



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“GENERACIÓN DE UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Pichia pastoris* SOBREPRODUCTORA DE HORMONA HIPERGLICÉMICA DE CRUSTÁCEO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JUAN ALFONSO LEDEZMA ESTRADA

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 18 DE NOVIEMBRE DE 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“GENERACIÓN DE UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Pichia pastoris* SOBREPRODUCTORA DE HORMONA

HIPERGLICÉMICA DE CRUSTÁCEO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JUAN ALFONSO LEDEZMA ESTRADA

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODALES

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ _____

DIRECTOR

M. EN C. BEATRIZ ALVAREZ MAYORGA _____

SINODAL

DR JUAN CAMPOS GUILLÉN _____

SINODAL

M. EN C. JUAN PABLO RÓBLES ÁLVAREZ _____

SINODAL

CONTENIDO	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Proteínas recombinantes	1
1.2. <i>Pichia pastoris</i>	1
1.3. Uso de software	4
1.4. Sistema de expresión con plásmidos pPICZ	4
1.4.1. Vectores pPICZ	5
1.4.3. Uso de <i>Escherichia coli</i>	6
1.5. Crustáceo <i>Litopenaeus vannamei</i>	6
1.6. CHH	7
1.7. Electroforesis por SDS-PAGE con Tricina	7
2. OBJETIVOS	8
2.1. General	8
2.2. Específicos	8
3. HIPÓTESIS	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Medios de cultivo	10
4.1.1. Medio LB	10
4.1.2. Medio LB bajo en sales con Zeocina:	10
4.1.3. Medio YPD	10
4.4. Restricción enzimática	11
4.5. Construcción del plásmido pPICZA::CHH	12
4.6. Proceso de clonaje de pPICZA con la secuencia de oLVCHH	12

4.7.	Transformación de células competentes con pPICZA:CHH	13
4.7.1.	PCR Colony	13
4.8.	Comprobación de inserción correcta	14
4.9.	Obtención de grandes cantidades del plásmido	15
4.9.1.	Maxiprep	15
4.10.	Linearización del plásmido e introducción en <i>Pichia</i>	16
4.11.	Electroporación	16
4.12.	Extracción de DNA genómico de <i>P. pastoris</i> transformada	17
4.13.	PCR genómico	19
4.14.	Cultivo comparativo de <i>P. pastoris</i>	19
4.15.	Extracción y cuantificación de proteínas	20
4.16.	Extracción de RNA	22
4.17.	Electroforesis en SDS-PAGE-Tricina	23
5.	RESULTADOS	25
5.1.	Transformación	25
5.2.	Miniprep	26
5.3.	Restricción enzimática	26
5.4.	Clonaje del plásmido pPICZA con la secuencia oLVCHH	27
5.5.	Transformación de XL-1 Blue con el plásmido ligado	27
5.6.	PCR Colony	28
5.7.	Comprobación de inserción correcta de pPICZA::oLVCHH	29
5.8.	Maxiprep	31
5.9.	Electroporación	31
5.10.	Extracción de DNA genómico	32
5.11.	PCR genómico	33
5.12.	Cultivo comparativo de <i>P. pastoris</i>	34
5.13.	Extracción de proteína	35
5.14.	Geles tricina	36
5.15.	Extracción de RNA	36
5.16.	Síntesis de cDNA	37

6. DISCUSIÓN	39
7. CONCLUSIÓN	41
8. REFERENCIAS	42

Índice de cuadros

Cuadro	Página
1. Reactivos y cantidades para la reacción de RT PCR	22
2. Cantidades molares para 100 ml de buffers (tomado de Schägger, 2006)	23
3. Indicaciones para preparar los geles (tomado de Schägger, 2006)	23
4. Proporciones de reactivos para la restricción enzimática	26
5. Cantidades de reactivos utilizadas para la restricción comprobatoria	30
6. Cálculos de las proteínas después purificación de proteínas	37
7. Resultado de cuantificación de RNA de las muestras de inducción	37

Índice de Figuras

Figura	Página
8. Diagrama del vector pPICZ (tomado de invitrogen, 2010)	6
9. Ciclos para PCR	14
10. Condiciones de reacción del PCR genómico	19
11. Transformación de XL-1 Blue con los pGOv4 en placas con kanamicina	25
12. Transformación de XL-1 Blue con los pGOv4 en placas con ampicilina	25
13. Restricción de pGOV4::oLVCHH.	27
14. Restricción del plásmido pPICZA, para la ligación con oLVCHH	27
15. Transformación de <i>E. coli</i> con la ligación de pPICZA::oLVCHH	28
16. Análisis <i>in silico</i> del fragmento que se generaría en el PCR Colony	29
17. Resultado de la reacción de PCR Colony	30
18. Restricción del plásmido integrado comparado con el análisis <i>in silico</i>	31
19. Restricción enzimática de pPICZA::oLVCHH con PmeI y SacI	32
20. Transformación de X-33 con el plásmido pPICZA::oLVCHH	33
21. Número de colonias transformadas por placa	34
22. Resultado del PCR genómico de la cepa 500-4 positiva a oLVCHH	34
23. Comparación de las fermentaciones	35
24. Peso final de pellets de comparación, en dos (blanco) y una fase (negro)	36
25. DO durante la fermentación con glicerol (A) y metanol (B)	36
26. Tinción de plata de los geles de tricina	38
27. Resultado del gel cargado con los resultados del PCR del cDNA	38

RESUMEN

La hormona hiperglicémica de crustáceo (CHH) tiene una función importante en el metabolismo y consumo de alimento de muchos crustáceos. Administrarla de manera continua junto con la dieta podría tener efectos benéficos en la producción acuícola. En particular, con el camarón *Litopenaeus vannamei*, que es la principal especie producida en México, lo cual podría traer beneficios económicos importantes. Para poder estudiar sus efectos a largo plazo, este trabajo tuvo como objetivo la generación de una cepa de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, productora de CHH recombinante. Entre otras características, este organismo tiene la cualidad de plegar adecuadamente las proteínas, lo cual incrementa las probabilidades de obtener CHH recombinante con bioactividad además de lograr altas concentraciones. En este trabajo se logró clonar el cDNA de la CHH del camarón *Litopenaeus vannamei* en una cepa de *Pichia pastoris*, pero la proteína no pudo ser verificada en su expresión.

1. ANTECEDENTES

1.1. Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes son aquellas que son el resultado de la expresión de DNA recombinante en una célula (Agilent Technologies, 2011). El desarrollo de la tecnología de DNA recombinante y el avance en la optimización de bioprocesos con organismos recombinantes generó una amplia gama de posibilidades para la producción de proteínas nativas e incluso con modificaciones (Guerrero-Olazarán y col., 2004).

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de uno de los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o de aquellos desarrollados con fines de investigación, o bien se pueden diseñar y construir sistemas de expresión según necesidades específicas. Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de DNA que poseen los elementos genéticos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo hospedero, además de recibir las moléculas de DNA recombinante (Guerrero-Olazarán y col., 2004).

Para la selección de un sistema de expresión adecuado para la síntesis de una proteína recombinante se tienen que tener en consideración el origen biológico y las propiedades químicas y biológicas de la proteína de interés, su aplicación posterior y el bioproceso que se empleará para su producción. Respecto a las propiedades químicas y biológicas de la proteína es importante analizar su secuencia nucleotídica codificante para evaluar el uso de codones preferenciales y la presencia de secuencias de finalización prematura de la transcripción, la secuencia aminoacídica para evaluar sus propiedades y la toxicidad sobre el hospedero, el destino celular (extra o intracelular) y el grado de pureza requerido. (Guerrero-Olazarán y col., 2004)

1.2. *Pichia pastoris*

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* es una de las herramientas más utilizadas para la producción a gran escala de proteínas recombinantes debido a las ventajas

que ofrece. El promotor derivado del gen de la alcohol oxidasa I (AOX1) de *P. pastoris* es ideal para la expresión de genes heterólogos por su alta transcripción. Comparte similitud con *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los sistemas mejor caracterizados, lo cual permite el uso de las mismas herramientas para ambos sistemas.

También *P. pastoris* tiene una predilección por la respiración aerobia, lo cual facilita el cultivo a altas densidades en comparación con las levaduras fermentativas (Balamurugan y col., 2007).

P. pastoris es un microorganismo unicelular fácil de manipular y cultivar. Además es eucariota, por lo que es capaz de realizar muchas de las modificaciones postraduccionales características de las proteínas eucariotas, como procesamiento proteolítico, plegado, formación de puentes disulfuro y glicosilación. Debido a esto, con este sistema se producen formas activas de proteínas aunque su secuencia no sea proveniente del organismo que la produce, a estas proteínas se les llama proteínas heterólogas.

El sistema de *P. pastoris* también reduce el tiempo de producción debido a su fuerte inducción con metanol (Valero, 2013), es relativamente sencillo y económico comparado con otros sistemas de expresión de eucariontes superiores como sistemas celulares en cultivo de insecto o de tejido de mamífero. Adicional a esto, usualmente se obtienen niveles de expresión mayores utilizando *P. pastoris* como sistema de producción (Cregg y col., 2000). Life Technologies ofrece un sistema eficiente de producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*, el cual está disponible de forma comercial (www.lifetechnologies.com).

Las especies de levadura metilotróficas (capaces de utilizar el metanol como fuente de carbón y energía) fueron descubiertas hace 40 años. Estas levaduras se desarrollaron para generar altos niveles de biomasa, principalmente para su uso como alimento en la producción de ciertos animales. En la década de los 80s se descubrió que el promotor AOX1 de estas especies de levadura podía generar altos niveles de expresión de proteínas heterólogas (Courderc y Baratti, 1980).

La vía para metabolizar el metanol comienza con la oxidación hacia formaldehído por la enzima alcohol oxidasa (AOX), generando peróxido de hidrógeno. Esta

enzima tiene una baja afinidad por el oxígeno. Se creó que esto es lo que genera la síntesis de grandes cantidades de esta enzima. Existen dos promotores para esta enzima, en particular, el número 1 (AOX1) es fácilmente inducible, y es esa la característica que le da el alto rendimiento al sistema de producción de proteínas heterólogas (Cregg y col. 1988). Bajo condiciones adecuadas, es posible obtener niveles de expresión de la secuencia de interés de hasta el 5% de la expresión total del RNA (Cregg y col., 2000).

La expresión del gen AOX1 está controlada al nivel de la transcripción, esencialmente por una represión de la transcripción de la enzima alcohol oxidasa, similar al mecanismo de GAL1 en *Saccharomyces cerevisiae* (Tschopp y col. 1987). El mecanismo de represión es. El metanol es necesario para la expresión del gen; mientras que la presencia de otro sustrato como la glucosa reprime la transcripción, incluso cuando existe metanol en el medio. Mientras una fuente de carbono como la glucosa esté presente en el medio, *P. pastoris* no inducirá a AOX1 por la menor energía requerida para metabolizar la glucosa. Es por esto que el crecimiento en glicerol está recomendado para la inducción óptima por metanol, ya que el glicerol no es buena fuente de carbono (Tschopp y col. 1987).

En cepas recombinantes de *Pichia*, la mayoría tienen una mutación en HIS4 (gen de la histidinol deshidrogenasa), que las vuelve mutantes auxótrofas. Esto favorece la selección de los vectores que restauran la auxotrofia, pues contienen el gen HIS4 (Cregg y col., 2000). Sin embargo, también se usan antibióticos para seleccionar las clonas positivas. Pueden utilizarse antibióticos clásicos como la ampicilina. El problema con estos antibióticos es que no son efectivos contra organismos contaminantes o cepas que no tienen la resistencia al antibiótico. Esto se debe a que solo tienen una capacidad bacteriostática, no provoca muerte celular sino que sólo evita el crecimiento de las células. En el caso del kit EasySelect, el antibiótico proporcionado es la Zeocina, la cual es un factor eficiente de selección y tiene un mecanismo de resistencia específico. Este mecanismo fue obtenido del gen *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt, y col. 1990).

Anteriormente distintos autores han reportado la producción positiva de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. Cregg y Cereghino reportan hasta el año 2000

más de 300 proteínas recombinantes de producción exitosa, desde proteínas de bacterias y hongos hasta proteínas humanas y virales (Cregg y col, 2000). En el caso de proteínas recombinantes de crustáceos, se han reportado varios trabajos con producción exitosa de proteínas biológicamente activas en *Pichia*. Treerattrakool y col reportaron en 2003 la expresión exitosa de la hormona hiperglicémica (CHH) de *Penaeus monodon*. El rendimiento final de dicha proteína al ser secretada fue de 260 ug/L y tanto la proteína cruda como purificada mostraba efectos de aumento en el nivel de glucosa en la hemolinfa de este camarón al ser inyectada.

1.3. Uso de software

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron distintos software de análisis de DNA. El primero que se utilizó para el pedido de la secuencia sintetizada de la hormona hiperglicémica fue el “Codon Optimization” de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) con el que se obtuvo la secuencia de la hormona para que pudiera ser expresada en *P. pastoris*.

Para el análisis y evaluación de restricciones enzimáticas y modificaciones en vectores de expresión y la secuencia de la hormona se utilizó el software Benchling de Benchling Inc. (San Francisco, CA). Este software muestra las secuencias de los plásmidos con todas las secuencias codificantes y se puede utilizar para hacer digestiones enzimáticas virtuales, lo que facilita la visualización de los resultados al saber qué debería verse si un experimento es exitoso. Se pueden visualizar los sitios de inserción de primers en una secuencia y así facilitar la planeación de un PCR.

1.4. Sistema de expresión con plásmidos pPICZ

Estos plásmidos de Life Technologies son ampliamente utilizados para la transformación simple y efectiva de *P. pastoris*. El sistema es denominado EasySelect™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El sistema ofrece la posibilidad de clonar la secuencia de interés en los plásmidos denominados pPICZ y pPICZ α , cuya particularidad es la expresión intracelular o extracelular, respectivamente; esto depende de las necesidades e intereses específicos de producción.

1.4.1. Vectores pPICZ

Como se puede observar en la figura 1, pPICZ es un vector de 3329 nucleótidos con el promotor AOX1 en la región 5' (bases 1-941), el epítotope *c-myc* en la región 3' del gen de interés (1012-1044), una cola de histidinas 6x (1057-1077) y la región de terminación de la transcripción del AOX1 (1078-1418). Además de las secuencias de resistencia a Zeocina (*sh ble*): promotor TEF1 (1419-1830), promotor EM7 (1831-1898), el gen de zeocina *Sh ble* (1899-2273) y la región de terminación de la transcripción CYC1 (2274-2591). También contiene un origen de replicación pUC origin (2602-3275 complementary strand), siendo pPICZ un vector para expresión intracelular, mientras que pPICZ α tiene el factor alfa (α -factor) de *Saccharomyces cerevisiae*. Este péptido señal es añadido en la N-terminal de la proteína recombinante y es una señal para la levadura de secreción al medio. Esto trae ventajas tanto en la purificación como en la conservación de la biomasa en el momento de la purificación (Invitrogen, Life Technologies Co. 2010).

1.4.2. Condiciones de crecimiento

La temperatura de crecimiento de *Pichia pastoris* es de 28 a 32°C para cultivos líquidos, placas y viales. El crecimiento por arriba de 32°C durante la inducción puede ser perjudicial para la expresión de la proteína y puede incluso provocar muerte celular. Otros datos importantes son que:

- El tiempo de duplicación en la fase log de Mut⁺ (cepa de uso de metanol a velocidad normal) o Mut^s (cepa de uso ralentizado del metanol) en YPD es de aproximadamente 2 horas.
- Mut⁺ y Mut^s no difieren en su velocidad de crecimiento a menos que sean puestas a crecer en presencia de metanol.
- El tiempo de duplicación en fase log de Mut⁺ en medio mínimo es de 4 a 6 horas.
- El tiempo de duplicación en fase log de Mut^s en medio mínimo es de 18 horas.
- Una OD₆₀₀= aprox. 5×10^7 células/mL

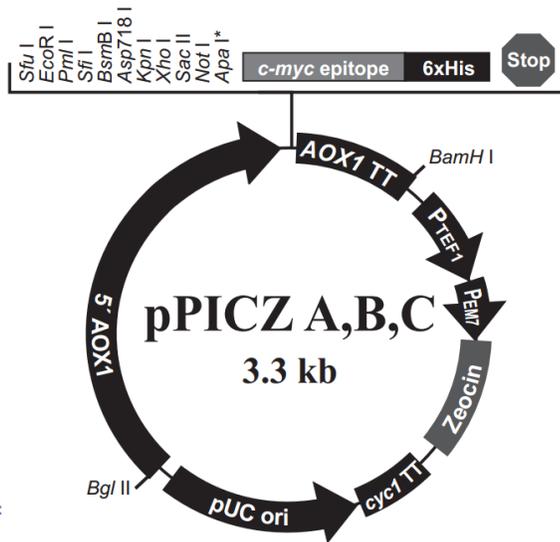


Figura 1. Diagrama del vector pPICZ (tomado de invitrogen, 2010).

1.4.3. Uso de *Escherichia coli*

- Cepa XL-1 Blue: cepa de células competentes a transformación que se utiliza normalmente para la diferenciación de azul-blanco con plásmidos recombinantes. Esta cepa es deficiente de *endA* y *recA*, genes de la endonucleasa A y de recombinación, lo que facilita el manejo para miniprep y maxiprep [Agilent Technologies, Santa Clara, CA. 2004]. Las células serán proporcionadas por la Unidad de Proteogenómica de la UNAM Campus Juriquilla.

1.5. Crustáceo *Litopenaeus vannamei*

Este crustáceo del subgrupo Malacostraca es una especie importante para el comercio. La producción de este camarón es la más importante del mundo, llegando a más de 3 millones de toneladas en 2005. El principal mercado del camarón lo constituyen los Estados Unidos de Norteamérica, de quien se esperaba que la importación fuese de aproximadamente 477 000 toneladas con un valor de 3,1 billones de USD en 2005. México es uno de los países con más producción de este crustáceo (FAO, 2014), por lo cual una mejora en su producción aportaría un cambio importante para dicho cultivo.

Esta especie es tan ampliamente utilizada porque puede tolerar un amplio intervalo de salinidad, pasando desde condiciones de agua dulce (0.5–2.0 g/L) hasta hipersalinas (60 g/L) (Valenzuela y col., 2010). Sin embargo, el cultivo comercial de este camarón ha sido acompañado por problemas en aumento de enfermedades, las cuales son causadas en su mayoría por patógenos oportunistas como virus, bacterias y hongos (Yuan y col. 2013).

1.6. CHH

Esta hormona se encuentra en los crustáceos y es pleiotrópica en el subgrupo Malacostraca, induce cambios en el metabolismo de los carbohidratos y lípido, regula otras funciones como la represión de la muda por los ecdisteroides y la inhibición del proceso reproductivo por metilfarnesoato (Morris y col. 2010)

Es un péptido de 72 aminoácidos el cual ya fue secuenciado (Wang y col., 2000) y tiene 100% de identidad con el péptido predicho por Lago-Lestón (Lago-Lestón y col, 2007) el cual fue obtenido a partir de cDNA. La secuencia es la siguiente:

LFDPSCTGVFDRQLLRRLRRVCDDCFNVFREPNVSTECRSNCYNNEVFRQCMEY
LLPPHLHEEHRLAVQMV.

1.7. Electroforesis por SDS-PAGE con Tricina

Debido al bajo peso molecular de la proteína esperada, se optó por un método de separación de proteínas más sensible que el SDS-PAGE-Glicina convencional, ya que con este método las proteínas de peso molecular menor a 30 kDa se pierden fácilmente o no logran distinguirse (Schägger, 2006). En el caso del protocolo con tricina, proteínas desde 2 a 100 kDa pueden ser fácilmente distinguidas al hacer un teñido de dichas proteínas.

El protocolo para este método implica soluciones similares al momento de preparar los geles. Las diferencias están en los buffers utilizados para la corrida del gel y la adición de urea en el gel de 16% de poliacrilamida para una mejor separación de proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Generar una cepa de *Pichia pastoris* productora de hormona hiperglicémica del camarón *Litopenaeus vannamei* (Lv-CHH).

2.2. Específicos

- Clonación de la secuencia de CHH en el plásmido pPICZA
- Selección de colonias de *Pichia pastoris* positivas al plásmido integrado de CHH
- Evaluación de la producción de CHH por medio de PCR punto final.

3. HIPÓTESIS

Es posible generar una cepa de *Pichia pastoris* productora de CHH recombinante de manera intracelular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Medios de cultivo

4.1.1. Medio LB

Se mezclaron 10 g de Triptona (Difco, BD, NJ), 10 g de NaCl (J.T. Baker, PA) y 5 g de extracto de levadura (Difco, BD, NJ). Se agregó agua desionizada hasta un volumen de 950 ml. Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 1 N. Se aforó el volumen a 1 l. Para la preparación del agar en placa se agregaron también 15 g de agar (Difco, BD, NJ) por litro de medio LB. Ambas mezclas se esterilizaron a 15 psi y 121°C por 15 minutos. Para el caso del agar, en cuanto la temperatura estuvo a 50°C se le agregaron los antibióticos y se colocaron aproximadamente 25 ml por placa de 100 mm. La ampicilina (Gibco, Life Technologies, CA) se colocó a una concentración de 100 µg/ml.

4.1.2. Medio LB bajo en sales con Zeocina:

Se preparó de la misma manera que el medio LB, solo que la cantidad de NaCl se reducía a la mitad, se colocaron solo 5 g de NaCl para conservar la actividad del antibiótico. A los 55°C se agregó la Zeocina (Invitrogen, CA). Todos los procedimientos en los que se usó la Zeocina se llevaron a cabo en oscuridad para evitar su degradación. Las placas o medio se protegieron contra la luz.

4.1.3. Medio YPD

Para preparar 1 litro, se disolvieron 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa en 900 ml de agua destilada. Para la preparación de agar en placas, se agregó 20 g de agar. Se ajustó el pH a 6.5 ± 0.2 y se aforó a 1 litro. A continuación se esterilizó a 121°C a 10 psi por 20 minutos.

4.2. Medios BMMY (Buffered Methanol Complex Medium) y BMGY (Buffered Glycerol Complex Medium)

Para la preparación de 1 litro se disolvieron 10g de extracto de levadura y 20 gramos de peptona en 700ml de agua destilada. Se esterilizó 20 minutos a 121°C. Una vez que estuvo a temperatura ambiente, se agregaron los aditivos: 100ml de

buffer de fosfato de potasio (J.T. Baker, PA) 1M pH6.0, 100ml de YNB (Yeast Nitrogen Base) (Sigma-Aldrich, SL) 10X (13.4%), 2ml de biotina 500X (Sigma-Aldrich, SL) (0.002 g/l) y 100ml de glicerol () 10X (10%) para el BMGY o 100ml de metanol (J.T. Baker, PA) 10X (5%) para el BMMY. Todos los aditivos fueron esterilizados por filtración (0.22 μ m). Los medios se almacenaron a 4°C.

4.3. Condiciones de crecimiento

Los cultivos de *Pichia pastoris* fueron incubados a 30°C. En el caso de cultivos con Zeocina en el medio, cualquier matraz, placa o tubo con el cultivo fue protegido con papel aluminio y cinta para evitar la degradación. Todo cultivo líquido fue incubado con agitación de 250 a 300 rpm.

4.3.1. Crecimiento con metanol

En el medio BMMY de inducción y crecimiento en presencia de metanol la concentración fue algo crucial. Dicha concentración debía mantenerse para evitar la muerte del cultivo. Esto se pudo lograr administrando cada 24 horas un volumen adecuado de una solución al 5% de metanol en agua estéril destilada a una concentración final en el cultivo de 0.5%. En los cultivos de inducción se sacó una muestra cada 24 horas, por lo que se complementaba el volumen extraído de la muestra con el volumen introducido de solución de metanol.

4.4. Restricción enzimática

Se llevaron a cabo distintas reacciones de restricción enzimática con los plásmidos que se trabajaron. Estas se llevaron a cabo con distintas enzimas, dependiendo de los fragmentos que se querían generar. La mayoría de las enzimas utilizadas tenían como temperatura de reacción 37°C. Dependiendo de la enzima se utilizaba un buffer distinto para ellas.

La reacción de restricción enzimática llevó un proceso común, el cual aseguró que el DNA manipulado se cortó evitando la actividad estrella de las enzimas (fenómeno que ocurre cuando las enzimas están demasiado tiempo en reacción y comienzan a cortar el DNA en sitios a los que no están definidas). El procedimiento para dichas reacciones fue el siguiente:

1. Se mezclaron las cantidades deseadas de agua estéril, Buffer de la enzima de restricción, plásmido a cortar y enzima de restricción (en ese orden).
2. La mezcla de reacción se sometió a 37°C durante 30 minutos a 1 hora en un termoblock para asegurar que la temperatura de reacción fuera constante.
3. Se aumentó después la temperatura a 65°C y se mantuvo por 20 minutos para desactivar la enzima o enzimas.
4. La muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente para poder manejarla.

4.5. Construcción del plásmido pPICZA::CHH

Este vector se modificó con la secuencia del péptido Lv CHH de *Litopenaeus vannamei*, la cual se introdujo dentro de la secuencia de pPICZA. Esto tomando en cuenta la preferencia de codones y secuencia con un software online de optimización de codones “Codon Optimization: Integrated DNA Technologies”.

Se hizo un análisis de los sitios de corte de enzimas de restricción de pPICZA para encontrar aquellos que fueran ideales para introducir la secuencia de CHH dentro del marco de lectura del vector sin cortar varios sitios a la vez.

Ya diseñada la secuencia final, se pidió un servicio de construcción personalizada para evitar el proceso de aislamiento de la secuencia directo del crustáceo y todos los ensayos moleculares y el tiempo que esto representa.

4.6. Proceso de clonaje de pPICZA con la secuencia de oLVCHH

La secuencia de oLVCHH se aisló del plásmido construido que se recibió. El servicio de síntesis genética informó que el plásmido en el que se recibió la secuencia de oLVCHH fue pGOV4, un plásmido sencillo que sólo tiene un origen de replicación para *E. coli* y dos genes de resistencia para kanamicina y ampicilina.

El aislamiento de la secuencia se llevó a cabo por medio de PCR, utilizando los primers 5' CHH Fwd (5' – ATGTCACTATTCGACCCTAGTTG-3') y 3' CHH Rev (5'- ACCATTTGGACAGCCAACCT-3'). una vez terminada la reacción de PCR, el producto se analizó por medio de una corrida en gel de agarosa 2% para poder después cortar el fragmento del gel con la banda que se replicó para luego ser limpiada con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Después de la purificación se llevó a cabo la ligación del fragmento CHH con el plásmido pPICZA.

4.7. Transformación de células competentes con pPICZA:CHH

Se transformaron células competentes de *E. coli*, de la cepa XL-1 Blue con el plásmido pPICZA::CHH por choque térmico (Froger y Hall, 2007), descongelando en hielo por 15 minutos las células. Ya descongeladas se les colocaron de 10-30 ng del plásmido. Después se incubaron 30 minutos en hielo, se les dio un choque térmico de 42°C por 45 segundos y se regresaron al hielo por 5 minutos. Después de este proceso cada alícuota se introdujo en 750 µl de medio SOC (Sigma) y se incubó con agitación vigorosa de 250 a 300 rpm de 30 a 90 min a 37°C. Se procedió a sembrar la preparación. Se sembraron 200 µl de la mezcla en una placa de medio LB bajo en sales con Zeocina y el resto se centrifugó 5 min a 3000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en los restos del sobrenadante para sembrar en placa. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C, en posición invertida y en oscuridad.

4.7.1. PCR Colony

Se verificó la presencia del plásmido en las colonias de *E. coli* colocando una muestra de la colonia en una reacción de PCR que contenía el PCR SuperMix (invitrogen) y una solución de los siguientes primers (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, USA):

- 5' CHH Fwd (5'-ATGTCACTATTCGACCCTAGTTG-3')
- 3' CHH Rev (5'-ACCATTTGGACAGCCAACCT-3')

4.7.1.1. Procedimiento

1) Contenido de la reacción:

PCR SuperMix	4.5 µl
Solución de primers	0.08 µl de cada primer
Colonia de <i>E. coli</i> a evaluar	0.4 µl aprox. (Colonia picada de placa)

2) Ciclar 30 veces utilizando los parámetros mostrados en la figura 2.

3) El total de reacción de PCR se corrió en un gel de agarosa, junto a un marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp plus ladder, Thermo Scientific).

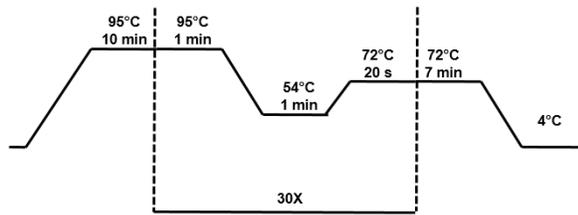


Figura 2. Ciclos para PCR.

4.7.1.2. Miniprep

- Se centrifugó el cultivo 5 min a 10000 g. Se descartó el sobrenadante.
- Se agregaron 250 µl de buffer P1 Buffer de resuspensión (este buffer debe estar en hielo, ya que contiene RNasa),
- Se mezclaron lentamente por inversión.
- Se adicionaron 250 µl de buffer P2 buffer de lisis
- Se mezclaron por inversión activamente hasta que la reacción tomó una apariencia viscosa (no excediendo de 5min).
- Se agregaron 350 µl de buffer N3 Buffer de neutralización, se invirtió 4-6 veces lentamente, hasta que la solución se tornara turbia.
- Se centrifugó por 10 min a 14000 g.
- El sobrenadante se agregó a la columna de purificación (integrada a un tubo colector) y se centrifugó por 30-60 segundos, se descartó el sobrenadante.
- Se adicionó a la columna 0.5 ml de buffer PB y se centrifugó de 30-60 segundo, se descartó el eluido. Se lavó la columna con 0.75 ml de buffer PE y se centrifugó 30-60 segundos. Descartando el eluido y centrifugando 1 min para retirar residuos del buffer.
- Se colocó la columna en un tubo colector nuevo para eluir el DNA adicionando 50 µl de agua desionizada, en el centro de la columna. Se dejó reposar por 1 min y luego fue centrifugada por 1 min.
- Se midió la concentración de DNA por medio de Nanodrop.

4.8. Comprobación de inserción correcta

Ya obtenido el plásmido, se procedió a realizar un mapeo por enzimas de restricción para verificar la inserción del gen. Se utilizaron EcoRI y BamHI.

Se verificó la correcta inserción de la secuencia mediante PCR con los oligos pAOX Fwd (5' TTGCGACTGGTTCCAATTGAC 3') y el TTR-Rev (5' ACCGGTCTTC TCGTAAGTGC 3'). Los cuales darían un producto de 449 bp y se podrían utilizar con los otros primers 5' CHH Fwd o 3' CHH Rev.

4.9. Obtención de grandes cantidades del plásmido

Cuando se corroboró que alguna o varias de las colonias llevaban el plásmido correctamente introducido, se llevó a cabo la multiplicación de este plásmido a partir del crecimiento de las células transformadas de *E. coli*. Se cultivaron 250 ml de medio LB bajo en sales con 25 µL/ml de Zeocina durante toda la noche a 37°C en agitación. De este cultivo se llevaron a cabo la concentración del plásmido por medio de un Maxiprep utilizando el kit de Quiagen.

4.9.1. Maxiprep

- 1) El cultivo se centrifugó de 7-8 min a 6000 rpm, se agregaron 10 ml de reactivo P1 frío (reactivo con RNasa), se mezcló por inversión lentamente.
- 2) Se agregaron 10 ml de P2, se deja 5 min a temperatura ambiente, se invirtieron de 5 a 6 veces y se añadió buffer P3, se dejó 20 min en hielo invirtiéndolos después.
- 3) Se centrifugó 40 min a 10000 rpm a 4°C. Se desechó el pellet y se recuperó el sobrenadante (repetiendo el proceso en caso de detritos flotando en el sobrenadante).
- 4) La columna de purificación se equilibró con 10 ml de buffer QBT
- 5) Una vez lista, se añadió el sobrenadante, se lavó 2 veces con 30 ml de reactivo QC, se cambió de tubo colector y se eluyó con 10 ml de QF.
- 6) Se añadieron 7 ml de isopropanol frío y se dejó incubar durante 4 h. Se centrifugó a 4°C 30 min a 14000 rpm.
- 7) Se lavó con etanol al 70% y se secó el pellet.
- 8) Se resuspendió en 250 µl del tampón adecuado, o agua, y se pasó a un tubo nuevo. Se midió su concentración y se guardó a -20°C.

4.10. Linearización del plásmido e introducción en *Pichia*

Cuando se obtuvo el plásmido purificado, se linearizó para la posterior transformación de la cepa productora de la proteína de interés, en este caso, la transformación de *Pichia pastoris* GS115. El plásmido se linearizó haciendo un corte dentro de la región del promotor AOX1 5'. Las enzimas de restricción utilizadas fueron Sac I y Pme I.

Para este proceso, se tomaron de 5-10 µg del plásmido, 1 U de la enzima por µg de ADN, se agregó el buffer de digestión adecuado y agua libre de nucleasas, completando un volumen de 20 µl. Se incubó 1 h a 37°C. La reacción se inactivó subiendo la temperatura a 65°C por 20 min. El DNA linealizado se purificó de la mezcla utilizando el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research).

4.11. Electroporación

En este proceso se utilizó un cultivo de *P. pastoris* que fue activado en 5 ml dos días antes e inoculado en 100 ml un día antes para poder tener un cultivo denso (de 1.3 a 1.6 de DO preferentemente). Este cultivo se preparó para someterlo a electroporación:

1. Se centrifugó el cultivo a 1500 g por 5 minutos a 4°C. Se resuspendió el cultivo en 500 ml de agua estéril enfriada en hielo.
2. Se centrifugaron las células como en paso anterior y se resuspendió en 250 ml de agua estéril enfriada en hielo.
3. Se centrifugó como en el paso 1 y se resuspendió el pellet en 20 ml de sorbitol 1M enfriado en hielo.
4. Se centrifugaron las células como en el paso 1.
5. Se resuspendió en 1 ml de sorbitol 1M frío para un volumen final de aproximadamente 3 ml. Se mantuvieron en hielo y se usaron el mismo día.
6. Se mezclaron 80 µl de células con 5-10 µg de DNA linearizado (disuelto en 10 µl de agua estéril) y se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm.
7. Se incubó la cubeta con las células en hielo por 5 minutos.
8. Se pulsaron las células en el el Bio-Rad Gene Pulser XCell (BioRad, CA)

utilizando las instrucciones del aparato de electroporación para *P. pastoris*.

- Capacitancia [C]=25 μ F
 - Resistencia [PC]=200 Ω
 - Voltaje [V]=2000 V
9. Inmediatamente después se añadió 1 ml de sorbitol 1M frío a la cubeta. Se transfirió el contenido de la cubeta a un tubo estéril de 15 ml y se incubó a 30°C sin agitación por 1.5 horas.
 10. Se inocularon 10, 25, 50, 100 y 200 μ l en cajas de medio YPD separadas, cada una con 100 μ g/ml de Zeocina. También se inocularon los pellets celulares en placas de 500 y 1000 μ g/ml de Zeocina.
 11. Se incubaron las placas por 2 días a 30°C hasta que se formaron colonias.
 12. Se eligieron 20 colonias y se purificó cada colonia en placas de medio fresco YPD con la misma concentración de Zeocina.

Se hizo una comparación de la eficiencia de electroporación según la enzima utilizada para linearizar el plásmido. Se linearizaron 15 μ g del plásmido con enzima Pme I y otros 15 μ g con Sac I. de estas cantidades sólo se recuperaron 10 μ g de la secuencia linearizada con Pme I y 5 μ g del linearizado con Sac I. Estos plásmidos linearizados se electroporaron en la cepa X-33 para poder tener un buen vigor en el crecimiento del cultivo.

4.12. Extracción de DNA genómico de *P. pastoris* transformada

Para la extracción de DNA se utilizó una versión modificada del protocolo de extracción genómica del kit de BioRad AquaPure Genomic DNA Isolation Kit, el cual se estableció como lo siguiente:

1. Se generó un cultivo de la cepa en 5 ml de medio YPD con Zeocina a 100 μ g/ml
2. Se centrifugó el cultivo a 2500 rpm y se resuspendió en 500 μ l de agua destilada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
3. Se centrifugó de 13000 a 16000 g por 30 s para decantar las células, removiendo después todo el sobrenadante posible.
4. Se resuspendió el pellet añadiendo 300 μ l de “Solución de Lisis de DNA”

- (proporcionada por el kit).
5. Se agregaron de 30 a 50 perlas de vidrio "Sigma Glass Beads 710-1180 microns" a la suspensión y se sometió a vortex por 2 minutos.
 6. El tubo se incubó a 80°C por 5 minutos. Se pasó el líquido a un tubo nuevo de 1.5 ml.
 7. Se añadieron 1.5 µl de solución de RNasa A [4 mg/ml] al lisado.
 8. Se mezcló la muestra por inversión 25 veces y se incubó a 37°C por 45 minutos.
 9. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente.
 10. Se añadieron 100 µl de "Solución de Precipitación de Proteínas" (proporcionada en el kit).
 11. Se sometió a agitación vigorosa en un Vortex por 20 segundos.
 12. Se centrifugó de 13 a 16000 g por 3 minutos. Apareciendo un pellet apretado.
 13. Se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml y se agregó 300 µl de isopropanol 100% y se mezcló por inversión 50 veces.
 14. Se centrifugó de 13 a 16000 g por 1 minuto.
 15. Se desechó el sobrenadante cuidando el pellet en el fondo y se secó el tubo en papel absorbente limpio. Añadir 300 µl de etanol 70% e invertir el tubo varias veces.
 16. Se centrifugó como en el paso 14. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el pellet.
 17. El tubo se dejó invertido en papel absorbente por 15 minutos para que pudiera secarse.
 18. Se añadieron de 50 a 100 µl de "Solución de Hidratación de DNA" (proporcionada en el kit).
 19. Se incubó la muestra a temperatura ambiente toda la noche.
 20. El día siguiente se sometió a agitación en Vortex por 5 segundos a velocidad media y se centrifugó brevemente para decantar el líquido.
 21. Se midió la concentración de DNA en el Nanodrop y se guardó la muestra a 4°C.

4.13. PCR genómico

Se realizó el PCR genómico con 4.5 µl de PCR SuperMix y 0.08 µl de cada primer para cada reacción. Después se agregaron 0.3 µl de solución de extracción de DNA genómico a la mezcla de cada tubo. Las condiciones de reacción fueron establecidas como lo indica la Figura 3.

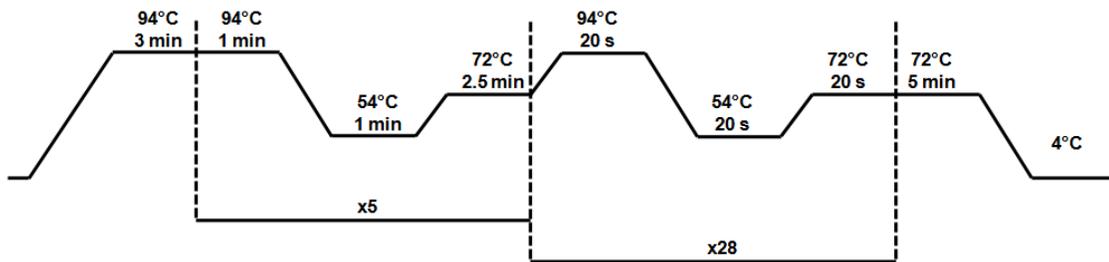


Figura 3. Condiciones de reacción del PCR genómico.

Al final del proceso cada reacción fue cargada en un gel de Agarosa 1% con 2 µl de bromuro de etidio.

4.14. Cultivo comparativo de *P. pastoris*

Se llevó a cabo una fermentación a pequeña escala en la que se comparó el ritmo de crecimiento de la cepa de *P. pastoris* transformada contra algunos negativos y las cepas nativas proporcionadas en el kit de EasySelect. Las cepas que se utilizaron fueron:

- Colonia positiva al pPICZA::oLVCHH (colonia 4 de la placa de 500 µg/ml de Zeocina)
- Control de expresión intracelular GS115/pPICZ/LacZ
- Control de expresión de proteína GS115 HIS4
- Control cepa nativa GS115
- Control positivo a pPICZA sin el inserto (colonia #2 de la placa de 100 µg/ml de Zeocina con 10 µl de células transformadas con la secuencia aislada con PmeI)

Estas cepas fueron inoculadas en medios condicionados BMGY y BMMY. Se pusieron 5 cultivos por duplicado con 15 ml de cada medio, teniendo 10 tubos

Falcon para la comparación. Cada grupo fue inoculado a partir de las mismas colonias por medio de picado de colonias, se dejó la punta de 1000 μ l dentro del tubo Falcon para generar la oxigenación necesaria para el buen crecimiento de la levadura. Todos los tubos se pusieron a fermentar a 30°C y 250 rpm, en posición horizontal para que el intercambio de oxígeno fuese mayor.

Después de la inoculación, cada mañana por 5 días se extrajeron alícuotas de 100 μ l para medir su densidad óptica con el Microplate Reader de BioRad a 595 nm. Además de esto se extrajeron 2 alícuotas de 700 μ l de cada cultivo, dichas alícuotas se centrifugaron, conservando el sobrenadante en el caso de la GS115 HIS4 y el pellet en caso de las otras 4 fermentaciones. Después de esto se remplazaba el volumen perdido con 1.5 ml de la fuente de carbono (glicerol o metanol 10X).

Los cultivos que iniciaron con BMGY fueron mantenidos en crecimiento con glicerol por 48 h, después de este periodo los cultivos se centrifugaron y lavaron con medio BMY (medio condicionado sin fuente de carbono). Se llenó después cada tubo con 15 ml de BMMY y se continuó la fermentación con las mismas extracciones.

4.15. Extracción y cuantificación de proteínas

Con las muestras que se estuvieron tomando periódicamente de las fermentaciones comparativas se llevó a cabo la extracción de proteína total del pellet. Primero se tomaron 4 de las muestras de diferentes días del medio en el que se cultivó GS115 HIS4 para poder observar los cambios en la expresión de la albúmina sérica bovina. Las 4 muestras se mezclaron con una sexta parte de su volumen de colorante de Laemli desnaturalizante, después estas muestras se calentaron a 95°C por 10 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% y 0.15mm de espesor.

Con las muestras de las que se conservó el pellet, se estandarizó un procedimiento de lisis celular para poder romper la levadura por medios mecánicos de la siguiente forma:

1. Toda muestra a tratar debía mantenerse en hielo el mayor tiempo posible.
2. Se agregaron de 300 μ l de buffer RIPA con inhibidor de proteasas en una

dilución 1:100 al pellet.

3. Se añadieron entre 30 y 50 perlas de vidrio "Sigma Glass Beads 710-1180 microns".
4. Se sometió el tubo a agitación en vortex por dos minutos en intervalos de 5 segundos, se puso el tubo en hielo inmediatamente después de terminar.
5. Se dejó 5 minutos en hielo y después se recuperó todo el líquido, asegurando que la punta de la micropipeta alcanzara el fondo del tubo. Se transfirió el líquido a un tubo nuevo de 1.5 ml.
6. Mientras los tubos estaban en el hielo, se enfrió una centrifuga refrigerada a 4°C.
7. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo de 0.6 ml.
8. Se llevó a cabo la cuantificación de proteína por el método de Bradford para igualar la cantidad de proteína a cargar en el gel de poliacrilamida:
 - a. En una placa de 96 pozos para el Microplate Reader de BioRad se cargó una curva de albúmina con concentraciones conocidas de 0, 31.5, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 3000, 4000 y 5000 ng por triplicado.
 - b. Se cargó 1ul de las muestras por pozo, esto se hizo por triplicado.
 - c. En todos los pozos se introdujeron 200 µl de reactivo de Bradford (BioRad Protein Assay Reagent Concentrate).
 - d. Se dejó incubando por 2 minutos y se leyó a 595 nm.
 - e. Se hizo la curva de albúmina y se estableció R^2 y Y de la ecuación para calcular las concentraciones necesarias de las muestras.
9. Se cargaron las muestras según el resultado y se corrió el gel a 120 V hasta que el frente de corrida alcanzara el nivel del buffer en la cámara. Se reveló el gel con reactivo de Coomassie o por tinción por plata (kit Silver Stain Plus, BioRad)

4.16. Extracción de RNA

Se lisaron las células en las muestras de la inducción con metanol. Esto se logró de forma mecánica con perlas de vidrio Sigma (lavadas con SDS 3 veces) y Buffer RLT. Después se realizó la extracción con el kit de Qiagen “RNeasy Mini Kit”, siguiendo el protocolo “Bench Protocol; Purification of Total RNA”:

1. Se rompieron y homogenizaron las células y se añadió etanol a las muestras.
2. Se transfirió la muestra a una columna de RNeasy en un tubo de 2 ml. Se cerró la tapa de la columna y se centrifugó por 15 s a 8000 g y se descartó el sobrenadante.
3. Se añadieron 700 µl de Buffer RW1 a la columna RNeasy, Se procedió como en el paso anterior.
4. Se añadieron 500 µl de Buffer RPE a la columna. Se cerró la tapa y se procedió como el paso 2.
5. Se añadieron 500 µl de Buffer RPE a la columna. Se procedió como en el paso 2.
6. Se puso la columna en un tubo nuevo de 2 ml, se cerró la tapa y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min.
7. Se puso la columna RNeasy en un tubo nuevo de 1.5 ml. Se añadieron 50 µl de agua libre de RNasas, se cerró la tapa y se centrifugó 1 minuto a 8000 g.

Al final del protocolo de extracción, se llevó a cabo un RT PCR para poder sintetizar cDNA a partir del RNA que fue aislado. Los reactivos fueron proporcionados por el laboratorio A 14 del INB campus Juriquilla en las concentraciones listas para la reacción como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Reactivos y cantidades para la reacción de RT PCR.

Reactivo	Cantidad
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTPs Mix (100 mM)	0.8 µl
10 RT Random Primer	2 µl
Transcriptasa Reversa	1 µl
RNA	14.2 µl
Total de reacción	20 µl

4.17. Electroforesis en SDS-PAGE-Tricina

Con las muestras extraídas de la proteína total intracelular de la inducción de la cepa positiva a CHH, una cepa negativa a la proteína pero también inducida y un control de X-33 en YPD, se buscó la banda perteneciente a CHH en un gel de electroforesis SDS-PAGE con tricina. Los buffers necesarios para la corrida de los geles fueron preparados según el cuadro 2. Se prepararon 500 ml de soluciones stock de Tris base (Sigma) y Tricina (BioRad) 1M, el HCl (J.T. Baker) fue utilizado en solución concentrada, por lo cual se calculó la masa molar a partir del porcentaje del reactivo.

Cuadro 2. Cantidades molares para 100 ml de buffers (tomado de Schägger, 2006).

	Buffer Ánodo 10X	Buffer Cátodo	Buffer del gel 3X
Tris (M)	1	1	1
Tricina (M)	–	1	–
HCl (M)	0.225	–	1
SDS (%)	–	1	0.3
pH	8.9	8.25	8.45

Cuadro 3. Indicaciones para preparar los geles (tomado de Schägger, 2006).

		Gel de concentración 4%	Gel de 10%	Gel de 16%	Gel de 16%/6 M de urea
AB-3	(ml)	1	6	10	10
Buffer del gel (3X)	(ml)	3	10	10	10
Glicerol	(g)	–	3	3	–
Urea	(g)	–	–	–	10.8
Volúmen final (agregando agua)	(ml)	12	30	30	30
Polimerizar agregando:					
Persulfato de amonio (10%)	(μ l)	90	150	100	100
TEMED	(μ l)	9	15	10	10

Los geles fueron preparados con las proporciones mostradas en el cuadro 3. La solución AB-3 fue sustituida por la solución AB-6, la cual consiste de una solución de 46.5 g de acrilamida (Sigma) y 3 de bisacrilamida (BioRad) en 100 ml. Una vez hechos los geles, las muestras se mezclaron con buffer Laemli de

desnaturalización de proteínas 6X. La muestra después era calentada a 95°C por 5 minutos y después cargada en el gel, dejando dos carriles para el marcador de peso molecular. Corriendo el gel a 100 V para que la muestra pasara por el gel concentrador y a 180 V para que corriera por el gel más denso.

5. Resultados

5.1. Transformación

Se resuspendió el plásmido pGOV4 con una porción del papel en el que fue enviado. Su concentración fue de 2.7 ng/μl.

Después de la transformación se pusieron a crecer las células en las placas por la noche, teniendo al día siguiente colonias resistentes a ampicilina y kanamicina (Figura 4 y 5). Después de seleccionar las colonias para miniprep las cajas se sellaron con parafilm y se guardaron a 4°C. Se muestra el control negativo para comprobar que la ampicilina fue eficaz (Figura 7).



Figura 4. Transformación de XL-1 Blue con los pGOv4 en placas con kanamicina.

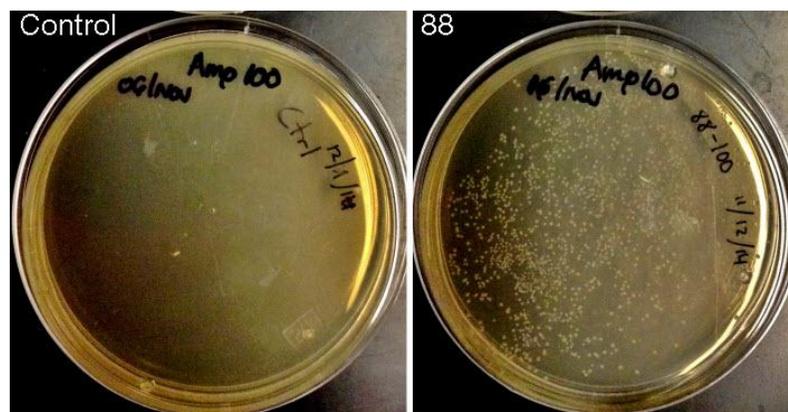


Figura 5. Transformación de XL-1 Blue con los pGOv4 en placas con ampicilina.

5.2. Miniprep

De las colonias positivas de transformación se tomaron 2 de la placa de ampicilina para hacer un cultivo en 3 ml de medio LB con ampicilina. A estos dos cultivos se les extrajo el DNA por medio de miniprep. Las concentraciones resultaron de 129.4 ng/ μ l para la colonia identificada como 88.1 y de 163.3 ng/ μ l para la colonia que se nombró como 88.2.

5.3. Restricción enzimática

Con el DNA obtenido de los miniprep se hizo la restricción enzimática para la comprobación del plásmido. Esta reacción también serviría para aislar la secuencia de oLVCHH para la ligación con el plásmido pPICZA. Las enzimas utilizadas en la comprobación fueron BglI y NotI, estas enzimas cortan secuencias que flanquean al inserto sintetizado en el vector. De acuerdo a las concentraciones obtenidas con los minipreps, se hizo la digestión de cada muestra cómo se presenta en el cuadro 4.

Cuadro 4. Proporciones de reactivos para la restricción enzimática.

Plásmido pGOV4::oLVCHH	Bgl I	Xba I y Not I	Control
DNA	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Enzima	0.3 μ l	0.3 μ l	-
Buffer 10X (3.1 NEBuffer)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
H ₂ O	14.7 μ l	14.7 μ l	15 μ l
Total de reacción	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Después de la reacción de restricción enzimática, la muestra fue cargada en un gel de agarosa al 1.5% con 1 μ l de bromuro de etidio. Este gel se corrió durante 40 minutos a 140 V y se visualizó en un fotodocumentador Kodak (figura 6).

Se puso la restricción con una de las dos enzimas de la restricción doble para cortar el DNA toda la noche. Al día siguiente se purificó el DNA y se sometió a reacción con la segunda enzima. Esto generó bandas muy tenues, pero visibles para saber dónde cortar el gel y llevar a cabo la ligación después (figura 6). Cuando se purificó el DNA con ayuda del kit de Zymoclean, se midió en nanodrop. Para el plásmido se llevó a cabo la misma estrategia que la utilizada con el inserto. En rojo puede verse las bandas que fueron cortadas del gel para la purificación del

plásmido digerido (figura 7). También se dejó una alícuota de la restricción hecha por la noche para comprobar si las enzimas por separado trabajaban correctamente.

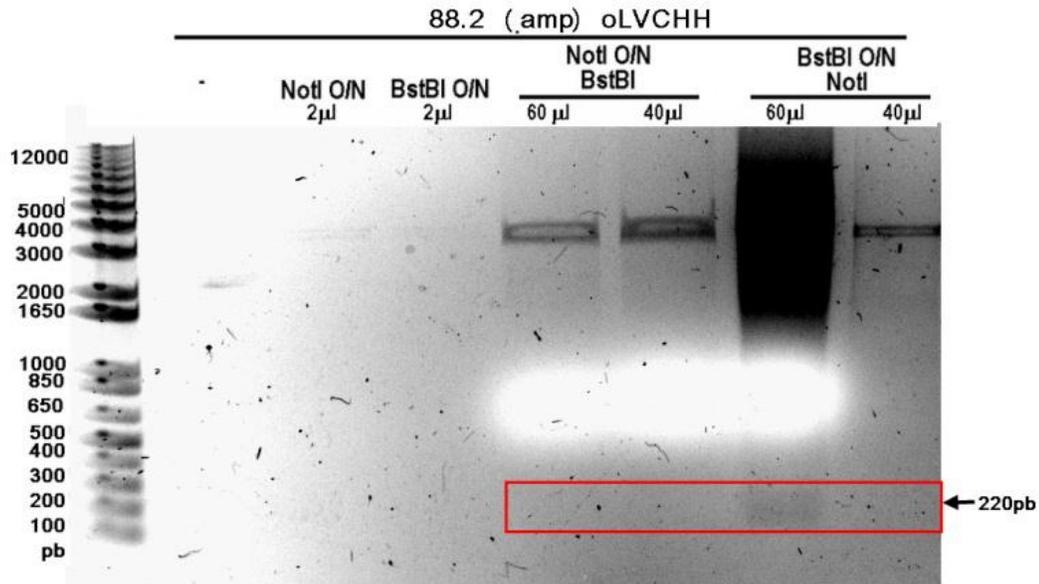


Figura 6. Restricción de pGOV4::oLVCHH.

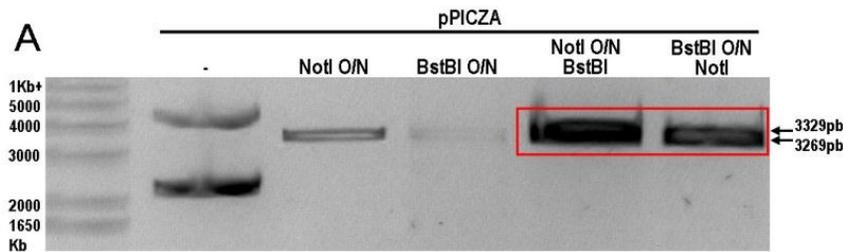


Figura 7. Restricción del plásmido pPICZA, para la ligación con oLVCHH.

5.4. Clonaje del plásmido pPICZA con la secuencia oLVCHH

La reacción de ligación de las dos secuencias purificadas se llevó a cabo con proporciones molares para que la relación entre el plásmido y la secuencia fueran 1:1, 1:3 y 1:6.

5.5. Transformación de XL-1 Blue con el plásmido ligado

La transformación con el plásmido positivo pPICZA::oLVCHH se llevó a cabo de la misma forma que con pGOV4. Cada una de las proporciones de ligación fue

transformada de manera separada (Figura 8). En la primera fila (superior) se puede observar las colonias que aparecieron como positivas a la ligación. En estas placas de medio LB bajo en sales con Zeocina [50 µg/ml] se extendieron 50 µl del medio SOC con células transformadas en cada placa. En la segunda fila (inferior) se muestran las placas que fueron inoculadas con la muestra restante de la transformación, la cual fue centrifugada a 11000 rpm y luego resuspendida en 200 µl para ser extendida en las placas.

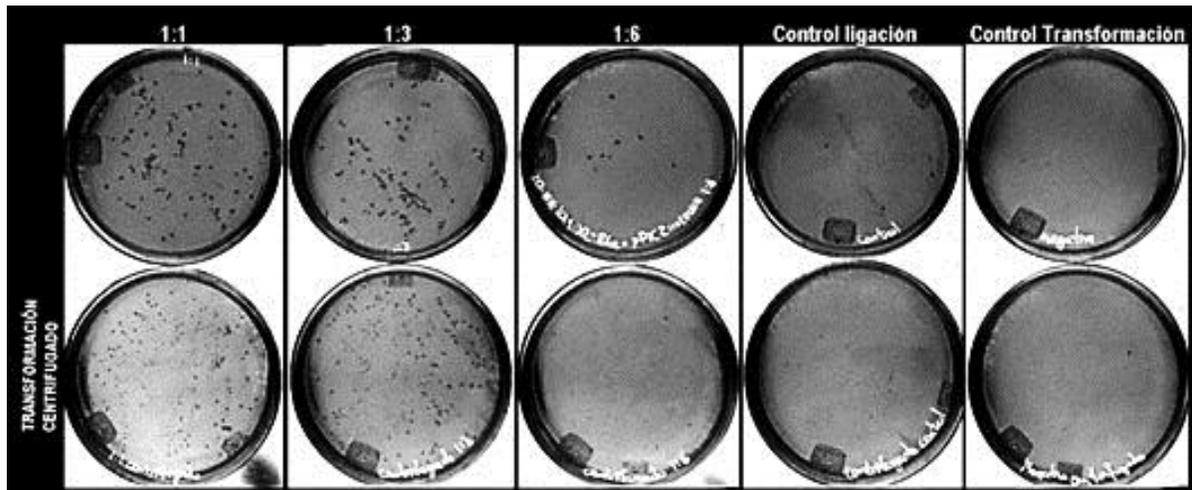


Figura 8. Transformación de *E. coli* con la ligación de pPICZA::oLVCHH.

5.6. PCR Colony

El PCR colony de las colonias positivas a transformación fue llevado a cabo con los primers Forward y Reverse para el promotor AOX1. Se hizo previamente un análisis *in silico* para poder saber la longitud del fragmento de DNA que se generaría al hacer el PCR Colony. Dicho fragmento generado estaba predicho en tener una longitud de 496 bp (Figura 9), por lo que las bandas a la altura del marcador de 500 bp del DNA Ladder serían consideradas como positivas a una ligación correcta de plásmido. Para la reacción de PCR se calculó la molaridad de los plásmidos liofilizados en 15.6 µM para el primer Forward y 15.7 µM para el Reverse.

Dichos plásmidos fueron resuspendidos para tener stocks de 100 µM, de los cuales se prepararon alícuotas de 25 µM. Se preparó la mezcla para todas las colonias positivas seleccionadas (43 colonias) con 4.5 µl de Platinum PCR Supermix de Life

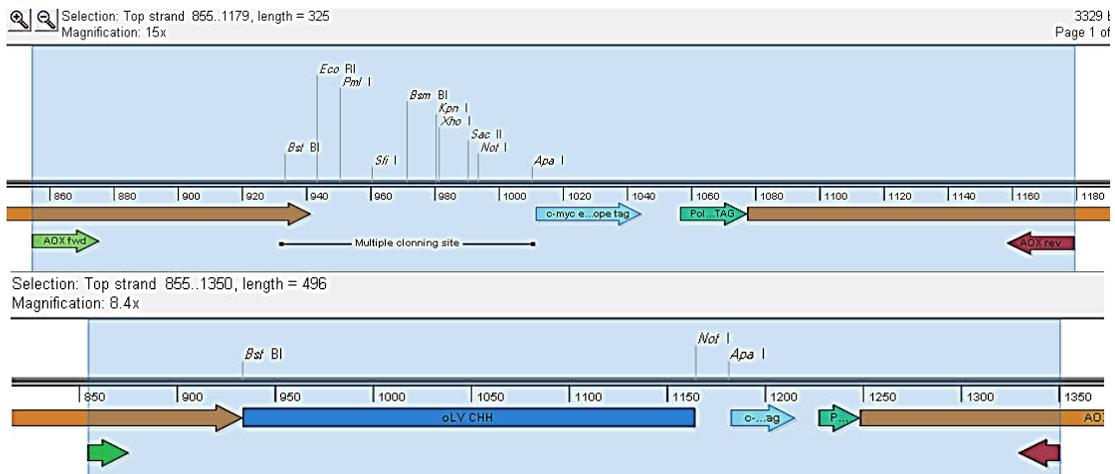


Figura 9. Análisis *in silico* del fragmento que se generaría en el PCR Colony.

Technologies (Carlsbad, CA. USA) y 0.5 μ l que comprendía el volumen de primer (0.08 μ l por cada primer) y el volumen que dejaría la colonia de XL-1 Blue que se picaría. Se corrió la reacción y el resultado de las reacciones se corrió en gel de agarosa 1% (figura 10).

La línea punteada roja representa la altura en el gel en el que debería estar la secuencia generada de PCR en un plásmido con una ligación correcta (figura 10). En total se encontraron entre todas las colonias 27 falsos positivos, con pPICZA pero no con el inserto. Sólo una colonia (9, marcada en amarillo) fue positiva al inserto, el cual estaba en la línea de 500 bp en el gel. A partir de esta colonia se llevó a cabo un miniprep para seguir con la evaluación del plásmido contenido en la cepa.

5.7. Comprobación de inserción correcta de pPICZA::oLVCHH

Se comprobó la inserción correcta del inserto oLVCHH en el plásmido pPICZA por medio de restricción enzimática, los fragmentos resultantes y su peso comprobarían si la secuencia se integró de la manera correcta en el sitio requerido y en una sola copia. La reacción se llevó a cabo con las enzimas BglII, BamHI y NotI (cuadro 5). Antes de llevar a cabo la restricción, se analizó *in silico* la secuencia del plásmido que tendría el inserto integrado. Este análisis proporcionó los pesos esperados de las bandas al correrlas en electroforesis de agarosa (figura 11).

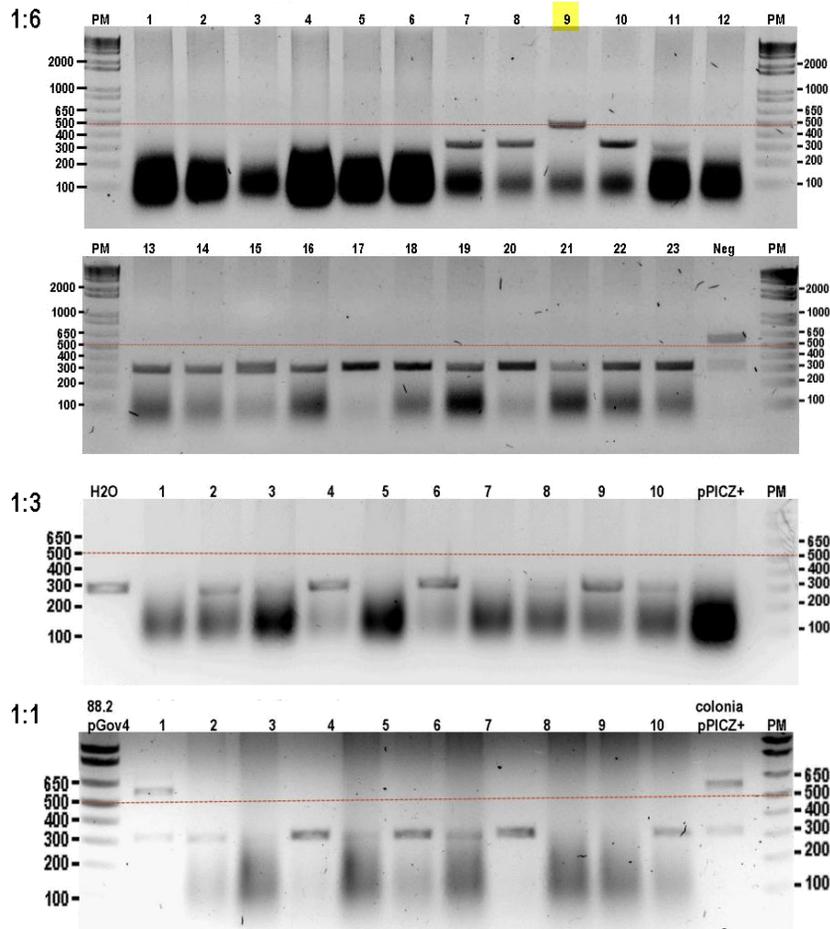


Figura 10. Resultado de la reacción de PCR Colony.

Cuadro 5. Cantidades de reactivos utilizadas para la restricción comprobatoria.

	Control	BglII	BglII + NotI	BglII + BamHI	BamHI + NotI
DNA	3.9 µl	3.9 µl	3.9 µl	3.9 µl	3.9 µl
Enzima	-	0.2 µl	0.2 µl cada una	0.2 µl cada una	0.2 µl cada una
NEBuffer 3.1 10X	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	14.1 µl	13.9 µl	13.9 µl	13.9 µl	13.9 µl

En la figura 11 se pueden observar las bandas predichas en el análisis *in silico*. Las bandas obtenidas coincidieron. En la figura se muestra el peso de cada banda. La banda de 420 bp generada por el corte de BamHI y NotI corresponde al inserto del gen introducido oLVCHH.

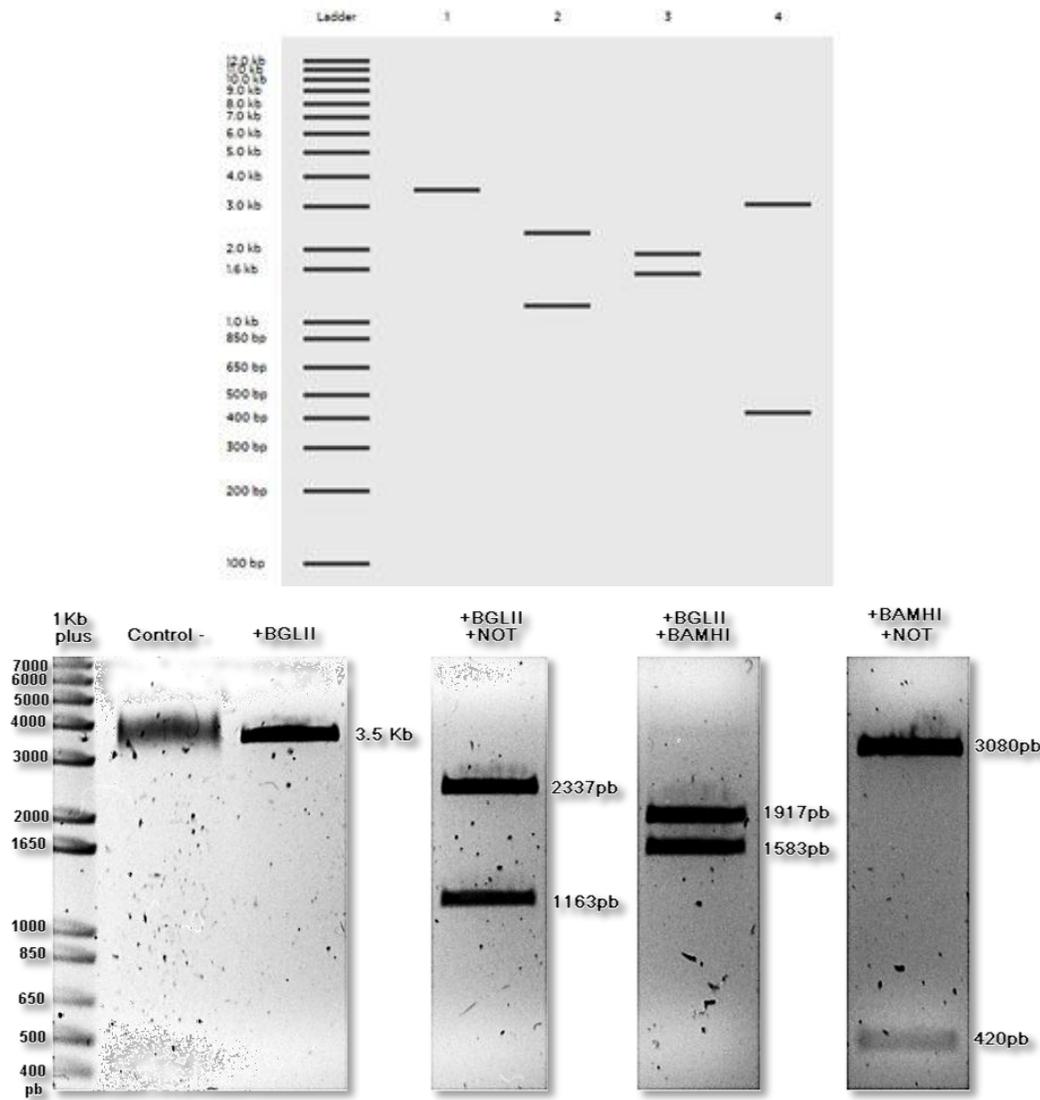


Figura 11. Restricción del plásmido integrado comparado con el análisis *in silico*.

5.8. Maxiprep

Con la secuencia del plásmido integrado comprobada, se llevó a cabo el maxiprep de la colonia positiva al plásmido. Al final del procedimiento se obtuvieron 400 μ l de suspensión de plásmido purificado con concentración de 545.2 ng/ μ l.

5.9. Electroporación

Del plásmido purificado con la columna de maxiprep se llevó a cabo la linearización a partir de restricción enzimática con PmeI y SacI. Después de la restricción se

purificaron los plásmidos por medio del kit “DNA Clean & Concentrator” de Zymo. De los 15 µg que fueron sometidos a restricción con cada enzima, se pudieron purificar 10 de los linearizados con PmeI y 5 de SacI debido a la limitada capacidad de las columnas de Zymo (5 µg). Se tomó una alícuota de 0.1 µl de cada purificación de DNA linearizado para correr en gel de agarosa 1% (figura 12). Se puede observar la diferencia de peso entre el plásmido linearizado y el plásmido cerrado (control sin rótulo).

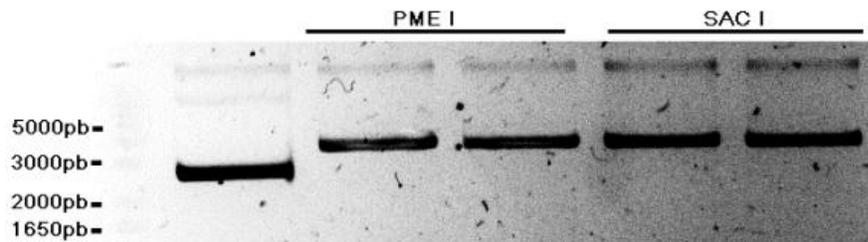


Figura 12. Restricción enzimática de pPICZA::oLVCHH con PmeI y SacI.

La electroporación se llevó a cabo con la cepa X-33. Las condiciones de electroporación fueron las dadas por el equipo BioRad “Gene Pulser XCell”. Después del pulso eléctrico se adicionó el sorbitol 1M y se incubó como lo establecido en el protocolo de EasySelect. Después de llevar a cabo la electroporación se inocularon las placas con volúmenes ascendentes de inóculo. Estas placas crecieron en 2 días en colonias distinguibles y de buen tamaño. La placa de 500 µg/ml de Zeocina mostró 4 colonias resistentes, la placa de 1000 con una sola colonia y la de 2000 no mostró crecimiento alguno, al igual que la placa control (figura 13). La diferencia entre el número de colonias generadas con los plásmidos linearizados con las dos enzimas se muestra en la Figura 14.

5.10. Extracción de DNA genómico

Con 20 de las colonias positivas de la placa de 25 µl [100 µg/ml] del plásmido linearizado con PmeI y las colonias positivas de la placa de 500 µg/ml se llevó a cabo el análisis de los plásmidos insertados en dichas colonias para comprobar si el plásmido introducido era realmente pPICZA::oLVCHH. Se extrajo el DNA con el

protocolo de AquaPure de BioRad. Se llevó a cabo un PCR genómico con las muestras.

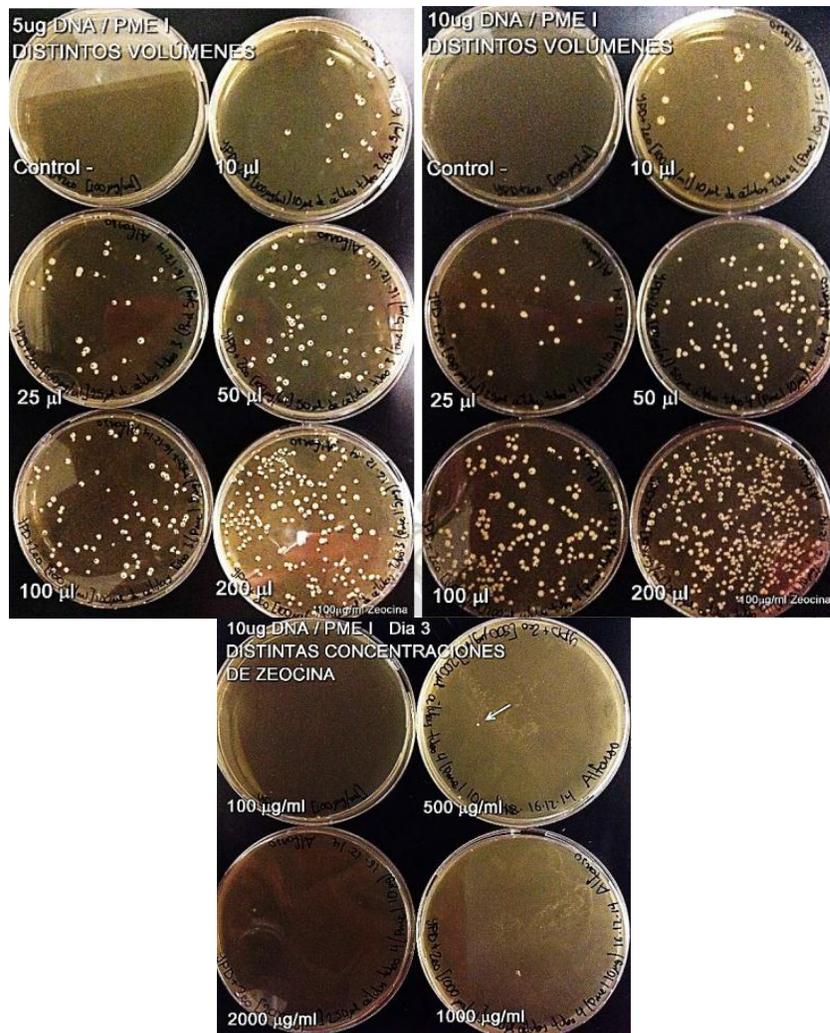


Figura 13. Transformación de X-33 con el plásmido pPICZA::oLVCHH.

5.11. PCR genómico

Se llevó a cabo el PCR genómico con los primers forward y reverse para AOX. Sólo una de las muestras mostró ser positiva para la secuencia oLVCHH. La muestra número 4 de la placa de 500 µg/ml mostró la misma banda que el control positivo (figura 15). Se utilizaron colonias adicionales positivas a pPICZA como control de expresión

Eficiencia de Electroporación de *Pichia Pastoris* con diferentes cantidades de DNA linearizado y de volúmenes sembrados (DIA 2)

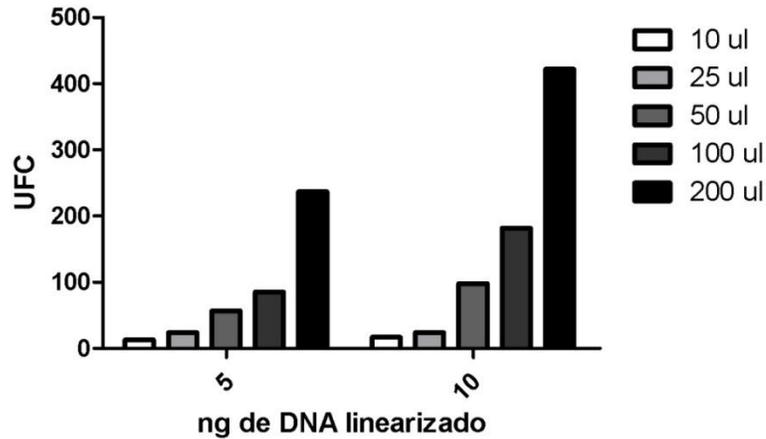


Figura 14. Número de colonias transformadas por placa.

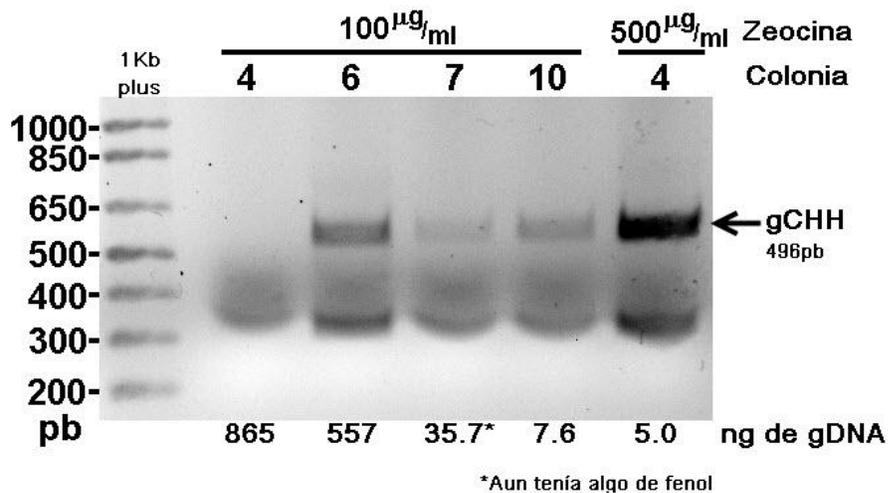


Figura 15. Resultado del PCR genómico de la cepa 500-4 positiva a oLVCHH.

5.12. Cultivo comparativo de *P. pastoris*

Utilizando los datos del Microplate Reader se graficó el crecimiento de las fermentaciones para comparar el crecimiento en presencia de metanol como única fuente de carbono y utilizando glicerol para generar biomasa y después inducir el cultivo con metanol junto con las cepas control (figuras 16 y 18). Se hizo un segundo cultivo de inducción, esta vez sólo con la sepa positiva al cDNA de CHH.

Se inocularon 2.3 l de medio que fueron concentrados en 300 ml. Este cultivo se sometió a inducción por 5 días, su producción de biomasa fue medida para comprobar el rendimiento (figura 17). A este cultivo se le tomaron alícuotas de 1.5 ml y fueron extraídas las proteínas.

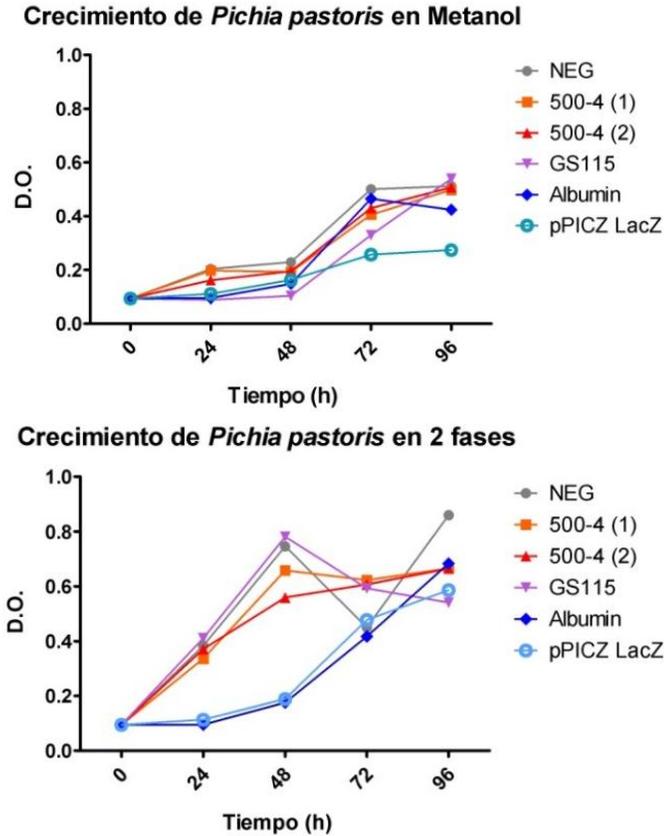


Figura 16. Comparación de las fermentaciones.

5.13. Extracción de proteína

La proteína extraída fue comparada con una curva de BSA (cuadro 6, curva no mostrada). Todas las muestras y la curva fueron medidas por reacción de Bradford en el equipo BioRad "Microplate Reader". La curva tenía una correlación de 0.997, por lo que se tomó como estadísticamente confiable. Después de medir las muestras se decidió que sólo las muestras con los pellets más grandes serían útiles para correr en el gel, sin embargo el gel no mostró una banda clara para CHH.

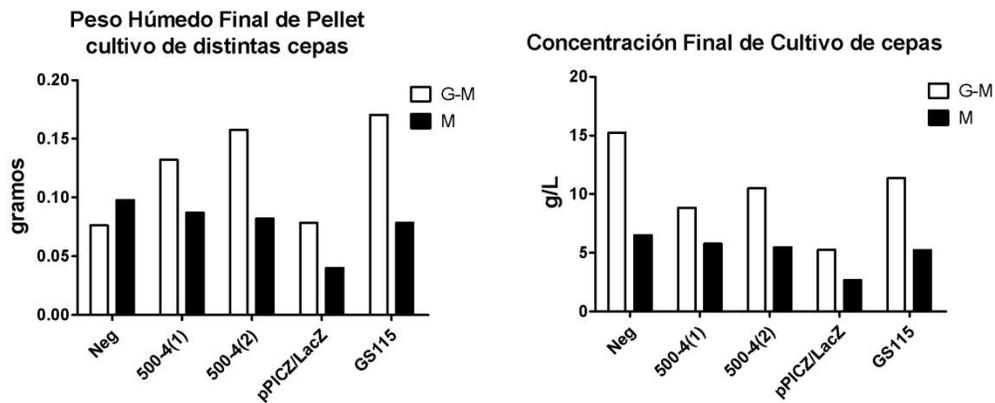


Figura 17. Peso final de pellets de comparación, en dos (blanco) y una fase (negro).

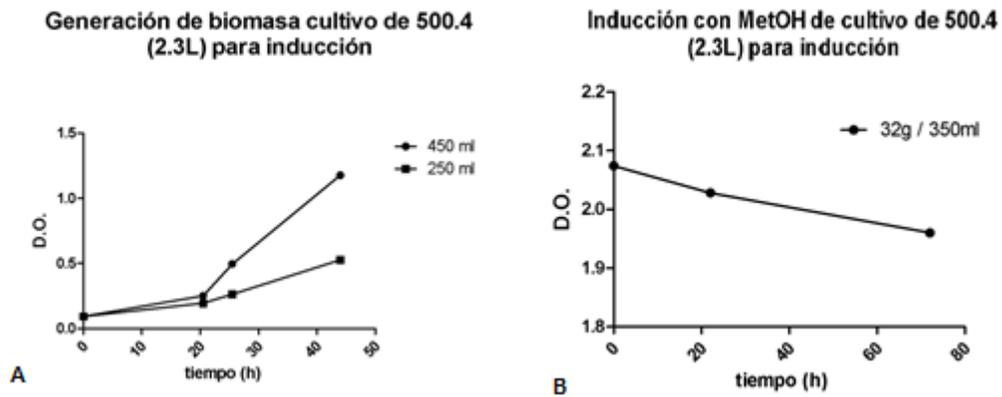


Figura 18. DO durante la fermentación con glicerol (A) y metanol (B).

5.14. Geles tricina

El gel fue teñido con el kit de BioRad "Silver Stain Plus". No se observó con claridad una banda correspondiente a la hormona CHH. La duración de la electroforesis fue de 2 horas en poder separar las bandas del marcador de peso molecular asegurar la separación de las bandas de 10 kDa o menor (figura 19).

5.15. Extracción de RNA

Con el kit de extracción de RNA se extrajo de muestras de 3 días de inducción con 2 tubos de la colonia positiva 500-4 y 2 tubos de un control. Se cuantificó el DNA y Se calculó la cantidad de muestra para la reacción de RTPCR (cuadro 7).

Cuadro 6. Cálculos de las proteínas después purificación de proteínas.

Muestras	Absorbancia		Promedio	Desv. Est.	Concentración		
Neg 1.1	0.293	0.291	0.301	0.295	0.0052915	Negativa	
500 1.1	0.299	0.299	0.295	0.29766667	0.0023094	Negativa	
Neg 2.1	0.313	0.299	0.308	0.30666667	0.0070946	Negativa	
500 2.1	0.298	0.286	0.28	0.288	0.00916515	Negativa	
500 1.2	0.342	0.315	0.3	0.319	0.0212838	Negativa	
Neg 2.2	0.309	0.309	0.29	0.30266667	0.01096966	Negativa	
500 2.2	0.264	0.304	0.288	0.28533333	0.02013289	Negativa	
Neg 1.2	0.329	0.3	0.316	0.315	0.01452584	Negativa	
Neg 1.3	0.313	0.319	0.31	0.314	0.00458258	Negativa	
Neg 2.3	0.315	0.32	0.312	0.31566667	0.00404145	Negativa	
500 1.3	0.299	0.305	0.306	0.30333333	0.00378594	Negativa	
500 2.3	0.357	0.356	0.36	0.35766667	0.00208167	233.93	
Neg 1.4	0.511	0.563	0.539	0.53766667	0.02602563	1344.18	44.63
500 2.4	0.886	0.836	0.675	0.799	0.11025879	2956.11	20.29
500 1.4	0.635	0.627	0.605	0.62233333	0.01553491	1866.42	32.14
Neg 2.4	0.693	0.59	0.712	0.665	0.06564297	2129.59	28.17
2.3 L	0.449	0.401	0.458	0.436	0.03064311	717.1	41.83
							Laemli
							22.315
							10.145
							16.07
							14.085
							20.915

Cuadro 7. Resultado de cuantificación de RNA de las muestras de inducción.

	Muestra	[ng/ μ l] RNA	Vol. Para 200 ng para RTPCR	para 14.2 μ l
Día 1	500 I	12.22	14.2 (16.3)	-
	500 II	14.67	13.63	0.57
	Negativo I	23.83	8.39	5.81
	Negativo II	18.96	10.55	3.65
Día 2	500 I	25.38	7.88	6.32
	500 II	34.135	5.86	8.34
	Negativo I	31.59	6.33	7.87
	Negativo II	39.42	5.07	9.13
Día 3	500 I	63.64	3.14	11.06
	500 II	42.53	4.70	9.50
	Negativo I	39.9	5.01	9.19
	Negativo II	32.96	6.07	8.13
2.3 I	500	27.07	7.39	6.81

5.16. Síntesis de cDNA

Se corrieron los resultados de la síntesis de cDNA en un gel de Agarosa al 2% para asegurar la separación correcta de las secuencias elongadas de DNA (figura 20). La electroforesis tuvo una duración de 1 hora.

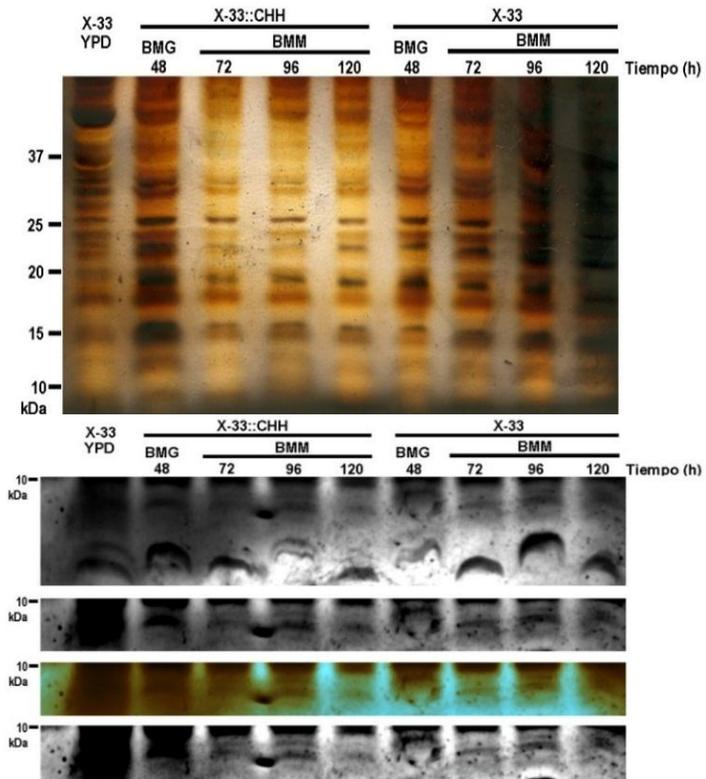


Figura 19. Tinción de plata de los gels de tricina.

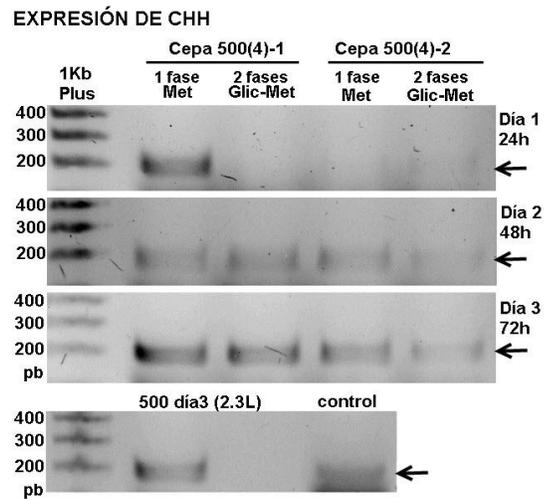


Figura 20. Resultado del gel cargado con los resultados del PCR del cDNA.

6. Discusión

En el proceso de transformación de las células XL-1 Blue, la eficiencia de transformación del choque térmico permitió que se mantuviera como método de transformación. La presencia de muchos falsos positivos en el proceso de transformación de XL-1 Blue con el plásmido pPICZA::CHH pudo deberse al mismo proceso de clonación, ya que aun teniendo el DNA de CHH y pPICZA con los mismos sitios cortados, pudo haber ligaciones que se llevaran a cabo entre la secuencia del plásmido sin CHH, por lo que a pesar de brindar resistencia a la Zeocina, el PCR mostraba la ausencia de CHH.

Después del proceso de clonación de CHH en pPICZA y su transformación en *Pichia pastoris*, las colonias en las que se observó un único amplicón de PCR de aproximadamente 200 bp fueron consideradas como positivas. Para este trabajo se eligió la cepa X-33 debido a su facilidad de crecimiento y la eficiencia de su transformación a comparación de la cepa GS115. Debido a la dificultad de la extracción del genoma de *P. pastoris*, el PCR genómico no tuvo resultados claros para la mayoría de las muestras, aunque en este proceso también sigue la posibilidad de los falsos positivos por la presencia de plásmidos vacíos. Incluso después de la purificación del plásmido positivo, la misma colonia de XL-1 Blue podría tener algunos de estos falsos, entorpeciendo el proceso de electroporación. Incluso en el caso de que hubiera más colonias positivas el lugar en el que el plásmido se insertaba era completamente aleatorio, este sistema de EasySelect no tiene secuencias que hagan que el plásmido se introduzca en lugares específicos. Si el plásmido se insertaba en una secuencia del genoma difícil de alcanzar por los primers por impedimentos de otras secuencias o arreglos del DNA, el PCR sería negativo.

Cuando se realizaron los cultivos comparativos se encontró que la biomasa se genera de forma mucho más rápida y en mayores cantidades iniciando el cultivo con BMGY que iniciando con BMMY. En el caso de la fermentación con GS115 HIS4 (Albumin) y GS115/pPICZ/LacZ el crecimiento no se presentó como esperado pero tuvo un mejor crecimiento después del inicio de la inducción. Las fermentaciones de la colonia positiva mantuvieron sus densidades después de la

inducción mientras que el cultivo nativo de GS115 y el negativo tuvieron una gran caída en su densidad y el negativo se recuperó, esto podría ser debido a la inserción de un plásmido pPICZA sin inserto en dicha colonia. En el caso de las fermentaciones hechas sólo con BMMY la densidad muestra un crecimiento mucho menor, como se muestra en la figura 19.

El análisis de la proteína no arrojó ningún resultado concluyente, a pesar de la especificidad del kit de BioRad de tinción de plata, la banda correspondiente de CHH no era clara, ya que debía haber una acumulación intracelular de la hormona en las células, lo cual daba sospechas de un problema en la traducción de la proteína. Debido a esto fue que se llevó a cabo el análisis del cDNA de la cepa positiva. Se eligió una de las cepas previamente evaluadas como posible positiva a CHH debido a que sería un positivo a pPICZ pero con ausencia de CHH. La presencia de DNA amplificado en la cepa control demuestra que dicha cepa, a pesar de haber sido probada como negativa a la transformación hecha con pPICZA::oLVCHH, es positiva pero con menor expresión, por lo que se invalidó como control. La diferencia de la expresión entre la cepa positiva y la supuesta como control es clara, con la primera muestra de presencia de metanol en el medio, el cDNA de CHH tenía una presencia indudable. Posteriores pruebas seguían arrojando una ausencia clara de CHH en la proteína total de la cepa positiva. La posibilidad de un falso con otro gen de Pichia se descartó por la especificidad de los primers para CHH.

7. Conclusión

A pesar de todos los medios utilizados y los intentos hechos con las distintas herramientas moleculares utilizadas, se puede demostrar que las cepas del organismo *Pichia pastoris* no fueron capaces de expresar la proteína CHH de *Litopenaeus vannamei*. El nivel de expresión del RNA de CHH implica que el plásmido y su integración en el genoma de *P. pastoris* fueron exitosas, pero que la traducción RNA-proteína en la maquinaria de la levadura no se llevó a cabo.

8. REFERENCIAS

- Agilent Technologies. 2011.** Recombinant Protein Characterization, A Primer. p. 4.
- Agilent Technologies. 2004.** XL-1 Blue Competent Cells.
- Balamurugan, V., Reddy, G. R., Suryanarayana V. V. S. 2007.** *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins—Vaccines. Indian Journal of Biotechnology. Vol 6, April 2007. pp 175-186
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., and Higgins, D. R. 2000.** Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Molecular biotechnology 16, 23-52.
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P. and Stillman, C. A. 1988.** Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. Molecular and Cellular Biology, Mar. 1989. P. 1316-1323.
- Couderc, R., Baratti J. 1980.** Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase, Agricultural and Biological Chemistry, 44:10, 2279-2289
- Drocourt, D. Calmels, T. Reynes, J. Baron, M. Tiraby, G. 1990.** Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. Nucleic Acids Research, Vol. 8, No. 13. p. 4009.
- FAO. 2014.** Programa de información de especies acuáticas: *Penaeus vannamei*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Departamento de Pesca y Agricultura.
- Froger, A., Hall, J. E. 2007.** Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. JoVE. 6. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=253>, doi: 10.3791/253
- Invitrogen. 2010.** EasySelect™ *Pichia* Expression Kit.
- Invitrogen. 2012.** Zeocin™ Selection Reagent.
- Lago-Lestón, A., Ponce, E., and Muñoz, M. E. 2007.** Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. Aquaculture 270, 343-357.

Life Technologies. 2014. *Pichia* Expression Systems. Thermo Fisher Scientific Inc. [Consultado 18 de agosto de 2015]. Disponible en <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/protein-expression-and-analysis/protein-expression/yeast-expression/Pichia-expression-systems.html>

Guerrero-Olazarán M., Cab-Barrera, E., Galán-Wong, L. J., Viader-Salvadó, J. M. **2004.** Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 noviembre, 2004, Hermosillo, Sonora, México.

Morris, S., Postel, U., Mrinalini, Turner, L. M., Palmer, J., Webster S. G. **2010.** The adaptive significance of crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in daily and seasonal migratory activities of the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis*. The Journal of Experimental Biology 213, p. 3062-3073.

Quiagen. 2002. QIAprep® Miniprep Handbook.

Quiagen. 2012. QIAGEN® Plasmid Purification Handbook.

Tschopp, J. F., Brust, P. F, Cregg, J. M., Stillman, C. A., Gingeras, T. S. **1987.** Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acids Research, Vol. 15, N. 9.

Valero, F. 2013. Bioprocess Engineering of *Pichia pastoris*, an Exciting Host Eukaryotic Cell Expression System. InTech Open science.

Valenzuela, W., Rodríguez, G., Esparza, H. **2010.** Cultivo intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) en agua de pozo de baja salinidad como alternativa acuícola para zonas de alta marginación. Universidad Autónoma Indígena de México. Ra Ximhai, enero-abril, año/Vol. 6, Número 1. Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 1-8.

Wang, Y. J., Hayes, T. K., Holman, G. M., Chavez, A. R., and Keeley, L. L. **2000.** Primary structure of CHH/MIH/GIH-like peptides in sinus gland extracts from *Penaeus vannamei*. Peptides 21, 477-484.

Yuan J., Zhang, X., Liu, C., Wei, J., Li, F., Xiang, J. **2013.** Horizontally transferred genes in the genome of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. BMC Evolutionary Biology 2013, 13:165.

Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE Protocol. Nature Publishing Group.