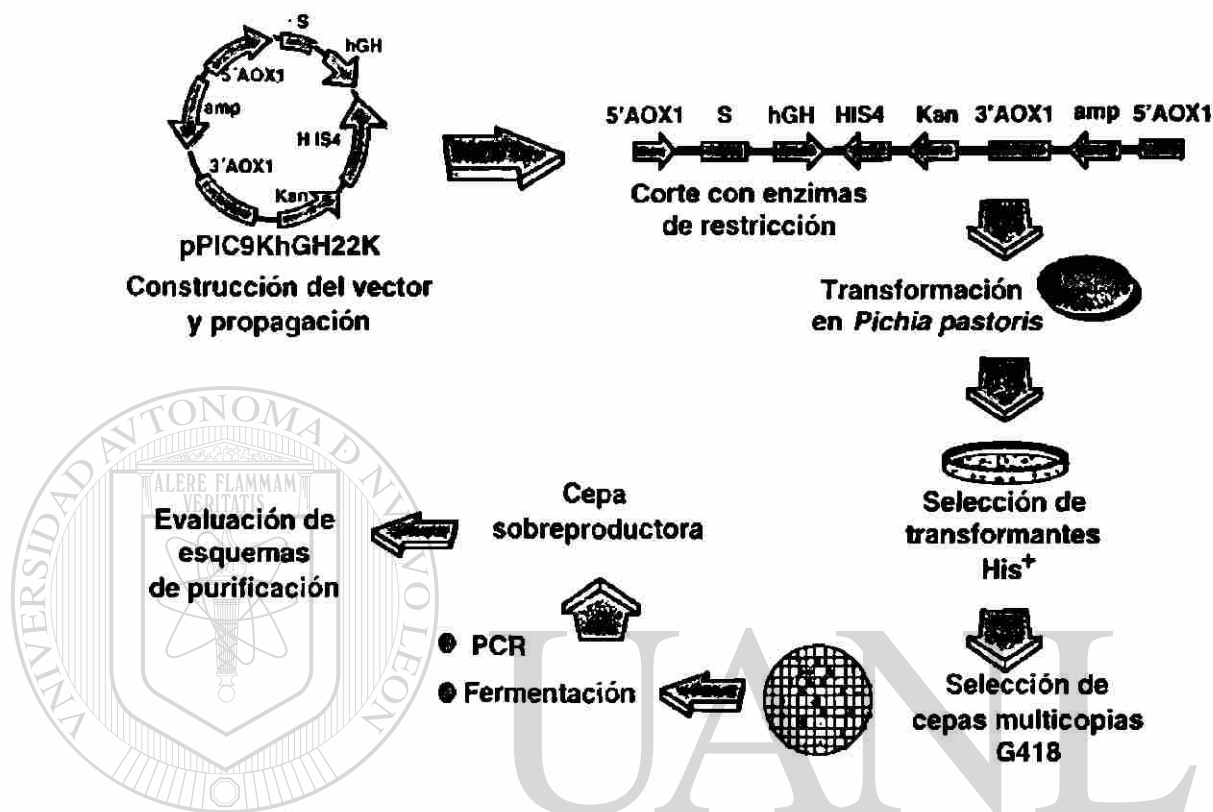
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 2.2 Estrategia general experimental

El trabajo experimental consistió de las siguientes etapas:

- a) **Construcción del vector pPIC9KhGH22K.** Se partió de la construcción pPIC9hGH22K y mediante el corte con las enzimas de restricción *Sac I* y *Not I* se recuperó el fragmento que contiene el ADNc de HGH, el cual posteriormente se transfirió al vector pPIC9K digerido con las mismas enzimas, y se verificó su identidad mediante patrones de restricción.
- b) **Transformación de la cepa GS115 de *Pichia pastoris*.** Se empleó el vector construido pPIC9KhGH22K linearizado con la enzima *Sac I* para permitir la recombinación homóloga con la región 5'AOX 1 del genoma de la levadura.
- c) **Selección de cepas multicopias.** Se seleccionaron las transformantes His<sup>+</sup> y después de verificar la integración del cassette de expresión mediante PCR, se efectuó el tamizaje con el antibiótico Geneticina o G418 para la selección de posibles multicopias. Se analizaron por PCR semicuantitativo las intensidades de las bandas de 2200 y 1060 pb en las cepas que crecieron a concentraciones mayores de G418.
- d) **Fermentación.** Se seleccionaron tres cepas para efectuar los ensayos de fermentación y el análisis de proteínas por Bradford y SDS-PAGE, para seleccionar la cepa sobreproductora.
- e) **Purificación.** Se evaluaron estrategias de purificación de la HGHr mediante precipitación con sulfato de amonio y Cromatografía de Intercambio Aniónico.



**Figura 4.** Representación de la estrategia general planteada para cumplir con los objetivos del presente trabajo. Incluye construcción del vector pPIC9KhGH22K, preparación y posterior transformación en *Pichia pastoris*, selección de posibles cepas multicopia, ensayos de PCR y fermentación, selección de cepa sobreproductora y finalmente evaluación de esquemas de purificación.

## 2.3. Métodos

### 2.3.1 Construcción del vector pPIC9KhGH22K

#### 2.3.1.1 Propagación y caracterización de los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K

Se efectuaron transformaciones de los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K en bacterias calcio-competentes *Escherichia coli* XL1-Blue, de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y cols. (74), que se describe a continuación. A 100  $\mu$ L de bacterias calcio-competentes *Escherichia coli* XL1-Blue se añadieron 10 ng de plásmido y se incubó en hielo por 30 min. Se dió un choque térmico a 37°C por 1 min, se incubó en hielo por 2 min y se añadieron 900  $\mu$ L de medio LB. Finalmente se incubó 1 h a 37°C con agitación constante (250 r.p.m.) antes de distribuir en cajas LB-agar con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y tetraciclina (5  $\mu$ g/mL). Se incubaron a 37°C por 12 a 16 h hasta observar colonias.

Se seleccionaron al azar colonias y se extrajo el ADN con la técnica de minipreparación por lisis alcalina en miniescala (75). Cada colonia se inoculó en 3 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y tetraciclina (5  $\mu$ g/mL) y se incubó a 37°C y con agitación (250 r.p.m.) de 12 a 16 h. El contenido de cada tubo se colectó en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL mediante centrifugaciones sucesivas a 14000 r.p.m. por 2 min, en una microcentrifuga Eppendorf modelo 5415. La pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ L de la solución I y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente se añadieron 400  $\mu$ L de solución II, se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min en hielo. Se agregaron 300  $\mu$ L de solución III, se mezcló suavemente por inversión y se incubó 20 min en hielo. Se centrifugó 9 min a 14000 r.p.m. y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo eppendorf de 2 mL estéril. A éste se le añadieron 650  $\mu$ L de isopropanol y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 min a 14000 r.p.m. y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70 %. Se efectuó un lavado final con etanol al 100 % y se secó la pastilla de ADN en un concentrador marca Labonco Corporation modelo 78100-00 .

El ADN se resuspendió en TE (10 mM Tris-HCl, pH 8) con RNasa 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para verificar la integridad del ADN, se resolvió en geles de agarosa al 0.6 % en una cámara de electroforesis horizontal a 90 V hasta aproximadamente 3/4 del gel. Las bandas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio en un transiluminador y en el sistema Gel Doc de Bio Rad.

Para verificar la identidad de los plásmidos se efectuaron cortes con las enzimas de restricción *Bgl II*, *Sac I* y *Not I*. Para *Bgl II* se realizó lo siguiente:

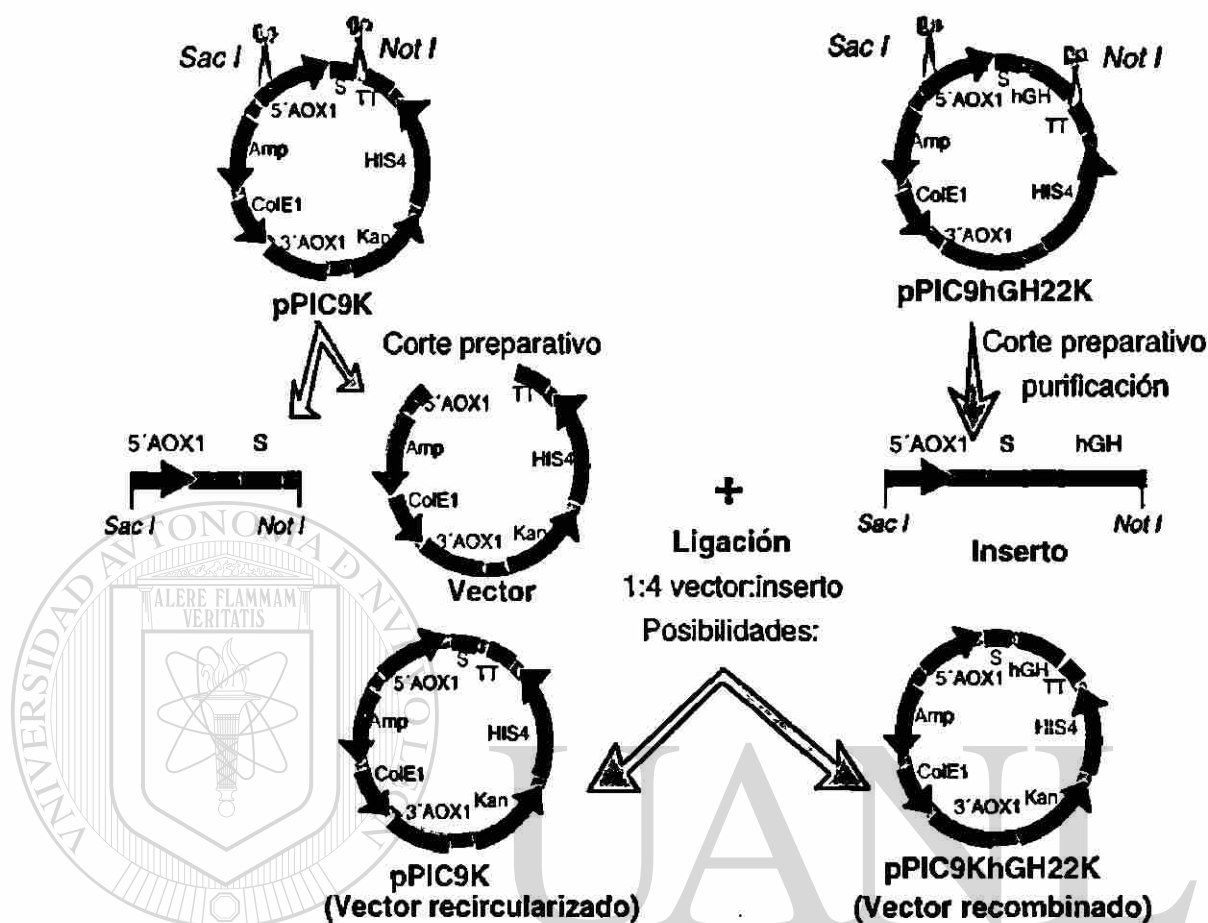
Reactivo	$\mu\text{L}$
Amortiguador Gibco BRL 3 10 X	1.0
Agua	6.75
<i>Bgl II</i> (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25
ADN (500 ng/ $\mu\text{L}$ )	2.0

Se incubó a 37°C por 2 h. Para las enzimas de restricción *Sac I* y *Not I* se realizó lo siguiente:

Reactivo	$\mu\text{L}$
Amortiguador NEB 4 10 X	1
Agua	6.25
<i>Sac I</i> (20 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25
ADN (500 ng/ $\mu\text{L}$ )	2.0

Se incubó 2 h a 37°C, se añadió 0.5  $\mu\text{L}$  de *Not I* (10 u/ $\mu\text{L}$ ) y se incubó 2 h más.

### 2.3.1.2 Cortes preparativos de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K



**Figura 5.** Estrategia efectuada para la construcción del vector pPIC9KhGH22K. Se representan los cortes efectuados con las enzimas *Sac I* y *Not I* para liberar del vector pPIC9hGH22K al fragmento de 1597 pb que contiene el ADNc de HGH, así como para preparar el vector pPIC9K para la ligación posterior. Se muestran además los posibles resultados de la reacción de ligación.

Para liberar del vector pPIC9hGH22K el fragmento de 1597 pb que contiene el ADNc de HGH, así como preparar el vector pPIC9K para la ligación posterior, se efectuaron digestiones analíticas para encontrar las condiciones óptimas de corte con las enzimas *Sac I* y *Not I*. Este corte libera parte de la región 5'AOX1, la secuencia señal y el ADNc de HGH (hasta el sitio de policlonación). Una vez establecidas, las digestiones preparativas se realizaron de acuerdo a la siguiente tabla:



Reactivo	pPIC9K	pPIC9hGH22K
Amortiguador NEB 4 10X	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Agua	73.75 $\mu$ L	48.75 $\mu$ L
ADN	10 $\mu$ L (5 $\mu$ g) 65°C 20 min	30 $\mu$ L (15 $\mu$ g) 65°C 20 min
<i>Sac I</i>	0.7 $\mu$ L 4 h + 0.55 $\mu$ L toda la noche	1.9 $\mu$ L 4 h + 1.85 $\mu$ L toda la noche.
<i>Not I</i>	2.5 $\mu$ L 4 h + 2.5 $\mu$ L toda la noche	3.8 $\mu$ L 4 h + 3.7 $\mu$ L toda la noche

Los cortes fueron analizados en geles de agarosa al 0.6 %.

### 2.3.1.3 Purificación del fragmento de 1567 pb

El fragmento de 1597 pb que contiene el ADNc de HGH (9.5  $\mu$ g de la digestión de pPIC9hGH22K) se purificó en un gel preparativo de agarosa al 1 %. La banda de 1597 se recuperó del gel cortando con un bisturí. El fragmento se recuperó de la agarosa mediante la técnica de electroelución (Schleider and Schuell). Se colocó el fragmento en una cámara con amortiguador TE estéril, se sometió a 100 V por 2 h y se recuperó el amortiguador del compartimiento. Se precipitó con etanol al 70 % a -70°C por 2 h. Se centrifugó 15 min a 14000 r.p.m. a 4°C. Se efectuaron dos lavados con etanol al 70% y se verificó la recuperación en un gel de agarosa al 1 %.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 2.3.1.4 Reacción de ligación

Se realizó la ligación del ADNc de HGH en el vector pPIC9K, para lo cual se empleó una proporción 1:4 vector:inserto purificado. La mezcla de ligación fue la siguiente:

Amortiguador 5X	4 $\mu$ L
Vector cortado sin purificar	6.0 $\mu$ L (300 ng)
Inserto purificado	3.9 $\mu$ L (290 ng)
Agua	4.1 $\mu$ L
Ligasa (1 u/ $\mu$ l, Gibco-BRL)	2.0 $\mu$ L

El volumen final de la reacción fue 20  $\mu\text{L}$ . La ligación se llevó a cabo a 16°C por 16 h. El resultado de la ligación se verificó en un gel de agarosa al 1 %.

### 2.3.1.5 Transformación de bacterias calcio-competentes con la reacción de ligación, obtención del ADN y caracterización.

La transformación se efectuó en bacterias calcio-competentes *Escherichia coli* XL1-Blue, de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y cols. (74). En un tubo se colocaron 5.5  $\mu\text{L}$  del producto de la ligación (equivalente a 75 ng del vector) y se llevó a 10  $\mu\text{L}$  con TE pH 8, y se utilizaron los siguientes controles: vector digerido (75 ng), testigo negativo (amortiguador TE pH 8) y testigo positivo (1 ng pUC19), y se incubaron en hielo por 15 min. Se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de las bacterias calcio-competentes a cada tubo y se incubaron en hielo por 30 min, 1 min a 37°C, y nuevamente en hielo por 2 min. Se añadieron 900  $\mu\text{L}$  de medio LB y se incubó una hora a 37°C a 250 r.p.m. El volumen de la reacción de la transformación se repartió en 4 placas LB-agar con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y tetraciclina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se incubó a 37°C por 16 h.

De las colonias obtenidas se levantaron 36 al azar y se extrajo el ADN con la técnica de minipreparación por lisis alcalina en miniescala (75). Los ADNs fueron caracterizados con la enzima *Bgl II*, se seleccionó el ADN de una clona el cual fue caracterizado más exhaustivamente con las enzimas de restricción *Sac I-Not I*, *Pst I*, *Pvu II*. Estas enzimas permitieron distinguir fácilmente al comparar el patrón de restricción de pPIC9KhGH22K contra pPIC9K y pPIC9hGH22K.

## 2.3.2 Construcción de la cepa recombinante de *Pichia pastoris*

### 2.3.2.1 Preparación del plásmido pPIC9KhGH22K para la transformación en *Pichia pastoris*

Para efectuar la transformación de *Pichia pastoris*, se linearizó el vector construido pPIC9KhGH22K. Adicionalmente, se linearizó pPIC9K como control.

Se efectuaron las digestiones preparativas de la siguiente manera:

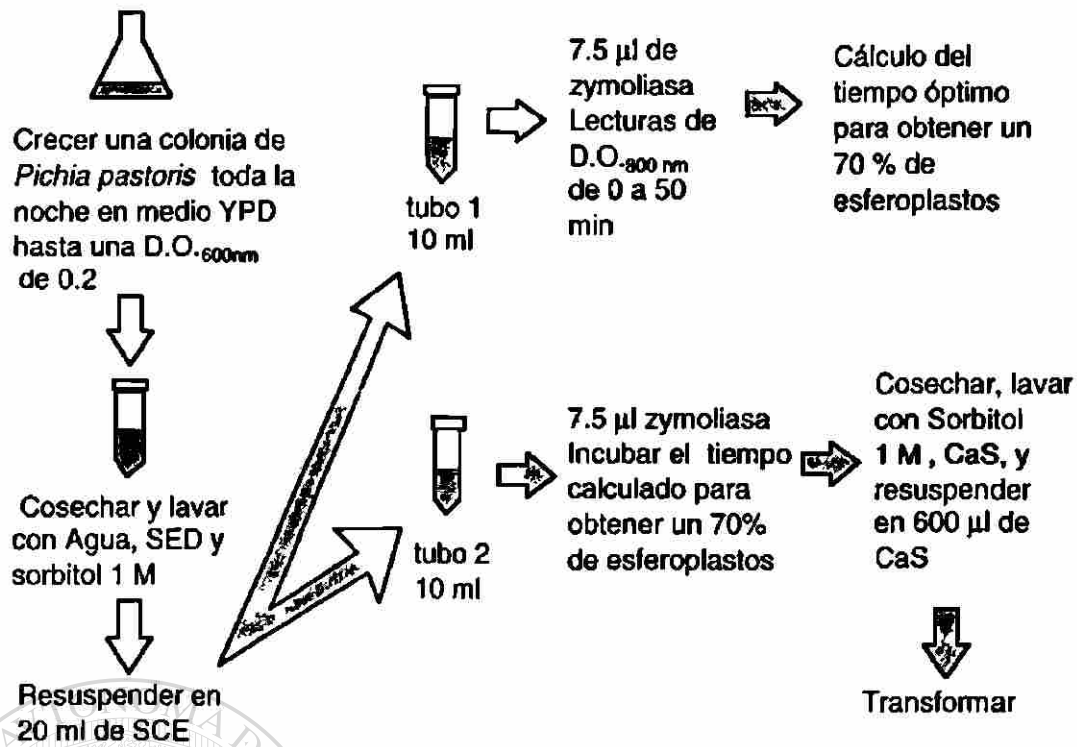
	pPIC9K	pPIC9KhGH22K
Amortiguador NEB 1 10X	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Agua	36 $\mu$ L	36 $\mu$ L
ADN	50 $\mu$ L (25 $\mu$ g)	50 $\mu$ L (25 $\mu$ g)
65°C 20 min		
Sac I 20 u/ $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
Vol. Final	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

Se incubó a 37°C por 16 h. El corte se corroboró en gel de agarosa al 1

%.

### 2.3.2.2 Transformación de *Pichia pastoris* mediante la técnica de esferoplastos

Se efectuó de acuerdo a lo descrito por Invitrogen (64). Se empleó la mitad de un cultivo fresco de *Pichia pastoris* GS115 para efectuar una cinética con el fin de obtener el tiempo óptimo para la formación de un 70 % de esferoplastos. Posteriormente se procedió a la preparación de esferoplastos para la transformación con la otra mitad del cultivo fresco.



**Figura 6.** Proceso seguido para obtener un 70 % de formación de esferoplastos, empleando la cepa GS115 de *Pichia pastoris*.

#### a) Cinética de esferoplastos

Se sembró por estría la cepa GS115 *Pichia pastoris* en placa YPD y se incubó la placa a 30°C por 2 días. En un tubo cónico de 50 mL conteniendo 10 mL de YPD, se inoculó una colonia de GS115 de la placa YPD y se creció toda la noche a 28-30°C y 250 r.p.m. Se colocaron 200 mL de YPD en tres matraces de 500 mL, se inocularon con 5, 10, y 20 µL de células del cultivo anterior y se incubaron toda la noche a 30°C y 250 r.p.m., se cosecharon las células del cultivo con D.O.<sub>600nm</sub> entre 0.2 y 0.3 por centrifugación a temperatura ambiente por 5-10 min a 1500 X g, en una centrífuga Beckman TJ-6. Estas células se usaron para la formación de esferoplastos. Se lavaron las células por resuspensión de la pastilla en 20 mL de agua estéril y se transfirieron a un tubo cónico estéril de 50 mL. Las células se empastillaron por centrifugación a 1500 X g por 5 min a temperatura ambiente. Se efectuaron 2 lavados más de la pastilla, con 20 mL de SED y sorbitol 1 M. Finalmente se resuspendieron en 20 mL de amortiguador SCE y se dividió la suspensión en dos tubos cónicos de 50 mL (~10 mL cada uno): el tubo 1 se

utilizó para efectuar la cinética de esferoplastos, y el tubo 2 se dejó en hielo para la transformación con el ADN.

Para la cinética se realizó lo siguiente:

Se ajustó el espectrofotómetro UV/Vis DU50 Beckman a 800 nm con el blanco que consistió de 800  $\mu$ L de SDS 5 % y 200  $\mu$ L de SCE. Se prepararon 17 tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Se rotularon como 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 y se añadieron 800  $\mu$ L de SDS al 5 % a cada tubo.

Del tubo cónico de células marcado como 1 se tomaron 200  $\mu$ L de la suspensión y se colocaron en el tubo de microcentrifuga marcado "0", siendo éste el tiempo cero y se dejó el tubo en hielo.

Se añadieron 7.5  $\mu$ L de zymoliasa al mismo tubo cónico de células marcado como 1, se mezcló por inversión y se incubó 30°C. Se monitoreó la formación de esferoplastos tomando 200  $\mu$ L a los tiempos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50 min a partir de que se añadió la zymoliasa, colocando las alícuotas en hielo. Se leyó la D.O.800nm para cada tubo.

El porcentaje de esferoplastos para cada punto del tiempo se determinó usando la ecuación:

$$\% \text{ de esferoplastos} = 100 - [(D.O.800nm \text{ al tiempo } t / D.O.800nm \text{ al tiempo } 0) \times 100]$$

Se determinó así el tiempo de incubación mínimo necesario para obtener el 70 % de esferoplastos.

#### b) Transformación

Al tubo cónico de células marcado como 2 que se dejó aparte en hielo, se añadieron 7.5  $\mu$ L de zymoliasa y se incubó a 30°C el tiempo calculado para obtener el 70 % de esferoplastos. Se cosecharon los esferoplastos por centrifugación a 750 X g por 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron con 10 mL de sorbitol 1 M (sin usar vórtex). Los esferoplastos se colectaron por centrifugación a 750 X g por 10 min a temperatura ambiente, y se lavaron con 10 mL de CaS. Finalmente se resuspendieron en 0.6 mL de CaS. Se usaron inmediatamente para la transformación debido a que no se pueden almacenar.

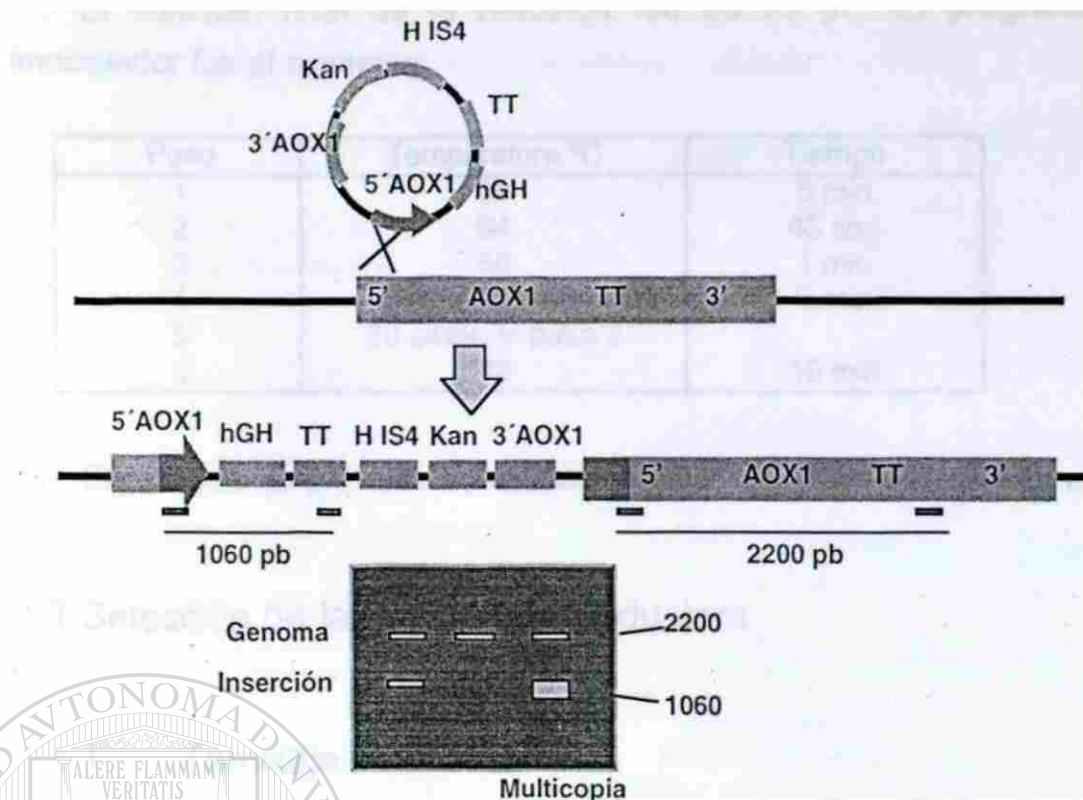
Se empleó para transformar el vector pPIC9KhGH22K digerido con *Sac* I, así como pPIC9K digerido con *Sac* I y además amortiguador TE, estos dos

como controles. Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de esferoplastos en un tubo de microcentrífuga estéril de 2 mL. Se añadieron 10  $\mu\text{g}$  de ADN linearizado o TE y se incubó el tubo a temperatura ambiente por 10 min. Se añadió 1.0 mL de solución fresca de PEG/CaT a las células y ADN, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifugó el tubo a 750 X g por 10 min a temperatura ambiente y se extrajo el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla de células transformadas en 150  $\mu\text{L}$  de medio SOS y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente se añadió 850  $\mu\text{L}$  de sorbitol 1 M. se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de cada transformación de esferoplastos-ADN con 10 mL de agarosa-RDB fundida y se vertió en las placas RDB. cada transformación rindió para 5 placas. Una vez que la agarosa se gelificó, se invirtieron las placas y se incubaron a 30°C por 6 días.

Se comprobó la viabilidad de las células, para lo cual se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de esferoplastos con 900  $\mu\text{L}$  de sorbitol 1 M y 100  $\mu\text{L}$  de esta dilución se mezclaron a su vez con 10 mL de agarosa fundida RDBH y se vertió en una placa RDBH, para demostrar que los esferoplastos pueden ser regenerados a células.

### 2.3.2.3 Verificación de la integración por PCR

La verificación genotípica de algunas cepas se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Figura 7). Se utilizaron extractos crudos de algunas de las cepas obtenidas por el tratamiento con liticasa (76). Se tomó un trozo de la colonia al tamaño de la cabeza de un alfiler con una puntilla estéril, y se resuspendió en 10  $\mu\text{L}$  de agua contenidos en un tubo de microcentrífuga de 500  $\mu\text{L}$ . Se añadió 5  $\mu\text{L}$  de liticasa (5  $\mu/\mu\text{L}$ ) y se incubó 10 min a 30°C. Posteriormente se sumergieron los tubos en nitrógeno líquido por un min. De este extracto crudo se tomaron directamente 5  $\mu\text{L}$  para llevar a cabo el PCR.



**Figura 7.** Verificación de genotipos de las transformantes de *Pichia pastoris* mediante PCR. Se muestra la integración del cassette de expresión, el sitio donde se aparean los iniciadores y los productos de PCR que se generan.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó empleando los iniciadores recomendados por Invitrogen (64), siguiendo las siguientes especificaciones:

Reactivo	$\mu\text{L}$	Conc. final
Amortiguador (10 X)	2.5	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	200 $\mu\text{M}$
Primer 5' (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
Primer 3' (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5	1.5 mM
Agua	10.0	*
Taq (5 U/ $\mu\text{L}$ , Perkin-Elmer)	0.5	2.5 U
Extracto crudo	5.0	*

El volumen final de la reacción fue de 25  $\mu$ L. El programa del termociclador fue el siguiente:

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	94	5 min
2	94	45 seg
3	60	1 min
4	72	2 min
5	30 ciclos al paso 2	
6	72	10 min

El producto amplificado se verificó con 5  $\mu$ l en un gel de agarosa al 1 %.

### 2.3.3 Selección de la cepa sobreproductora

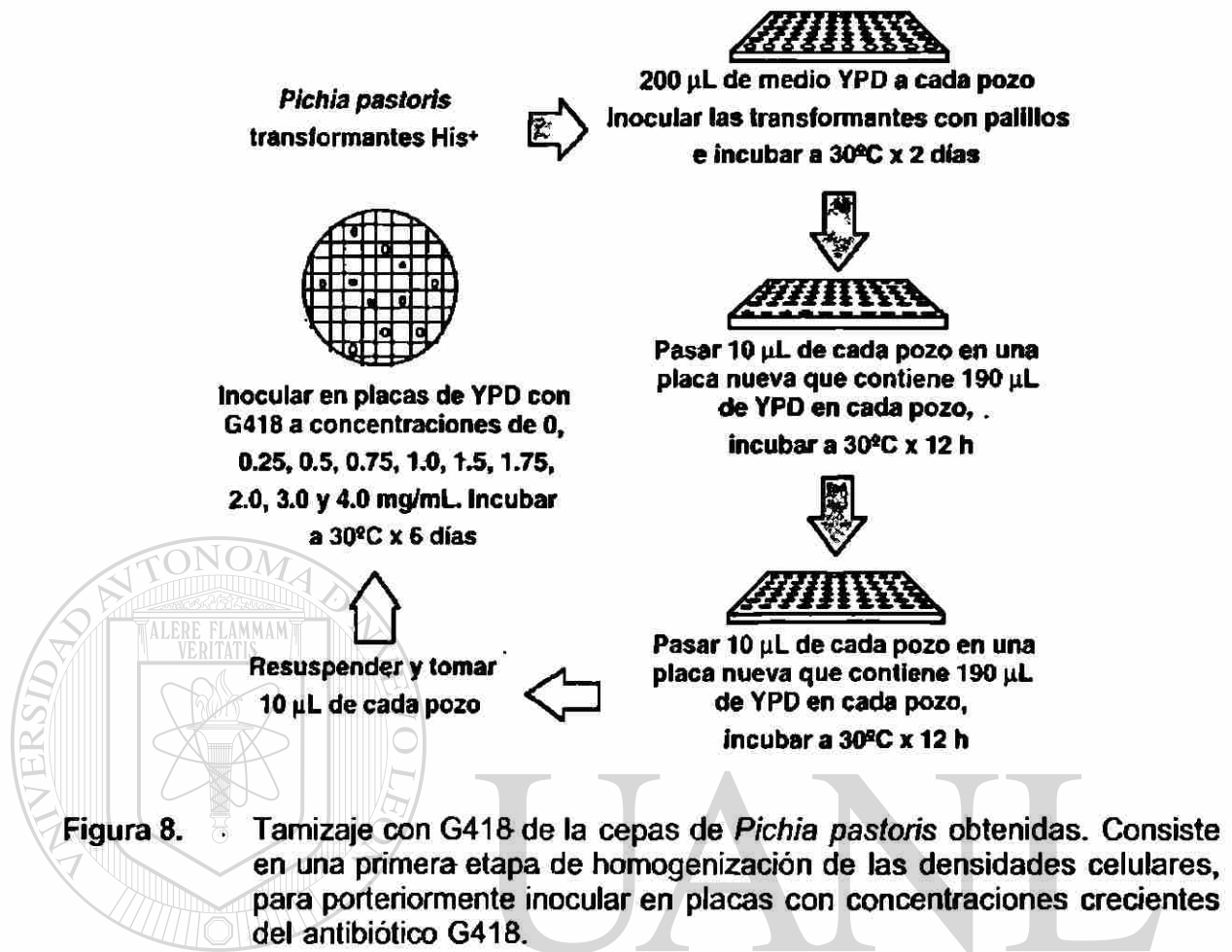
#### 2.3.3.1 Tamizaje con G418

Para seleccionar las posibles cepas multicopias, se efectuó el tamizaje a concentraciones crecientes de G418, debido a que a mayor número de copias del cassette de expresión integrado, la levadura es capaz de crecer a concentraciones mayores de G418..

Se añadieron 200  $\mu$ L de YPD a cada pozo de una placa de microtitulación y se inoculó cada pozo con cada una de las transformantes de pPIC9KhGH22K His<sup>+</sup> obtenidas mediante la técnica de esferoplastos, así como los siguientes controles: una cepa transformada con pPIC9K, una cepa transformada con pPIC9hGH22K sin resistencia a G418, y GS115 sin transformar, usando palillos de dientes estériles y agitando para resuspender las células. Se incubó a 30°C por dos días. Después en un segundo juego de placas se añadió 190  $\mu$ L de YPD a cada pozo y se inoculó con 10  $\mu$ L del primer juego de placas. Se incubó el segundo juego de placas a 30°C por toda la noche. Al siguiente día, se repitió el pase en un tercer juego de placas. Después de la incubación toda la noche, se resuspendieron las células en cada pozo por pipeteo, se tomaron 3  $\mu$ L de cada pozo y se colocaron en placas de YPD conteniendo G418 a concentraciones finales de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL en un patrón regular usando una plantilla numerada.



Se dejó secar el líquido y se incubaron las placas a 30°C. Se revisaron después de 2, 3, 4, y 5 días para ver las cepas resistentes a G418.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 2.3.3.2 Estimación semicuantitativa del número de copias por PCR

Después de incubar por 5 días, se revisaron las placas y se seleccionaron las colonias que crecieron a una concentración  $\geq 0.75$  mg/mL de G418. Se efectuaron ensayos de PCR en condiciones tales que permitieran evaluar las intensidades relativas de las bandas de 2200 y 1060 pb, que podrían sugerir más de una copia del gen de hGH, comparadas con la cepa construida anteriormente (GS115hGH22K-unicopia).

El ADN se extrajo mediante la técnica de TSNT (33). Se inoculó una colonia en 4 mL de YPD y se creció a 30°C y 250 r.p.m. por 24-48 h. Se cosechó en un tubo de microcentrifuga de 2 mL a 14000 r.p.m. 1 min y se lavó

la pastilla con 500  $\mu\text{L}$  de agua milli-Q. Se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de amortiguador TSNT (Tritón X-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y se mezcló, se añadió posteriormente 650  $\mu\text{L}$  de fenol saturado y se agitó por 5 min. Se agregó 150  $\mu\text{L}$  de Sevag y nuevamente se agitó en vórtex por 30 min. Se agregó 300  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE pH 8 y se agitó 10 seg. Se centrifugó 5 min a 14,000 r.p.m. y la fase acuosa se transfirió a un tubo de 2 mL. El ADN se precipitó con 1.3 mL de etanol absoluto. Se efectuaron 2 lavados con 1 mL de etanol al 70 %, la pastilla se secó en un evaporador centrífugo al vacío y finalmente se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de TE pH 8.

Se verificó la integridad del ADN en geles de agarosa al 0.6 % y la calidad por la relación espectrofotométrica 260/280. La cantidad aproximada se determinó por la fórmula  $\text{Abs} \times \text{Dilución} \times 50 = \mu\text{g/mL}$  de ADN, y se comparó en el sistema Gel Doc contra un ADN estándar.

Las condiciones experimentales del PCR semicuantitativo (78) se describen a continuación. La primera parte de la mezcla de reacción para el PCR consistió en lo siguiente:

Reactivo	$\mu\text{L}$	Conc. final
DMSO	1.25	5 %
Amortiguador 10 X	2	1X
dNTP's 10 mM	0.5	200 $\mu\text{M}$
Primer 5' 5 $\mu\text{M}$	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
Primer 3' 5 $\mu\text{M}$	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5	1.5 mM
Agua	8.75	*

Se añadió 50 ng de ADN y se calentó a 94°C por 5 min. Posteriormente se añadió la segunda parte de la mezcla de reacción:

Reactivo	$\mu\text{L}$	Conc. final
Taq 5 u/ $\mu\text{L}$ (Perkin Elmer)	0.2	0.04 u/ $\mu\text{L}$
Agua	4.3	*
Amortiguador 10X	3.5	1X

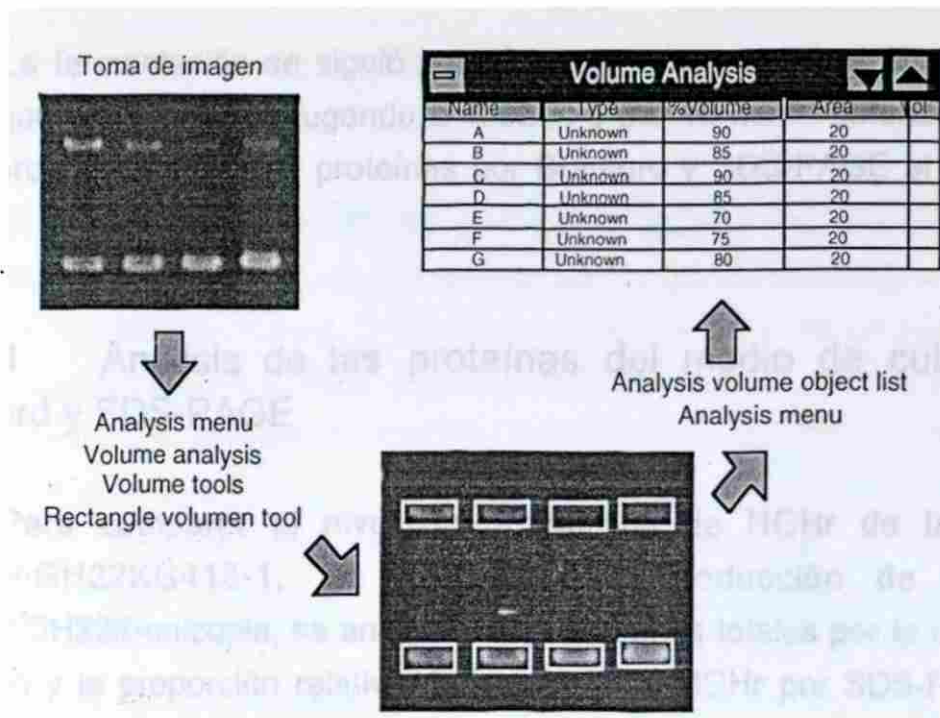
El volumen final de la reacción fue de 25  $\mu$ L. El programa del termociclador se muestra a continuación:

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	94	5 min
2	94	45 seg
3	60	1 min
4	72	2 min
5	18 ciclos al paso 2	
6	72	10 min

El producto amplificado se verificó en un gel de agarosa al 0.8 %. Se efectuó el análisis de las intensidades relativas de las bandas de 2200 y 1060 pb empleando el sistema Gel Doc de Bio Rad como a continuación se describe.

Para el análisis de la intensidad de cada banda en particular, se recurre a "Volume Analysis" (Figura 9). Esta herramienta se empleó en geles de SDS-PAGE y agarosa. Con "Volume Tools" se selecciona la forma de un rectángulo y se dibuja encima de cada banda. Si se desea comparar entre bandas del mismo carril o de carriles distintos, es conveniente encontrar la banda de mayores dimensiones para dibujar el rectángulo, y a partir de él copiarlo en el resto de las bandas, para eliminar el error debido a diferencias en las dimensiones.

Se marcan todas las bandas, y una zona sin bandas como blanco. Los resultados se obtienen en "Analysis volume object list". El valor numérico de Adjust volume en Cuentas X  $\text{mm}^2$  equivale a la intensidad de la banda.



**Figura 9.** Secuencia de pasos requeridos para el análisis de los geles en el sistema Gel Doc de Bio Rad. Mediante esta secuencia de pasos se obtiene la intensidad de cada banda en Cuentas X mm<sup>2</sup>.

### 2.3.3.3 Ensayos de fermentación

Se seleccionaron 3 cepas de *Pichia pastoris* denominadas GS115hGH22KG418, que crecieron a las mayores concentraciones de G418, y con ellas se efectuaron fermentaciones por triplicado, con el fin de verificar la producción de HGhr y seleccionar una cepa sobreproductora.

A partir de un stock en glicerol al 15 %, se estriaron placas de agar YPD de las 3 cepas, así como de la cepa unicopia, y se incubaron por 3 días a 30°C. Posteriormente, se inoculó una colonia y se resuspendió en 25 mL de medio BMG. Se incubó a 30°C y 250 r.p.m. hasta alcanzar una D.O.600nm de 4. Se efectuó una dilución en medio BMG fresco a una D.O.600nm final de 0.5. Se incubó a 30°C y 250 r.p.m. hasta alcanzar una D.O.600nm de 1.4. Finalmente, se obtuvo el paquete celular de cada matraz centrifugando a 4000 X g por 10 min y el paquete se resuspendió en 25 mL de medio BMM con una concentración de metanol de 0.75 %. La inducción se llevó a cabo a 30°C y 250 r.p.m., se añadió metanol cada 24 h para compensar la pérdida por evaporación. Se siguió el crecimiento registrando la D.O.600nm.

La fermentación se siguió por 120 horas. Se separó el sobrenadante del paquete celular centrifugando a 4000 X g por 10 min. Posteriormente se efectuaron los análisis de proteínas por Bradford y SDS-PAGE al medio de cultivo.

#### 2.3.3.4 Análisis de las proteínas del medio de cultivo por Bradford y SDS-PAGE

Para comparar el nivel de producción de HGhr de las cepas GS115hGH22KG418-1, 19 y 76 con la producción de la cepa GS115hGH22K-unicopia, se analizaron las proteínas totales por la técnica de Bradford y la proporción relativa de la banda de HGhr por SDS-PAGE. Se dializaron 10 mL de cada medio de cultivo contra 4 L de agua milli-Q a 4°C y con agitación, efectuando 2 cambios de agua más cada 2 h.

Para la técnica de Bradford, se tomaron 600 µL del medio dializado y se mezclaron con 2.4 mL del reactivo de Coomassie. Se incubó por 3 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se realizó una curva de calibración empleando albúmina sérica bovina (Sigma) como estándar.

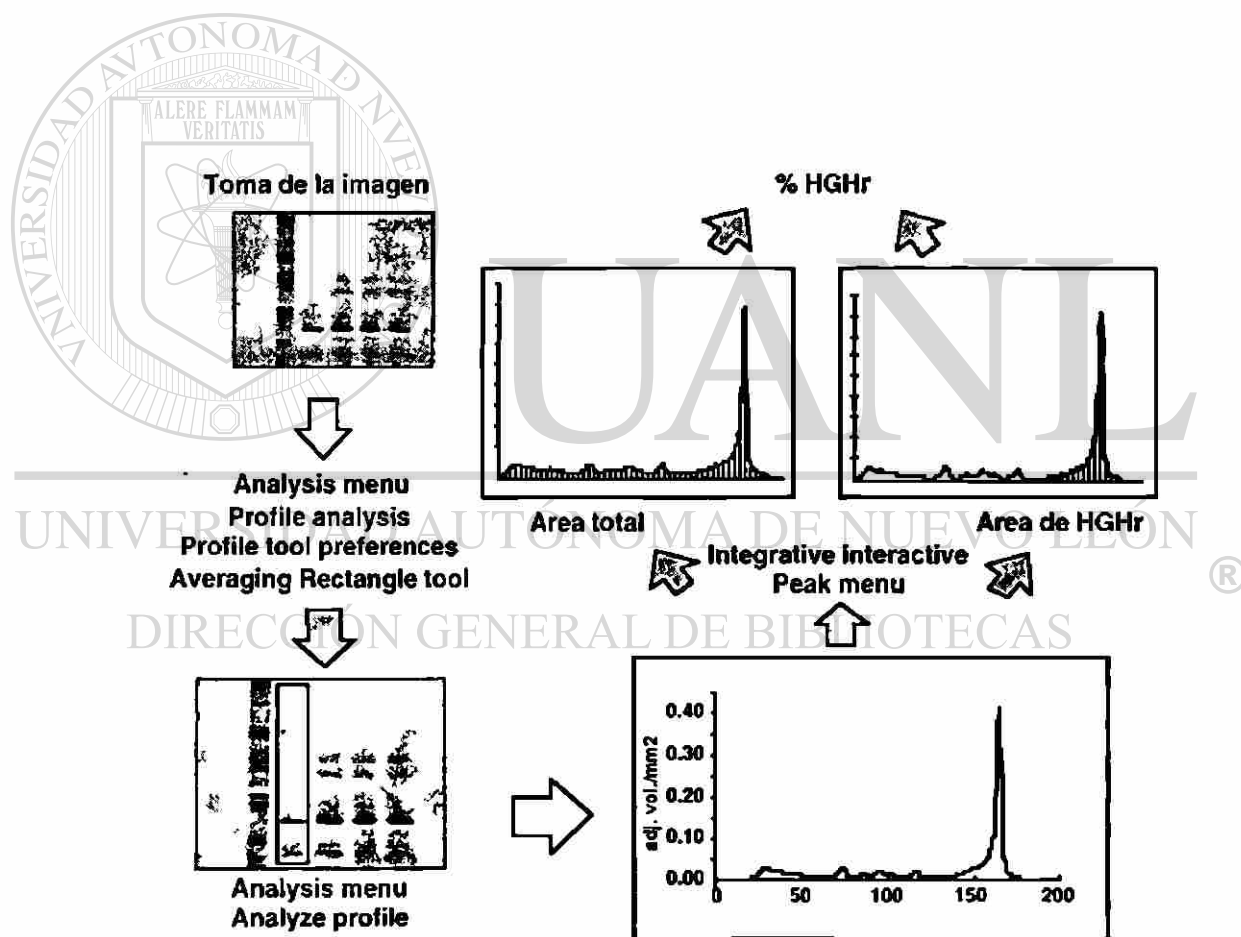
Se llevaron a sequedad 200 µL de medio de cultivo dializado en un evaporador centrífugo al vacío por 4 h. El residuo se resuspendió en 20 µL de amortiguador de muestra 1X, se aplicaron en un gel de acrilamida al 12 % y se corrió utilizando una cámara de electroforesis Mini Protean II Cell Bio Rad a 80 V hasta que las muestras entraron al gel separador, y posteriormente a 120 V hasta que se salió el frente del colorante. El gel se tiñó con Coomassie sumergiendo 20 min en solución fijadora, 20 min en solución de Coomassie y el tiempo y los cambios necesarios en solución decolorante hasta eliminar el exceso de colorante. Todo el tiempo se mantuvo en agitación a 60 r.p.m. en una plataforma agitadora Orbital Shaker Lab line Mod 3520. El gel se analizó en el sistema Gel Doc de Bio Rad de la siguiente manera:

En la figura 10 se muestra como se obtiene el % de HGh respecto al resto de las proteínas presentes. Después de tomar la imagen del gel SDS-PAGE en el Sistema Gel Doc de Bio Rad, se procede a efectuar el análisis del perfil de bandas de cada carril. Mediante la herramienta de Profile analysis denominada "Averaging Rectangle Tool" se dibuja un rectángulo cuyas dimensiones sean las de un carril a analizar. Posteriormente en "Analyze

Profile" proporciona el reporte gráfico donde cada pico representa una banda, cuya área y altura son directamente proporcionales a la intensidad de cada banda.

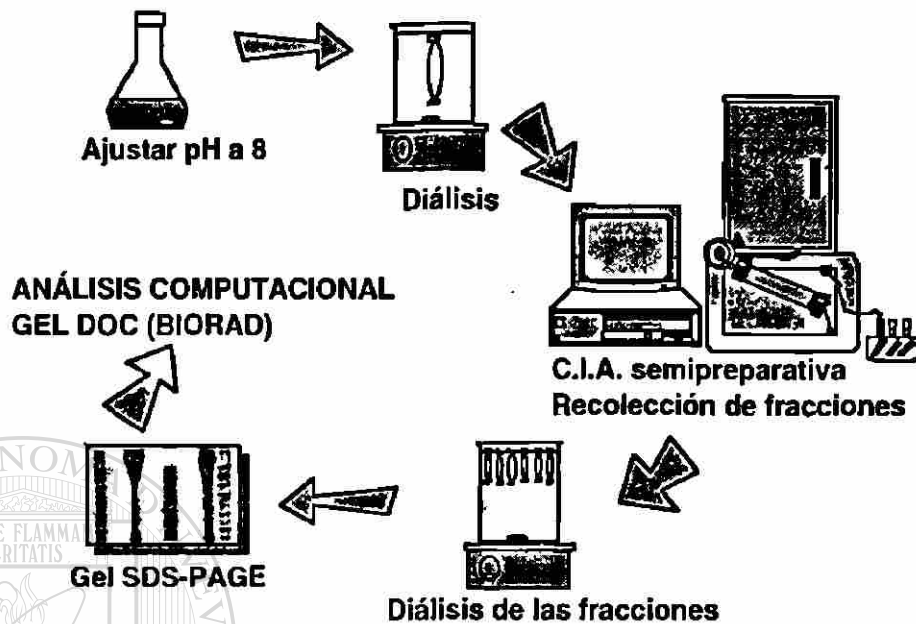
Efectuando un barrido manual de la gráfica utilizando el modo "integrative-interactive", en la parte inferior de la pantalla presenta el valor del área total. Utilizando el modo "Integrative-Interactive" se hace un barrido de la banda correspondiente a HGhr, y en la parte inferior de la pantalla muestra el valor del área correspondiente a HGhr. Con éstos dos valores se calcula el % correspondiente a HGhr.

Para comparar entre los carriles de un mismo gel, es conveniente identificar el carril más ancho, formar el rectángulo al tamaño de este carril, y copiar este rectángulo en los demás carriles para eliminar el error debido a diferencias en las dimensiones de los carriles.



**Figura 10.** Secuencia que se sigue para el análisis de los gels en el sistema Gel Doc de Bio Rad. Mediante esta secuencia de pasos se obtiene la pureza de la banda correspondiente a HGhr, al calcular su porcentaje respecto al perfil del resto de las proteínas presentes en el carril que se analiza.

## 2.4 Sistemas de purificación



**Figura 11.** Esquema general de la purificación de HGhr. Partiendo de un medio de cultivo ajustado a pH 8 y dializado, se efectuaron distintos ensayos cromatográficos de intercambio iónico, durante los cuales se recolectaron fracciones que se analizaron por SDS-PAGE.

Una vez seleccionada la cepa sobreproductora de acuerdo al nivel de producción de HGhr, se procedió a efectuar los ensayos de purificación mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico (Figura 11).

### 2.4.1 Precipitación con sulfato de amonio

La precipitación con sulfato de amonio se realizó con 90 mL del medio de cultivo libre de células (pH de 2.5), ajustado a pH 5 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N y se precipitaron con 10.2 g de sulfato de amonio que corresponde a un 20 % de saturación. El sulfato de amonio se agregó lentamente a 4°C sin dejar de agitar, el pH se mantuvo monitoreando con el potenciómetro y ajustando con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N cuando fue necesario. Al terminar de añadir el sulfato de amonio se dejó agitando 1 h.

El precipitado se recuperó por centrifugación en una centrífuga Beckman J2-MI, empleando un rotor JA-18, a 4470 X g por 30 min. El sobrenadante se transfirió a tubos cónicos y el precipitado se resuspendió y aforó a 5 mL con agua milli-Q.

Se dializaron 10 mL del sobrenadante y 2 mL del precipitado. Se tomó lo equivalente a 200  $\mu$ L del sobrenadante y 100  $\mu$ L del precipitado (teniendo en cuenta el aumento de volumen debido a la diálisis), se llevaron a sequedad en un evaporador centrífugo al vacío, se reconstituyeron en 20  $\mu$ L de amortiguador de muestra 1X y se analizaron en un gel SDS-PAGE al 12 %.

Para calcular la recuperación de HGhr en el precipitado y en el sobrenadante; así como su pureza, se consideró los volúmenes finales de cada uno, la cantidad que se colocó en el gel, así como el porcentaje de HGhr presente en el carril correspondiente. Para los cálculos se empleó la siguiente fórmula:

$$(\text{Vol. total ml} \times \text{cuentas D.O.} \times \text{mm}^2) \times 1000 / \text{Vol al gel } \mu\text{l}$$

## 2.4.2 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (System Gold de Beckman), empleando una columna de intercambio aniónico Protein Pak DEAE 8HR, cat. no. PN35650, AP-1, de dimensiones 10 X 100 mm, 8  $\mu$ m, 1000  $^{\circ}$ A (Waters, Chromatography Division Millipore). La fase móvil A consistió en Tris 25 mM, EDTA 1 mM a pH 8. La fase móvil B consistió en la fase móvil A más 1 M de NaCl. La detección se realizó a doble canal, 215 y 280 nm. El volumen de inyección fue de 1 mL y se efectuaron distintos programas de elución.

**Ensayo A:** Se empleó un medio obtenido de una fermentación a nivel fermentador de la cepa GS115hGH22K-unicopia, que contiene cantidades mayores de HGhr. A partir de este medio ajustado a un pH de 8 y dializado, se empleó el siguiente sistema de elución:

0.3 M de NaCl durante 7 min, 0.3-1 M en 7 min, 20 min a 1 M de NaCl, y 1-0.3 M en 7 min. El flujo permaneció constante a 1 mL/min.



**Ensayo B:** Se empleó el medio producido a nivel matraz con la cepa GS115hGH22KG418-sobreproductora. Se tomaron 10 mL del medio, se concentraron en un evaporador centrífugo al vacío y se ajustaron a 1 mL con la fase móvil A. El sistema de elución fue el anterior.

**Ensayo C:** Se empleó el medio del Ensayo B. Se tomaron 10 mL del medio, se concentraron en un evaporador centrífugo al vacío y se ajustaron a 1 mL con la fase móvil A. El sistema de elución fue el siguiente: 20 min a 0.3 M de NaCl y un flujo de 0.1 mL/min. 10 min a 0.3 M de NaCl y 0.4 mL/min, 0.3-1 M de NaCl en 30 min a 0.4 mL/min, 10 min a 1 M de NaCl y 1 mL/min, y finalmente 1-0.3 M de NaCl en 5 min y 1 mL/min.

En cada ocasión, las fracciones fueron recolectadas, dializadas contra agua y analizadas por SDS-PAGE. El % de recuperación se calculó de acuerdo al volumen recolectado y aplicado en el gel SDS-PAGE y a la intensidad de la banda de HGhr presente en cada fracción. Se consideró como un porcentaje del total de las Cuentas X mm<sup>2</sup> proporcionadas por el sistema Gel Doc de bio Rad.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Construcción del vector pPIC9KhGH22K

##### 3.1.1 Caracterización de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K

La caracterización de los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K de los cuales se partió para la construcción de pPIC9KhGH22K, presentaron los patrones de restricción esperados para las enzimas *Sac I-Not I*, *Bgl II*, *Pst I* y *Pvu II* (TABLA 4, Figuras 14 y 15).

##### 3.1.2 Transformación de bacterias calcio-competentes con la reacción de ligación, obtención del ADN y caracterización

De la purificación por electroelución del fragmento de 1567 pb obtenido a partir del vector pPIC9hGGH22K, el cual contiene el ADNc de HGH, se logró recuperar el 20 %. De la transformación de las bacterias *E. coli* XL1-Blue calcio-competentes con la reacción de ligación, se obtuvieron los siguientes resultados:

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA 3

**RESULTADOS DE LA TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS CALCIO-COMPETENTES, ASÍ COMO EL NÚMERO DE COLONIAS OBTENIDAS EN CADA EXPERIMENTO.**

Transformación	No. de colonias
Testigo positivo (pUC19, 1 ng):	912
pPIC9K linealizado (300 ng):	12
Reacción de ligación (75 ng):	1009

Debido a que se esperaba un plásmido de mayor tamaño (9843 pb), se seleccionaron 20 de las 36 colonias seleccionadas al azar, de acuerdo al corrimiento esperado de los ADN en gel de agarosa al 0.6 % (Figura 12).

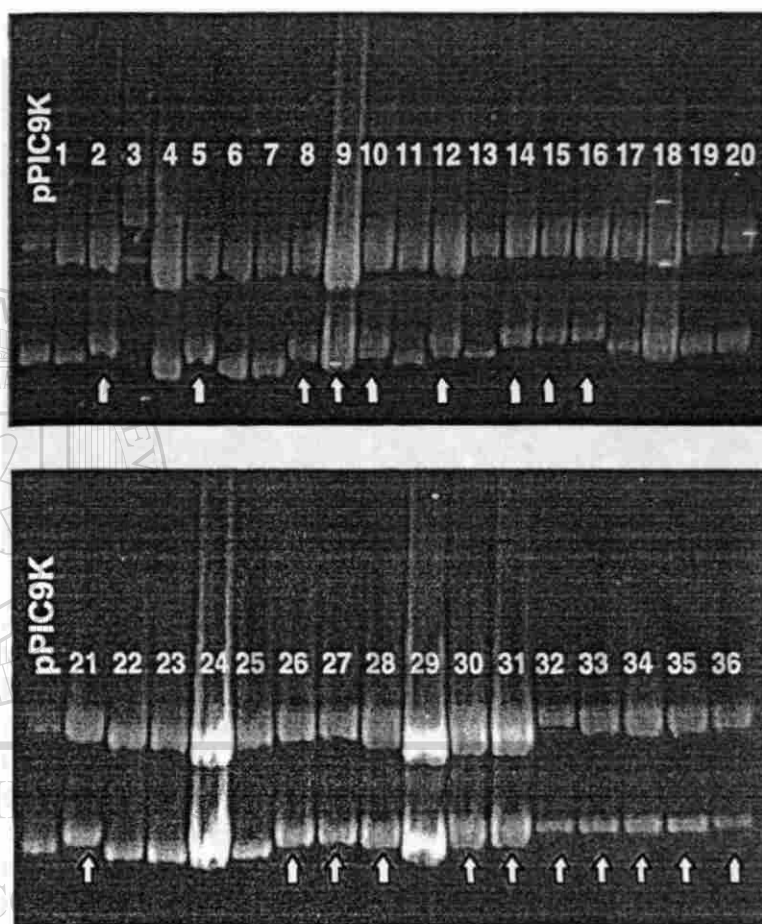
Estas clonas se caracterizaron con la enzima de restricción *Bgl II*, presentando los patrones esperados (Figura 13). pPIC9K posee 2 sitios de reconocimiento para *Bgl II*, mientras que el ADNc de HGH posee un sitio extra para *Bgl II*. Como referencias se usaron los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K. Este último genera también tres fragmentos, pero el fragmento mayor es de menor tamaño que en el plásmido pPIC9KhGH22K.

La caracterización la clona *Escherichia coli* XL1-Blue No. 34 con otras enzimas de restricción presentó los patrones esperados debido a que al introducir en el vector pPIC9K el ADNc de HGH, se libera un fragmento de 1597 pb en la digestión *Sac I-Not I* en lugar de un fragmento de 1030 pb, se introduce un sitio de reconocimiento extra para las enzimas *Bgl II* y *Pst I*, y dos sitios extra para el reconocimiento de *Pvu II* (TABLA 4, Figuras 14 y 15).

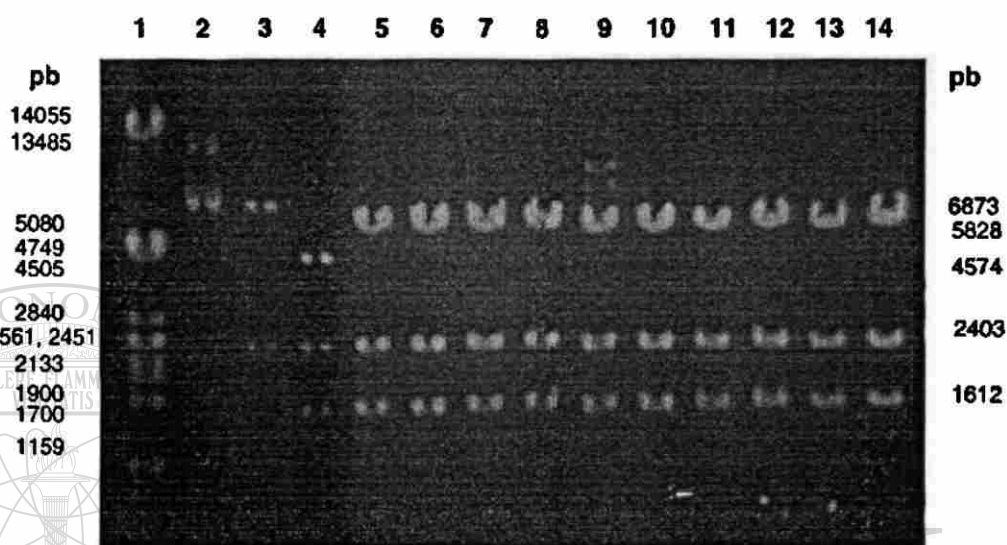
TABLA 4

**PATRONES DE DIGESTIÓN EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pPIC9K, pPIC9KhGH22K Y pPIC9hGH22K.**

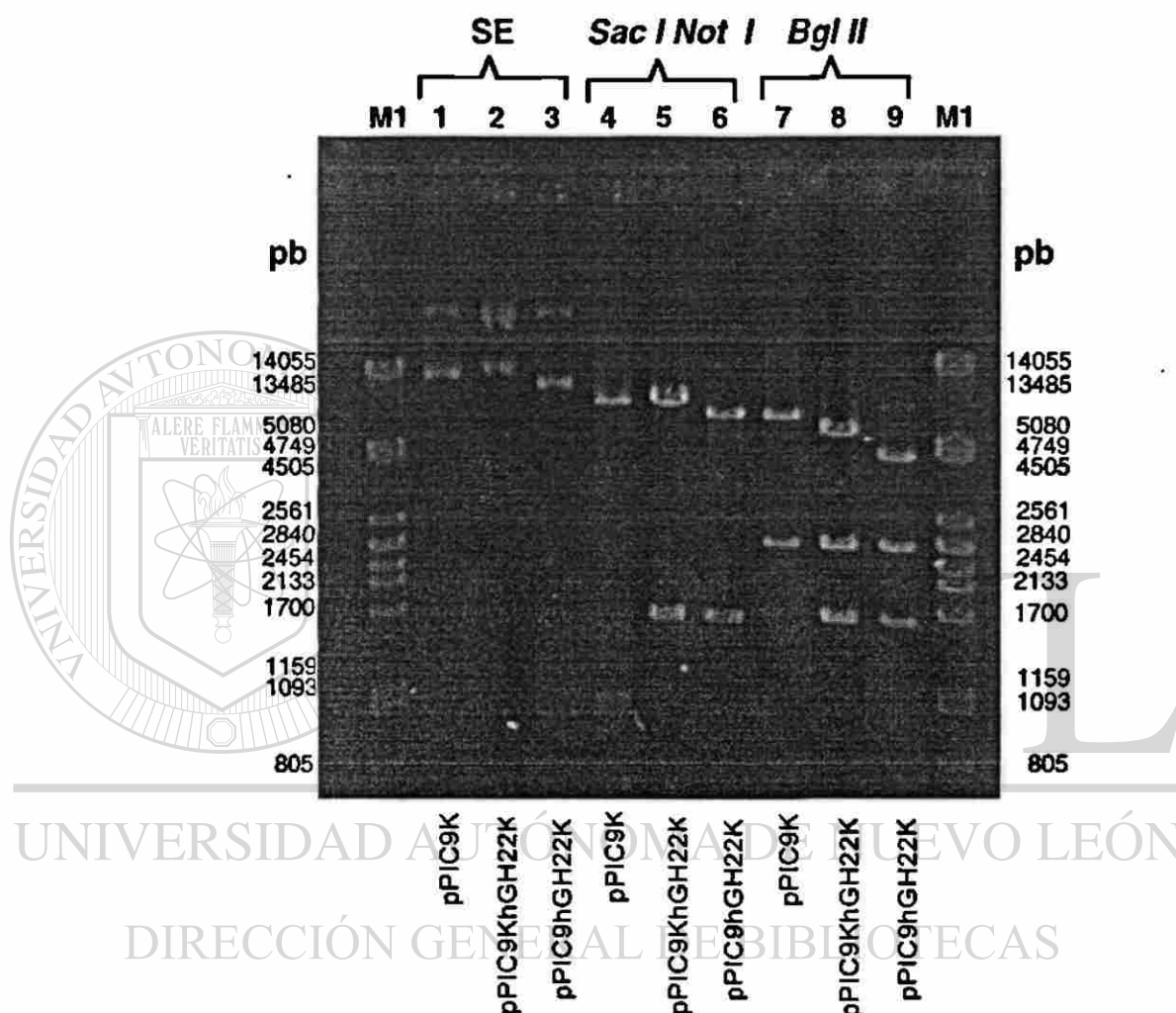
	pPIC9K	pPIC9KhGH22K	pPIC9hGH22K
Tamaño del plásmido	9276	9843	8589
Enzimas:	8246	8246	6992
<i>Sac I - Not I</i>	1030	1597	1597
<i>Bgl II</i>	6873 2403	5828 2403 1612	4574 2403 1612
<i>Pst I</i>	3653 2555 1827 1241	3855 2555 1827 1241 365	6397 1827 365
<i>Pvu II</i>	6327 2949	6130 2949 497 267	4877 2948 497 267



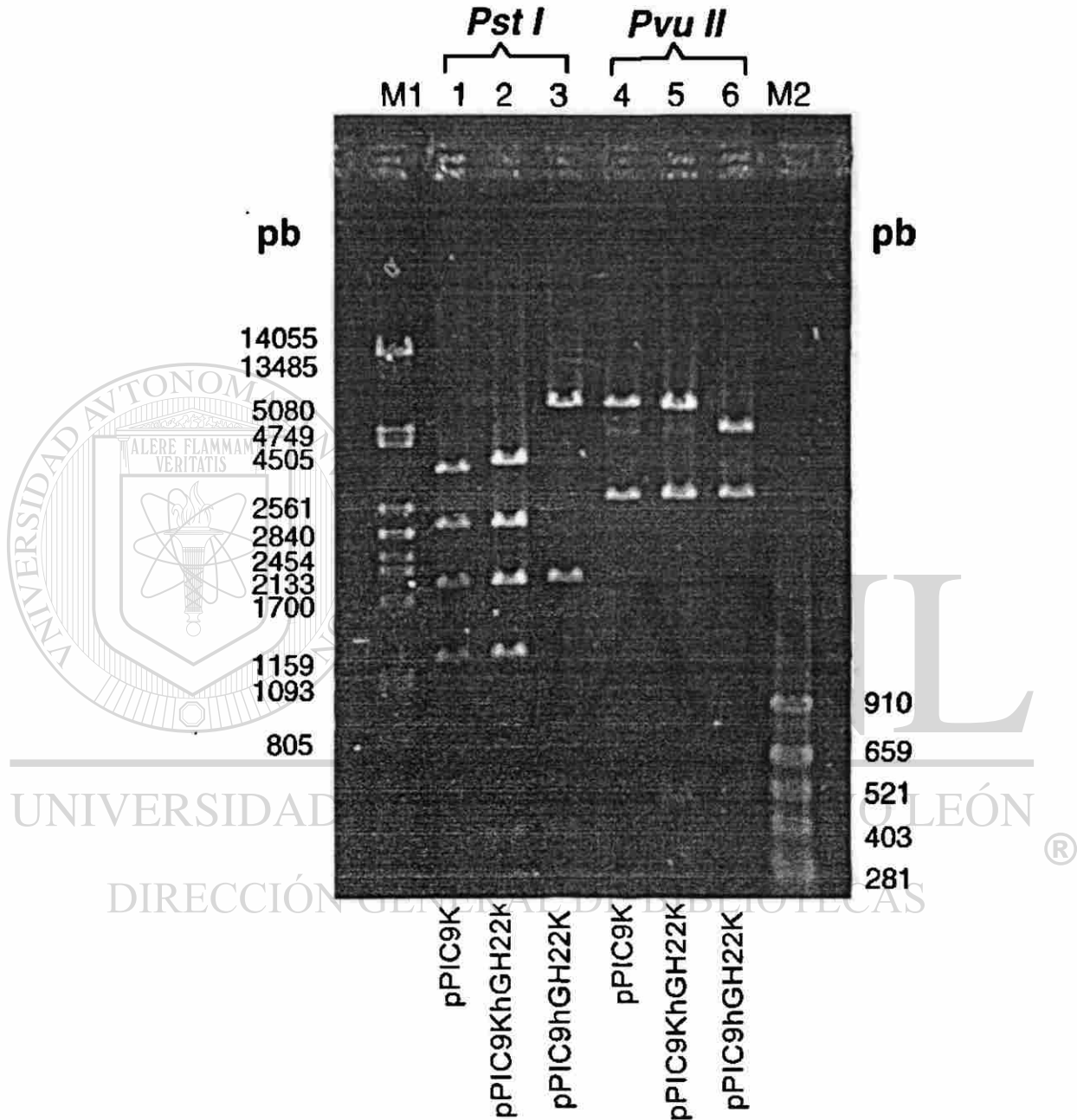
**Figura 12.** Gel de agarosa al 0.6 % de los ADN plasmídicos de las 36 colonias de *Escherichia coli* XL1-Blue, provenientes de la transformación con la reacción de ligación. Se marca con flechas las posibles clonas portadoras del plásmido pPIC9KhGH22K, debido a que el plásmido pPIC9KhGH22K por ser de mayor tamaño (9843 pb) debe presentar un menor desplazamiento electroforético que pPIC9K (9276 pb).



**Figura 13.** Gel de agarosa al 1 % de la caracterización enzimática con *Bgl II* de los ADN plasmídicos. Las clonas analizadas fueron *Escherichia coli* XL1-Blue 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36 (carriles 5 a 14). carril 1: marcador de peso molecular  $\lambda$  *Pst I*, carriles 2, 3 y 4: pPIC9K, pPIC9K y pPIC9hGH22K superenrollados. pPIC9K posee 2 sitios de reconocimiento para *Bgl II*, mientras que el ADNc de HGH posee un sitio extra para *Bgl II*. pPIC9hGH22K genera también tres fragmentos, pero el fragmento mayor es de menor tamaño que en el plásmido pPIC9KhGH22K.



**Figura 14.** Gel de agarosa al 1 % de la caracterización de los plásmidos pPIC9K, pPIC9KhGH22K y pPIC9hGH22K, superenrollados (SE, carriles 1, 2 y 3) y con las enzimas de restricción *Sac I-Not I* (carriles 4, 5 y 6) y *Bgl II* (carriles 7, 8 y 9). El marcador de peso molecular (M1) es  $\lambda$  *Pst I*. Se observa una diferencia en los corrimientos de los ADN<sub>s</sub> superenrollados debido a las diferencias en los tamaños. Al introducir en el vector pPIC9K el ADN<sub>c</sub> de h3H, se libera un fragmento de 1597 pb en la digestión *Sac I-Not I* en lugar de un fragmento de 1030 pb, además se introduce un sitio de reconocimiento extra para la enzima *Bgl II*.



**Figura 15.** Gel de agarosa al 1 % de la caracterización de los plásmidos pPIC9K, pPIC9KhGH22K y pPIC9hGH22K con las enzimas de restricción *Pst I* (carriles 1, 2 y 3) y *Pvu II* (carriles 4, 5 y 6). Los marcadores de peso molecular son  $\lambda$  *Pst I* (M1) y pBR *Alu I* (M2). Con la incorporación del ADNc de HGH al vector pPIC9K se gana un sitio de reconocimiento extra para la enzima *Pst I*, y dos sitios extra para el reconocimiento de *Pvu II*.

## 3.2 Construcción de la cepa recombinante de *Pichia pastoris*

### 3.2.1 Transformantes de *Pichia pastoris* obtenidas mediante la técnica de esferoplastos

A partir de la cinética de formación de esferoplastos por la acción de la enzima zymoliasa, se calculó 20 min a 30°C como el tiempo óptimo de incubación para obtener un 70 % de esferoplastos de acuerdo a la gráfica mostrada en la Figura 16 y a los siguientes cálculos:

$$\begin{aligned} \% \text{ de esferoplastos} &= 100 - [(DO_{800\text{nm}} \text{ al tiempo } t / DO_{800\text{nm}} \text{ al tiempo } 0) \times 100] \\ 70 &= 100 - [(0.063 / 0.215) \times 100] \end{aligned}$$

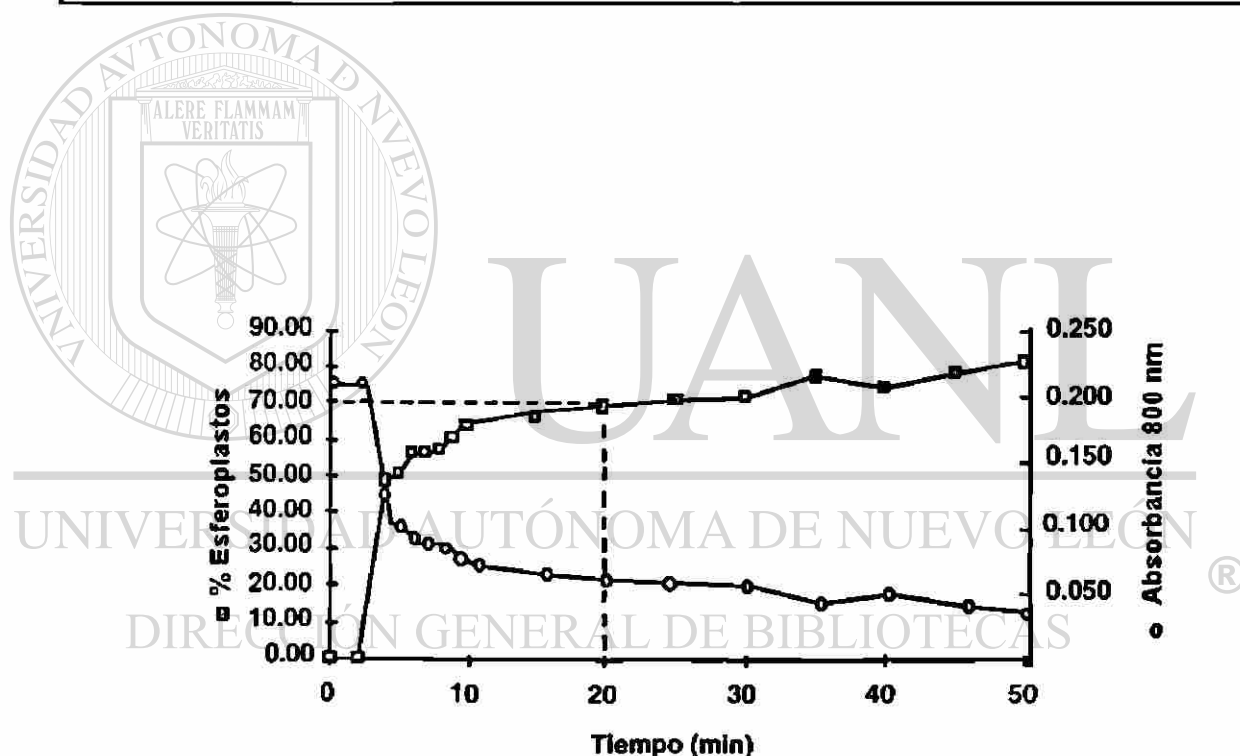


Figura 16. Gráfica de la cinética de formación de esferoplastos. Se muestra el porcentaje de esferoplastos obtenidos con el tiempo (■), y la D.O. 800nm (○). La interpolación con línea punteada muestra que a los 20 min se obtiene un 70 % de esferoplastos.

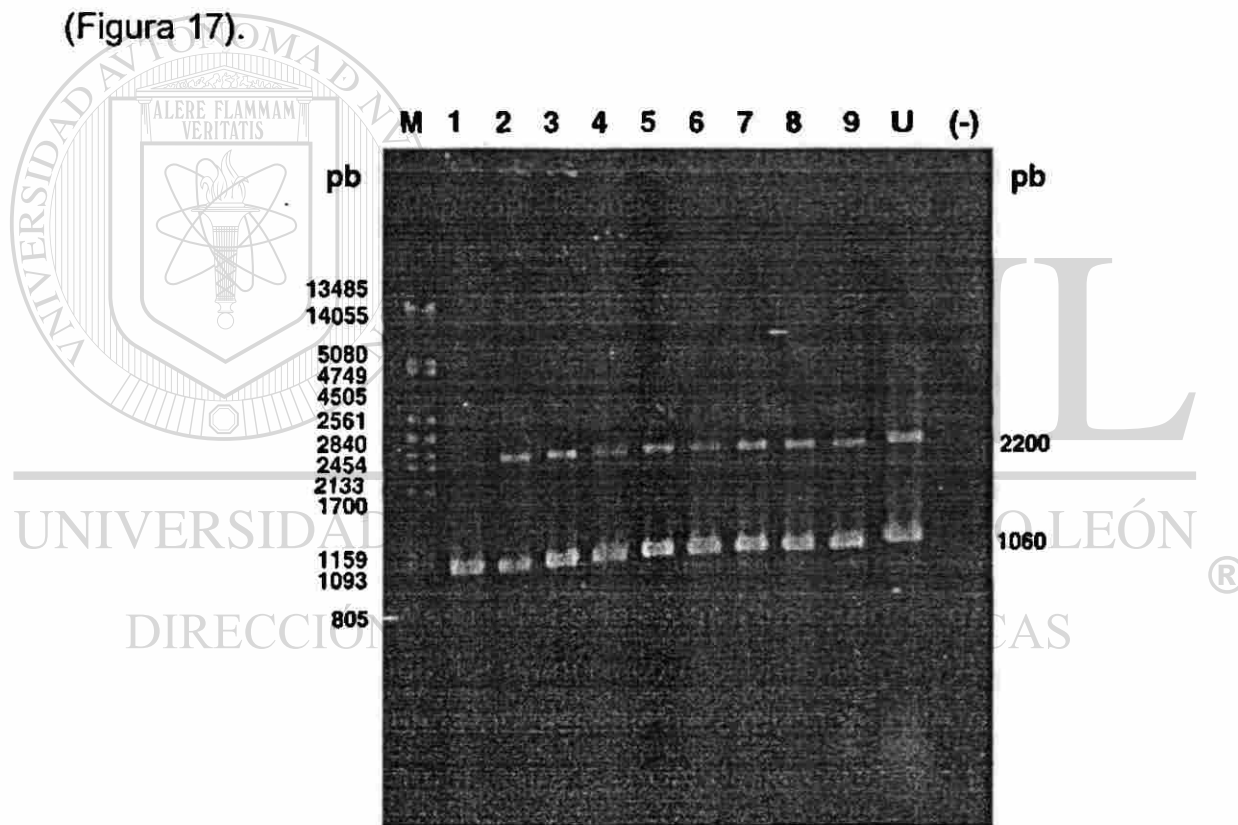
Después de 6 días de incubación en placas carentes de histidina a partir de la transformación de GS115, se obtuvieron 80 cepas de *Pichia*



*pastoris* His<sup>+</sup> con el vector construido pPIC9KhGH22K, 110 cepas con el vector pPIC9K, y ninguna con el control con amortiguador TE. Las 80 cepas se emplearon para los análisis posteriores.

### 3.2.2 Verificación de la integración por PCR

La PCR de algunas cepas transformantes de *Pichia pastoris* seleccionadas al azar a partir de los extractos crudos de ADN mostraron las bandas de 2200 y 1060. La primera corresponde al gen AOX1 del genoma de la levadura, y la segunda al cassette de expresión que contiene el ADNc de HGH. Como control se muestra el ADN de la cepa GS115hGH22K-unicopia (Figura 17).



**Figura 17.** Gel de agarosa al 1 % para la verificación de la integración del cassette de expresión por PCR de cepas transformantes de *Pichia pastoris*. M: marcador de peso molecular  $\lambda$ -*pst* I. 1 al 9 cepas obtenidas por esferoplastos. U: cepa unicopia, (-) control negativo de la PCR.

### 3.3 Selección de la cepa sobreproductora

#### 3.3.1 Tamizaje con G418.

Los resultados obtenidos del tamizaje fueron los siguientes:

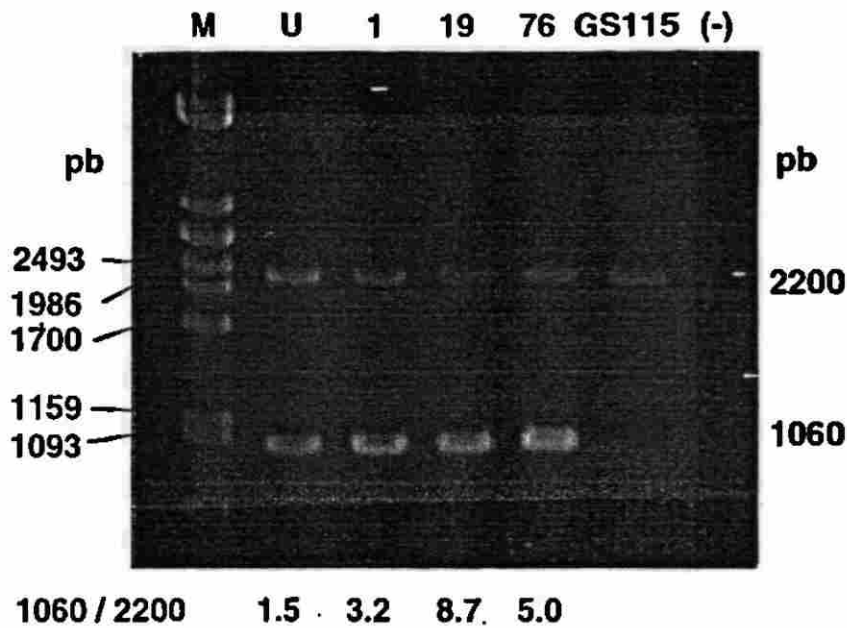
- a) Control con 0 mg/ml de G418. Crecieron las transformantes con pPIC9K, pPIC9hGH22K y GS115 sin transformar, además de todas las cepas de pPIC9KhGH22K.
- b) 0.25 y 0.5 mg/ml de G418. Crecieron todas las cepas de pPIC9KhGH22K y la transformante con pPIC9K. No presentaron crecimiento la cepa transformada con pPIC9hGH22K ni GS115 sin transformar.
- d) Concentración  $\geq 0.75$  mg/ml de G418. Crecieron las cepas de pPIC9KhGH22K designadas como 1, 10, 19, 34, 66 y 76.

Se seleccionaron las cepas que crecieron a concentraciones iguales o mayores de 0.75 mg/ml como posibles multicopia, para efectuar el análisis de PCR semicuantitativo y la fermentación. Después de un primer ensayo de fermentación, las cepas que presentaron mayor producción de HGHR fueron 1, 19 y 76.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### 3.3.2 Estimación semicuantitativa del número de copias por PCR

Las posibles cepas multicopia poseen más de un cassette del ADNc de HGHR (banda de 1060 pb). El análisis de la intensidad de la banda de 1060 respecto a la de 2200 pb (Figura 18, TABLA 5) muestra que la primera es mucho mayor en las cepas obtenidas por selección con G418 respecto a la cepa unicopia.



**Figura 18.** Gel de agarosa al 1 % del PCR semicuantitativo. El análisis de la relación de intensidades de las bandas 1060/2200, correspondientes al cassette de expresión y al gen *AOX1* mediante el sistema Gel Doc de Bio Rad para cada cepa, se muestra en la parte inferior de la foto. A mayor valor de esta relación, es más probable la presencia de más de una copia del cassette de expresión.

### 3.3.3 Evaluación de la producción de HGhr

El análisis de las proteínas totales en el medio de cultivo mediante Bradford, de las fermentaciones por triplicado de las cepas 1, 19, 76 y unicopia, se muestran en la TABLA 5.

**TABLA 5**

**ANÁLISIS LA PRODUCCIÓN DE HGhr EN LAS CEPAS GS115hGH22KG418-1, GS115hGH22KG418-19, GS115hGH22KG418-76 y GS115hGH22K-UNICOPIA DE *Pichia pastoris*, ASÍ COMO EL ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO POR PCR.**

Cepa	Proteínas totales $\mu\text{g/ml} \pm \text{S.D.}$	HGhr $\mu\text{g/ml}$	Sobrepro- -ducción %	Pureza HGhr %	Cociente 1060/2200	Relación con unicopia
1	$41 \pm 0.93$	32.18	44	79	3.2	2
19	$35 \pm 2.20$	27.28	22	78	8.7	6
76	$35 \pm 1.51$	27.83	25	80	5.0	3
Unicopia	$29 \pm 1.71$	22.33	*	77	1.5	1

Posteriormente, para el medio de cultivo de cada cepa se evaluó la producción de HGhr de la siguiente manera:

$$\mu\text{g/ml HGhr} = (\text{PT}) \times (\% \text{ R } 22 \text{ kDa})$$

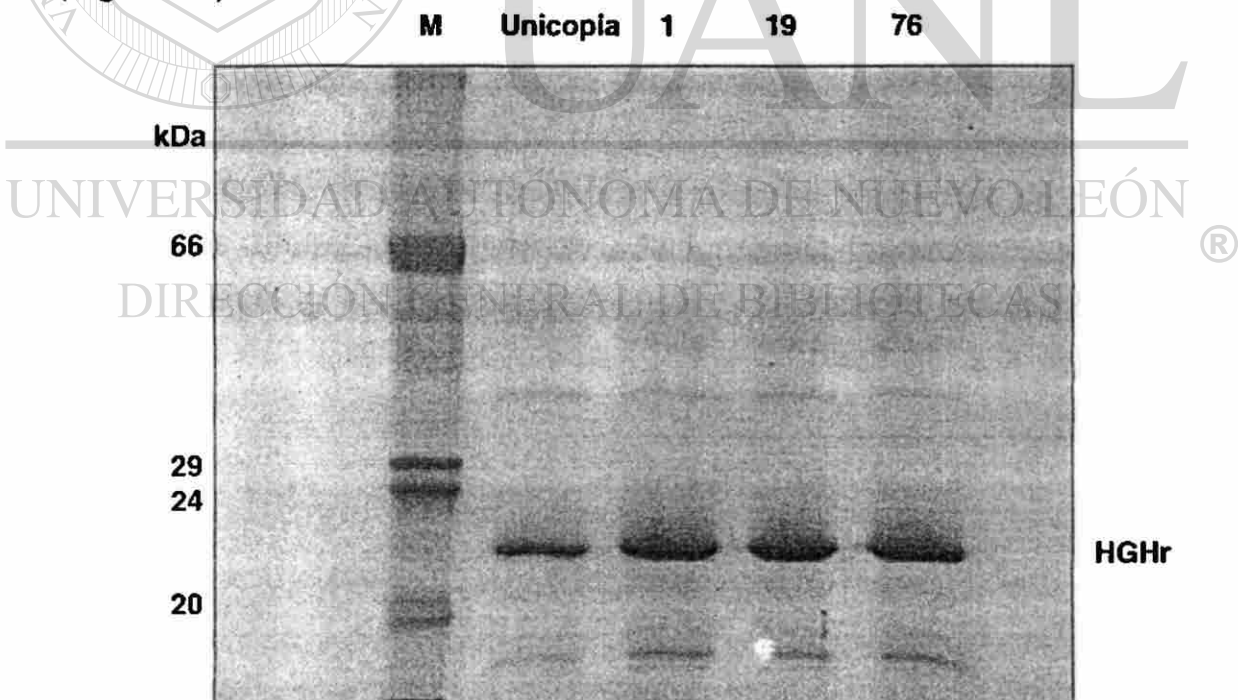
Donde:

PT: Proteínas totales ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenidas mediante Bradford.

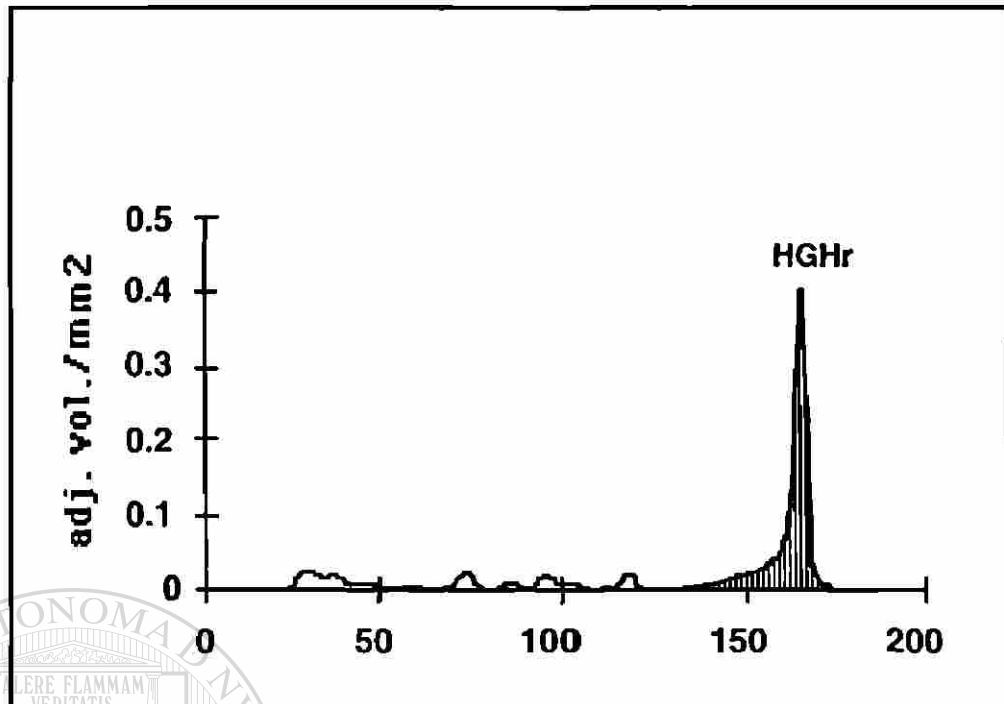
% R-22 kDa: Porcentaje relativo de la banda de 22 kDa correspondiente a HGhr respecto al resto de las proteínas presentes para cada medio de cultivo, analizado en cada carril del gel mediante el sistema Gel Doc de Bio Rad.

Además para conocer la sobreproducción de HGh respecto a la cepa unicopia, se tomó el valor de HGh de la cepa unicopia como un 100 %, y a partir de éste se determinó el porcentaje de sobreproducción (TABLA 5).

Se presenta un gel SDS-PAGE de los medios de cultivo de las cepas unicopia, 1, 19 y 76 (Figura 19) dializados y concentrados 10 veces, así como un perfil típico de pureza obtenido mediante el sistema Gel Doc de Bio Rad (Figura 20).



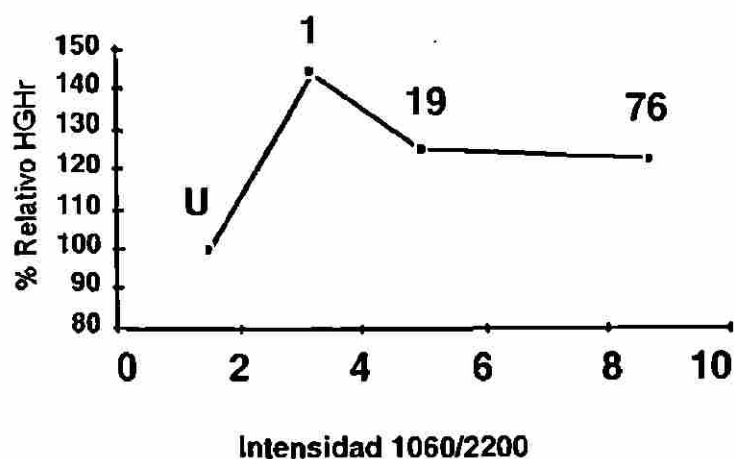
**Figura 19.** Gel SDS-PAGE de los medios de cultivo dializados y concentrados al vacío provenientes de las cepas unicopia, 1, 19 y 76. M: marcador de peso molecular. El contenido de cada carril equivale a 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo. La banda de 22 kDa corresponde a la HGhr.



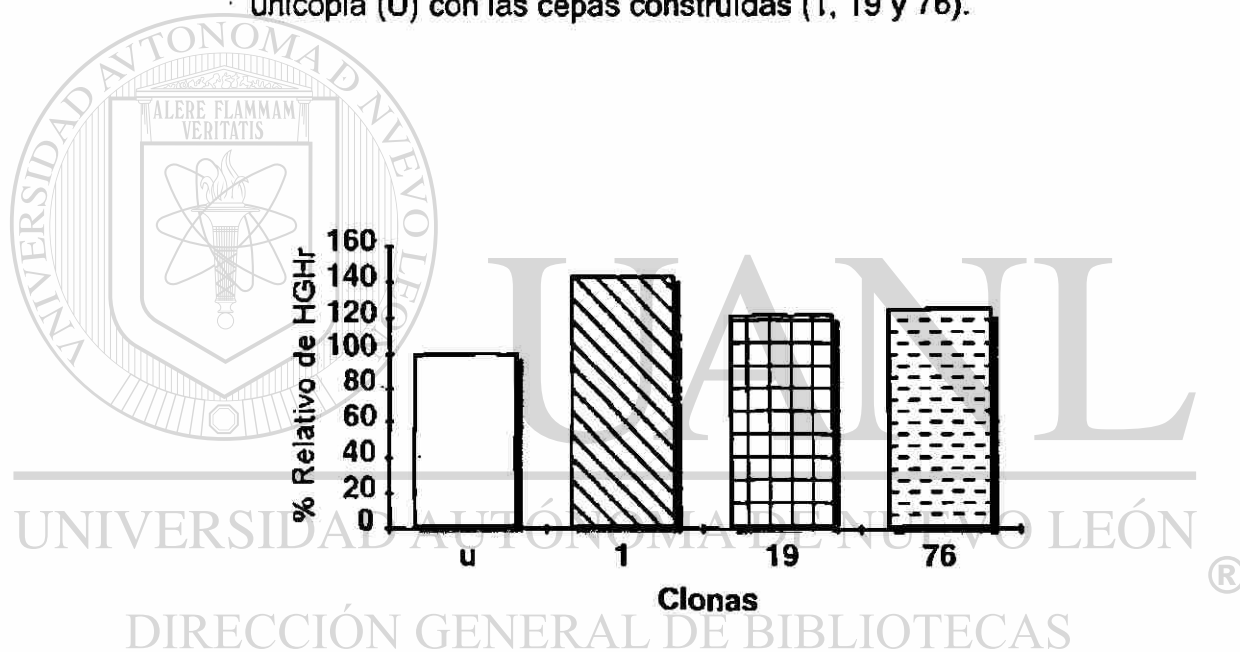
**Figura 20.** Densitograma del perfil de pureza de HGhr correspondiente a la cepa GS115hGH22KG418-1, en el que HGhr tiene un 79 % de pureza de acuerdo al análisis en el Gel Doc de Bio Rad.

### 3.3.4 Correlación del PCR y la producción de HGhr

Existe una tendencia positiva al analizar la producción de HGhr contra el cociente 1060/2200 (Figura 21). Si tomamos la producción de la cepa unicopia como un 100 %, podremos observar el aumento de un 22-44 % de la producción de HGhr de las cepas 1, 19 y 76 respecto a la cepa unicopia (Figura 22).



**Figura 21.** Gráfica del incremento en la producción de HGhr vs el cociente de las intensidades de las bandas 1060/2200 del PCR, al comparar la cepa unicopia (U) con las cepas construidas (1, 19 y 76).



**Figura 22.** Gráfica del porcentaje relativo de HGhr de las cepas construidas (1, 19 y 76) respecto a la cepa unicopia (u). Se observa un aumento de hasta un 44 %.

### 3.4 Sistemas de purificación

#### 3.4.1 Precipitación con sulfato de amonio

Para el análisis en gel SDS-PAGE del precipitado y el sobrenadante se efectuó la estimación cuantitativa de las intensidades de las bandas correspondientes a HGhr, así como la evaluación de sus purezas, considerando las cantidades colocadas en cada carril. Los resultados se presentan en la TABLA 6, y en la Figuras 23 y 24.

TABLA 6

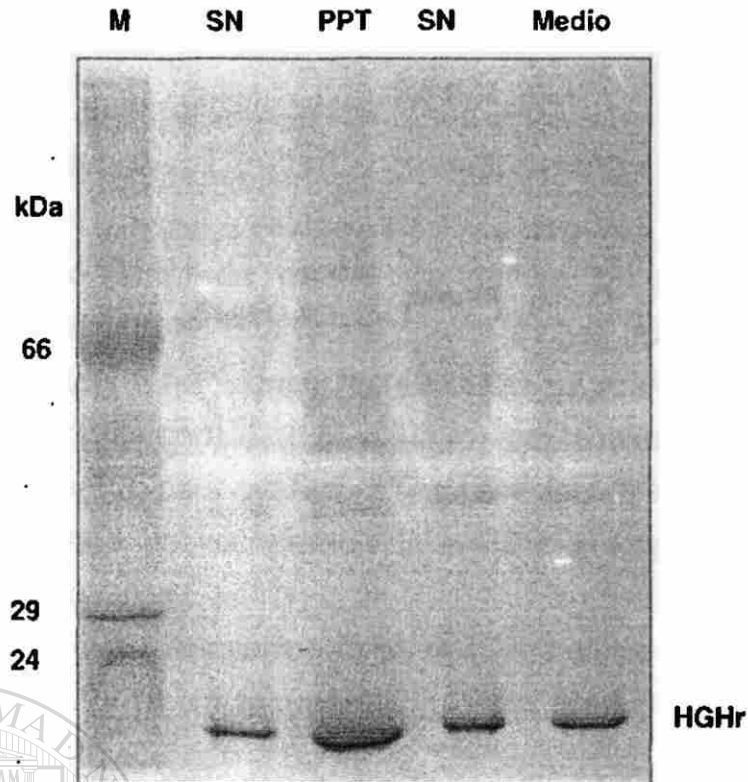
#### RESULTADOS DE LA PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO.

	Volumen total ml	Volumen al gel $\mu$ l	Cuentas totales D.O.*mm <sup>2</sup>	% de recuperación	% de HGhr (pureza)
Sobrenadante	300	100	8232	68	67
Precipitado	100	5	3863	32	84

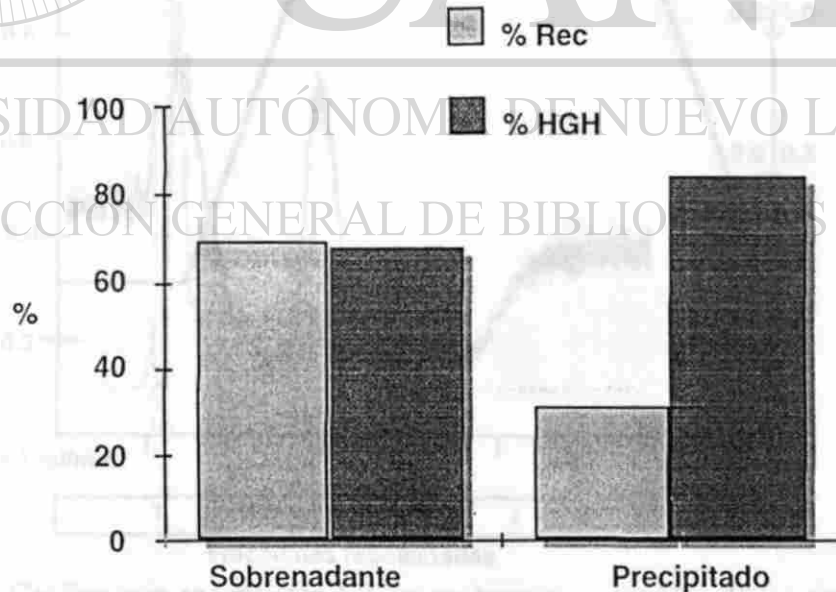
Los cálculos se efectuaron de la siguiente manera:

$$\left( \text{Vol. total ml} \times \text{cuentas D.O.} \times \text{mm}^2 \right) \times 1000 / \text{Vol al gel } \mu\text{l}$$

Se encontró que un 68 % de la HGhr permanece en el sobrenadante, mientras que un 32 % en el precipitado. Esto nos indica que al menos en las condiciones ensayadas, la precipitación con sulfato de amonio es ineficiente para separar la HGhr del resto de las proteínas.



**Figura 23.** Gel SDS-PAGE en el que se evaluó la precipitación con sulfato de amonio. En los carriles se muestra el marcador de peso molecular (M), sobrenadante (SN), precipitado (PPT) y medio completo. La banda de 22 kDa corresponde a HGhr.



**Figura 24.** Gráfica de los resultados de la evaluación de la precipitación con sulfato de amonio por SDS-PAGE. Se observa que la mayor parte permanece en el sobrenadante.



### 3.4.2 Cromatografía de intercambio iónico

#### 3.4.2.1 Ensayo A

Se empezó 1 ml de medio de cultivo producido por la cepa GS115hGH22K-unicopia en una fermentación a nivel fermentador ajustado a pH 8 y dializado. Las 5 fracciones recolectadas se representan en la Figura 25. De cada fracción se consideró el volumen recolectado y aplicado en el gel SDS-PAGE (Figura 26), para evaluar la recuperación de HGHR. Finalmente, se calculó el porcentaje de recuperación, así como el porcentaje de HGHR presente en cada fracción.

Se calculó que la mayor parte de la HGHR eluye en la fracción 4, que corresponde a un 65 % de recuperación. Esta fracción contiene la mayor pureza de HGHR que equivale a un 40 %. Un porcentaje importante se pierde en la fracción 2 (34 %), en la que la pureza de HGHR es menor (20 %) (Figuras 27 y 28).

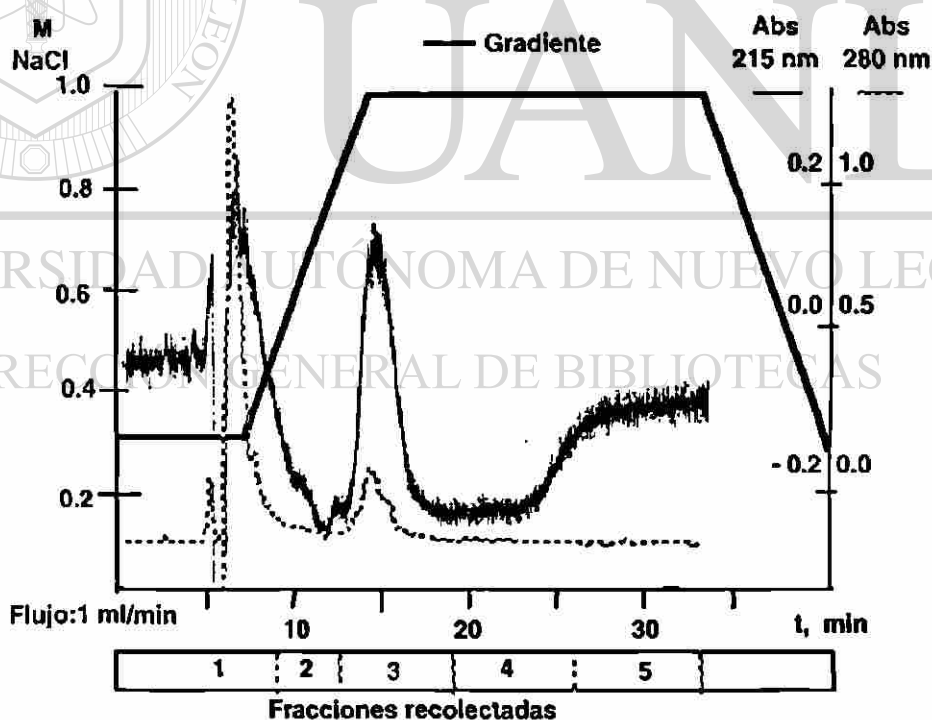


Figura 25. Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico A, así como las fracciones recolectadas.

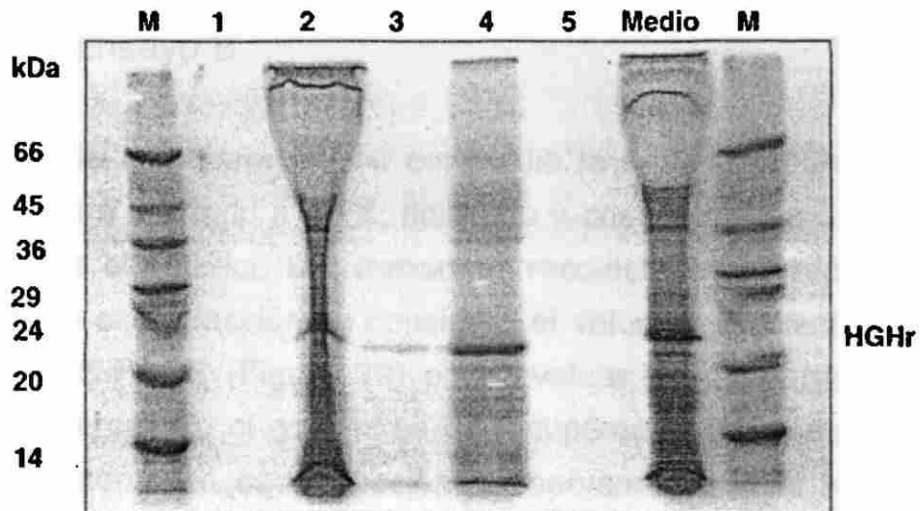


Figura 26. Gel SDS-PAGE de las 5 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico A. La banda de 22 kDa representa la HGhr.

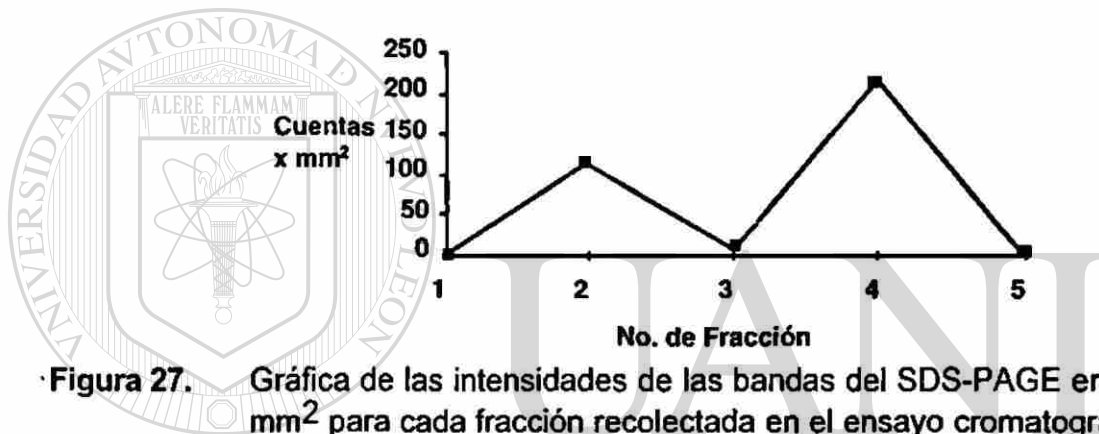


Figura 27. Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas  $\times \text{mm}^2$  para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico A.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

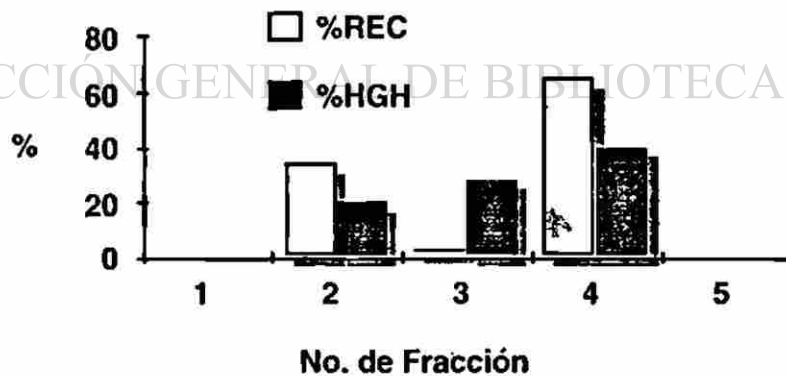


Figura 28. Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico A.

### 3.4.2.2 Ensayo B

Se emplearon 10 ml del medio la cepa GS115hGH22KG418-1 sobreproductora ajustado a pH 8, dializado y concentrado a 1 ml. El sistema de elución fue el anterior. Las fracciones recolectadas se representan en la Figura 29. De cada fracción se consideró el volumen recolectado y aplicado en el gel SDS-PAGE (Figura 30) para evaluar la recuperación de HGhr. Finalmente, se calculó el porcentaje de recuperación así como el porcentaje de HGhr presente en cada fracción. Observamos que la HGhr no eluye mayoritariamente en una fracción, sino que se reparte en las fracciones 2 a la 8. Se observa que la mayor parte de la HGhr eluye en la fracción 3, que corresponde a un 42 % de recuperación, aunque con una pureza muy pobre (46 %). De acuerdo a lo observado en el ensayo A, se esperaba que la fracción mayoritaria fuera la 5, sin embargo esta corresponde a tan sólo un 16 % de HGhr, con una pureza de 76 % (Figuras 31 y 32).

Se eligió efectuar un cambio en el método cromatográfico con el fin de mejorar la recuperación de HGhr, que corresponde al ensayo C.

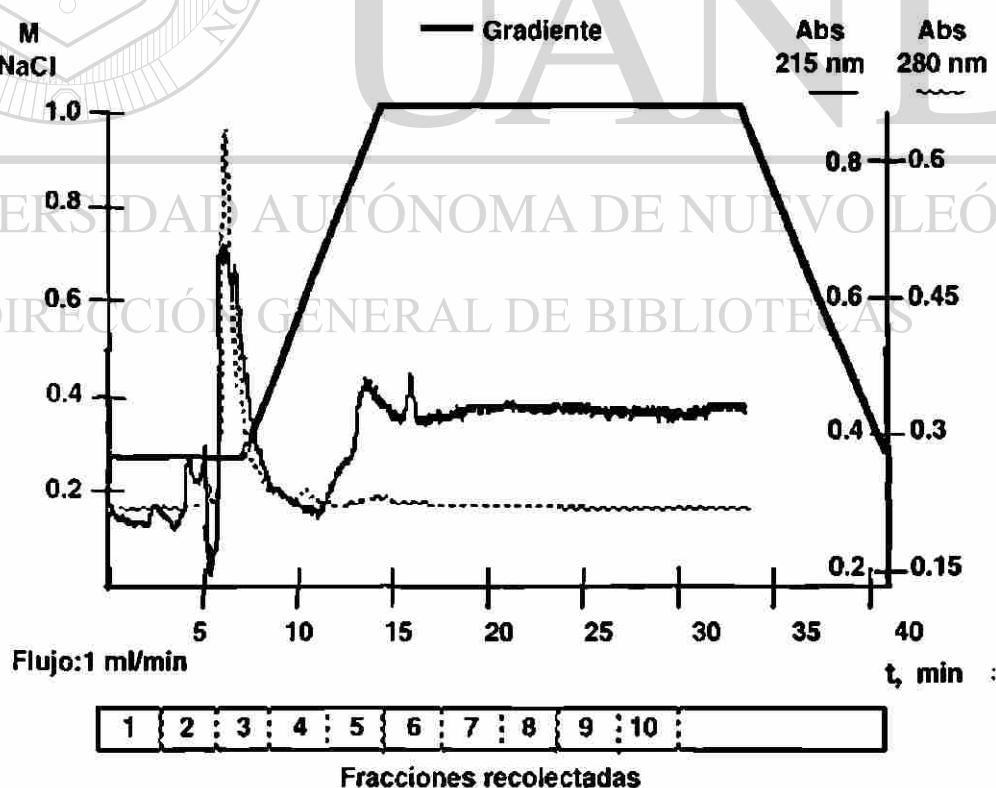


Figura 29. Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico B, así como las fracciones recolectadas.

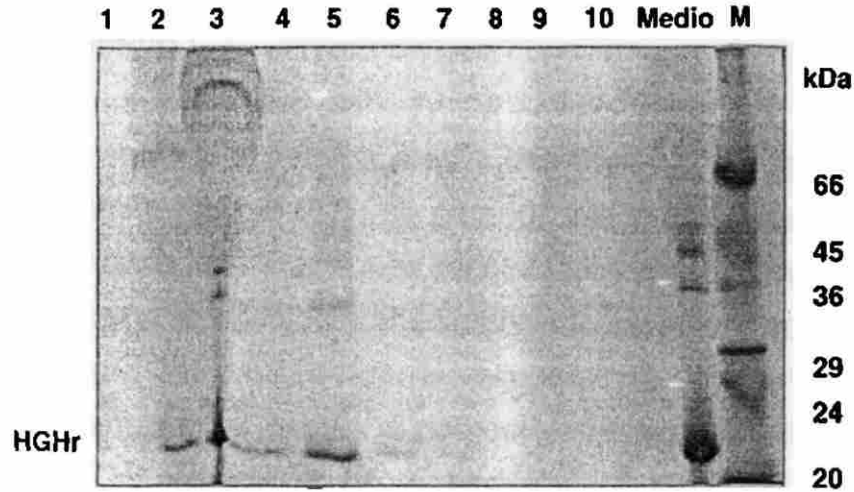


Figura 30. Gel SDS-PAGE de las 10 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico B. la banda de 22 kDa corresponde a HGhr.

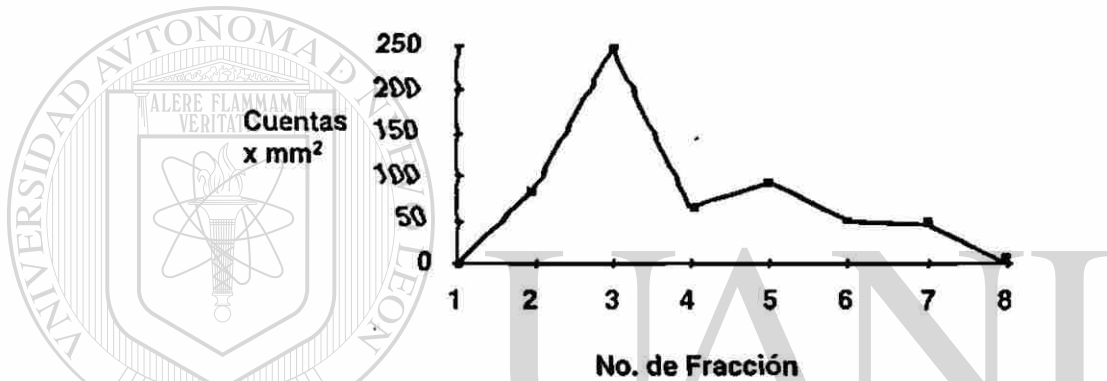


Figura 31. Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm<sup>2</sup> para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico B, en las que se detecta HGhr mediante SDS-PAGE.

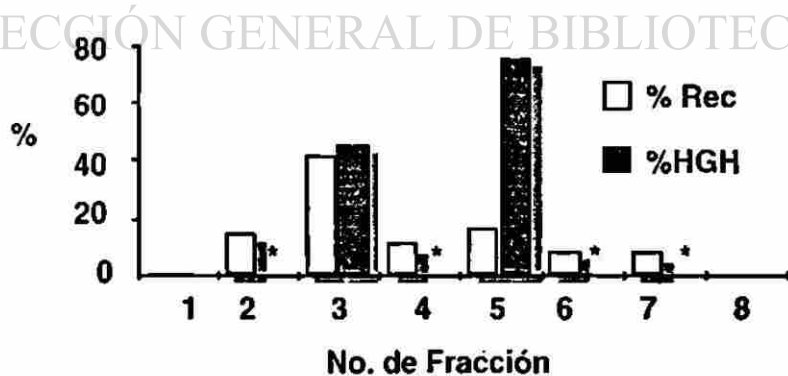
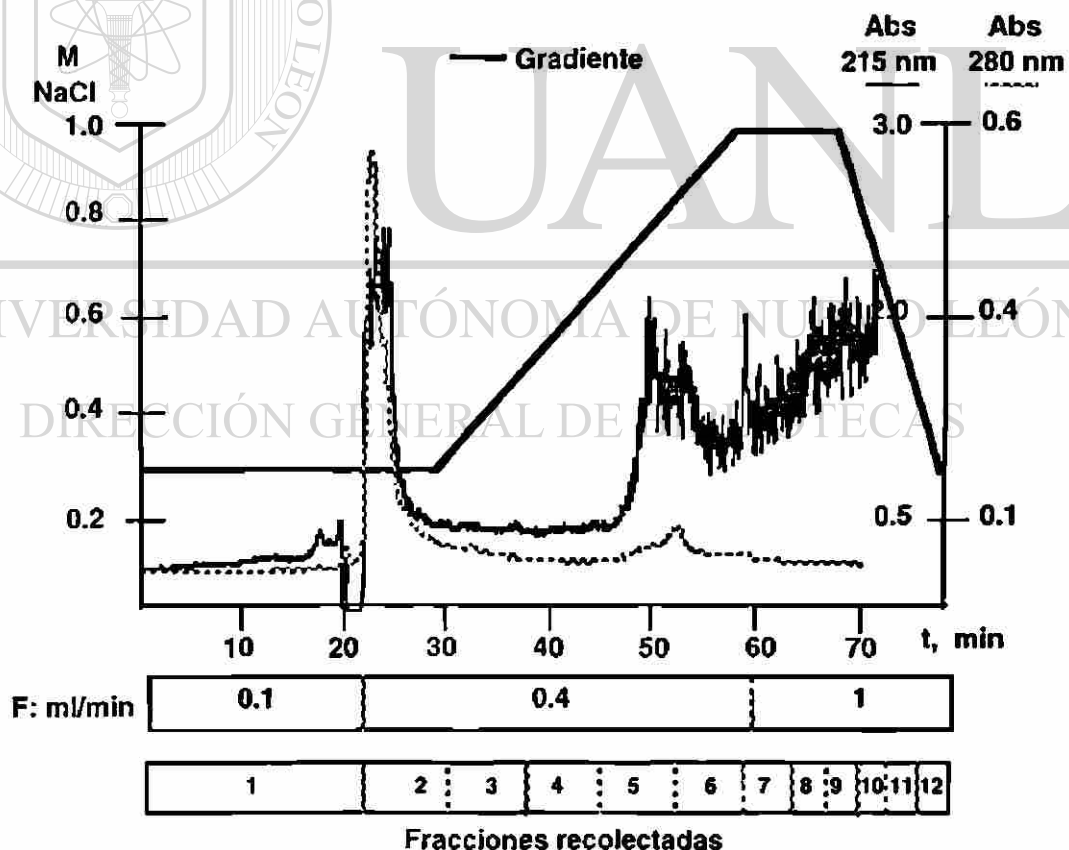


Figura 32. Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico B.

### 3.4.2.3 Ensayo C

Se empleó el mismo medio del Ensayo B y la velocidad del gradiente se disminuyó con el fin de permitir una mejor interacción entre la muestra y la columna. Las fracciones recolectadas se representan en Figura 33. De cada fracción se consideró el volumen recolectado y aplicado en el gel SDS-PAGE (Figura 34) para evaluar la recuperación de HGhr. Igual que en los ensayos anteriores, se calculó el porcentaje de recuperación así como el porcentaje de HGhr presente en cada fracción.

Observamos resultados similares al ensayo B. La HGhr no eluye mayoritariamente en una fracción, sino que como en el segundo ensayo se reparte en diversas fracciones (2 a la 7). Se observa que la mayor parte de la HGhr eluye en la fracción 3, que corresponde a un 48 % de recuperación, y con una pureza muy pobre (46 %). La fracción 6 corresponde a un 15 % de HGhr, con una pureza del 81 % (Figuras 35 y 36).



**Figura 33.** Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico C, la velocidad del flujo de fase móvil, así como las fracciones recolectadas.

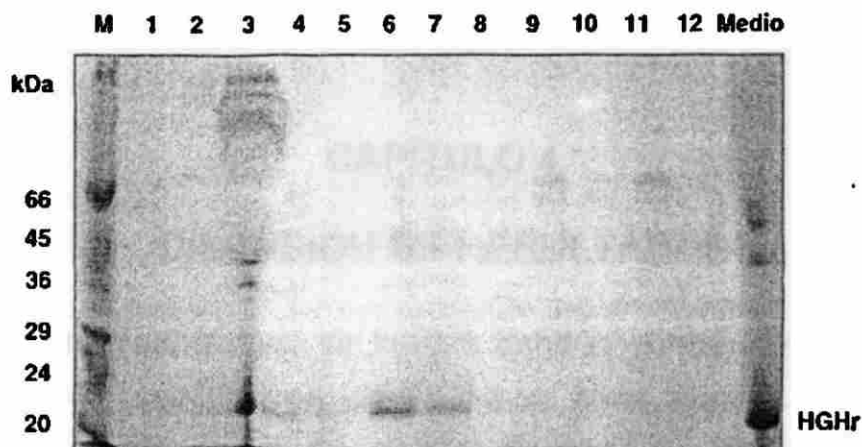


Figura 34. Gel SDS-PAGE de las 12 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico C. La banda de 22 kDa representa la HGhr.

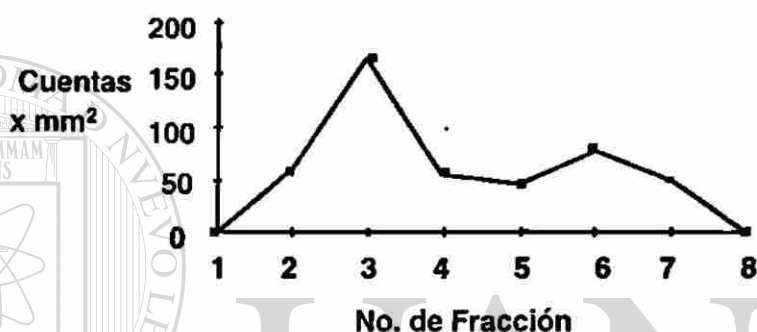
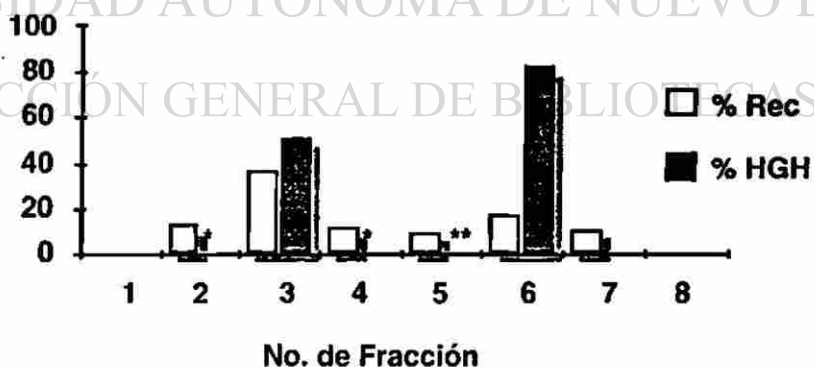


Figura 35. Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm<sup>2</sup> para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico C, en las que se detecta HGhr mediante SDS-PAGE.



\* No determinado

Figura 36. Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico C.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se llevó a cabo la construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de HGhr a nivel matraz. Se logró una sobreproducción de HGhr de un 44 % respecto a la cepa unicopia previamente construida (33). Se evaluaron esquemas de purificación para HGhr mediante precipitación con sulfato de amonio e intercambio aniónico. Sin embargo, con las condiciones de trabajo empleadas no se obtuvieron buenos resultados, por lo que se sugiere evaluar más exhaustivamente las variables empleadas.

#### Construcción del vector pPIC9KhGH22K

Para construir el vector pPIC9KhGH22K existían dos posibilidades: la ligación del fragmento de ADNc de HGH con el vector pPIC9hGH22K para obtener el vector recombinante pPIC9KhGH22K, y la religación de fragmentos del vector pPIC9K. La proporción 1:4 vector:inserto nos permitió asegurar el primero sin necesidad de purificar todos los fragmentos de interés, simplificando el proceso de clonación. La transformación de la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue con 75 ng de la reacción de ligación generó 1009 colonias, de las cuales se seleccionaron 36 colonias al azar. El DNA plasmídico de 20 de las clonas presentó un patrón de movilidad electroforético menor que pPIC9K y por tanto sugestivo de poseer el inserto adecuado. La caracterización enzimática de los ADNs con *Bgl* II confirmó su identidad (56 % de las clonas seleccionadas).

Se seleccionó la clona 34 y su identidad fué confirmada más exhaustivamente con las enzimas *Sac* I-Not I, *Pvu* II y *Pst* I, presentando los patrones de digestión esperados de acuerdo al programa DNA Strider.

## Construcción de la cepa recombinante de *Pichia pastoris*

La transformación esferoplastos con 10  $\mu\text{g}$  del vector pPIC9KhGH22K linearizado con *Sac I* produjo un total de 80 cepas de *Pichia pastoris*. Esto representa una eficiencia muy baja (8 clonas por  $\mu\text{g}$  de ADN) respecto a lo reportado por el fabricante del estuche ( $10^3$  a  $10^4$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN) (64). Esto puede deberse a las condiciones experimentales (pureza del ADN, control adecuado en la cinética de esferoplastos) ya que fue la primera vez que se empleó ésta técnica de transformación en nuestro laboratorio.

Para corroborar la integración del cassette de expresión se seleccionaron algunas cepas de *Pichia pastoris* al azar y se empleó la enzima liticosa para obtener un extracto crudo a partir del cual se realizó directamente el PCR, sin necesidad de purificar el ADN genómico de *Pichia pastoris* por las técnicas convencionales. Esto permitió analizar rápidamente un gran número de cepas de *Pichia pastoris* invirtiendo un tiempo mínimo en el proceso. El análisis del producto de PCR en gel de agarosa al 1 % confirmó la presencia de las bandas de 2200 y 1060 pb en las levaduras transformadas, lo cual indica que la integración del cassette de expresión al genoma de *Pichia pastoris* fue por inserción, ya que si hubiera reemplazamiento se obtiene sólo la banda de 1060 pb.

### Selección de la cepa sobreproductora

El tamizaje con G418 permitió seleccionar posibles cepas multicopia, ya que de las 80 cepas, seis (1, 10, 19, 34, 66 y 76) crecieron a concentraciones mayores de G418, que corresponde a un 7.5%. Está reportado que de un 1 a un 10 % de las mutantes His<sup>+</sup> pueden tener más de un inserto (62), y al emplear ADN linearizado con *Sac I*, el número de copias puede ser de hasta 10 (77). En uno de los primeros reportes de tamizaje con G418, la transformación de esferoplastos con el vector pPIC3K-ENV produjo 1000 transformantes, 26 transformantes crecieron a 1.5 mg/ml y 7 transformantes a 2 mg/ml (30). Además, analizaron el número de copias mediante Southern blot y encontraron una relación entre el número de copias y el nivel de resistencia a G418 (APÉNDICE C).



Comparando los antecedentes del tamizaje con G418 con los resultados obtenidos se encontraron diversos puntos críticos en la técnica. Si las densidades celulares no son las adecuadas ni son comparables, las cepas pueden crecer a concentraciones altas de G418 sin ser multicopias, conduciendo a resultados erróneos. En la siembra de las placas con G418, se tuvieron que inocular volúmenes menores que lo especificado en el protocolo para evitar contaminaciones de las cepas adyacentes, y resuspender continuamente para inocular densidades celulares similares de cada cepa en las placas de G418.

## Producción de HGhr

Ensayos preliminares de fermentación en los cuales se comparó el nivel de producción de la cepa unicopia con las cepas multicopias, permitieron seleccionar 3 cepas (1, 19 y 76) con los niveles más altos de proteínas y HGhr.

La posibilidad de la integración de más de un cassette de expresión fue confirmada mediante la relación de las intensidades de las bandas del PCR, ya que el cociente 1060/2200 resultó mayor en las cepas 1, 19 y 76 (3.2, 8.7 y 5.0, respectivamente) que en la cepa unicopia previamente construida (1.5). Sin embargo, no se logró determinar el número de copias del cassette de expresión en relación al cociente 1060/2200, debido a que se requiere hacer más ensayos comparativos por PCR y determinar el número aproximado de copias. Se recomienda para este fin el análisis mediante Southern Blot para estimar el número de copias (37, 39) y optimar las condiciones para un PCR cuantitativo..

Se realizaron fermentaciones por triplicado de las cepas 1, 19, 76 y unicopia. La evaluación de las proteínas totales mediante Bradford, y el % de HGhr calculado a partir del gel SDS-PAGE mostraron que las cepas de *Pichia pastoris* 1, 19 y 76 resultaron ser sobreproductoras de HGhr, con una sobreproducción hasta de un 44 % mayor que la cepa unicopia previamente construida, cumpliendo con el objetivo de obtener una cepa sobreproductora de HGhr.

Al analizar el cociente 1060/2200 respecto a la producción de HGhr, existe un incremento en la producción de las cepas construidas respecto a la cepa unicopia. Sin embargo este incremento no es lineal, siendo necesario

obtener un mayor número de cepas multicopia para efectuar un análisis más exhaustivo de la relación entre el número de copias vs. producción.

## Sistemas de purificación

No se obtuvo precipitación selectiva ni buena recuperación de HGhr al emplear sulfato de amonio al 20 % de saturación en las condiciones trabajadas, ya que un 68 % de la HGhr permanece en el sobrenadante. Es necesario efectuar más ensayos considerando como variables el porcentaje de saturación de sulfato de amonio, el tiempo de la adición, el pH del medio y la velocidad y el tiempo de centrifugación.

Un medio de cultivo obtenido a nivel fermentador permitió ensayar esquemas de purificación mediante intercambio aniónico. En el ensayo A no se logró obtener la HGhr en una sola fracción, pero en la fracción mayoritaria se logra mejorar la pureza de HGhr, de un 28 % a un 40 %. Este medio contenía concentraciones muy altas de HGhr y una mayor complejidad que a nivel matraz, a juzgar por el análisis de proteínas por SDS-PAGE.

El ensayo B realizado con el medio producido a nivel matraz con la cepa sobreproductora No. 1 mostró que la HGhr no se eluye en una fracción mayoritaria, sino que se reparte en diversas fracciones. A pesar de concentrar el medio, la cantidad de HGhr que se observa en el gel es mucho menor. El tercer ensayo, en el cual se efectuó un cambio disminuyendo la velocidad del gradiente con el fin de mejorar la interacción con la fase estacionaria, no mejoró los resultados. El primer ensayo sugiere debe explorarse más variables respecto a la muestra (pH, contenido de sales, cantidad de inyección, complejidad) y al sistema cromatográfico (composición y pH de la fase móvil, gradiente, etc.).

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró la construcción del vector pPIC9KhGH22K a partir de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K.

Se implementó la técnica de transformación de esferoplastos, sin embargo es necesario optimarla para lograr alcanzar la eficiencia reportada en la literatura.

Mediante la transformación de esferoplastos de la cepa GS115 de *Pichia pastoris* con el vector pPIC9KhGH22K linearizado con *Sac I*, se logró obtener 80 transformantes His<sup>+</sup>.

Se verificó la integración del ADNc de HGH en el genoma de *Pichia pastoris* mediante PCR, empleando extractos crudos de las cepas obtenidas con liticasa. Así mismo, se verificó su fenotipo por la producción y secreción de una proteína de 22 kDa.

El tamizaje con G418 de las 80 cepas analizadas mostró que seis de ellas (1, 19, 34, 66 y 76) fueron capaces de crecer a concentraciones iguales o mayores a 0.75 mg/ml.

El empleo del vector pPIC9K y la implementación del tamizaje con G418 permitirá el análisis futuro de un gran número de cepas, y facilitar la selección de posibles multicopia.

Se demostró que las cepas 1, 19 y 76 son sobreproductoras de HGHr con una sobreproducción del 22 al 44 % respecto a la cepa unicopia previamente construida.

El PCR semicuantitativo de las cepas 1, 19 y 76, mostró que el cociente de las intensidades de las bandas de 1060/2200 es mayor en las cepas construidas

que en la cepa unicopia, sugiriendo la presencia de más de una copia integrada del cassette de expresión.

La cepa que presentó la mayor producción de HGhr fue la cepa 1 (44 % de sobreproducción respecto a la cepa unicopia), aunque no fue la que obtuvo el mayor cociente 1060/2200.

Por los resultados anteriores, se requiere evaluar la producción de HGhr y la relación de intensidades de las bandas de 1060/2200, así como realizar análisis de Southern Blot, con un mayor número de cepas para describir el comportamiento de la producción de HGhr vs. el número de copias.

No se obtuvo precipitación selectiva con sulfato de amonio al 20 % de saturación ni buena recuperación en las condiciones trabajadas. Es necesario evaluar las variables involucradas en el proceso (porcentaje y velocidad de saturación con sulfato de amonio, pH, velocidad de saturación, velocidad y tiempo de centrifugación, etc.)

Aunque no se lograron obtener buenos resultados con la cromatografía de intercambio aniónico, el ensayo A sugiere que puede ser una buena opción para purificar HGhr, sin embargo se requiere optimar las condiciones de pH, composición de fase móvil, gradiente, etc.

El uso del moderno sistema Gel Doc de Bio Rad, permitió efectuar un análisis cuantitativo exacto de los geles de agarosa y SDS-PAGE, mismos que anteriormente se efectuaban en un densitómetro convencional.

## CAPÍTULO 6

### REFERENCIAS

- 1 Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell V W (1997). Bioquímica de Harper. 10 ed. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México. Cap. 45. 609-629.
- 2 Voerman BJ, Strack van Schijndel RJ, de Boer H, Groeneveld AB, Nauta JP, van der Veen EA, Thijs LG (1994). Effects of human growth hormone on fuel utilization and mineral balance in critically ill patients on full intravenous nutritional support. *J Crit Care* 9(3): 143-150.
- 3 Wolf SE, Barrow RE, Herndon DN (1996). Growth hormone and IGF-I therapy in the hypercatabolic patient. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10(3): 447-463.
- 4 Watson AR (1991). Safety of growth hormone. *Science* 337.
- 5 Butenandt O (1996). Growth hormone therapy in childhood. Growth hormone therapy in small children without growth hormone deficiency. *Fortschr Med* 114(16): 201-204.
- 6 Reusz GS, Miltenyi G, Stubnya G, Szabo A, Horvath C, Byrd DJ, Peter F y Tulassay (1997). X-linked hypophosphatemia: effects of treatment with recombinant human growth hormone. *T Pediatr Nephrol* 11(5): 573-577.
- 7 Mehls O, Tonshoff B, Haffner D, Wuhl E y Schaefer FJ (1994). The use of recombinant human growth hormone in short children with chronic renal failure. *Pediatr Endocrinol* 7(2): 107-113.
- 8 Davies UM, Jones J, Reeve J, Camacho-Hubner C, Charlett A, Ansell BM, Preece MA y Woo PM (1997). Juvenile rheumatoid arthritis. Effects of disease activity and recombinant human growth hormone on insulin-like

growth factor 1, insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3, and osteocalcin. *Arthritis Rheum* 40(2): 332-340.

- 9 Antoniazzi F, Bertoldo F, Mottes M, Valli M, Sirpresi S, Zamboni G, Valentini R y Tato L (1996). Growth hormone treatment in osteogenesis imperfecta with quantitative defect of type I collagen synthesis. *J Pediatr* 129(3): 432-439.
- 10 Merchav S, Graif Z y Skottner A (1993). In-vitro response of erythroid progenitors from children with thalassaemia major to human growth hormone and insulin-like growth factor I. *Clin Endocrinol (Oxf)* 39(2): 207-211.
- 11 Kappel M, Hansen MB, Diamant M, Jorgensen JO, Gyhrs A y Pedersen BK (1993). Effects of an acute bolus growth hormone infusion on the human immune system. *Horm Metab Res* 25(11): 579-585.
- 12 Mustafa A, Nyberg F, Mustafa M, Bakhiet M, Mustafa E, Winblad B y Adem A (1997). Growth hormone stimulates production of interferon-gamma by human peripheral mononuclear cells. *Horm Res* 48(1): 11-15.
- ~~13 Antoniazzi F, Bertoldo F, Mottes M, Valli M, Sirpresi S, Zamboni G, Valentini R y Tato L (1996). Growth hormone treatment in osteogenesis imperfecta with quantitative defect of type I collagen synthesis. *J Pediatr* 129(3): 432-439.~~
- 14 Carli F, Webster JD, Halliday D (1997). Growth hormone modulates amino acid oxidation in the surgical patient: leucine kinetics during the fasted and fed state using moderate nitrogenous and caloric diet and recombinant human growth hormone. *Metabolism* 46(1): 23-28.
- 15 Bowes SB, Umpleby M, Cummings MH, Jackson NC, Carroll PV, Lowy C, Sonksen PH y Russell-Jones DL (1997). The effect of recombinant human growth hormone on glucose and leucine metabolism in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82(1): 243-246.

- 16 Jeevanandam M, Holaday NJ y Petersen SR (1996). Adjuvant recombinant human growth hormone does not augment endogenous glucose production in total parenteral nutrition-fed multiple trauma patients. *Metabolism* 45(4): 450-456.
- 17 Bringer J, Lhoret RR, Hedon B y Lefebvre P (1993). The use of growth hormone (hGH) in ovulation induction in women. *Contracept Fertil Sex* 21(9): 678-682.
- 18 Lanzone A, Fortini A, Fulghesu AM, Soranna L, Caruso A y Mancuso S (1996). Growth hormone enhances estradiol production follicle-stimulating hormone-induced in the early stage of the follicular maturation. *Fertil Steril* 66(6): 948-953.
- 19 Piaditis GP, Hatzioanidis AH, Trovas GP, Misichronis GS, Kounadi TG, Devetzaki OA, Andronis CK, Rangou DB y Chlouverakis CS (1996). The effect of sequential administration of octreotide alone and octreotide/growth hormone simultaneously on buserelin stimulated ovarian steroid secretion in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 45(5): 595-604.
- 20 Gunn AJ, Gunn TR, Rabone DL, Breier BH, Blum WF y Gluckman PD (1996). Growth hormone increases breast milk volumes in mothers of preterm infants. *Pediatrics* 98: 279-282.
- 21 Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, Pardo F, Biondi B y Sacca L (1996). A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 334(13): 809-814.
- 22 Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itajura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozarri G, Crea R y Seeburg P (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a ADN sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281(5732): 544-548.
- 23 Gray GL, Baldrige JS, McKeown KS, Heyneker HL y Chang CN (1985). Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in

*Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene* 39: 247-254.

- 24 Kato C, Kobayashi T, Kudo T, Furusato T, Murakami Y, Tanaka T, Baba H, Oishi T, Ohtsukaa E, Ikeharaa M, Yanagida T, Kato H, Moriyama S y Horikoshi K (1987). Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. *Gene* 54:197-202.
- 25 Hsiung HM, Cantarell A, Luirink J, Oudega B, Veros AJ y Becker GW (1989). Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Biotechnology* 7: 267-271.
- 26 Becker GW y Hsiung HM (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 204, 145, 150.
- 27 Chang CN, Rey M, Bocchner B y Gray G. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. *Gene* 55: 189-196.
- 28 Martínez-Torres A. (1994). Expresión en *Escherichia coli* de las hormonas del crecimiento humano y bovino en fusión con la proteína de unión a la maltosa. Tesis de Maestría. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.
- 29 Franchi E, Maisano F, Testori SA, Galli G, Toma S, Parente L, Ferra FD y Grandi G (1991). A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnology* 18: 41-54.
- 30 Tokunaga T, Iwai S, Gomi H, Kodama K, Ohtsuka E, Ikehara M, Chisaka O y Matsubara K (1985). Expression of synthetic human growth hormone gene in yeast. *Yeast* 39: 117-120.
- 31 Ortiz-López R (1992). Obtención de líneas celulares productoras de las isoformas de 20 y 22 kDa de la hormona del crecimiento humano. Tesis de Maestría. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética,



Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L.  
Monterrey, N.L., México.

- 32 Pavlakis GN, Hizukaa N, Gorden P, Seburg PH y Hamer DH (1981). Expression of two human growth hormone genes in monkey cell infected by simian virus 40 recombinants. *Proc Natl Acad Sci* 78: 7398-7402.
- 33 Escamilla-Treviño LL (1996). Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHR) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestría. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.
- 34 Sudbery PE (1996). The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr op in biotech* 7: 517-524.
- 35 Cregg JM, Vedvick TS y Raschke WC (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio-Technology* 11: 430-433.
- 36 Faber KN, Harder W, Ab G y Veenhuis M (1995). Methylotrophic yeasts as a factories for the production of foreign proteins. *Yeast* 11: 1331-1344.
- 37 Wegner GH (1983). Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. *US patent* 4: 329, 414.
- 38 Sreekrishna K y Kropp KE (1996). Nonconventional Yeast in biotechnology. A Handbook. Springer. Wolf (Ed.) Berlin. Chapter 6. *Pichia pastoris*. 203-253.
- 39 Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz R, Madden KR, Kellaris PA, Davis G, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G y Thill GP (1987). High-level expression and efficient assembly of Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BiolTechnology* 5: 479-485.

- 40 Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig W y Grinna L (1987). High Level Secretion of Glycosilated Invertase in the Metylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 1305-1308.
- 41 Sreekrishna K, McCombie WR, Potenz R, Parker KA, Mazzaferro PK, Maine GM, Lopez JL, Divelbiss DK, Holden KA, Barr RD y Fuke M (1988). Clonal variation in the expression of human tumor necrosis factor (TNF) in the methylothetic yeast *Pichia pastoris*. Presented at the fifth annual Biotech USA industry conference and exhibition, San Francisco, Calif.
- 42 Digan ME, Lair SV, Brierley RA, Siegel RS, Williams ME, Ellis SB, Kellaris PA, Provow SA, Craig WS, Velicelebi G y Harpold MM (1989). Continous production of a novel lysozime via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 7: 160-164.
- 43 Clare JJ, Rayment FB, Sreekrishna K y 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.
44. Scorer CA, Buckholz, Clare JJ y Romanos MA. (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope prottein in the methylothetic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136:111-119.
- 45 Despreaux CW y Manning RF (1993). The dacA gene of *Bacillus stearothermophilus* for D-alanine carboxipertidase: cloning, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Gene* 131: 35-41.
- 46 Laroche Y, Storme V, de Meutter J, Messens J y Lauwereys M (1994). High-level Secretion and Very Efficient Isotopic Labeling of Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Expressed in the Methylothetic Yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 12: 1119-1124.

- 47 Fryxell B, O'Donoghue K, Graeff RM, Lee HC y Branton WD (1995). Functional expression of Soluble Forms of Human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Prot Express and Purif* 6: 229-336.
- 48 Zhu A, Monahan C, Zhang Z, Hurst R, Leng L y Goldstein J (1995). High-Level Expression and Purification of Coffe Bean  $\alpha$ -Galactosidase Produced in the Yeast *Pichia pastoris*. *Arch of Biochem and biophys* 324: 65-70.
- 49 Ridder R, Schmitz R, Legay F, Gram H (1995). Generation of Rabbit Monoclonal Antibody Fragments from a Combinatorial Phage Display Library and Their Production in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 13: 255-260.
- 50 Guo W, González-Candelas L y Kolattukudy PE (1995). Cloning of a new Pectate Lyase Gene *pe/C* from *Fusarium solani* f. sp. pisi (Nectria haematococca, Mating Type VI) and Characterization of the Gene Product Expressed in *Pichia pastoris*. *Arch of Biochem and biophys* 323: 352-360.
51. Mohanraj D. Olson T y Ramakrishnan. (1995). Expression of Biologically Active Human Vascular Endothelial Growth Factor in Yeast. *Growth Factors* 12: 17-27.
- 52 Brankamp RG, Sreekrishna K, Smith PL, Blankenship DT y Cardin AD. (1995). Expression of a Synthetic Gene Encoding the Anticoagulant-Antimetastasic Protein Ghilanten by the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Prot Express and Purif* 6: 813-820.
- 53 Steinlein LM, Graf TN e Ikeda RA (1995). Production and Purification of N-Terminal Half-Transferrin in *Pichia pastoris*. *Prot Express and Purif* 6: 619-624.
- 54 Payne WE, Gannon PM y Kaiser CA (1995). An inducible acid phosphatase from the yeast *Pichia pastoris*: characterization of the gene and its product. *Gene* 163: 19-26.

- 55 Vozza LA, Wittwer L, Higgins DR, Purcell TJ, Bergseid M, Collins-Racie LA, LaValle ER y Hoeffler JP (1996). Production of a Recombinant Bovine Enterokinase catalytic Subunit in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 14: 77-81.
- 56 Payne MS, Petrillo KL, Gavagan JE, DiCosimo R, Wagner W y Anton DL (1997). Engineering *Pichia pastoris* for biocatalysis: co-production of two active enzymes. *Gene* 194: 179-182.
- 57 Lam LPY y Berger SA (1997). Intracellular Expression and Purification of the *c-kit* Receptor Kinase Domain in *Pichia pastoris*. *BioTechniques* 23:82-86.
- 58 Lai SK, Tulasiram P y Jameel S (1997). Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. *Gene* 190:63-67.
- 59 Wuebbens MW, Roush ED, Decastro CM y Fierke CA (1997). Cloning, Sequencing and Recombinant expression of the Porcine inhibitor of Carbonic Anhydrase: A Novel Member of the Transferrin Family. *Biochemistry* 36: 4327-4336.
- 
- 60 McGrew JT, Leiske D, Dell B, Klinke R, Krasts D, Wee SF, Abbot N, Armitage R y Harrington K (1997). Expression of trimeric ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expression transformants. *Gene* 187: 193-300.
- 61 Hansen OC y Stougaard P (1997). Hexose Oxidase from the Red Alga *Chondrus crispus*. Purification, Molecular Cloning, and Expression in *Pichia pastoris*. *The J of Biol Chem* 272:11581-11587.
- 62 Mistry AR, Falciola L, Monaco L, Tagliabue R, Acerbis G, Knight A, Harbottle RP, Soria M, Bianchi ME, Coutelle C y Hart SL (1997). Recombinant HMG1 Protein Produced in *Pichia pastoris*: A Nonviral Gene delivery Agent. *Biotechniques* 22: 718-729.

- 63 Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM y Gingeras TR (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cel Biol* 5: 1111-1121.
- 64 Invitrogen (1994). *Pichia* Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Version 3.0.
- 65 Barr KA, Hopkins SA y Sreekrishna K (1992). Protocol for Efficient Secretion of HSA Developed from *Pichia pastoris* . *Pharm Eng* 12(2): 48-51.
- 66 Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY y Madden KR (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cel Biol* 5: 3376-3385.
- 67 Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K y Henwood CA (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105, 05-212.
- 68 Scorer C.A., Clare J.J., McCombie W.R., Romanos M.A. y Sreekrishna K. (1994). Rapid Selection Using G418 of High Copy Number transformants of *Pichia pastoris* for High-level Foreign Gene Expression. *Biotechnology* 4, 181-184.
- 69 Sreekrishna K y Hopkins SA. Unpublished data.
- 70 Sreekrishna K y Parker KA. Unpublished data.
- 71 Romanos MA, Clare Beeseley KM, Rayment FB, Ballantine SP, Makoff AJ, Dougan G, Fairweather NF y Charles IG (1991). Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high level production and immunological properties. *Vaccine* 9:901-906.

- 72 Vedvick T, Buckholz RG, Engel M, Urcan M, Kinney J, Provow S, Siegal RS y Thill GP (1991). High-Level Secretion of Biologically Active Aprotinin from the Yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology*. 1, 197-202.
- 73 Cregg JM y Madden KR. (1988). Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host for the production of foreign proteins. *Dev Ind Microbiol* 29: 33-41.
- 74 Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.U.S.A.
- 75 Morelle G. (1989). A plasmid extraction Procedure on a Miniprep Scale. *Focus*, 1: 7.
- 76 Linder S, Schliwa M y Kube-Granderath E (1996). Direct PCR Screening of *Pichia pastoris* Clones. *Biotechniques* 2: 980-982.
- 77 Romanos M (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Op in Biotech* 6: 5527-533.
- ~~78 Gallardo-Blanco HL (1998). Construcción de cepas de *pichia pastoris* sobreproductoras de hormona recombinante del crecimiento bovino. Tesis de Maestría. Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.~~
- 79 Invitrogen (1996). pPIC9K: A *Pichia* Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression; Instruction Manual Version B.

## APÉNDICE A

### REACTIVOS

#### EDTA 500 mM pH 8.

Agregar 186.1 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8 con NaOH 10 N y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min.

#### NaOH 10 N

Disolver 40 g de NaOH y aforar a 100 mL con agua destilada estéril.

#### Tris-HCl 2 M pH 8

Disolver 242.2 g de Trisma en 700 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min.

#### TE 100X pH 8 (EDTA 100 mM, Tris-HCl 1 M)

Para preparar 100 mL mezclar 50 mL de Tris-HCl 2 M pH 8 y 20 mL de EDTA 500 mM pH 8. Aforar a 100 mL con agua destilada. Autoclavear 20 min.

Para preparar una solución de trabajo efectúe una dilución 1:100.

---

#### Solución I

50 mM glucosa

25 mM Tris-HCl (pH 8)

10 mM EDTA

4 mg/mL de lisozima

Para 100 mL disolver 0.9 g de glucosa, añadir 1.25 mL de Tris-HCl 2M y 2 mL de EDTA 500 mM. Autoclavear 20 min.

#### Solución II

0.2 N NaOH

1 % SDS.

Para 100 mL, agregar 2 mL de NaOH 10 N y 10 mL de SDS 10 %. Aforar a 100 mL con agua destilada. Esta solución se emplea recién preparada.

**Solución III**

**7.5 M Acetato de amonio pH 7.8**

Pesar 57.8 g de acetato de amonio y disolver en 100 mL de agua destilada estéril.

**Medio LB (Luria-Bertani)**

1 % Triptona, 0.5 % Extracto de levadura, 1 % NaCl, pH 7.0

Para 1 L disolver: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl en 950 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min. enfriar a 55°C y añadir los antibióticos deseados. Almacenar a temperatura ambiente o a 4°C.

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

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

**500X B (0,02 % biotina)**

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

**100XH (0.4 % histidina)**

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

**10X D (20 % dextrosa)**

Disolver 200 g de D-glucosa en 1 L de agua destilada, autoclavar por 15 min o esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

**10X GY (10 % glicerol)**

Mezclar 100 mL de glicerol con 900 mL de agua. Esterilizar por filtración o autoclave. guardar a temperatura ambiente. La vida media de esta solución es mayor de un año.



**100X AA (0.5 % de cada aminoácido)**

Disolver 500 mg de cada aminoácido: ácido L-glutámico, L-metionina, l-lisina, L-leucina y L-isoleucina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

**Amortiguador de fosfato de potasio 1 M pH 6.0.**

Combinar 132 mL de 1 M  $K_2HPO_4$  y 868 mL de 1 M  $KH_2PO_4$  . Confirmar el pH (si es necesario ajustar con ácido fosfórico o KOH). Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente. La vida media de esta solución es mayor de un año.

**YPD (Medio de extracto de levadura peptona y dextrosa)**

1 % extracto de levadura

2 % peptona

2 % Dextrosa

20 g/L de agar

Para preparar 1 L, agregar 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona a 900 mL de agua destilada. Si se van a preparar placas, incluir 20 g de agar. Autoclavear 20 min en ciclo líquido. Agregar 100 mL de 10XD. El medio líquido se almacena a temperatura ambiente. las placas se guardan a 4°C.

Duran varios meses.

**Placas de YPD con G418**

1 % extracto de levadura

2 % peptona

2 % Dextrosa

1.5 % de agar

La solución stock de G418 se prepara a una concentración de 100 mg/mL de G418 en agua destilada estéril, se esteriliza por filtración y se almacena a -20°C.

Preparar YPD-agar y mantener a 55-60°C y añadir el volumen apropiado de la solución de G418. Mezclar cuidadosamente, para evitar la formación de burbujas. Almacenar a 4°C hasta por 6 meses.

Solución Stock de G418 requerida para preparar placas YPD-agar a diferentes concentraciones de G418.

Final [G418] (mg/mL)	mL de solución stock/250 mL de YPD-agar
0.25	0.625
0.5	1.250
0.75	1.875
1.00	2.500
1.50	3.750
1.75	4.375
2.00	5.000

### Reactivos para esferoplastos y transformación

a) Proporcionados en el estuche:

SE: 1 M sorbitol, 25 mM EDTA, pH 8.0

DTT: 1 M DTT en agua

SCE: 1 M sorbitol, 1 mM EDTA y 10 mM de amortiguador citrato de sodio, pH 5.8

CaS: 1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>.

Zymoliasa: 3 mg/mL en agua

40 % PEG: 40 % (p/v) PEG 3350 (Grado de reactivo) en agua

CaT: 20 mM Tris, pH 7.5 y 20 mM CaCl<sub>2</sub>

SOS: 1 M sorbitol, 0.3X YPD, 10 mM CaCl<sub>2</sub>

Sorbitol 1 M

b) Preparados en fresco para cada transformación:

SED: 19 mL de SE y 1 mL de 1 M DTT

PEG/CaT: 1:1 mezcla de 40 PEG y CaT

### RDB (Medio de Regeneración-Dextrosa)

1 M Sorbitol

1 % Dextrosa

1.345 YNB

4 X 10<sup>-5</sup> % Biotina

0.005 % Aminoácidos

Disolver 186 g de sorbitol en 700 mL de agua. Para preparar placas añadir 20 g de agar. Autoclavear 20 min en un ciclo líquido. Enfriar y mantener a 45°C.

Preparar una solución precalentada a 45°C de una mezcla de las siguientes soluciones stock:

100 mL de 10X D

100 mL de 10 X YNB

2 mL de 500X B

10 mL de 100X AA

88 mL de agua destilada estéril

Añadir a la solución de sorbitol.

Para preparar RDBH añadir además 10 mL de 100X H a la mezcla precalentada.

Para preparar top agarosa añadir 10 g de agarosa con el sorbitol, mantener la solución autoclaveada a 60°C en un baño de agua antes de la adición de la mezcla precalentada. Durante la transformación usar una solución fundida a 45°C.

#### **BMG (Medio mínimo amortiguado con Glicerol)**

100 mM de Amortiguador de potasio, pH 6.0

1.34 % de YNB

4 X 10<sup>-5</sup> % de Biotina

1 % de glicerol

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### **BMM (Medio mínimo amortiguado con metanol)**

100 mM de Fosfato de potasio, pH 6.0

1.34 % de YNB

4 X 10<sup>-5</sup> % de Biotina

0.75 % de Metanol

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

**MD y MDH (Medio Mínimo Dextrosa ± Histidina)**

1.34 % de YNB

4 X 10<sup>-5</sup> % de Biotina

1 % de Dextrosa

Autoclavear 800 mL de agua destilada y enfriar a 60°C. Agregar 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500X y 100 mL de Dextrosa 10X. Para preparar MDH añadir 10 mL de 100XH, mezclar y almacenar a 4°C. Para preparar placas agregar 15 g de Agar antes de esterilizar el agua.

**Crecimiento de cepas de *Pichia*:**

La temperatura de crecimiento de *Pichia pastoris* es 28-30°C en cultivos líquidos y placas. Crecer a 32°C durante la inducción puede ser perjudicial a la expresión de proteína, y puede provocar la muerte celular.

Otros factores importantes son:

El tiempo de duplicación en fase log de Mut<sup>+</sup> o Mut<sup>S</sup> *Pichia* en YPD es ~ 2 horas.

Las cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>S</sup> no difieren en los intervalos de crecimiento en ausencia de metanol.

El tiempo de duplicación en la fase log de Mut<sup>+</sup> *Pichia* en MM es 4-6 horas. ®

El tiempo de duplicación en la fase log de Mut<sup>S</sup> *Pichia* en MM es 18 horas.

Una OD<sub>600</sub> ≈ 5 x 10<sup>7</sup> células/mL

**Almacenamiento de cepas de *Pichia*:**

Para almacenamiento de tiempo corto de células, usar medio YPD o punción en YPD agar.

Cultivar una colonia de GS115 o una transformante GS115 His<sup>+</sup> en YPD.

Transferir a vial con YPD.

Las células pueden ser almacenadas en YPD por varias semanas a +4°C.

Para almacenamiento de mayor tiempo, las células son almacenadas en congelamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Cultivar una sola colonia de GS115 o una transformante GS115 His<sup>+</sup> toda la noche en YPD.

Cosechar las células y resuspender en YPD conteniendo 15 % de glicerol a una OD600 final de 50-100 (aproximadamente  $2.5-5.0 \times 10^9$  células/mL).

Las células son congeladas con nitrógeno líquido o en baño hielo/etanol y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Nota:**

Después de un tiempo prolongado de almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ , es recomendado que las transformantes GS115 His<sup>+</sup> sean revisadas para corroborar el genotipo y viabilidad por estría en placas MM, MD o MGY antes de usarse.

#### **Reactivos para SDS-PAGE**

##### **Acrilamida-bisacrilamida**

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

##### **1.5 M Tris-HCl pH 8.8**

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

##### **0.5 M Tris-HCl pH 6.8**

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

##### **SDS 10 %**

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

**Amortiguador de muestra 2X:**

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

Antes de usarse añadir 50 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol a 950 mL de la mezcla anterior.

**Persulfato de amonio 10 %**

Pesar 50 mg y disolver en 500  $\mu$ l de agua destilada.

**Amortiguador de corrida 5X**

	1 L
Tris	15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g

Aforar a 1 L con agua destilada y verificar el pH (8.3  $\pm$  0.2). No ajustar.

**Solución fijadora**

Metanol 50 % y ácido acético 10 %.

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

**Solución colorante de Coomassie**

Azul brillante de Coomassie G 0.05 %, Metanol 50 %, ácido acético 10 %.

Azul brillante de Coomassie G 0.25 g, Metanol 500 mL, ácido acético 100 mL.

Aforar a 1 L con agua destilada.

**Solución decolorante:**

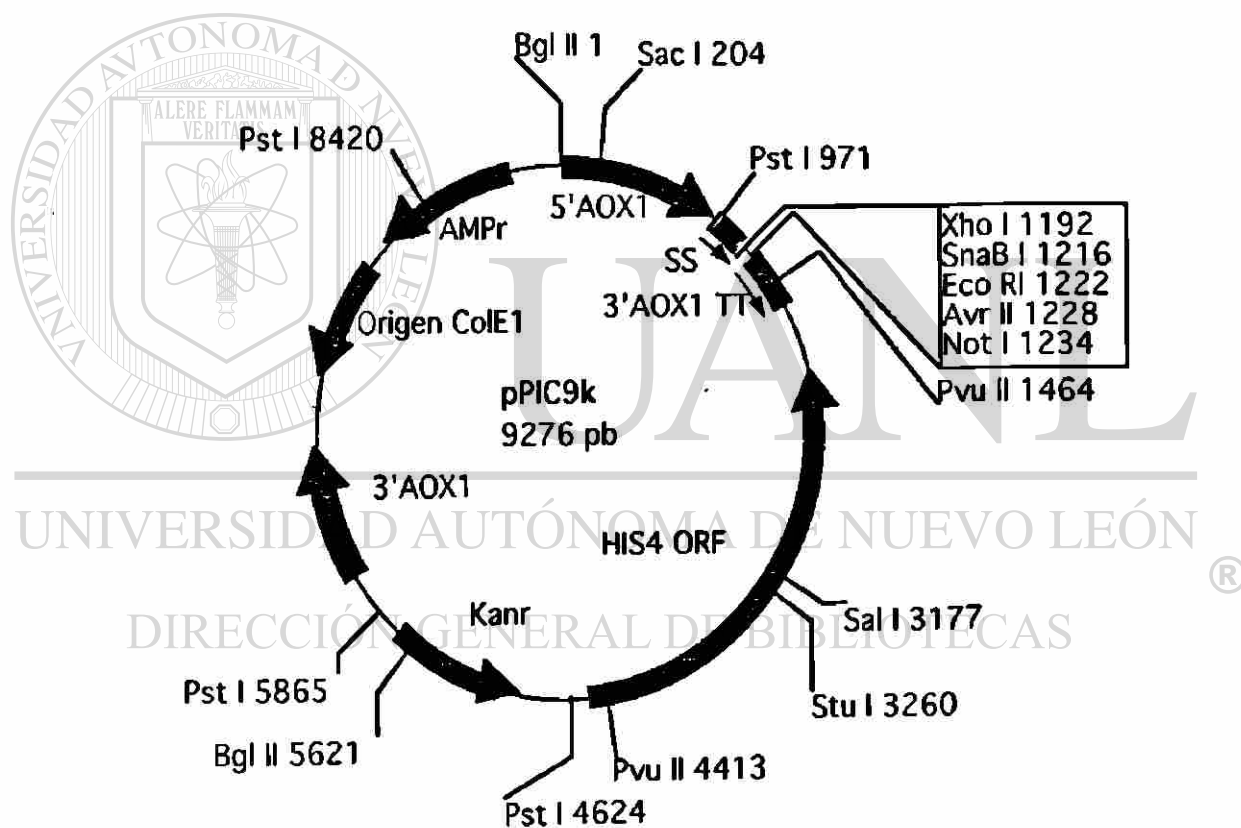
Metanol 5 %, ácido acético 7 %.

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

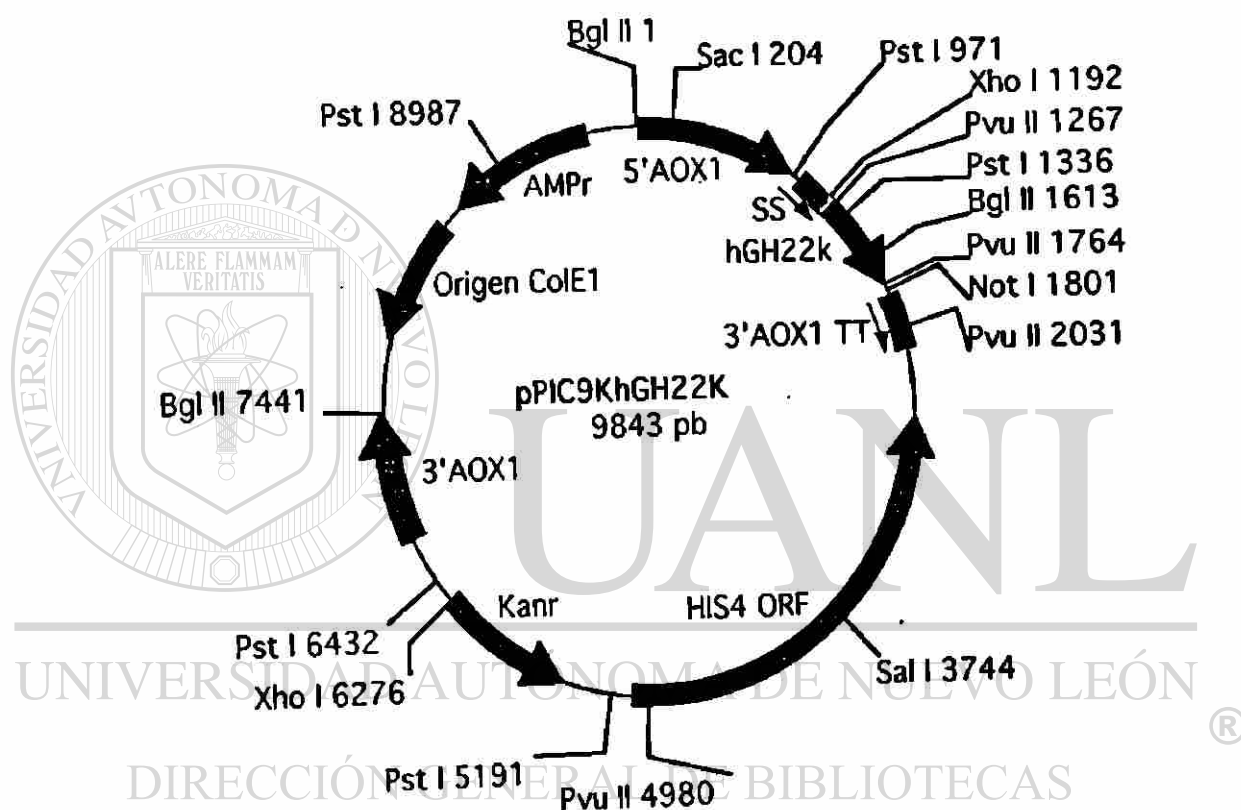
## APÉNDICE B

### GRÁFICAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

GRÁFICA DEL PLÁSMIDO pPIC9K QUE MUESTRA ALGUNOS SITIOS DE RESTRICCIÓN RELEVANTES

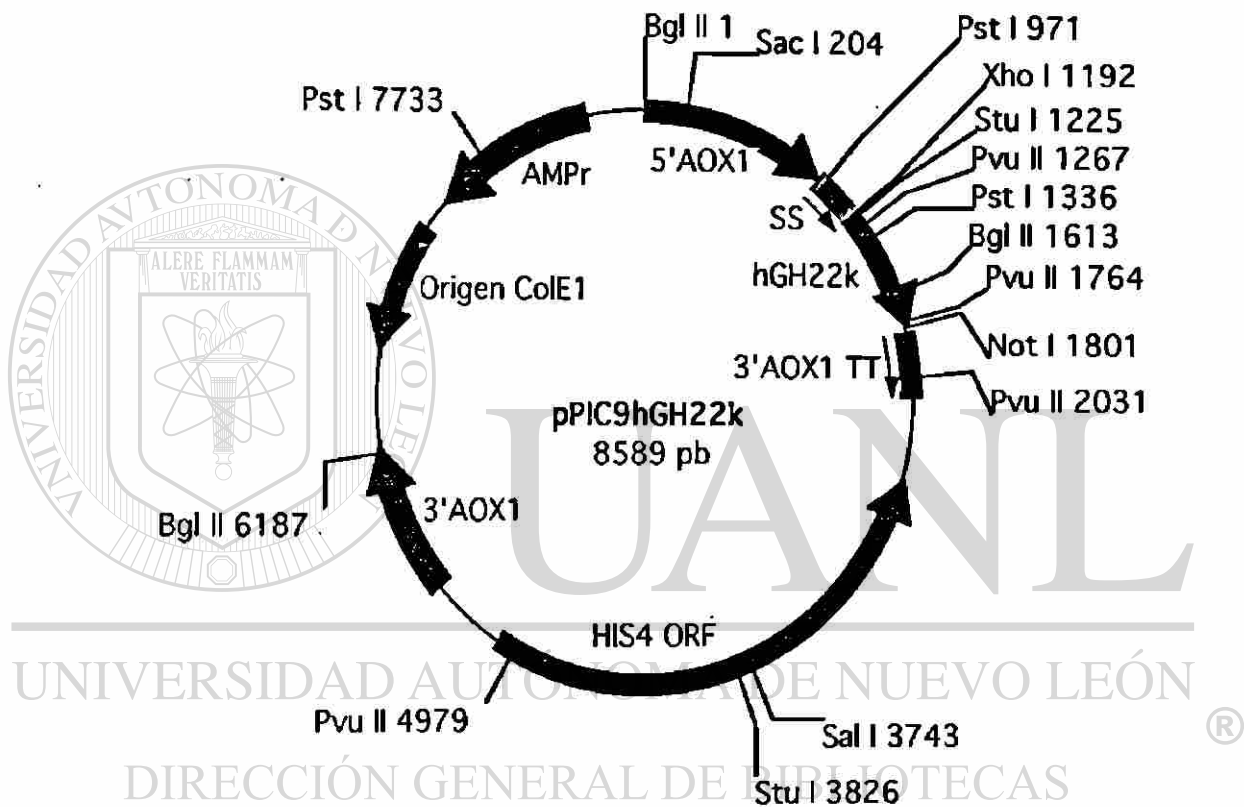


GRÁFICA DEL PLÁSMIDO pPIC9KhGH22K QUE MUESTRA ALGUNOS SITIOS DE RESTRICCIÓN RELEVANTES





GRÁFICA DEL PLÁSMIDO pPIC9hGH22K QUE MUESTRA ALGUNOS SITIOS DE RESTRICCIÓN RELEVANTES



## APÉNDICE C

### RESULTADOS DEL TAMIZAJE CON G418

Se representa con A: crecimiento pobre, B: crecimiento regular y C: crecimiento abundante. Se puede identificar que las clonas 1, 10, 19, 34, 66 y 76 crecen a concentraciones  $\geq 0.75$  mg/ml de G418.

Clona	Concentración de G418 (mg/ml de medio)									
	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	1.75	2.00	3.00	4.00
U	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GS115	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PPIC9K	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
1	C	C	C	B	B	-	-	-	-	-
2	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
3	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
4	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
5	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
6	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
7	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
8	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
9	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
10	C	C	C	A	-	-	-	-	-	-
11	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
12	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
13	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
14	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
15	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
16	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
17	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
18	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
19	C	C	C	B	-	-	-	-	-	-
20	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
21	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
22	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
23	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
24	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
25	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
26	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
27	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
28	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
29	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
30	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
31	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
32	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
33	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
34	C	C	B	A	-	-	-	-	-	-
36	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-

Clona	Concentración de G418 (mg/ml de medio)									
	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00	1.50	1.75	2.00	3.00	4.00
37	C	A	A	-	-	-	-	-	-	-
38	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
39	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
40	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
41	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
42	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
43	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
44	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
45	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
46	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
47	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
48	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
49	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
50	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
51	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
52	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
53	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
54	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
55	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
56	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
57	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
58	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
59	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
60	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
61	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
62	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
63	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
64	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
65	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
66	C	C	B	A	-	-	-	-	-	-
67	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
69	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
70	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
71	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
73	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-
74	C	C	B	-	-	-	-	-	-	-
75	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-
76	C	C	C	C	C	A	A	-	-	-
78	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
79	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
80	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
81	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
82	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
83	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-
84	C	C	A	-	-	-	-	-	-	-

## APÉNDICE D

### DATOS CROMATOGRÁFICOS

Porcentaje de HGhr presente en cada fracción y porcentaje de recuperación de HGhr del medio de cultivo de una fermentación a nivel fermentador en el ensayo A.

Fracción	% HGhr	% Recuperación
1	0	0
2	20	34
3	28	1
4	40	65
5	0	0

Porcentaje de HGhr presente en cada fracción y el % de recuperación de HGhr del medio de cultivo de una fermentación a nivel matraz con la clona GS115hGH22KG418-1 sobreproductora en el ensayo B.

Fracción	% HGhr	% Recuperación
1	0	0
2	42	15
3	46	42
4	67	11
5	76	16
6	45	8
7	31	8
8	0	0
9	0	0
10	0	0

Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción y el % de recuperación de HGhr del medio de cultivo de una fermentación a nivel matraz con la clona 1 sobreproductora en el ensayo C.

Fracción	% HGhr	% Recuperación
1	0	0
2	37	11
3	46	48
4	52	10
5	42	8
6	81	15
7	67	8
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

## APÉNDICE E

### SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

#### pPIC9hGH22K

AGATCTAACATCCAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGGCCATCCGACATCCACAGTCCATTTCTCACACATAAGTGCCAA  
 ACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTTGCCA  
 TCGAAAAACAGCCAGTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACCCATGACTTTAT  
 TAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTCAATGTTTATTTCGGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAAACATCA  
 CTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCAATGTTCCCAAAATGCCCCAAAACCTGACAGTTTAAACGCTGTCTT  
 GGAACCTAATATGACAAAAGCOTGATCTCATCAAGATGAACAAAGTTTGGTTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAA  
 GAACTTCCAAAAGTCGCCATACCCTTTGCTTGTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGC  
 AGTCTCTCTATCGTTCTGAAACCCCGTGCACCTGTCCGGAAGCGAAATGGGGAAACACCCCGTTTTTGGATGATTATGCAATTG  
 TCTCCATTGTATGTTCCAAAGATTCTGTGGAACTGCTGATAGCCTAACGTTCAATGAAATTTAACTGTTCTCAACCC  
 CTACTTGCAGCAATATATAAACAGAAGGAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTTATTAOCTTACTTTCAFAA  
 TTGGACTGGTTCCAATTGACAAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGCAAACTTGAAAGATCAAAAAACAATAATTATCG  
 AAGGATCCAACAGATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCACTTTTATTCCGAGCATCCTCCGCATTAGCTGTCCAGTCAACACT  
 ACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCTATCGTTACTCAGATTAGAAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTT  
 TGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGTCAAAGAAGAAGGGGTATC  
 TCTCGAAGAAAGATTCCCAACCATTCCTTATCTAGACTTTTGGACAACGCTATGCTCCGGCCCATGCTGTGCACCAGCTGGCC  
 TTTGACACTACCAGGAGTTTGAAGAAGCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCT  
 GTTCTCAAGTCTATTCCGACACCCCTCCAACAGGGAGGAACACAACAGAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCT  
 GCTCATCCAGTCTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCTCAGGAGTGTCTCGCCAACAGCCTGGGTACGGCCGCTCTGACAGCAAC  
 GTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAACCGTGTGAGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGACTGGGACGA  
 TCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTT  
 CAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGCCATCTGTCACTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCTGCC  
 GTAGAATTCCTTAGGGCGCCCGAATTAATTCGCCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACCTACGAGAAGACCG  
 GTCTTGCTAGATTCFAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTGTT  
 AACATPATAGTATAGGATTTTTTTGTCATTTTGTCTCTCTGTCAGGACTGCTCTGATCAGCCATATCGCAGCTGATGA  
 ATATCTGTGTAGGTAGGTTTGGGAAATCATTGAGTTTGAATTTTTCTCTGTCAGGACTGCTCTGATCAGCCATATCGCAGCTAGAT  
 TAAGTGAGAAGTTCTTTGTGCAAGCTTATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCAAGTTAAATTTGCTAACGCAGTCAGGCA  
 CCGTGTATGAAATCAACAATGCGCTCATCGTCACTCTCGGCACCGTCAACCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGG  
 TACTGCCGGCTCTTGGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGTCTAGCGCTATATGCGTTGAT  
 GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCCGCCAGTCTGCTGCTTCCGTACTTGGAGCC  
 ACTATCGACTACCGGATCATGGCGACCACACCCGCTGTGGATCTATCGAATCTAAATGTAAGTTAAAAATCTCTAAATAATTAA  
 ATAAGTCCAGTTTCTCCATACGAACCTTAACAGCATTGGGGTGAAGCTATGACCTTCAACAGCAGCCAGATCCATCACTGCTT  
 GGCCAAATATGTTTCTAGTCCCTCAGGAGTTACGCTTTGTGAAGTGAATTTCTGGAAGGTTGCAAGTTAACTCCGCTGTATTG  
 ACGGGCATATCCGTACGTTGGCAAAGTGTGGTGGTACCGGAGGAGTAACTCCACAACCTCTCGGAGAGTAGCCACCAACAAC  
 ACAGATCCAGCGTGTGTACTTGATCAACATAAGAAGAAGCATTCTCGATTTCAGGATCAAGTGTTCAGGAGCGTACTGATTGG  
 ACATTTCCAAAGCCTGCTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGCAATACACTTGGCTACAATTTCAACCCCTTGGCAA  
 CTGCACAGCTTGGTTGTGAACAGCATCTCAATTCGGAAGCTCCTTGTCTGTATATCGACAGCCAACAGAATCACCTGGGAA  
 TCAATACCATGTTACGCTTGAGCAGAAGGCTGAGGCAACGAAATCTGGATCAGCGTATTTATCAGCAATAACTAGAACTTCAGA  
 AGGCCAGCAGGCAATGTCAACTACACAGGGCTGATGTGTCATTTGAACCATCACTTGGCAGCAGTAACGAACTGGTTTCCT  
 GGACCAATATTTTGTACACTTGAACAGTTTCTGTTCCGTAAGCCATAGCAGTACTGCTTGGGCGCTCTGCTAGCAGCA  
 TACACTTAGCACAACCTTGTGGCAACGTAGTACTTGGGGTAAGGTAACATCCTTCTTAGGTGGAGATGCAAAAAACAAT  
 TCTTTGCAACAGCAACTTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGGAAAGGAGAAATGGCGTTCCACCAGGAATATAGAGG  
 CCAACTTCTCAATAGGTTTGGCAAAACGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTCAACTTGAACGCTCTCCGTTAGTTGAGCTT  
 CATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTTAAACGTTATCTGGCAATTGCATAAGTTCTCTGGGAAAGG  
 AGCTTCTAACACAGGTGCTTCAAAGCGACTCCATCAAACCTTGGCAGTTAGTTCTAAAAGGGCTTTGTACCAATTTTGACGAACA  
 TTGTGACAATTTGGTTGACTAATTCATAATCTGTTCCGTTTTCTGGATAGGACGACGAAGGGCATCTCAAATTTCTGTGAGG  
 AGGCTTAGAAACGTCATTTTGCACAAATCAATACGACCTTCAGAAGGACTTCTTTAGGTTTGGATTCTTCTTTAGGTTGTTC  
 CTGGTGTATCTCGCTTGGCATCTCCTTCTCTTCTAGTACCTTTAGGACTTCATATCCAGGTTTCTCTCCACCTCGTCCAAC  
 GTCACACCGTACTTGGCACAATCAACTAATGCAAAAATAAAATAAGTCAGCACATTCACAGGCTATATCTTCTTGGATTTAGCTT  
 CTGCAAGTTCAATCAGCTTCTCTCCTAATTTTAGCGTTCAAACAAAACCTTCTGCTGCTAAATAACCGTTTGGTATAAGAACCTTCTG  
 GAGCATGCTCTTACGATCCCAAGGTTCTTCAATGGCTCTAAGACCTTTGATTGGCCAAAACAGGAAGTGGCTTCAAGTGA  
 CAGAAACCAACACCTGTTTGTCAACCACAAATTTCAAGCAGTCTCCATCACAATCCAATTCGATACCCAGCAACTTTTGAAGTTC  
 GTCCAGATGTAGCACCTTTATACCAAAACCGTGCAGCAGAGATTGGTAGACTCCAGTTTGTGTCCTTATAGCCTCCGGAATAGA

CTTTTGGACGAGTACACCAGGCCAACGAGTAATTAGAAGAGTCAGCCACCAAAGTAGTGAATAGACCATCGGGGGCGGTACAGTA  
 GTCAAAGACGCCAACAAAATTTACCTGACAGGGAACTTTTGACATCTTCAGAAAAGTTCCGTATTCAGTAGTCAATTGCCGAGCAT  
 CAATAATGGGGATTATACAGAAAGCAACAGTGGAAAGTCACATCTACCAACTTTGCCGTCTCAGAAAAAGCATAAACAGTTCTACT  
 ACCGCCATTAGTGAACCTTTTCAAATCGCCAGTGGAGAAGAAAAAGGCACAGCGATACTAGCATTAGCCGGCAAGGATGCAACT  
 TTATCAACCAGGGTCTATAGATAAACCTAGCGCCTGGGATCATCTTTGGACAACTCTTTCTGCCAAATCTAGGTCCAAAATCA  
 CTTCATTGATACCATTTATGTACAACTTGAGCAAGTTGTGATCAGTCTCCTCAAATTTGGTCTCTGTAAACGGATGACTCAACTTG  
 CACATTAACTTGAAGCTCAGTGCATTGAGTGAACCTTGATCAGGTTGTGCAGCTGGTCAGCAGCATAGGGAAACACGGCTTTTCCT  
 ACCAAATCAGGAATTTATCAAACCTTGCAACACTTGCCTATGCAGGTAGCAAGGGAAATGTCATACTTGAAGTCGGACAGTGA  
 TGTAGTCTTGAGAAATTCGAAGCCGTATTTTTATTATCAGTGAAGTCACTCAGGAGATCTCTACGCCGCACGCATCGTGGC  
 CGGCATCACCGGCCACAGGTGGGGTTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGG  
 CTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCAT  
 TCCTTGGCGCGCGGTGCTCAACGGCTCAACCTACTACTGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCCAGT  
 ATCTATGATTGGAAGTATGGGAATGGTATACCCGCATTTCTCAGTGTCTTGAGGTCTCCTATCAGATTATGCCAACTAAAGCA  
 ACCGGAGGAGGAGATTTTCATGGTAAATTTCTCTGACTTTTGGTTCATCAGTAGACTCGAAGTGTGAGACTATCTCGGTTATGACAG  
 CAGAAATGCTCTTCTTGGAGACAGTAAATGAAGTCCACCATAAAGAAATCCTTGTATCAGGAACAAACTTCTTGTTCGAAAC  
 TPTTTCGGTGCCTTGAACATATAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCGGGCAATGCTTACCTTCTGGACCTTCA  
 AGAGGTATGTAGGGTTTGTAGATACTGATGCCAACTTCAGTGAACAAGTGTCTATTTTCGTTCAAACCATTCGGAATCCAGAGAAA  
 TCAAAGTTGTTTGTCTACTATTGATCCAAAGCCAGTGGCGTCTTGAAACTGACAATAGTGTGCTCGTGTTTTGGAGTCACTTTGT  
 ATGAATAAATCTAGTCTTTGATCTAAATAATCTTGACGAGCCAAAGCGATAAATACCCAAATCTAAAATCTTTTAAACGGTTAA  
 AAGGACAAGTATGTCTGCCTGTATTAACCCCAAATCAGCTCGTAGTCTGATCCTCATCAACTTGAGGGGCACTATCTTGTTTTA  
 QAGAAATTTGGCGAGATGCGATATCGAGAAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCAAGATCTCTGCCTCGCGGT  
 TTCGGTGTAGCGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGAC  
 AAGCCCGTCAAGGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCCAGTAGCGATAGCGGAGTATATAC  
 TGGCTTAACATATCGCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAAGGAGAA  
 AATACCGCATCAGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTGCTTGGCTCGCGGAGCGGTATCAGCTCA  
 CTCAAAGGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGG  
 AACCGTAAAGAGCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGA  
 GGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTTGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC  
 GCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG  
 TAGGTCGTTGCTTCAAGCTGGGCTGTGTGCAAGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTCGCCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTG  
 AGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC  
 TACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC  
 TTCGGAAAAAGAGTTGGTGTGCTTGTATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTA  
 CGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGG  
 GATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTGTAAATCAATCTAAAGTATA  
 TATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAAGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTAFTTTCGTTTCAATCCATAG  
 TTGCTCAGTCCCGTGTGTAGATAACTACGATAACGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTCTGCAATGATAACCGGAGACCC  
 ACGCTACCCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGCGGAGCGCAGAAAGTGGTCTTCCAATTTATCCGCC  
 TCCATCCAGTCTATTAATGTTGCGGGAAGCTAGAGTAAAGTGTGCGCCAGTAAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATGCTGTG  
 CAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGCCGAGTTACATGATCCCC  
 CATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTT  
 ATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCT  
 GAGAATAGTGTATGCGCGCAGCCAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGT  
 GCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTCAGTGTAAACCCACTCGT  
 GCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAAACGGAAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGG  
 GAATAAGGGGACACGGAATGTTGAATACTCACTCTTCTTTTTCAATATTAATGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCAT  
 GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC  
 TAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTTCAAGAAATTAATTCATGT  
 TTGACAGCTTATCATCGATAAGCTGACTCATGTTGGTATTTGAAAATAGACCGCAGATCGGGAACACTGAAAAATAACAGTTATTA  
 TTCCG

Mayúsculas negritas: Fragmento liberado mediante el corte con las enzimas  
 de restricción *Sac I* y *Not I*.

## pPIC9K

· AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTGGCCATCCGACATCCACAGGTCATTCTCACACATAAGTGCCAA  
 ACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGGCA  
 TCGAAAAACAGCCAGTTATTTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCAATTCCTTCTATFAGGCTACTAACACCATGACTTTAT  
 TAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTATGTTTATTTCCGAATGCAACAAAGCTCCGCATTACCCCGAACATCA  
 CTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCCAAACACTGACAGTTTAAACGCTGTCTT  
 GGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACCTAAGTTGGTTGCTTGAATGCTAACCGCCAGTTGGTCAAAA  
 GAAACTTCCAAAAGTCGCCATACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCCG  
 AGTCTCTCTATCGTCTGTAACCCCGTCCACTGTCCGAAACGCAATGGGAAACACCCCGCTTTTGGATTGATATGCAATG  
 TCTCCACATTTGTATGCTTCCAAAGATTTCTGTTGGAAATCTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCC  
 CTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAAGGAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCTATA  
 TTGGACTGGTTCCAAATTGACAAAGCTTTTGAATTTAACGACTTTTAAACGCAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCG  
 AAGGATCCAAACGATGAGATTTCCTTCAAATTTTACTGCAATTTTATTGCGACATCCTCCGCATFAGCTGCTCCAGTCAACACT  
 ACAACAGAAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCTCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTT  
 TGCCATTTTCCAAACAGCAAAATAACGGGTTATTGTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAAGAAAGGGGTATC  
 TCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCCTTAGGGCGGCCGGAATTAATTGCGCTTAGACATGACTGTTCCCTCAG  
 TTCAGTTGGGCATTTACGAGAAGACCGGTTCTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCGCTGAGAGATGCAG  
 GCTTCATTTTGTACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTCTTTCTCGTACGAGCTTGCT  
 CCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTGGGAAAATCATTGAGTTTGTATGTTTTTCTTGGTATT  
 TCCCCTCCTCTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGAAGTTCGTTTGTGCAAGCTTATCGATAAGCTTAAATGCGGTAGTTTATC  
 ACAGTTAAATGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAAACAATGCGCTCATCGTATCCTCGGCACCGTCAACCTGGAT  
 GCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCGGTAAGTGCAGGCTCTTGGGGATATCGTCCATCCGACAGCATCCCGAGTCACATG  
 CGCTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCGGTTCTCGGAGCACTGTCGACCGCTTTGGCCGCGCC  
 AGTCTGCTCGCTCGCTTGGAGCCTATGCACTGAGCTAGCTGAGGACACACCCGCTCTGTTGATCTATCGAATCTAA  
 ATGTAAGTTAAATCTCTAAATAAATAAATAAGTCCAGTTTCTCCATACGAACCTTAAACAGCATCCCGGTGAGCATCTAGACT  
 TCAACAGCAGCCAGATCCATCCTGCTTGGCCAAATGTTTTCAGTCCCTCAGGAGTTACGCTTGTGAAAGTATGAACCTCTGGA  
 AGGTTGCAGTGTAACTCCGCTGATTGACGGGCATATCCGTACGTTGGCAAAGTGTGTTGGTACCAGGAGTAATCTCCACA  
 ACTCTCTGGAGAGTAGGCACCAACAAACACAGATCCAGCGTGTGTACTTGATCAACATAAGAAGAAGCATTCTCGATTGTCAGG  
 ATCAAGTGTTCAGGAGCGTACTGATTGGACATTTCCAAAGCCTGCTCGTAGGTTGCAACCGATAGGGTGTAGAGTGTGCAATAC  
 ACTTGGTACAATTTCAACCTTGGCAACTGCACAGCTTGGTTGTAACAGCATCTTCAATTTCTGGCAAGCTCCTTGTCTGTCTAT  
 ATCGACAGCCAACAGAAATCACC TGGGAATCAATACCATGTTTCAGCTTGGAGACAGAAGGCTGAGGCAACGAAATCTGGATCAGCG  
 TATTTATCAGCAATAACTAGAACTTCAGAAGGCCAGCAGGCATGCAATACTACACAGGGCTGATGTGTCATTTTGAACCATCA  
 TCTTGGCAGEAGTAACGAACCTGTTTCC TGGACCAAAATTTTGTACACTTAGGAACAGTTTCTGTTCCGTAAGCCATAGCAGC  
 TACTGCCCTGGGCGCTCCTGCTAGCAGATACACTTAGCACCAACCTTGTGGGCAACGTAGATGACTTCTGGGGTAAGGGTACCA  
 TCCTTCTTAGGTGGAGATGCAAAAAAATTTCTTTGCAACCAGCAACTTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGAAGGCA  
 GAATTGCGGTTCCACCAGGAATATAGAGGCCAATTTCTCAATAGGCTTTGCAAAAACGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTC  
 AACTTGCAACGCTCCTCGTTAGTTGAGCTTCATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTTAAAGTTATCT  
 GGCAATTGCATAAGTTCTCTGGGAAAGGAGCTTCTAACACAGGTGCTTCAAAGCGACTCCATCAAACCTTGGCAGTTAGTTCTA  
 AAAGGGCTTTGTACCATTTTGACGAACATTTGTCGACAAATGGTTTACTAATCCATAATCTGTTCCGTTTCTGGAATAGGACG  
 ACGAAGGGCATCTTCAATTTCTTGTGAGGAGGCTTAGAAACGTCAAATTTGACAAATCAATACGACTTCAGAAGGGACTCT  
 TTAGGTTTGGATTCTTTTAGTTGTTCTTGGTGTATCTGGCTTGGCATCTCCTTTCTTCTAGTGACCTTTAGGGACTTCA  
 TATCCAGGTTTCTCTCCACCTCTGTCACAGCTACTTGGCACATCTAACTAATGCAAAAATAAATAAGTACAGCACATTC  
 CCAGGCTATATCTTCTTGGATTGACTTCTGCAAGTTTCATCAGCTTCTCCTCAATTTTAGCGTTCAACAAAACCTTCTGCTGTC  
 AATAACCGTTTGGTATAAGAACCTTCTGGAGCATTGCTCTTACGATCCACAAGGTGGCTTCCATGGCTCTAAGACCCCTTGTATT  
 GGCCAAAACAGGAAGTGCCTTCCAAAGTACAGAAACCAACCTGTTTGTTCACCAACAAATTTCAAGCAGTCTCCATCACAAATC  
 CAATTCGATACCCAGCAACTTTTGAAGTTGCTCCAGATGTAGCACCTTTATACCACAACCGTGACGACGAGATTTGGTAGACTCCA  
 GTTTGTGTCCTTATAGCCTCCGGAATAGACTTTTGGACGAGTACACCAGGCCAACGAGTAATTAGAAGAGTCAGCCACCAAAG  
 TAGTGAATAGACCATCGGGGCGGTCAGTAGTCAAAGACGCCAACAAAATTTCACTGACAGGGAACTTTTTGTACATCTTCAGAAAG  
 TTCGTATTCAGTAGTCAATTTGCCGAGCATCAATAATGGGGATTATACAGAAAGCAACAGTGAAGTACATCTACCAACTTTGCG  
 GTCTCAGAAAAAGCATAAACAGTTCTACTACCGCCATTAGTGAACCTTTCAAATCGCCAGTGGAGAAGAAAAAGGCACAGCGA  
 TACTAGCATTAGCGGGCAAGGATGCAACTTTATCAACCAGGGTCTATAGATAACCTTAGCGCTGGGATCATCTTTGGACAAC  
 TCTTTCTGCCAAATCTAGGTCCAAAATCACTTCTATTGATACCATATTGTTACAACCTTGAGCAAGTTGTCGATCAGCTCCTCAAAT  
 TGGTCTCTGTAAACGATGACTCAACTTGCACATTAACCTGAAAGCTCAGTCGATTGAGTGAACCTGATCAGGTTGTGACGCTGGT  
 CAGCAGCATAGGAAAACCGCTTTTCTTACCAACTCAAGGAATATCAAACCTGCAACACTTGGCTATGCAAGGTAGCAAGGG  
 AAATCTCATCTGAAGCTGGACAGTGAAGTGTAGCTTGAAGAAATCTGAAGCCGATTTTTTATTATCAGTGAGTCACTCAG  
 GAGATCTCTACCGCGACGCATCGTGGCCGACTGCAAGGGGGGGGGGGCTGAGGTTCTGCTGTTGAAGAAGGTTGCTG  
 ACTCATACCAGGCCGAATCGCCCCATCAACAGCCAGAAAGTGAAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCA  
 GTTGGTGAATTTGAACTTTTGTCTTGGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTCGGGAAAGATGCGTGTATGATCCTTCAAACCTCAGCAAAA  
 GTTCCGATTTATCAACAAAGCCGCTCCCGTCAAGTCAAGCTAAGTCTGCCAGTGTACAACCAATTAACCAATTTCTGATTA  
 GAAAACTCATCGAGCATCAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTAATCAATACCATTTTTTGAAGAAAGCCGTTCTGT  
 AATGAAGGAGAAAACCTCACCGAGGCAGTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTTCTGGATCCGACTCGTCCAAATCAA  
 TACAACCTATTAATTTCCCTCTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCAACATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAAGATGG  
 CAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAAAAATCACTCGCATCAACCAAACCG

TTATTCATTCTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACC  
 GGCCGAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGGAATCAGGATATCTTCTAATACCTGGAAATGCTGTTTTCCCGGG  
 GATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTGATGGTGGGAGAGGCATAAATTCGGTCAGCCAG  
 TTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCC  
 CATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGA  
 ATTTAATCGCGGCCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGT  
 TTTATTGTTCAATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTTGGCTTTCCCGCCCGCC  
 TGCAGGTCGGCATCACCGGCCACAGGTGGGTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCA  
 CTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGCTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCAAT  
 GCACCATTCCTTGGCGCGCGGTGCTCAACGGCCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCCGATAAGGGAGAGC  
 GTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGGAATGGTGATAACCCGCATCTTTCAGTGTCTTGAGGTCTCCTATCAGATTATGCCAAC  
 TAAAGCAACCGGAGGAGGAGATTTCATGGTAAATTTCTCTGACTTTTGGTCATCAGTAGACTCGAACTGTGAGACTATCTCGGTT  
 ATGACAGCAGAAATGTCCTTCTTGGAGACAGTAAATGAAGTCCCACCAATAAAGAAATCCTTGTTATCAGGAAACAACTCTTGT  
 TTCGAACTTTTTCGGTGCCCTTGAACATAAAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCGGGCAAAATGCTTACCTTCTGG  
 ACCTTCAAGAGGTATGTAGGGTTGTAGATACTGATGCCAATTCAGTGACAACGTTGCTATTTCGTTCAAACCATTCGGAATCC  
 AGAGAAATCAAAGTTGTTGTCTACTATTGATCCAAGCCAGTGGGCTTGAACATGACAATAGTGTGCTCGTGTTTTGAGGTCA  
 TCTTTGTATGAAATAAATCTAGTCTTTGATCTAAAATAATCTTGACGAGCCAGGGCGATAAATACCCAAATCTAAAACCTTTTTAAA  
 ACGTTAAAAGGACAAGTATGCTGCTGCTATTAACCCCAAAATCAGCTCGTAGTCTGATCCCTCATCAACTTGAGGGGCACTATCT  
 TGTTTAGAGAAATTTGCCGAGATGCGATATCGAGAAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCAAGATCTCTGCCT  
 CGCGCGTTTCGGTGATGACCGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGG  
 AGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCAGTCAAGTAGCGGATAGCGGAG  
 TGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATAAGCGGTGAAAATACCGCACAGATGCGTA  
 AGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGGCTCGGTCGTTCCGGCAGCGGATGCGGAT  
 CAGCTCACTCAAAGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACCGGAAAGAATGAGCAAAAAGCCGCAAAA  
 GGCAAGAACCGTAAAAGGGCGCGTGTGCTGCGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCA  
 AGTCAGAGGTGCGAAAACCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTTCCCGTGAAGCTCCCTGTCGCGCTCTCCTGTTCGGA  
 CCCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGATATCTCAG  
 TTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGGTTCCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTAT  
 CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG  
 GCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC  
 AGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTCAAGCAG  
 CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCAC  
 GTTAAGGGATTTTGGTCTAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTA  
 AAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTCA  
 TCCATAGTTGCCGTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGC  
 GAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTCAACTTT  
 ATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGCGGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCC  
 ATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACCGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT  
 GATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCTTCCGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACT  
 CATGGTTATGGCAGCAGTGCATAATCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAG  
 TCATCTGAGAAATAGTGTATGCGGGCAGCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT  
 TAAAAGTGTCTATCATTGGAAAACGTTCTTCCGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACC  
 CACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCA  
 AAAAAGGGAATAAGGGCGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATAATTATGAAGCATTTATCAGGGTTATT  
 GTCATAGACGGGATACATAATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTCCCGGCACATTTCCCGAAAAGTGCACC  
 TGACGCTAAGAAACCATTTATATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGGGTATCAGAGGCCCTTTCTGCTTCAAGAAATTAATT  
 CTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTGACTCATGTTGGTATTGTGAAATAGACGCAGATCGGGAACACTGAAAAATAACA  
 GTTATTATTCC

Mayúsculas negritas: Fragmento liberado mediante el corte con las enzimas  
 de restricción *Sac I* y *Not I*.



pPIC9KhGH22K

AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAA  
ACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGCCA  
TCGAAAAACCAGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCCTCTATTAGGCTACTAACACCCATGACTTTAT  
TAGCCTGTCTATCTCGCCCCCTGGCGAGGTTCAATGTTGTTTATTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCA  
CTCCAGATGAGGGCTTCTGAGTGTGGGGTCAAAATAGTTTTCATGTTCCCAAATGGCCCAAACATGACAGTTTAAACGCTGTCTT  
GGAACCTAATATGACAAAAGCGTGCATCTCAAGATGAATTAAGTTTGGTTGCGTTGAAATGCTAACCGGCCAGTTGGTCAAAA  
GAACTTCCAAAAGTCGCCATACCGTTTGTCTTGTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAAATAATCTCATTAATGCTTAGCGC  
AGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGTGCACCTGTGCGGAAACGCAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTG  
TCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAAATTAACCTGTTCTAACCC  
CTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAAGGAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAA  
TTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGACAACCTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCG  
AAGGATCCAACCGATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCAGTTTTATTGCGAGCATCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACT  
ACAACAGAAGATGAAACGGCACAAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTT  
TGCCATTTTCCAACAGCACAAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATC  
TCTCGAGAAAAGATTCCCAACCATTCCTTATCTAGACTTTTGAACAACCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGACACCAGCTGGCC  
TTTGACACCTACCAAGGATTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCTCGAGAACCCCAAGACCTCCCTCT  
GTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCCTCAACAGGGAGGAAACAACAAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCT  
GCTCATCCAGTCTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCTCAGGAGTGTCTTCGCAACAGCCTGGTGTACGGCCCTCTGACAGCAAC  
GTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGACTGGGCAGA  
TCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAACCTCACACAACGATGACGCCTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTT  
CAGGAAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTCCGCATCGTGCAGTGGCCCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCTGCC  
GTAGAATCCCTAGGGCCCGCGAAATTAATCCGCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAGTTGGGCTTACGAGTACGGAAGACCG  
GTCCTGCTAGATCTAATAGAGGATGTCAGAAAGCCATTTGCCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGACTTTTTTATTGTTG  
AACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTCAATTTGTTTCTCTCGTACGAGCTTGCTCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGA  
ATATCTTGTGGTAGGGGTTTTGGGAAAATCATTGAGTTTGAATTTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGAT  
TAAGTGAGAAGTTCGTTTGTGCAAGCTTATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCAAGTTAAATGCTAACCGAGTCAAGCA  
CCGTGTATGAAATCAACAATGCGCTCATCGTCACTCCGACCCGTCACCCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCCG  
TACTGCCGGGCTCTTGGGGATATCGTCCATTCGACAGCAATCGCCAGTCACTATGGCGTCTGCTAGCCGCTATATGCCGTTGAT  
GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCGACCCGCTTTGGCCGCGCCAGTCTGCTGCTTCCGCTACTTGGAGCC  
ACTATCGACTACGGATCATGGGACCACACCCGCTCTGTGGATCTATCGAATCTAAATGTAAGTTAAAACTCTAAAATAATTAA  
ATAAGTCCAGTTTCTCCATACGAACCTTAAACAGCATTGCGGTGAGCATCTAGACCTTCAACAGCAGCCAGATCCATCACTGCTT  
GGCCAATATGTTTCAAGTCCCTCAGGAGTTACGCTCTGTGAAATGATGAACTTCTGGAAGGTTGCAAGTTAACTCCGCTGTATTG  
ACGGGCATATCCGTACGTTGGCAAAGTGTGGTTGGTACCGGAGGAGTAATCTCCAAACTCTCTGGAGAGTAGGCACCAACAAAC  
ACAGATCCAGCGTGTGTACTTTGATCAACATAAGAAGAAGCATCTCTGATTTGCAGGATCAAGTGTTCAGGAGCGTACTGATTGG  
ACATTTCCAAAGCCTGCTCGTAGGTGCAACCGATAGGGTTGTAGAGTGTGCAATACACTTGGCTACAAATTTCAACCCCTTGGCAA  
CTGCACAGCTTGGTTGTGAACAGCATCTTCAATTTGGAAGCTCCTTGTCTGTATATCGACAGCCAACAGAATCACCTGGGAA  
TCAATACCATGTTTACGTTGAGACAGAAGGCTGAGGCAACGAAATCTGGATCAGCGTATTATCAGCAATAACTAGAACTTCAG  
AAGGCCAGCAGGCATGTCAAATACTACACAGGCTGATGTGTCATTTTGAACATCATCTTGGCAGCAGTAAACGAATGCTTTCC  
TGGACAAATATTTTGTACACTTAGGAACAGTTTCTGTTCCGTAAGGCAATAGCAGCTACTGCTGGGCGCTCCTGCTTAGCAG  
ATACACTTAGCACCAACCTTGTGGGCAACGTAGATGACTTCTGGGGTAAAGGTTACCATCCTTCTTAGGTGAGATGCAAAAACAA  
TTTTCTTGAACCAAGCACTTGGCAGGAACACCCAGCATCAGGGAAGTGAAGGCAGAATTCGCGTTCCACAGGAATATAGAG  
GCCAACTTTCTCAATAGGCTTGCAAAACGAGAGCAGACTACACCAGGGCAAGTCTCAACTTGCACAGCTCCTCGTTAGTTGAGCT  
TCATGGAATTTCTGACGTTATCTATAGAGAGATCAATGGCTCTCTTAAACGTTATCTGGCAATTCGATAAGTTTCTCTGGGAAAG  
GAGCTTCAACACAGGTGCTTCAAAGCGACTCCATCAAACCTGGCAGTTAGTTCTAAAAGGGCTTTGTCCACATTTTGAAGAAC  
ATTTGTGACAAATGGTTTGTACTAATTCATAATCTGTTCCGTTTTCTGGATAGGACGACGAAGGGCATCTTCAATTTCTTGTGAG  
GAGGCTTAGAAACGTCAATTTGACAAATTCATACGACCTTCAAGAAGGACTTCTTAGGTTTGGATTCTTCTTTAGGTTGTT  
CCTTGGTGTATCCTGGCTTGGCATCTCTTCTTCTTAGTGACCTTTAGGGACTTCATATCCAGGTTTCTCTCCACCTCGTCCAA  
CGTACACCGTACTTGGCAGATCTAACTAATGCAAAAATAAATAAGTACGACATTTCCAGGCTATATCTTCCCTTGGATTAGCT  
TCTGCAAGTTTCATCAGCTTCTCCCTAATTTTAGCGTTCAACAAAACCTCGTCTCAAATAACCGTTTGGTATAAGAACCCTCTG  
GAGCATGCTCTTACGATCCCAAGGTGGCTTCCATGGCTTAAGACCCCTTGTATTGGCCAAAACAGGAAGTGGTTCCAAGTG  
ACAGAAACCAACACCTGTTTGTTCACCCACAAATTTCAAGCAGTCTCCATCACAATCCAATTCGATACCCAGCAACTTTTGTAGTT  
GCTCCAGATGTAGCACCTTTATACCACAAAACCGTGACGACGAGATTGGTAGACTCCAGTTTGTGTCCTTATAGCCTCCGGAAATAG  
ACTTTTTGGACGAGTACACACAGGCCAACAGTAATTAGAAGAGTACGCCACCAAGTAGTGAATAGACCATCGGGCGGCTCAGT  
AGTCAAAAGCGCCAAACAAATTTCACTGACAGGAACTTTTGACATCTTCAGAAAGTTGTTATTCAGTATGCAATTCGGGAGCA  
TCAATAATGGGGATTATACAGAAGAACAGTGGAACTCACATCTACCAACTTTGGCGTCTCAGAAAAGCAATAAACAGTTCTAC  
TACCGCCATTAGTGAACCTTTTCAAATCGCCAGTGGAGAGAAGAAAAGCACAGCGATACTAGCATTAGCGGGCAAGGATGCAAC  
TTTTATCAACCAGGGTCTATAGATAACCTAGCGCTGGGATCATCTTTGGACAACCTTTCTGCAAAATCTAGGTCCAAAATC  
ACTTCATTGATACCAATTATTTGACAACCTTGGCAAGTTGTGATCAGCTCTCAAATGGTCTCTGTAACGGATGACTCAACTT  
GCACATTAACCTGAAGCTCAGTGCATTGAGTGAACCTGATCAGGTTGTGACAGCTGGTACGACGATAGGGAAAACAGGCTTTTCC  
TACCAAAACCAAGGAATATCAAACCTGCAACACTTGGCTATGCAGGTAGCAAGGAAATGTCATACTTGAAGTCCGACAGTGA  
GTGTAGTCTTGAAGAAATCTGAAGCCGTAATTTTATTATCAGTGAAGTCACTCAGGAGATCTCTACGCCGACGCATCGTGG  
CCGACCTGCAGGGGGGGGGGGGGGGCTGAGGCTGCTCTGTAAGAAGGTTGTTGCTGACTCATACCAGGCTGAATCGCCCATC

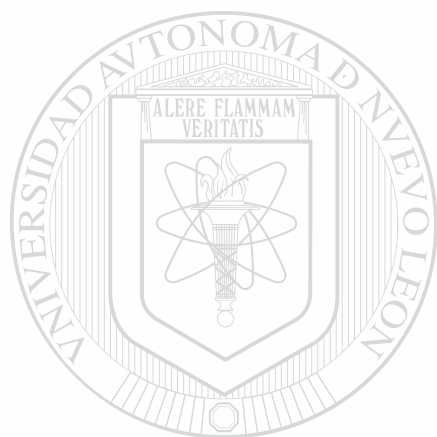
ATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTGTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAACTTTGGCTTTGCC  
 ACGGAACGGTCTGCGTTGTCGGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTCCGATTTATTCAACAAAGCCCGCTC  
 CCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTACAAACCAATTAACCAATTTCTGATTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAAAC  
 TGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGT  
 TCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCCATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAA  
 AATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACT  
 TGTTC AACAGGCCAGCCATFACGCTCGTCAAAAATCCTCGCATCAACCAACCGTTATTCAATTCGTGATTGGCCCTGAGCGGA  
 GAUGAAAATACCGGATCGTGTAAAAGGACAAATACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGGCAGGAACACTGCCAGGCATCAAC  
 AATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAAACATGCATCA  
 TCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTGTAGTGGTCGGAAGAGGCATAAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACAT  
 CATTTGGCAACCGTACCTTTTGGCATGTTTCAGAAAACACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCSATAGATTGTCCGACCTGA  
 TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAAATCAGCATCCATGTTGGAAATTAATCGCGGCCCTCGAGCAAGACGTT  
 TCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTTGTTTCATGATGATATATTTTTAT  
 CTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCTCCCCCTGCAGGTGGGCATCACCGGGCCACAGG  
 TGCGGTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGC  
 GTGGGTATGTTGGCAGGCCCGTGGCGGGGACTGTTGGGGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTTCGGCGGGCGGTGCTCA  
 ACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAAGGATCGCATAAAGGAGAGCGTCGAGTATCTATGATTGGAAGTATGGG  
 AATGGTGATACCCCGATTCTTCAGTGTCTTGAAGTCTCTATCAGATTAATGCCCAACTAAAGCAACCGGAGGAGGAGATTTTCATG  
 GTAAAATTTCTCTGACTTTTGGTTCATCAGTAGACTCGAACGTGAGACTATCTCGGTTATGACAGCAGAAAATGTCCTTCTTGGAGA  
 CAGTAAATGAAGTCCCACCAATAAAGAAATCCTTGTATCAGGAACAACTTCTTGTTCGAACTTTTTCGCTGCTTGAACATAT  
 AAAATGTAGAGTGGATATGTCGGGTAGGAATGGAGCGGGCAATGCTTACCTTCTGGACCTTCAAGAGGTATGTAGGTTTGTAG  
 ATACTGATGCCAACTTCAGTGACAACGTTGCTATTTCTGTTCAAAACATTCGAAATCCAGAGAAATCAAAGTTGTTTGTCTACTAT  
 TGATCCAAGCCAGTCCGGTCTTGAACCTGACAATAGTGTGCTCGTGTTTGAGGTTCATCTTTGATGAAATAAATCTAGTCTTTGA  
 TCTAAATAATCTTGACGAGCAAGGCATAAATACCCAAATCTAAAATCTTTAAAACGTTAAAAGGACAAGTATGCTGCTGCGA  
 TATTAACCCCAAATCAGCTCGTATGCTCATCACTCAACTTGAGGGCAGTCTTTGTTTGTAGAAAATTTGCGGATGTCGGA  
 TATCGAGAAAAGGTACGCTGATTTTAAACGTGAAATTTATCTCAAGATCTCTGCTCGCGGTTTCGGTATGACGGTGA AAAAC  
 CTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAG  
 CGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCA  
 GAGCAGATGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTT  
 CCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCTGGCTGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT  
 ATCCACAGAAATCAGGGGATAACCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCCGCTTG  
 CTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC  
 TATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCGGACCCCTCCCGTTACCGGATACCTGTCCGC  
 CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGTTCAAGCTG  
 GCTGTGTGCAGAACCCCGCTTACGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACG  
 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCITGAAGTGGTG  
 GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCCGAAAAAGAGTGGTAGC  
 TCTTGTATCCGGCAAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACCGCGAGAAAAAAGGATCTC  
 AAGAAGATCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGAATTTGGTCAAGAGATTATC  
 AAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGAC  
 AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTTTCGTTTCCATAGTTGCTGCTGCTCCCGCTGCTG  
 AGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTCAATGATACCGCGAGACCACGCTCACCGGCTCCAGATTT  
 ATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTG  
 TGCCGGAAAGCTAGAGTAAAGTAGTTCCGCAAGTAAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCT  
 CGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGT  
 TAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCT  
 CTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGAC  
 CGAGTTGCTCTTGGCCGGCTCAACACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATATTGAAAACGTTT  
 TTCGGGGCAAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCA  
 TCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT  
 GTTGAATACTCATACTCTCTCTTTTCAATATTTGAAGCATTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATG  
 TATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGGCCACATTTCCCGAAAAGTGCACCTGACGCTAAGAAAACCATTATTATCATG  
 ACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTTCTCAAGAAATTAATCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAA  
 GCTGACTCATGTTGGTATTTGTGAAATAGACGCAGATCGGGAACTGAAAAATAACAGTTATTATTCG

Mayúsculas negritas: Secuencia que codifica para HGH madura.

## APÉNDICE F

## SECUENCIA AMINOACÍDICA DE HGH MADURA

FPTIPLSRLFADNMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTP  
SNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQ  
TLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCR  
SVEGSCGF



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología  
Molecular e Ingeniería Genética



Tesis: CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE Y EVALUACIÓN DE ESQUEMAS DE PURIFICACIÓN.

Campo de estudio: Biotecnología

---

### Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 10 de Enero de 1969, hija de Juan Manuel Sánchez Carrillo y Margarita Domínguez Vallejo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico-Clínico-Biólogo en 1990 con mención honorífica, tercer lugar de la generación.

Experiencia Profesional: Asistente de investigación en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina desde 1992.

