

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

**PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA LIGNINA PEROXIDASA H8 EN LA LEVADURA
METILOTROFICA *Pichia pastoris*.**

PRESENTADA POR

L. B. G. JOSÉ LUIS NAVA RÍOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA**

JULIO, 2019

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología y en el laboratorio de Bioinformática y Genómica ambos pertenecientes al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Antonio Alí Pérez Maya, la Codirección del Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez y la participación como miembro de la comisión la Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla.

Agradecimientos:

Agradezco A mi familia, en especial a mi Padre, mis hermanas y mis abuelos por el apoyo durante toda la vida.

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi comisión de tesis empezando por el Dr. Antonio Alí Pérez Maya por su gran calidad humana, infinita paciencia y valiosísima asesoría, al Dr. Jorge A. I. Ascacio Martínez por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza y los buenos consejos que enriquecieron mi tesis, y a la Dra. Ana Maria G. Rivas Estilla por tener la confianza en mis habilidades y darme la oportunidad de realizar este proyecto.

A mis compañeros de generación, así como a mis compañeros de departamento y demás tesistas por los consejos, asesorías, tips y demás fortunas.

A mis compañeros de Biología estructural, Alex Cerna, Alex, Aide, Ana Esther, Anita, Javier, Robbi, Samael, Marco, Mike, Xico a los que les tengo un gran aprecio por todos estos años de convivencia.

A mi cuadro chico especialmente a Marcos y Jaudiel, así como a Orlando, Angel Estrada, Guille, Luis Angel, Sara, Roberto, Victor, Valeria, Angel Francisco, Rebeca, Karen, David, Alfredo por esa calidez característica de ustedes.

A estudiantes de otras generaciones con los que aprendí y pase buenos momentos empezando por Memo y a Muza, Abraham, Rolando, Diana, Elda Jorge Roacho, Gerardo, Erick, Mariel, las chicas del coro, Fresia, Florencia, Ana Itzel, Montse, Stephen, Juanito, Edwin, Fernanda, Javier y Sucy.

A la multitud de estudiantes de verano y servicio social con los que colaboré entre ellos: Nancy, Dani, Mauricio, Ángel, Gil, Juan Pedro, Yare, Jorge, Nestor, Oliver, Hilda, Edna, Welsh, Rebeca, Rolando, Orlando, Sergio Alondra, Erika, Oscar, Priscila, Mariana.

Al personal administrativo, docente, no docente y de Investigación del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de U.A.N.L. y de

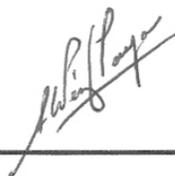
subdirección de posgrado en especial a Juany, Ariadna, Don Lalo, Angy, Cecy, Azeneth y Yessenia que siempre me ha apoyado.

A mis amigos de la preparatoria, Adriana, Erick, Javier, Jess, Manuel, Martín y Sergio que me ayudaron a despejarme después de los días de trabajo en el laboratorio.

Le dedico este trabajo a todo aquel que en este largo trayecto me ha acompañado y ha alentado, a todos ustedes gracias por las buenas intenciones y los grandes momentos, a su vez va dirigido a todos aquellos quienes buscan que la información disponible sea gratuita y veraz un agradecimiento de todo corazón.

**“PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA LIGNINA PEROXIDASA H8 EN LA
LEVADURA METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*”.**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Antonio Alí Pérez Maya
Director de Tesis



Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez
Co-Director de Tesis



Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

LBG. José Luis Nava Ríos.

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 113

PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA LIGNINA PEROXIDASA H8 EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*.

Introducción. La producción de enzimas del complejo degradador de la madera es importante para un amplio rango de actividades industriales, tal es el caso de la lignina peroxidasa que es usada en el pretratamiento del material lignocelulósico en procesos de biorefinado y la degradación de compuestos tóxicos como colorantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), nanomateriales y antibióticos mediante estrategias de biorremediación. Adicionalmente se le han atribuido funciones de producto con alto valor agregado como agente despigmentante, biosensor o en la generación de aditivos alimenticios (ácido ferúlico y vainillina) y biocombustibles basados en la conversión de lignina. Lo anterior hace que su producción recombinante sea de interés biotecnológico. Los esfuerzos previos de clonación han generado resultados desalentadores siendo los más comunes: bajo rendimiento, baja actividad y la necesidad de procesos adicionales para favorecer el correcto plegamiento. En el presente trabajo se exploró una alternativa para solventar estos inconvenientes mediante la producción heteróloga de la enzima lignina peroxidasa H8 en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, además se implementó una estrategia de optimización de codones basada en emular el perfil de uso de codones presente en el organismo nativo en la secuencia de interés a insertar en el organismo hospedero. **Objetivo:** Expresar y caracterizar la isoforma H8 de la enzima lignina peroxidasa en la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. **Metodología.** Se diseñó una secuencia con armonización de codones de la isoforma del gen LiPH8 de la lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* y se envió a sintetizar artificialmente en el vector de expresión para levaduras pPIC9K. Después se transformó para su almacenaje en la cepa de *Escherichia coli* Top10[®]F. Posteriormente se linealizó e insertó en el genoma de la levadura *Pichia pastoris* cepa GS115 por recombinación homóloga en la región del gen alcohol oxidasa 1 (*AOX1*), seguidamente se evaluó la generación de cepas recombinantes por selección en medio mínimo y amplificación por PCR hacia el sitio *AOX1*. Se caracterizaron los fragmentos con enzimas de restricción y se evaluó el fenotipo para cada colonia obtenida. Las proteínas de interés se caracterizaron mediante Western blot. **Resultados.** Se logró la transformación de un vector pPIC9K LiPH8. Se caracterizó la correcta inserción del gen usando enzimas de restricción en el vector y fragmentos de amplificación. Se generaron cepas recombinantes de *Pichia pastoris* GS115 LiP H8 (N = 40) y se identificó la presencia del fenotipo Mut⁺ (23) o Mut^S (2), simultáneamente se clonó e identificaron colonias H2 Mut⁺ (3). Se cuantificaron en promedio 1.20 mg/mL de proteínas totales provenientes del proceso de inducción de las cepas recombinantes LiPH8. Se evaluó satisfactoriamente la expresión de la proteína recombinante H8 por la técnica de Western Blot hacia

la etiqueta FLAG presente en la proteína, obteniéndose bajos niveles de expresión de proteínas totales en cepas con inserción de una sola copia. **Conclusiones.** El uso de estrategias basadas en la modificación de la secuencia es una opción viable para el aumento en la producción de proteínas recombinantes de interés industrial, sin embargo, estas estrategias han sido poco estudiadas y pueden generar desafíos adicionales para una correcta implementación. En el presente trabajo se utilizó la estrategia de armonización de codones para la producción recombinante de la enzima lignina peroxidasa H8 en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* y se logró producir la enzima LiP H8 e identificar mediante western blot.

Firma del director:

DR. C. ANTONIO ALÍ PÉREZ MAYA
Director de Tesis

Índice General

Contenido	Página
RESUMEN.....	I
Índice General	III
Lista de tablas.....	VI
Lista de figuras	VIII
Abreviaturas	X
Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1: Origen del término “Biotecnología”	1
1.2: La biotecnología como herramienta para el desarrollo:	7
1.3: Sistema de expresión de proteínas recombinantes	9
1.4: <i>Pichia pastoris</i> como modelo de expresión de proteínas recombinantes.....	17
1.5: Evento de recombinación homóloga.....	21
1.6: Fenotipos obtenidos a partir del evento de recombinación homóloga: ¿cepas Mut⁺ o Mut⁻?.....	22
Capítulo 2: Antecedentes	24
2.1: Descripción general de la enzima “Lignina Peroxidasa”	24
2.2: Producción recombinante de enzimas lignocelulolíticas	26
2.3: Usos y aplicaciones de la lignina peroxidasa	27
2.4: Ingeniería de proteínas en la lignina peroxidasa	29
2.5: Antecedentes del laboratorio de biotecnología.....	30
Capítulo 3: Justificación y objetivos	31
3.1 Justificación:	31
3.2 Objetivo general:	32
3.3 Objetivos específicos:.....	32
Capítulo 4: Metodología.....	33
4.1 Diseño <i>In silico</i> del vector de expresión LipH8	34
4.1.1 Búsqueda y diseño de las secuencias	34
4.1.2 Clonación del vector pPIC9K-LiPH8 y verificación de integridad.....	35
4.1.3 Extracción del ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina	35

4.1.4 Caracterización de los genes sintetizados	35
4.2 Construcción del sistema de expresión de <i>Pichia pastoris</i> GS115 con pPIC9K-LiPH8	36
4.2.1 Inserción por recombinación homóloga en <i>Pichia pastoris</i>	36
4.2.2 Selección de cepas recombinantes mediante PCR	36
4.3 Producción y evaluación de Lignina Peroxidasa H8 en <i>Pichia pastoris</i>	36
4.3.1 Producción de Lignina Peroxidasa H8 en <i>Pichia pastoris</i>	36
4.3.2 Diálisis del medio de cultivo recuperado	37
4.3.3 Precipitación y cuantificación de proteínas producidas	38
4.3.4 Separación electroforética SDS-PAGE de la proteína LiPH8 recombinante	38
4.3.5 Identificación de la Lignina peroxidasa H8 por Western blot	39
Capítulo 5: Resultados	40
5.1 Diseño <i>in silico</i> del vector de expresión LipH8	40
5.1.1 Obtención de las secuencias a sintetizar	40
5.1.2 Diseño y armonización de codones <i>in silico</i> de los genes lignina peroxidasa H2 y H8 sintetizados.....	45
5.1.3 Transformación en <i>E. coli</i> y evaluación de integridad	49
5.2 Inserción por recombinación homóloga en la cepa GS115 de <i>Pichia pastoris</i> 53	
5.2.1 Electroporación y evaluación del fenotipo de las cepas.....	53
5.2.2 Selección de cepas recombinantes mediante PCR	54
5.3 Producción de las enzimas Lignina Peroxidasa H8	57
5.3.1 Crecimiento e inducción de cepas y producción de proteínas recombinantes	57
5.3.2 Cuantificación de la producción por el Método de Bradford	58
Capítulo 6: Discusión	61
6.1 Diseño <i>in silico</i> del vector de expresión LipH8	61
6.2 Inserción por recombinación homóloga en la cepa GS115 de <i>Pichia pastoris</i> 62	
6.3 Producción de las enzimas Lignina Peroxidasa H8	63
Capítulo 7: Conclusiones	67
Capítulo 8: Perspectivas	68
Capítulo 9: Bibliografía.....	69
Capítulo 10: Anexos	79
Anexo 1: Protocolos usados	79
1.1: Visualización en geles de agarosa al 1% de productos amplificados.....	79

1.3: Miniprep rápido.	83
1.5: Extracción de DNA genómico mediante técnica TSNT	85
1.6: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	87
1.7: Transformación de <i>E. coli</i> por Shock térmico / calcio competencia	89
1.8: Transformación de <i>Pichia pastoris</i> por electroporación	91
1.9: Generación de biomasa e inducción de la producción en <i>Pichia pastoris</i>. 92	
1.11: Precipitación de proteínas mediante el reactivo metanol-cloroformo.	93
1.12: Cuantificación de proteínas por método de Bradford.	94
1.13: SDS-PAGE [Laemmli] (Mini-PROTEAN® Tetra Cell).	98
1.14: Tinción de geles SDS-PAGE con azul de Coomassie brillante R-250.	102
1.15: Western blot.	103
1.16: Almacenaje a largo plazo de cepas de <i>Pichia pastoris</i>.	105
Anexo 2: Medios de cultivo generales	106
2.1 Medios de cultivo para bacterias gram negativas (<i>E. coli</i>).	107
2.1.1 LB: Caldo de Lisogenia (Luria-Bertani)	107
2.1.2 SB: Superbroth	108
2.1.3 TB: (Terrific broth)	108
2.1.4 SOB: Super Optimal Broth	109
2.1.5 SOC: Super Optimal broth with Catabolite repression	109
2.2: Medios de cultivo para levaduras (<i>Pichia pastoris</i>).	110
2.2.1 YPD: Yeast extract, Peptone, Dextrose:	110
2.2.2: Placas de medio selectivo para levaduras - mínimo dextrosa (MD).	111
2.2.3: Medio de inducción BMMY - medio tamponado en complejo con metanol.	113

Lista de tablas

Tabla 1.- Eventos de mayor relevancia para el establecimiento de la biotecnología y el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante	3
Tabla 2.- Clasificación de acuerdo al color de las aplicaciones de la biotecnología	8
Tabla 3.- Comparativa de los principales sistemas de expresión de proteínas recombinantes.....	13
Tabla 4.- Condiciones para la realización de la curva estándar de proteína.....	38
Tabla 5.- Localización genómica de los genes de H2 y H8 en genomas de referencia de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	44
Tabla 6.- Comparativa entre los parámetros de secuencias codificante usadas para la generación de las tablas de uso de codones.....	49
Tabla 7.- Parámetros usados y valores de constante de tiempo obtenidos durante el proceso de electroporación en <i>E. coli</i> Top10'F.....	50
Tabla 8.- Comparativa de concentración de DNA usado para transformar la cepa <i>Pichia pastoris</i> GS115 y constantes de tiempo obtenidos para cada vector transformado.....	53
Tabla 9.- Proceso de producción durante la generación de proteínas recombinantes mediante la inducción con metanol en <i>Pichia pastoris</i> GS115.....	57
Tabla 10.- Condiciones para la realización de la curva estándar de proteína.....	58

Tabla 11.- Valores de absorbancia, concentración y desviación estándar de proteínas totales de cepas pPIC9K-H8.....59

Lista de figuras

Figura 1.- Ejemplo de un vector de expresión “Shuttle” típico de levadura.....	19
Figura 2.- Ejemplos de vectores de expresión usados con producción extracelular de proteínas mediante el uso del peptidoseñal “factor- α	20
Figura 3.- Evento de recombinación homóloga descrito en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 4.- Evento de reemplazo génico mediante recombinación homóloga en <i>Pichia pastoris</i>	23
Figura 5.- Clasificación de la familia de las LiP’s de acuerdo a la presencia de intrones y exones.....	24
Figura 6.- Estrategia general.....	33
Figura 7.- Alineamiento múltiple de las secuencias comparando la secuencia “canónica” de H8 (uniprot P06181), la secuencia reportada por primera vez y un genoma de referencia (cepa RP 78).....	41
Figura 8.- Alineamiento aminoacídico de las isoenzimas lignina peroxidasa H2 y H8 realizado mediante la plataforma web: BlastP.....	42
Figura 9.- Comparativa entre la secuencia aminoacídica “canónica” para la enzima LiP H2 (P11542) y genomas de referencias de las cepas de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> RP 78 (centro) y ATCC 20696 (superior) realizado con el programa en línea Clustal Omega.....	43
Figura 10.- Plásmidos sintetizados correspondientes a las enzimas LiP H2 y H8.....	46
Figura 11.- Imagen representativa de la secuencia nativa y armonizada obtenida por la herramienta “Codon Harmonizer Tool”.....	47
Figura 12.- Perfil de uso de codones para las secuencias evaluadas	48
Figura 13.- Fotografías representativas de las placas obtenidas de la transformación con los plásmidos de la lignina peroxidasa H2 y H8 y plásmidos de referencia	50
Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v representativo del DNA plasmídico de las cepas TOP10’F transformadas	51
Figura 15.- Comparativa de electroforesis “ <i>in silico</i> ” y experimental de las digestiones de DNA plasmídico con las enzimas <i>Pst</i> I, <i>Ac</i> I, <i>Sma</i> I y <i>Sna</i> BI.....	51

Figura 16.- Electroforesis <i>in silico</i> y experimental de productos amplificados por PCR en gel de agarosa al 2% PCR hacia los iniciadores AOX1.....	52
Figura 17.- Electroforesis “in silico” y experimental de digestiones con las enzimas <i>NlaIII</i> , <i>HphI</i> , <i>AccI</i> , <i>BstEII</i> de productos amplificados hacia los iniciadores AOX1 en productos amplificados de pPIC9K-H2 y H8.....	52
Figura 18.- Representación visual de los sitios de corte de enzimas de restricción y su posición relativa a los genes de LIP H2 y H8.....	54
Figura 19.- Fenotipos de integración posibles por el evento de recombinación homóloga para el gen alcohol oxidasa 1 (AOX1) y amplificación de locus AOX1 en las cepas transformadas <i>P. pastoris</i> GS115.....	55
Figura 20.- Evaluación por amplificación de locus AOX1 en 18 cepas transformadas H8.	56
Figura 21.- Curva estándar de concentración de proteína por el método de Bradford.....	58
Figura 22. - Representación gráfica de la concentración de proteínas totales obtenidas durante la producción bajo inducción en metanol.....	59
Figura 23.- Figura 23.- Gel SDS-PAGE 12% de cepas recombinantes y Western blot de LiP H8.....	60

Abreviaturas

AOX1. Alcohol oxidasa 1 (proteína).

BMMY. Medio amortiguado con metanol.

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético.

E. coli. Escherichia coli, organismo modelo, bacteria gram -.

EK. Enteroquinasa.

D.O. Densidad óptica.

DNA. Ácido desoxirribonucleico.

FLAG. Etiqueta de marcaje de proteína con secuencia aminoacídica DYKDDDDK, con sitio de corte para la enteroquinasa.

HCl. Ácido clorhídrico, ácido fuerte.

GRAS. "Generally regarded as safe".

LB. Medio de lisogenia; "Luria -Bertani".

LiP. Lignina Peroxidasa.

LP. Proteínas del complejo lignocelulolítico.

MD. Minimal dextrose, Medio mínimo dextrosa.

MetOH. Metanol

MnP. Manganeso Peroxidasa.

MQ. Agua desionizada tipo 1, con una resistencia típica de 18.2 MΩ·cm a 25°C.

NaOH. Hidróxido de sodio, Base.

SDS. dodecilsulfato sódico, compuesto tensoactivo aniónico, detergente.

SDS-PAGE. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

PAH's. Hidrocarburos poliaromáticos cíclicos.

PTM. Modificaciones postraduccionales.

TB. Caldo terrífico (Terrific Broth), medio de cultivo para bacterias, incluye glicerol como fuente de carbono, excelente para la preparación de DNA plasmídico.

YPD. Medio general para el crecimiento de levaduras, extracto de levadura, peptona y dextrosa.

WB.

Western

blot.

Capítulo 1: Introducción

1.1: Origen del término “Biotecnología”

La formalización de la biotecnología como una nueva rama del conocimiento inició el 14 de abril de 1917. En cuya fecha un ingeniero agrícola húngaro, Karoly Ereky acuñó el término biotecnología refiriéndose a las líneas de trabajo encaminadas a la creación de productos generados por la manipulación y modificación de recursos naturales mediante el uso de organismos biológicos¹.

Károly Ereky fue un egresado de ingeniería mecánica que trabajó en compañías vienesas de diseño de equipamiento para procesamiento de comida y madera. En 1905 se mudó a Budapest donde se convirtió en profesor asistente en la universidad técnica “József Müegyetemen” y sus intereses se tornaron hacia los problemas concernientes a los excedentes en la producción agrícola. Durante 1905 el ministro de reforma de agricultura húngaro Ignatius Darányi lo envió en un viaje de estudio a Berlín, continuando posteriormente sus estudios sobre desarrollo de la agricultura en Dinamarca en 1909.

Para 1909 había fundado en Budapest “Nagybirtok” [Los Grandes dominios] una granja de producción animal. En 1911 fundó la “Nagybirtokosok Állatértékesít Egyesületét” [Asociación de Terratenientes de Venta Animal] y en 1912, inauguró una compañía de engorda de cerdos para la producción de carne en el distrito de Nagytétény ubicado en las orillas de Budapest, donde se “diseñaban” 10,000 toneladas de grasa a partir de 60,000 toneladas de maíz y Cebada. Él mencionaba el uso de los cerdos como “instrumentos vivos” los cuales producían una ganancia comercial, donde los parámetros “entrada de alimento” y “salida de grasa” jugaban un papel fundamental para su significancia económica².

El primer uso de la palabra biotecnología en un evento público del cual haya evidencia registrada fue el 14 de abril de 1917, en una reunión de la “Magyar Mérnök- és Építész-Egylet” [asociación de ingenieros y arquitectos húngaros] (MMÉE por sus siglas en húngaro) de las divisiones industriales, mecánicas y eléctricas, siendo publicada por primera vez en la revista científica de la misma asociación en los artículos “plantas de gran producción alimenticia I” [Élelmiszertermelő nagyüzemek I] el 10 de julio de 1917 y el 17

de julio de 1917 “plantas de gran producción alimenticia II” [Élelmiszertermelő nagyüzemek II].

Durante 1919 Karoly Ereky profundizó su nuevo concepto en dos publicaciones en alemán, llamados “Nahrungsmittelproduktion und landwirtschaft” [producción de comida y agricultura] y “*Die Großbetriebmäßige Entwicklung der Schweinemast in Ungarn*” [desarrollo en gran escala de engorda de porcinos bajo condiciones normales en Hungría], respectivamente. Pero fue hasta 1919 cuando publicó el libro “Biotechnologie der Fleisch-, Fett-, und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe: für naturwissenschaftlich gebildete Landwirte verfasst” [Biología de la producción de carne, grasa y leche en un gran negocio agrícola: escrito para granjeros educados científicamente] el cual tuvo buenas reseñas cuando el término tomó tracción entre los autores de la época^{3,4}, definiendo por biotecnología a un proceso en el cual se realiza el uso y aprovechamiento del conocimiento científico en base a las leyes presentes en la naturaleza para la creación de tecnologías encaminadas hacia la producción, a partir de materias primas aprovechables para el bienestar humano. Refiriéndose así al uso de recursos obtenidos de organismos biológicos para la producción de bienes materiales de uso común para el humano, como lo son los derivados del ganado porcino sea el cuero, la carne, la grasa y demás productos obtenidos.

Ereky sostenía la idea que las sociedades modernas no se podían sostener con los métodos de producción campesinos por lo que era necesario modernizarlas a través de las ciencias físicas y el conocimiento técnico más avanzado.

El concepto de biotecnología se acuña durante la primera guerra mundial momento en el cual la producción de alimentos en Hungría escaseaba por lo que se buscaban maneras novedosas y eficientes para producir alimentos, nace así el concepto de “animal/máquina productora”, este concepto fue retomado en varios países como Alemania donde se pensó en los microorganismos como máquinas o Estados Unidos de América donde surgió el movimiento “Chemurgy” caracterizado por la síntesis química de productos a partir de residuos agrícolas, siendo en sus inicios usado para la producción de etanol⁵.

Esta corriente de innovación tecnológica fue contemporánea con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, promovió las condiciones para su aislamiento

por parte de los investigadores ingleses Howard Florey, Ernst B. Chain y Norman Heatley, y la realización de las pruebas animales en 1940, Siguieron las pruebas clínicas en 1941, logrando posteriormente su producción en masa mediante tanques agitados con medio de licor de maíz en 1943 en los laboratorios del Northern Regional Research en Peoria, Illinois, generando una cantidad suficiente para satisfacer las necesidades de las fuerzas armadas estadounidenses y sus aliados durante la segunda guerra mundial⁶.

El acuño del término biotecnología y el descubrimiento y posterior producción de la penicilina son dos de los hechos más destacables que hilaron una gran serie de descubrimientos (tabla 1) en distintas disciplinas como la química y la microbiología. Éstos contribuyeron al entendimiento sobre las bases fundamentales de la vida, lo que permitió establecer las técnicas para su aprovechamiento en situaciones prácticas cubriendo necesidades básicas de los individuos como la alimentación y la salud.

Ejemplos de dichos descubrimientos son:

Tabla 1.- Eventos de mayor relevancia para el establecimiento de la biotecnología y el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante.		
Año	Descubrimiento	Personaje/institución involucrado(a)
Establecimiento de las bases de la bioquímica		
1735	Publicación del libro “Systema Naturæ”.	Carlos Linneo
1859	Publicación del libro “El origen de las especies”.	Charles Darwin
1866	Acuño del término filogenia.	Ernst Haeckel
1866	Establecimiento de las leyes mendelianas.	Gregor Mendel
1862	Demostración del cultivo estéril en medio.	Louis Pasteur
1869	Aislamiento e identificación de los ácidos nucleicos.	Johann Miescher Friedrich
1878	Acuño del término “enzima”.	Wilhelm Friedrich Kühne

1885	Aislamiento y clasificación temprana de <i>Escherichia coli</i> .	Theodor Escherich
1885, 1891	Aislamiento y descripción de las bases nitrogenadas presentes en los ácidos nucleicos.	Albrecht Kossel
1888	Descripción y acuño del término cromosoma.	Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz
1902	Asociación de los cromosomas con los factores hereditarios que contemplan las leyes de Mendel.	Theodor Boveri y Walter Sutton
1917	Acuño del concepto de biotecnología.	Karoly Ereky
1928	Descubrimiento del “principio transformante”.	Frederick Griffith
EL DNA como molécula de almacenaje de la información genética		
1944	Atribución del “principio transformante” al DNA.	Oswald T. Avery, Colin Macleod, Maclyn McCarty.
1952	Toma de la primera fotografía del DNA mostrando un patrón helicoidal por cristalografía de rayos X.	Rosalind Franklin
1953	Descubrimiento de la estructura tridimensional del DNA.	James Watson and Francis Crick
1952, 1954	Secuenciación de la insulina y descripción de su puente disulfuro.	Frederick Sanger
1954	Descubrimiento de la RNA polimerasa.	Severo Ochoa
1955	Descubrimiento de los ribosomas	George E. Palade
1956	Descubrimiento de la DNA polimerasa.	Arthur Kornberg
1958	Demostración del carácter semiconservativo del DNA	Matthew Meselson y Franklin Stahl
1960	Descripción del Modelo del Operón.	François Jacob y Jacques Monod
1963	Descripción de las modificaciones	Akira Kaji, Hideko Kaji

	postraduccionales.	y David Novelli
1964	Elucidación de la naturaleza en tripletes del código genético.	Marshall W. Nirenberg y Philip Leder
1966	Identificación de los fragmentos de Okazaki en <i>E. coli</i> .	Kiwako Sakabe y Reiji Okazaki
1967	Descubrimiento de la ligasa T4.	Bernard Weiss y Charles C. Richardson
Establecimiento de las bases de la biotecnología industrial y sus primeros productos		
1970	Purificación de las enzimas de restricción tipo II “sitio específico”, <i>HindII</i> .	Hamilton O. Smith
	Descubrimiento sobre la función del RNAm en la síntesis de proteínas.	Walter Gilbert
1975	Secuenciación de DNA.	Frederick Sanger
	Descripción de la metilación del DNA.	Arthur D. Riggs
	Desarrollo de los anticuerpos monoclonales.	Georges Köhler, César Milstein.
1978	Se identifica la caja TATA	David Swenson Hogness
	Se crea la primera versión sintética del gen de la insulina humana en el laboratorio Genetech y posteriormente la comercializa la compañía Ely Lilly & Co.	Herbert Boyer y Stanley Cohen
1980	Se concede la patente sobre una cepa modificada de <i>Pseudomonas putida</i> capaz de degradar hidrocarburos mediante la adición de plásmidos con los genes degradadores de hidrocarburo, primer precedente legal para patentar organismos modificados genéticamente.	Ananda Mohan Chakrabarty
1981	El primer animal transgénico con transmisión germinal es producido mediante la microinyección de un plásmido bacteriano con fragmentos del virus SV40	Frank Ruddle, Frank Constantini, Elizabeth Lacy, Ralph Brinster y Richard Palmiter
1982	Aprobación por la FDA de la “humulina” versión	

	recombinante de la insulina producida en <i>E. coli</i> .	
1983	Diseño de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Kary Mullis
1984	Descubrimiento de regiones “núcleo” en minisatélites y creación de la técnica DNA fingerprinting en base a los patrones descubiertos.	Alec Jeffreys
	Primer uso reportado de la levadura <i>saccharomyces cerevisiae</i> como sistema de expresión de proteínas recombinantes.	Grant A. Bitter Kevin M.Egan
1985	Establecimiento de <i>Pichia pastoris</i> como modelo de producción de proteínas recombinantes a nivel industrial.	J M Cregg, K J Barringer, A Y Hessler, K R Madden
1986	Primera vacuna recombinante (Hepatitis B) para uso humano.	Pablo DT Valenzuela
	Primera medicamento anticancerígeno es producido por el uso de biotecnología.	
La secuenciación del genoma como herramienta para la investigación y la democratización de las tecnologías genómicas		
1990	Inició del proyecto de secuenciación del genoma humano.	Department of Energy (DOE), National Institutes of Health (NIH)
1996	Secuenciación de genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
1998	Establecimiento de las líneas de células madre embrionarias.	
2000	Publicación de la secuencia del organismo modelo de la mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>).	
2001	Publicación del boceto del genoma humano.	
2002	Publicación del boceto del genoma del ratón.	
2003	Fin del proyecto del genoma humano.	
2009	Publicación del genoma de <i>Pichia pastoris</i> . GS115	

2013	Edición genómica basada en el sistema CRISPR/Cas	Le Cong, F. Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D. Hsu, Xuebing Wu, Wenyan Jiang, Luciano A. Marraffini, Feng Zhang
2015	Estudios metabólicos sobre la utilización de metanol/glicerol en <i>Pichia pastoris</i>	
2016	Genoma de referencia de <i>Pichia pastoris</i> refinado y comparación de cepas disponible en pichiagenome.org	
	Edición genómica CRISPR/Cas en <i>Pichia pastoris</i>	Astrid Weninger Anna-Maria Hatzl Christian Schmid, Thomas Vogl, Anton Glieder

1.2: La biotecnología como herramienta para el desarrollo:

Los descubrimientos mencionados previamente, asentaron las bases para el establecimiento de técnicas para la producción de proteínas a nivel industrial y esto repercutió en rubros como la agricultura, ganadería, medicina y algunos procesos industriales como la industria del papel y la biorremediación.

Comenzó una tendencia de asociar las aplicaciones con colores (tabla 2) surgiendo conceptos como la “revolución verde” de las aplicaciones ambientales, o la explotación de la biotecnología azul refiriéndose a los recursos marinos, también se ha mencionado el uso de la biotecnología roja para combatir las enfermedades asociadas a la pobreza, englobando a las aplicaciones médicas de la biotecnología como el uso de mosquitos modificados genéticamente para combatir la malaria o el uso del “arroz dorado” para combatir la deficiencia de vitamina A, debido a estas asociaciones comunes entre aplicaciones y colores se ha propuesto un código de color basado en áreas de aplicación⁷.

Tabla 2.-Clasificación de acuerdo con el color de las aplicaciones de la biotecnología (rainbow code of biotech)]

Área	Aplicación
Médicas (Rojo)	<p>Moléculas farmacológicamente activas</p> <p>Producción de hormonas, vacunas, investigación y diagnóstico de enfermedades hereditarias y genéticas.</p> <p>Xenotransplantes de órganos “humanizados”.</p> <p>Modelos de enfermedades humanas como cerdos con enfermedades cardíacas o fibrosis cística, identificación de organismos patógenos, farmacogenómica, proteómica, epidemiología molecular, medicina preventiva.</p>
Industriales (Gris)	<p>Enzimas de importancia industrial (celulolíticas para la industria del papel, bioplásticos, biocombustibles, productos biodegradables), biominería.</p>
Procesos acuáticos (Azul)	<p>Eliminación de contaminantes (metales pesados, compuestos orgánicos, aguas residuales), biorremediación, investigación de especies marítimas, producción de peces transgénicos.</p>
Agrícola, Medio ambiente (Verde)	<p>Variedades mejoradas con mayor producción por manejo genético, organismos modificados genéticamente con resistencia a plagas, herbicidas o factores ambientales de estrés, manejo biológico de plagas.</p> <p>Biorremediación, control de olores, degradación de material orgánico.</p>

Nutricional (Amarillo)	Análisis de los factores endógenos genéticos que afectan la producción de propiedades organolépticas en alimentos, Investigación del metabolismo y su asociación con la dieta.
Bioinformática, Nanotecnología (Dorado)	Predicción de posibles proteínas, diseño de proteínas “optimizadas” (ingeniería metabólica), análisis evolutivos (filogenia), estadísticos, experimentación “ <i>in silico</i> ”, paleo genómica, Investigación de circuitos biológicos, Lab-on-chip, microfluídica.
Fermentaciones	Producción de bebidas alcohólicas, pan y productos lácteos.
Nota* Codificación de color basado en: The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind ⁷ .	

1.3: Sistema de expresión de proteínas recombinantes

Para la producción de proteínas recombinantes se utilizan diversos sistemas de expresión, que consisten en el uso o adaptación de organismos en los que se insertan y expresan genes de manera heteróloga; Esto se logra mediante el uso de vectores de expresión que funcionan como vehículos para la transferencia y posterior expresión del gen insertado en un marco de lectura abierto apropiado en el organismo deseado.

Tras el aislamiento y posterior ligación del gen deseado se pueden producir moléculas de DNA con la capacidad de codificar a las proteínas de interés, para llegar a producir dichas moléculas la secuencia correspondiente al gen de la molécula a producir debe ser insertada en un vehículo apropiado para su producción recombinantes, en el caso de los plásmidos los elementos necesarios son:

- Promotor, el cual dictará la producción del gen de interés (los cuales son usualmente controlados por promotores nativos del organismo a utilizar).
- Sitio múltiple de clonación, donde será insertado el DNA a expresar.
- Genes de selección (usualmente genes de resistencia antibiótico), los cuales permitirán las cepas recombinantes.
- Genes reporteros los cuales servirán permitirán conocer la correcta expresión del gen de interés.
- Origen de replicación, el cual dará la capacidad de autorreplicarse a la molécula recombinante.

La transferencia del material genético se puede realizar de mediante el uso de plásmidos los cuales son fragmentos independientes del genoma con capacidad de replicación que confieren características deseables al organismo a usar, o mediante mecanismos de recombinación para la inserción de los genes de interés dentro del genoma obteniéndose en ambos casos organismos modificados genéticamente con la capacidad de producir las proteínas de interés.

Existe una amplia gama de organismos modelo para la producción de proteínas recombinantes, siendo el más conocido y caracterizado la bacteria gram negativa *Escherichia coli*, la cual se ha establecido desde los inicios de la ingeniería genética como procarionta modelo por excelencia para la producción de proteínas recombinantes debido a sus bajos tiempos de replicación, bajo costo de mantenimiento, fácil manipulación, entre otras características, descritas a mayor detalle en la tabla (3) a continuación, sin embargo sufre de varias desventajas en comparación a modelos eucarióticos para la producción de proteínas con alta complejidad estructural como son aquellas que presentan la formación de dominios compuestos por subunidades, moléculas que incorporan grupos prostéticos no presentes en procariontas como las hemoproteínas y la incapacidad de producir perfiles de glicosilación parecidos al humano, siendo estas características menos que ideales para la producción de proteínas recombinantes provenientes de un organismo eucariótico o en específico de proteínas de humano; como alternativa al uso de *Escherichia coli* se implementado el uso de

organismos modelo pertenecientes al género eucariótico, teniéndose al uso de las levaduras destacando en específico *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* como un término medio entre las características de los sistemas eucarióticos y procariotas, siendo su principal desventaja la incorporación de perfiles de glicosilación distintos a los presentes en las proteínas de eucariotas superiores, debido a esto se han diseñado cepas modificadas mediante ingeniería genética para realizar el procesamiento con resultados similares a los presentes en el humano tal es el caso de la cepa Glycoswitch® producida por BioGrammatics la cual ha sido usada para la producción de una enzima serin-proteasa llamada “quimasa” usualmente presente en mastocitos^{8,9}.

Existen modelos de expresión de proteínas recombinantes basados en cultivos celulares inmortalizados como son los sistemas de expresión basados en células de insecto/baculovirus (SF9) o de mamíferos como las células de ovario de hámster chino CHO, células de riñón de hámster bebe (BHK21), células de mieloma murino (NS0 y Sp2/0), estos modelos más cercanos a los eucariotas superiores presentan la ventaja de realizar modificaciones postraduccionales complejas y presentar altos niveles de proteína expresada, sin embargo presentan las desventajas de utilizar medios de cultivo caros, procesos de manipulación complejos, tasas de costo/producción bajas, y producir modificaciones postraduccionales (PTM) que no son expresadas en los humanos, como la galactosa- α 1,3-galactosa (α -gal) y el ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) los cuales pueden causar problemas en su uso en la producción de fármacos ya que los humanos poseen anticuerpos hacia ese tipo de N-glicanos.

Los cultivos celulares basados en cultivos humanos evitan el último problema antes mencionado teniendo la ventaja de las modificaciones postraduccionales más fieles a las presentes en los organismos superiores, siendo el mayor ejemplo los patrones de glicosilación, sin embargo los problema asociados a estos sistemas de expresión son, la contaminación con otros microorganismos ya sean con micoplasmas¹⁰, o con otras líneas celulares siendo la más común HeLa, provocando el uso de cepas mal identificadas, lo que causa incertidumbre y baja

reproducibilidad en los resultados obtenidos durante los experimentos^{11,12}, estas posibles causas de error pueden ser identificadas en debido momento mediante el uso de análisis por STR para la identificación de líneas celulares y el uso del cultivo microbiológico son métodos efectivos precautorios para la identificación de posibles contaminantes en los cultivos celulares¹³.

Tabla 3.- Comparativa de los principales sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Organismo	CARACTERÍSTICAS
Bacterianos (<i>E. coli</i>)	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formación de cuerpos de inclusión. • Resistencia mecánica al estrés. • Sistemas de expresión establecidos. • Bajo costo de mantenimiento. • fácil manipulación del Organismo. • Organismo usado habitualmente en laboratorio. • Capacidad de escalamiento del proceso. • Tiempos de duplicación cortos (20 minutos). <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Proteólisis interna. • Plegamiento adicional para obtener biomoléculas en su forma funcional. • Baja formación de puentes disulfuro. • No soporta modificaciones postraduccionales. • (N-glicosilación, O-glicosilación, amidación, hidroxilación, miristoilación, palmitación o sulfación). • La estabilidad del inserto es dependiente de la selección con antibiótico o medio selectivo. <p>Características de producción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inserción, expresión y evaluación de cepas recombinantes rápido (~1-2 semanas).

Ventajas:

- Formación de cuerpos de inclusión.
- Resistencia mecánica al estrés.
- Sistemas de expresión establecidos.
- Bajo costo de mantenimiento.
- Fácil manipulación del Organismo.
- Organismo caracterizado y usado habitualmente en laboratorio.
- Capacidad de escalamiento del proceso.
- Corto tiempo de expresión de proteínas recombinantes.
- Modificaciones postraduccionales (glicosilación, metilación acilación).
- *Pichia pastoris*- N-glicosilación de 8-17 manosas.
- *Saccharomyces cerevisiae* - 50-150 manosas.
- Capacidad de escalamiento del proceso.
- Resistencia al estrés mecánico.
- No produce endotoxinas.
- Producción celular eficiente (alta expresión, estrictamente regulada [AOXI]).
- Secreción al medio de cultivo.
- Se han producido hormonas.
- GRAS en el sistema 2006.

Desventajas:

- Adición de O-glicosilaciones no observadas en células de mamífero.

Características de producción:

- Inserción, expresión y evaluación de cepas recombinantes - medio (~2-4 semanas).

Baculovirus/Células de insecto

Ventajas:

- Modificaciones postraduccionales parecidas a las humanas.
- Eficiente formación de puentes disulfuro.
- Capacidad de plegamiento correcto de las proteínas recombinantes.

Desventajas:

- Alto costo de mantenimiento (medios de cultivo caros, uso de CO₂).
- Requiere condiciones de esterilidad estrictas.
- Uso de equipo especializado.
- Resiembra continua / Tiempo de vida corto.
- Difícil de escalar.

Características de producción:

- Inserción, expresión y evaluación de cepas recombinantes - Medio (~3 semanas)

<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Tejidos animales en cultivo</p>	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Modificaciones postraduccionales parecidas a las humanas. • Capacidad de plegamiento correcto de las proteínas recombinantes. • Capacidad de producir proteínas estructuralmente complejas, de múltiples subunidades. <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alto costo de mantenimiento. • Requiere condiciones de esterilidad estrictas. • Uso de equipo especializado. • Resiembra continua / Tiempo de vida corto. • Difícil de escalar. • Baja densidad celular. • Contaminación cruzada. <p>Características de producción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inserción, expresión y evaluación de cepas recombinantes - Lento (meses).
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Animales transgénicos (Vacas, Ovejas)</p>	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fácil purificación de la proteína recombinante. • Producto comercializable sin pasar por purificación. <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Difícil establecimiento del sistema. <p>Características de producción:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inserción, expresión y evaluación de cepas recombinantes - Lento (meses-años).
<p>Adaptado de: Chapter 11 “Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein”, Methods in Enzymology, Volume 463, DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63011-1.¹⁴</p>	

1.4: *Pichia pastoris* como modelo de expresión de proteínas recombinantes

Las principales características de interés de *Pichia pastoris* como modelo de expresión de proteínas recombinantes incluyen: bajos niveles de proteínas endógenas, uso de promotores inducible mediante metanol como fuente de carbono (30% de la proteína celular), secreción de proteínas al medio de cultivo, alta densidad celular >130 g peso seco por litro, tiempo de duplicación de 90 minutos, crecimiento en un intervalo de pH de 3 - 6.5, almacenaje de alrededor de 1 año en placas a 4°C^{15,16}.

Pichia pastoris (*Komagataella Phaffii*) al ser un organismo eucariótico presenta modificaciones postraduccionales más similares a los de eucariotas superiores (procesamiento de péptido señal, plegamiento “folding” correcto, formación de puentes disulfuro, N-glicosilación y O-glicosilación, debido a las características previamente descritas *Pichia pastoris* es uno de los sistemas de expresión eucarióticos predilectos para la producción de proteínas recombinantes¹⁷.

El hábitat natural de *Pichia pastoris* corresponde a corteza de roble y alimentos empacados, puede crecer en una amplia variedad de medios de carbono como glucosa, glicerol, fructosa, sorbitol, etanol, metanol, alanina, lisina, succinato, etilamina, cadaverina, glucitol, manitol, L-rhamnosa y trehalosa.

Pichia pastoris no crece en galactosa, arabinosa, ribosa, maltosa, sucrosa, lactosa, rafinosa, melibiosa, celulosa o almidón, puede crecer en sucrosa, sometida al proceso de esterilización por autoclave debido a la ruptura de la sucrosa en glucosa y fructosa¹⁵.

Su tiempo de duplicación es de 90 minutos en glucosa y aproximadamente de 6 horas en metanol. En medio sólido forma colonias blancas color crema no filamentosas, presentado bajo observación en microscopio múltiples yemas, su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C con agitación a 250 rpm para cultivos líquidos. El almacenamiento de *Pichia pastoris* deberá ser a 4°C en medio YPD líquido o en placas de Petri¹⁵.

Maccani y colaboradores¹⁸ reportaron una comparación entre la eficiencia de la producción de proteínas humanas evaluando la producción de el anticuerpo anti-HIV-1 “3D6scFv-Fc” y la albúmina de suero humano donde mencionan que la capacidad de la producción en *Pichia pastoris* es dependiente de la complejidad de la proteína recombinante a producir siendo de mayor producción para proteínas menos complejas.

Dentro de las capacidades metabólicas de *Pichia pastoris* recientemente se ha demostrado que disminuye su capacidad de demanda de energía 3 veces durante condiciones de crecimiento lento lo que le permite sobrevivir con menos demanda de sustrato a comparación de *Saccharomyces cerevisiae*¹⁹.

Los vectores usados en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* pertenecen al tipo acarreador/lanzadera o “*Shuttle*” en inglés por su capacidad de ser replicados en *E. coli* mientras que la expresión de su gen de interés se realiza en *Pichia pastoris* (figura 4), presentando marcadores funcionales en uno o ambos organismos, la mayoría de estos vectores contienen un sitio múltiple de clonación (MCS, por sus siglas en inglés) flanqueado por una secuencia promotoras y terminadora del gen *AOX1* de *Pichia pastoris*, adicionalmente existen vectores que permiten la secreción de proteínas heterólogas mediante el uso de señales de secreción como el factor de apareamiento α de *S. cerevisiae*, como es el caso de pPIC9, o el factor de secreción de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* como en el vector pHIL-S1^{20,21}.

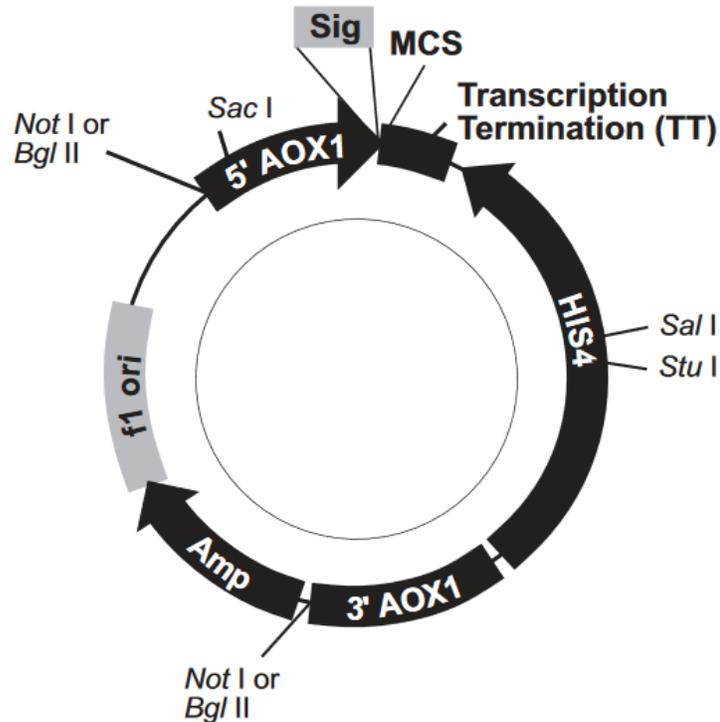


Figura 1.- Ejemplo de un vector de expresión “Shuttle” típico de levadura. Se enlistan los elementos que lo componen: **5' AOX1**.-Elemento promotor del gen alcohol oxidasa 1 de *Pichia pastoris*. **Sig**.- secuencia péptido señal. **MCS**.- Sitio múltiple de clonación. **TT**.- Terminador de la transcripción. **HIS4**.- marcador de auxotrofia basado en el gen Histidinol deshidrogenasa. **3'AOX1**.- elemento 3' del gen del gen alcohol oxigenasa de *Pichia pastoris*. **Amp**.- Marcador de resistencia a antibiótico, Ampicilina. **F1 Ori**.- Origen de replicación bacteriano. **Sitios de restricción** marcados en las inmediaciones del plásmido ejemplo.⁸¹

Además de lo anterior mencionado existen vectores para generación de cepas multicopias in vivo que permiten una inserción estable de varias copias del gen de interés por mecanismos de recombinación homóloga como son el caso de pPIC3.5, pPIC6, pPIC6 α , pPIC9K, pPICZ, pPICZ α y pGAPZ, pGAPZ α , pFLD, pFLD α y pAO8015 siendo el último mencionado el único vector de expresión multicopia “*in vitro*”.

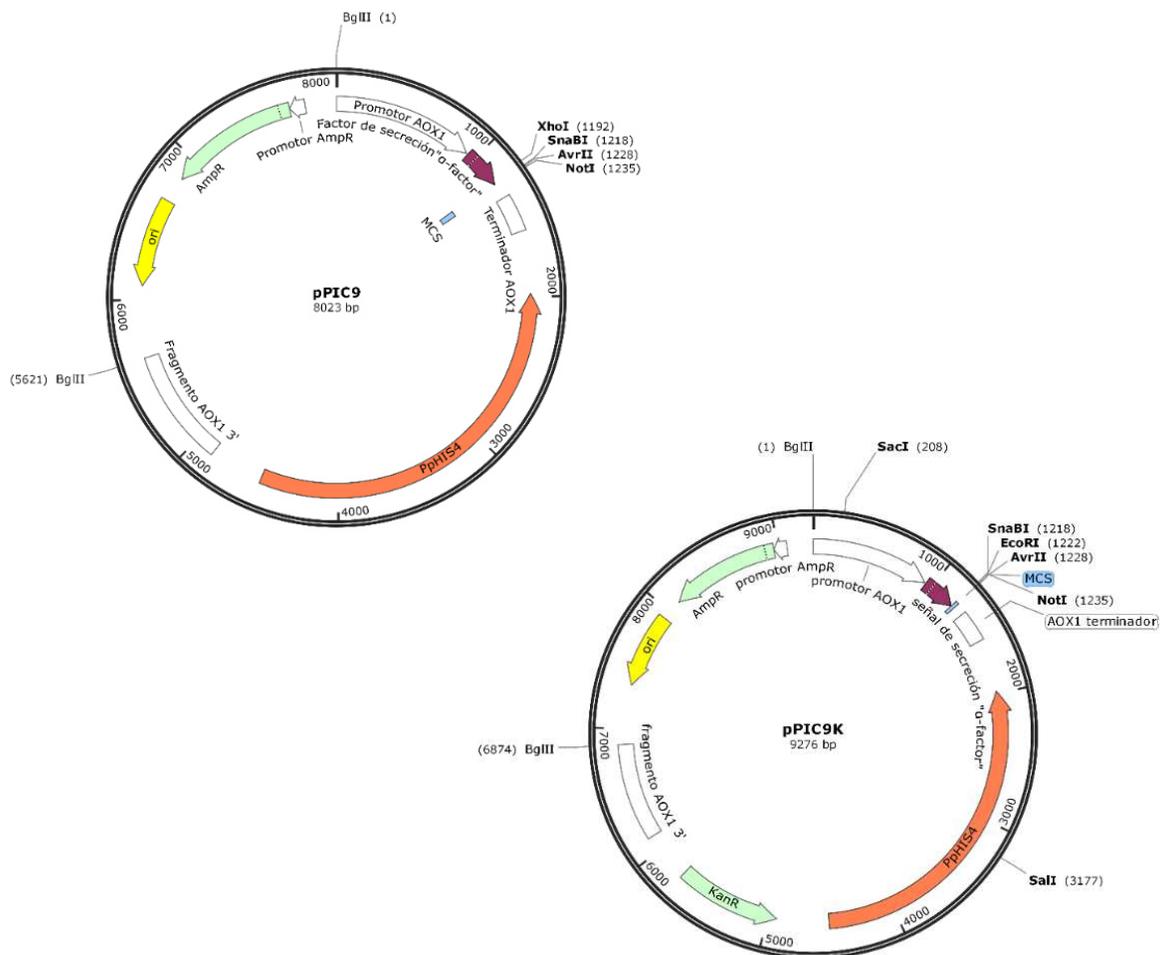


Figura 2.- Ejemplos de vectores de expresión usados con producción extracelular de proteínas mediante el uso del peptidoseñal “factor- α ” para la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (pPIC9, monocopia, pPIC9K, multicopia)⁸².

1.5: Evento de recombinación homóloga

La integración en el genoma de *Pichia pastoris* ocurre debido a un evento conocido como recombinación homóloga donde se explota la capacidad de recombinación génica de los extremos de DNA libre en la transformación de DNA para estimular la recombinación al interactuar directamente con secuencias homólogas en el genoma proceso que fue observado y descrito en *Saccharomyces cerevisiae* ²².

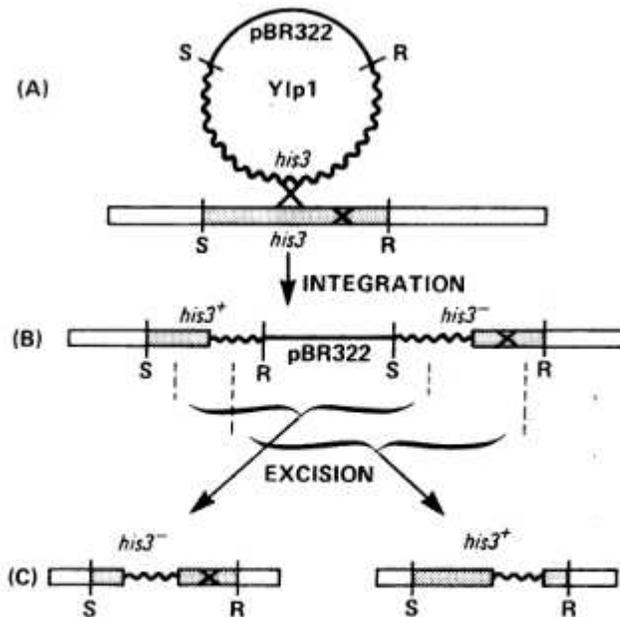


FIG. 4. (A) Homologous recombination at *his3* sequences between YIp1 and yeast chromosomal DNAs. (B) Integrated structure of a low-frequency transformant. (C) Possible structures after excision of transforming DNA. The *his3*-532 lesion maps in the middle of all cloned His⁺ DNA fragments used in this paper (unpublished data).

Figura 3.- **Evento de recombinación homóloga descrito en *Saccharomyces cerevisiae***. El evento de recombinación genera la integración del vector YIp1 en el genoma, el cual es fusión de un vector pBR322 conteniendo un gen de *Saccharomyces cerevisiae* correspondiente al gen de imidazol, glicerol-fosfato deshidratasa, enzima de la familia de las liasas la cual causa auxotrofia hacia la histidina al ser mutada²¹.

La integración del casete de expresión en *Pichia pastoris* en el cromosoma en una región específica del locus se utiliza para generar transformantes estables genéticamente, durante el establecimiento de *Pichia pastoris* como modelo de expresión se explotó la similitud entre las secuencias de genes nativos de *Saccharomyces cerevisiae* para establecer marcadores de auxotrofia como el gen *HIS4*²⁰, esto debido a que la integración cromosomal es más deseable que el uso de los sistemas de expresión de plásmidos episomales los cuales tienden a tener un bajo número de copias, su estabilidad es dependiente del tamaño del plásmido el cual se puede perder durante generaciones repetidas debido a que son mitóticamente inestables y conllevan el uso continuo de medios selectivos los cuales suelen contener aditivos como los antibióticos los que elevan el costo de producción, por lo que es deseable la producción el desarrollo de cepas de expresión genéticamente estable sin pérdida del vector en ausencia de marcadores de selección²³.

1.6: Fenotipos obtenidos a partir del evento de recombinación homóloga: ¿cepas Mut⁺ o Mut⁻?

La capacidad de crecimiento mediante la inducción del metanol para las cepas de *Pichia pastoris* es determinado mediante la transformación de la cepa con DNA linealizado conteniendo el gen de interés junto al gen *HIS4* (histidinol deshidrogenasa) como marcador de selección, siendo ambos flanqueados hacia los extremos homólogos para las regiones 5' y 3' del locus cromosómico *AOX1* en el ejemplo ilustrado, el DNA linealizado fue digerido con *BglII*, en el caso representado se obtiene una sustitución del gen *AOX1* con el gen a clonar ocasionando que el fenotipo de las transformantes sea de crecimiento lento (Mut⁻) en placas de medio mínimo (MM) debido a la eliminación de las copias nativas del gen de la alcohol deshidrogenasa en comparación con las células intactas con metabolismo normal para el metanol (Mut⁺).

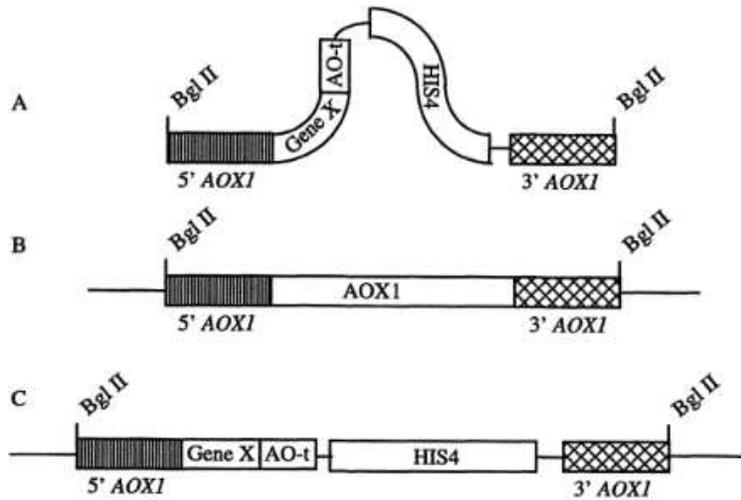


Figura 4.- Evento de reemplazo génico mediante recombinación homóloga en *Pichia pastoris*. El evento ocurre entre una secuencia linealizada correspondiente a una unidad transcripcional flanqueada por extremos correspondientes a la secuencia nativa dentro del genoma de *Pichia pastoris* del gen de la Histidinol deshidrogenasa¹⁵.

Capítulo 2: Antecedentes

2.1: Descripción general de la enzima “Lignina Peroxidasa”

La familia de las ligninas peroxidadas está compuesta por genes compuestos de ocho a nueve intrones de los cuales seis se encuentran en posiciones idénticas en cada gen (figura 5), Con una longitud de 48 hasta 78 pb, donde la región adyacente a sitio de inicio de la transcripción está representada por una secuencia consenso CAMMATGNC.

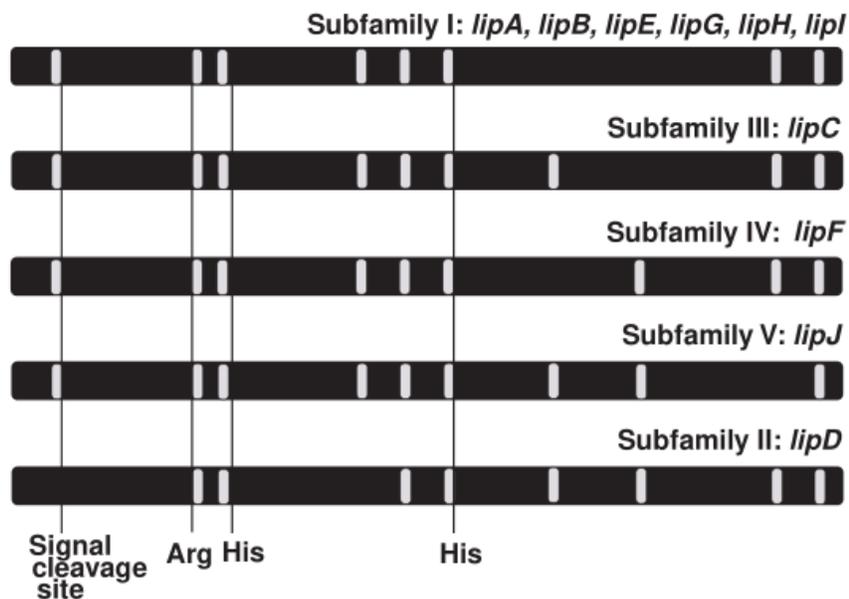


Figura 5.- Clasificación de la familia de las LiP's de acuerdo con la presencia de intrones y exones. Los intrones/exones están representados como barras blancas y negras respectivamente, las localizaciones de los aminoácidos conservados coordinan la posición del grupo hemo, la posición relativa del sitio de corte del péptido señal está marcada²⁵.

Cada proteína de la familia de las ligninas peroxidadas codifican para enzimas maduras de 343/344 aminoácidos con un péptido señal de 27-28 aminoácidos, las secuencias intrónicas se adhieren a la regla GT-AG y a la secuencia consenso 5'-NNHTNAY-3' donde la longitud de los intrones es constante, aproximadamente 50 pb; El promotor de las LiP's consiste de una caja TATA en la posición 66-81 pb

antes del codón de inicio y una secuencia CAAT situada en la región río abajo - 107 a 228 pb, también es regulada por una región dependiente de cAMP, XRE y la proteína tipo factor AP-2²⁴.

La identificación de hemoproteínas con actividad degradadora de lignina presentes en el organismo *Phanerochaete chrysosporium* fue estudiada en 1984²⁶, posteriormente en 1986 Murtagh y Farrell a partir de este hongo clasificaron 10 hemoproteínas con actividad de lignina peroxidasa de acuerdo a su orden de elución en una columna de intercambio aniónico siendo 4 de estas dependientes de la presencia de magnesio, encontrándose en todas una alta homología en su estructura y con los tamaños de 37 a 42 kDa, de las 10 hemoproteínas identificadas, los picos predominantes con actividad específica contra el alcohol veratrílico fueron las correspondientes a H2, H6 y H8, siendo la última encontrada en mayor concentración y las primeras 2 con un mayor valor de actividad específica en la oxidación del alcohol veratrílico²⁷.

En la naturaleza existen dos tipos principales de hongos degradadores de la madera, los hongos blancos de la podredumbre capaces de degradar lignina, celulosa y hemicelulosa y los hongos cafés de la podredumbre con la capacidad de degradar solamente celulosa y hemicelulosa, ambos tipos de hongos presentan maquinarias moleculares distintas para degradar la madera. Sorprendentemente al hacerse análisis moleculares de secuencias de DNA mitocondrial y ribosomal de la subunidad pequeña se hallaron estrechamente relacionadas²⁸. Entre ambos tipos de hongos se ha propuesto un antecesor evolutivo común, pero la presencia de transformación bidireccional entre hongos blancos y cafés de la podredumbre, no había sido explicado con certeza, Zhou, Wei & Dai²⁹ al analizar secuencias correspondientes a genes de LP's (Peroxidasas lignocelulolíticas) mencionan que la diversidad de secuencias de LP's puedan ser fruto de eventos tempranos de duplicación génica previa a eventos de especiación donde posteriormente debido al efecto de evolución nacimiento-y-muerte (birth-and-death) se obtuvieron variedades de LP's distintas a sus ancestros, mientras que los patrones de intrones genero específico pueden ser causados por eventos de duplicación

intraespecie/intragénero debido a evolución concertada para los genes de la LiP's, mencionando que la cantidad de MnPI, MnPII, VP, LiP, VP y CII fue demasiado baja para determinar con exactitud los procesos de evolución concertada y nacimiento-y-muerte.

Los hongos de la podredumbre blanca como *Phanerochaete chrysosporium* son organismos ubicuos usados en procesos de biorremediación por su capacidad de producción de enzimas lignocelulolíticas como la lignina peroxidasa cuya actividad degradadora de lignina se ha evaluado para la degradación de distintos compuestos, lo que se ha convertido en un tema importante y de interés para su uso en el tratamiento de aguas residuales y su producción para aplicaciones distintas de interés comercial³⁰.

El uso directo de las enzimas aisladas de los hongos de la podredumbre blanca se ha identificado como una alternativa para eliminar los problemas relacionados con la generación de la biomasa y el crecimiento a gran escala del organismo, así como los tiempos largos de incubación y los efectos asociados a la exposición de contaminantes en el micelio, de esta forma se logra un mayor control del proceso³¹.

2.2: Producción recombinante de enzimas lignocelulolíticas

Dentro de los retos que se han establecido para la producción recombinante de las enzimas lignocelulolíticas se encuentran la optimización de la expresión, caracterización intensiva y el análisis de la estructura de las enzimas y sus mecanismos de acción, sugiriéndose que hasta el momento solo el conjunto de varias enzimas lignocelulolíticas permite la degradación exitosa de la lignina³².

La producción recombinante de una enzima degradadora de lignina activa en *E. coli* fue lograda por primera vez en 1996 por Withman & Tien³³, siendo la MnP H4 reconstituida mediante el post-plegamiento de cuerpos de inclusión los cuales contenían la enzima recombinante inactiva logrando su correcto funcionamiento, obteniéndose su actividad cinética idéntica a la proteína nativa mediante la adición

de los cofactores necesarios para el correcto funcionamiento del sitio activo de la enzima, siendo que tras la adición de CaCl_2 y del grupo prostético Hemo se obtuvo la recuperación de su actividad, observándose que ambos son necesarios para la actividad de dicha peroxidasa, esta estrategia había sido previamente usada con éxito para la reconstitución de la peroxidasa del rábano picante (HRP por sus siglas en inglés)³⁴.

La producción de la isoforma H2 de la lignina peroxidasa ha sido previamente evaluada en distintos sistemas de expresión como lo son *Escherichia coli*³⁵, *Aspergillus niger* (hongo degradador de contaminantes en aguas residuales del aceite de oliva³⁶), obteniéndose niveles bajos de producción y estructuras con formas inactivas, por lo que se presenta una complejidad adicional de un ensamblaje *in vitro* para lograr su actividad, no fue sino en el 2009 que se logró la producción de la isoenzima H2 en un sistema de expresión multicopia de *Pichia pastoris* con rendimiento de hasta 100 mg/L³⁷, de igual manera la producción de la isoenzima H8 con buena producción cantidad de proteína producida.

El uso del péptido señal “factor- α ” para la producción y secreción a medio de cultivo ha sido reportado con éxito para la producción tanto de LiP³⁷ como de MnP³⁸.

2.3: Usos y aplicaciones de la lignina peroxidasa

Los posibles productos recombinantes de la producción de la enzima lignina peroxidasa H8 de *Phanerochaete chrysosporium* pueden ser aplicados en:

El uso directo del medio de cultivo dializado que contiene a LiPH8 recombinante para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con uno o varios de los siguientes compuestos: Colorantes, xenobióticos, pesticidas, plaguicidas, compuestos fenólicos, PAH's, o que en su estructura presenten un anillo aromático; O bien el uso directo de medio dializado para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la degradación del material lignocelulolítico en los procesos industriales de producción del azúcar, (facilitando la separación de la

misma) así como un posible precursor para la generación de biocombustibles derivados del material lignocelulósico.

Aplicación de las ligninas peroxidasa para la generación de productos derivados de la lignina como:

Derivados aromáticos de la lignina BTX (benceno, tolueno, xileno) o de interés alimenticio como generar saborizantes o bien mejorar las propiedades organolépticas teniendo como ejemplo la producción de vainillina.

La aplicación directa de las peroxidases como agente decolorante en el proceso conocido como “bleaching” o blanqueado en el tratamiento de la mezcilla, que es una alternativa a los agentes químicos usados como lo son algunos ácidos, bases y el cloro para la generación de acabados con fines estéticos en la elaboración de prendas de vestir como en el caso de la mezcilla.

Su aplicación en la industria cosmecéutica como alternativa segura a los procesos tradicionales de eliminación de la hiperpigmentación causada por un exceso en la producción de melanina en ciertas zonas de la epidermis.

Las aplicaciones descritas repercutirían en la sociedad al disminuir los costos asociados en los procesos de tratamiento de agua residuales por la presencia de contaminantes en los efluentes a partir de las industrias textiles y de la producción del papel, instituciones públicas como centros hospitalarios, oficinas gubernamentales y centros urbanos.

Adicionalmente permitirían establecer procesos ecológicamente responsables de descontaminación de efluentes y de bajo impacto para los ecosistemas afectados por medio de la disminución del uso de agentes contaminantes y/o tóxicos en los procesos anteriormente descritos.

Disminuir los costos de proceso y los efectos contaminantes del pretratamiento de la madera y residuos lignocelulósicos, así como de los procesos de decoloración de telas.

Los usuarios beneficiados por los resultados del proyecto incluirían:

- Las comunidades afectadas por la contaminación de ríos y lagos, así como mantos acuíferos.
- Empresas dedicadas al manejo y tratamiento de aguas residuales mediante el uso de biorremediación para la descontaminación de efluentes de contaminantes xenobióticos como colorantes, antibióticos y PAH's (hidrocarburos aromáticos cíclicos).
- Industrias relacionadas al procesamiento de materias primas como la del papel y la textil enfocada aplicando a la lignina peroxidasa para reducir la coloración presente en el papel y la mezclilla.
- Las industrias derivadas del procesamiento de material lignocelulósico para la eliminación de la lignina como parte del pretratamiento de sus materias primas en industrias alimenticias y química con interés en productos basados en lignina y de generación de biocombustibles, Por último, la industria farmacéutica como posible candidata en la investigación de nuevos agentes cosmeceúticos.

2.4: Ingeniería de proteínas en la lignina peroxidasa

En cuanto a la isozima H8 solo se ha producido en el sistema de expresión *Pichia methanolica* en el año 2004³⁹. El uso de éste, actualmente se ha descontinuado en investigación, por lo que es de interés la producción recombinante en un sistema de expresión mejor caracterizado como es *Pichia pastoris*.

Semba y colaboradores lograron mejorar la termoestabilidad de la LiP al menos 4 veces durante 30 minutos al recrear un modelo de peroxidasas ancestrales⁴⁰, evaluando mutaciones en sitios conservados en los aminoácidos correspondientes a 239-241(HTI→FLL); adicionalmente en la investigación de ligninas peroxidasas se ha revelado un mecanismo basado en inhibición suicida en la LiP H8 por compuestos fenólicos, lo que mediante la modificación por ingeniería de proteínas, aminoácido 242 A→D , lo que ha podido disminuir al manipular el estado del

radical transitorio del electrón-lanzadera susceptible a radical, lo que mejoró la actividad de la enzima más de 2 veces⁴¹.

Recientemente el uso de modelos basados en secuencias ancestrales ha ayudado dilucidar la historia molecular de las proteínas pertenecientes al complejo lignocelulolítico, donde se describen los cambios bioquímicos presentados en cada enzima y su etapa de aparición⁴², adicionalmente estas estrategias han ayudado a plantear un mayor entendimiento de la vida en las etapas tempranas de la tierra⁴³.

2.5: Antecedentes del laboratorio de biotecnología

Con anterioridad en el laboratorio de biotecnología se ha logrado la producción de distintas hormonas destacando la producción de la hormona de crecimiento humana en *Escherichia coli*⁴⁴ y en *Pichia pastoris*^{45,46}, Hormona de crecimiento caprina⁴⁷, Hormona de crecimiento bovina⁴⁸ y con la adición de una etiqueta de histidina (BGH-6His)⁴⁹, Hormona de crecimiento de 20 kDa⁵⁰, hormona de crecimiento variante⁵¹, hormona de crecimiento de canina⁵², equina, felina y el lactógeno placentario⁵³, GABA p1 humana en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*⁵⁴, Producción de hormona de crecimiento humana con la adición de una etiqueta de histidina (HGH-6His)⁵⁵, así como la producción de la proteína de membrana externa del VPH E2-6His⁵⁶, Superóxido dismutasa a (SodA) de *Nocardia brasiliensis* en *Pichia pastoris*⁵⁷. En cuanto a la prolactina se cuenta con el antecedente de la producción, caracterización y ensayos biológicos de las isoformas de 23 kDa y 16 kDa de prolactina humana en sistemas de expresión de *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*⁵⁸, y la producción caracterización y escalamiento de la isoforma de 23 kDa de la prolactina humana optimizada para su producción en *Pichia pastoris*⁵⁹.

Cabe mencionar que también se han evaluado las condiciones de cultivo para la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*⁶⁰.

Capítulo 3: Justificación y objetivos

3.1 Justificación:

La presencia de contaminantes en ríos, lagos, lagunas y mares debido al vertido de sustancias desechos industriales es un problema grave para la biodiversidad, ya que ponen en riesgo la integridad de los ecosistemas y su supervivencia, los antibióticos, por ejemplo, pueden modificar la dinámica de los procesos clave de biotransformación inhibiendo procesos como: desnitrificación, fijación del nitrógeno, degradación de compuestos orgánicos y generando cepas resistentes a antibióticos⁶¹. Todo esto impacta en el sector salud ya que aumenta la vulnerabilidad de los individuos a una exposición de sustancias tóxicas. Un ejemplo es la contaminación por la industria textil que genera grandes volúmenes de efluentes con una alta demanda bioquímica (DBO) y química (COD) de oxígeno, alta toxicidad y presencia de metales pesados alterando las condiciones naturales del área receptora⁶². La investigación de las complejo de las enzimas lignocelulolíticas (principalmente peroxidasas, lacasas, peroxigenasas y oxidasas) presentes en los hongos de la podredumbre blanca ha sido de importancia en los últimos años debido a su capacidad de degradar a la lignina, Este compuesto constituye la fracción mayoritaria de la pared celular de los árboles, y es esencial en el reciclaje de carbono en la biosfera y la principal materia prima en el planeta, Su producción en los Estados Unidos se estima de aproximadamente 200 billones de toneladas ⁶³.

Por otra parte, el uso de las peroxidasas fúngicas ha sido evaluada extensivamente los últimos 40 años por sus posibles aplicaciones industriales y medioambientales ⁶⁴. Por lo anterior es deseable llevar a cabo la aplicación de procesos de degradación biológica de xenobióticos por la enzima lignina peroxidasa H8 por su capacidad de utilizar como sustrato compuestos fenólicos y no fenólicos como los hidrocarburos poliaromáticos cíclicos (PAH's), clorofenoles y

de otras sustancias como colorantes industriales debido a su capacidad de cortar los enlaces β -O-4 entre los carbonos de los compuestos aromáticos en la estructura de la lignina⁶⁵.

3.2 Objetivo general:

Expresar y caracterizar la enzima lignina peroxidasa H8 de *Phanerochaete chrysosporium* en la cepa GS115 de *Pichia pastoris*.

3.3 Objetivos específicos:

1. Diseñar *in silico* el vector de expresión pPIC9K-LiPH8 optimizado por el método de armonización de codones.
2. Construir el sistema de expresión de *Pichia pastoris* GS115 con pPIC9K-LiPH8 mediante recombinación homóloga y caracterizar con enzimas de restricción.
3. Producir la enzima recombinante a partir del vector pPIC9K-LiPH8 y evaluar su expresión por Western Blot.

Capítulo 4: Metodología



Figura 6.- Estrategia general. Compreendida por la búsqueda, diseño y clonación de secuencias, la construcción del sistema de expresión en *Pichia pastoris*, concluyó con la producción a nivel matraz y evaluación de la enzima lignina peroxidasa H8 mediante la técnica de Western blot.

4.1 Diseño *In silico* del vector de expresión LipH8

4.1.1 Búsqueda y diseño de las secuencias

Se obtuvieron las secuencias correspondientes a las isoenzimas lignina peroxidasa H2 y H8 a partir de bases de datos de secuencias nucleotídicas específicas de cepas caracterizadas de *Phanerochaete chrysosporium* cotejando dichas secuencias con las reportadas en bases de datos de referencia nucleotídicas y aminoacídicas (NCBI y UniProt).

Seguidamente, se modificó la secuencia correspondiente a la lignina peroxidasa H8 realizando cambios en los nucleótidos correspondientes a los aminoácidos 239-241 para obtener una versión con mayor actividad.

En ambas secuencias se incluyó una etiqueta FLAG como sitio de reconocimiento específico para anticuerpos anti-FLAG localizado en el sitio amino terminal, Se procuró además que estuvieran flanqueadas con los sitios de restricción *Sna*BI y *Eco*RI para la secuencia de H2 y *Sna*BI y *Not*I para las secuencias de H8, finalmente las secuencias fueron sintetizadas por la compañía Genscript (New Jersey, EUA) en el vector de expresión para levaduras pPIC9K.

El uso del gen de la isoforma de la lignina peroxidasa H2 con la secuencia aminoacídica nativa fue dado como control de expresión, ya que su producción había sido previamente descrita en una cepa de *Pichia pastoris* X-33. La modificación anteriormente descrita de la isoforma LiPH8 había sido previamente expresadas en una cepa de *E. coli*, Sin embargo este diseño fue mejorado *in silico* mediante la armonización de la frecuencia de uso de codones para la cepa de *Pichia pastoris* GS115 en congruencia con el perfil presente en el organismo "*Phanerochaete chrysosporium*" para lo cual se utilizó plataforma web "Galaxy" y el script "Codon harmonization tool" ⁶⁶, Se introdujo información referente al uso de codones preferenciales para cada organismo obtenida de la base de datos "codon table database", para lo cual se usó como parámetros del script tablas de uso de frecuencia de codones tanto para *Phanerochaete chrysosporium* como para la cepa GS115 de *Pichia pastoris*.

4.1.2 Clonación del vector pPIC9K-LiPH8 y verificación de integridad

Se realizó la técnica de transformación por electroporación en una cepa de *Escherichia coli* Top10´F en el electroporador Biorad Gene Pulser II ajustado con los siguientes parámetros 200 Ω (Ohms) de resistencia, 25 μ F de capacitancia y 2.5 kV, posteriormente se realizó la selección de clonas recombinantes por resistencia a ampicilina mediante el crecimiento en placas de medio LB adicionadas con 100 μ g/mL del antibiótico ampicilina.

4.1.3 Extracción del ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina

Una vez transformadas cepas de *Escherichia coli* Top10´F se realizó la técnica de extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina, El DNA plasmídico obtenido de la técnica se cuantificó y se usó para amplificar los fragmentos presentes dentro del locus correspondiente a las regiones del vector flanqueadas por los sitios *AOX1* presentes en el vector, los fragmentos obtenidos por visualizados en un gel de agarosa al 1% para confirmar el correcto ensamblado de la secuencia sintetizada de acuerdo a los tamaños esperados de los genes de interés.

4.1.4 Caracterización de los genes sintetizados

Para evaluar la correcta síntesis e identidad de los genes de interés se realizaron los siguientes métodos:

Se hicieron cortes con las enzimas de restricción *Pst*I, *Ac*cI, *Sma*II y *Sna*BI hacia las secuencias plasmídicas de ambas construcciones para confirmar la presencia de los fragmentos de interés presentándose perfiles únicos y distintivos para cada gen de interés que a su vez fueron comparados con los perfiles simulados previamente mediante digestión virtual mediante el software SnapGene.

Se Amplificó por PCR la región del locus *AOX1* presentes en el vector pPIC9K y usando oligonucleótidos específicos posteriormente se digirieron los productos con las enzimas de restricción *Nla*III, *Hph*I, *Ac*cI, *Bst*EII.

4.2 Construcción del sistema de expresión de *Pichia pastoris* GS115 con pPIC9K-LiPH8

4.2.1 Inserción por recombinación homóloga en *Pichia pastoris*

Una vez confirmadas las secuencias de interés se linealizaron ambos plásmidos (H2 y H8), con la enzima de restricción *PmeI*, esto para generar cortes en extremos compatibles con el evento de recombinación homóloga para el gen endógeno *AOX1* de la cepa GS115 de *Pichia pastoris*, Los productos obtenidos de la digestión fueron utilizados para la técnica de transformación por electroporación en una cepa GS115 de *Pichia pastoris*, durante el ensayo se incluyó un control negativo (transformación con agua destilada) y un control positivo (Vector pPIC9K vacío linealizado), usándose los siguientes parámetros de electroporación, 200 Ω , 25 μ F y 1.5kV.

4.2.2 Selección de cepas recombinantes mediante PCR

A partir de las cepas transformadas de *Pichia pastoris* se realizó una selección en medio mínimo carente de histidina seleccionando de esta manera aquellas cepas en las que haya ocurrido el evento de recombinación homóloga mediante la selección de las cepas que hayan recuperado la capacidad de producir histidina debido al gen *HIS4* presente dentro del vector pPIC9K, adicionalmente se realizará una amplificación por PCR oligonucleótidos flanqueantes del gen en el locus del gen alcohol oxidasa (*AOX1*) para confirmar la integración, de acuerdo al protocolo descrito en los anexos, para la determinar el fenotipo de la cepa recombinante, Caracterizando como Mut⁺ sí realiza la degradación del metanol al integrar el gen de interés contiguo a una copia funcional del gen de la Alcohol Oxidasa 1, o Mut^S si hubo un evento de reemplazo de dicho gen.

4.3 Producción y evaluación de Lignina Peroxidasa H8 en *Pichia pastoris*

4.3.1 Producción de Lignina Peroxidasa H8 en *Pichia pastoris*

Las cepas caracterizadas se inocularon en 15 mL de medio YPD en matraces Erlenmeyer de 125 mL realizando la generación de biomasa durante 24-48 horas

a 30°C (Temperatura óptima de crecimiento para *Pichia pastoris*) hasta alcanzar una O.D._{600nm} ~50, una vez generada la biomasa se recuperó en tubos de 50 mL y se realizó una primera centrifugación a 4,000g durante 10 minutos seguido de un lavado con 15 mL de medio BMMY procurando eliminar el medio de cultivo de crecimiento sin perder la biomasa generada, posteriormente se realizó una segunda centrifugación a 4,000g durante 10 minutos seguido de un lavado con 15 mL de medio BMMY.

Una vez lavadas las pastillas celulares se realizó la inducción tras la adición del medio de inducción BMMY donde inicialmente se añadirá 0.5% v/v de metanol para realizar la aclimatación al medio inductor y posteriormente se suplementará con 1% v/v cada 24 horas, esto con la finalidad de reponer el metanol perdido en el medio de inducción ya sea por evaporación o consumo de la levadura, el cultivo durará en inducción de 3-6 días. (Véase el protocolo descrito en el apartado de anexos).

4.3.2 Diálisis del medio de cultivo recuperado

Una vez realizada la inducción se procedió a realizar el dializado de la fracción proteica de las muestras de inducción para cada gen sintetizado y sus controles, utilizando membranas de diálisis SpectraPor 4 (MCWO: 14 kDa, Spectrum-Labs.) esto con la finalidad de comparar la actividad de las proteínas presentes en medio de cultivo obtenido a partir de la inducción contra la fracción proteica dializada, adicionalmente la fracción dializada fue analizada por SDS-PAGE y por Western Blot con la finalidad de observar la presencia de la expresión de las proteínas recombinantes sintetizadas (Para el procedimiento del dializado véase el protocolo descrito en el apartado de anexos).

4.3.3 Precipitación y cuantificación de proteínas producidas

La proteínas cuantificar las proteínas totales precipitadas mediante la técnica metanol-cloroformo por el método de Bradford en microplaca de 96 pocillos, para lo anterior en primera instancia se realizó una curva de calibración de concentración con un estándar comercial de albúmina sérica bovina [BSA], para dicha curva se usaron concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL, se midieron las absorbancias a 600 nm, se obtuvo la ecuación para determinar la concentración de muestras representativas de la producción de proteínas recombinantes, siendo estas: Proteínas totales del medio de cultivo, dializado con membranas de diálisis SpectraPor4 y precipitadas por el método metanol cloroformo, estos ensayos se realizarán por triplicado, de los datos obtenidos se reportaron datos descriptivos (valores descritos en la tabla 4).

Tabla 4.- Condiciones para la realización de la curva estándar de proteína.			
Tubo #	Muestra (μL)	Estándar de proteína [BSA] (mg/mL)	Reactivo de Bradford (μL)
1	5	0.25	250
2	5	0.50	250
3	5	1.00	250
4	5	1.50	250
5	5	2.00	250
Blanco	5	0.00	250

4.3.4 Separación electroforética SDS-PAGE de la proteína LiPH8 recombinante

A partir de las fracciones aisladas se realizó un gel desnaturizante en poliacrilamida al 12% mediante la técnica SDS-PAGE, realizado de acuerdo al protocolo descrito en el anexo, el cual se separó inicialmente a 80 volts, hasta que la fracción de proteínas teñida por el buffer de carga ingresó completamente al gel de resolución, momento donde se aumentó el voltaje a 100 – 200 volts y se dejó correr las muestras durante 30 – 45 minutos, hasta que el recorrido de la banda

inferior de las proteínas llegó al fondo de la cámara electroforética (para la preparación y el manejo véase el protocolo añadido en la sección de anexos).

4.3.5 Identificación de la Lignina peroxidasa H8 por Western blot

Para asegurar la presencia de las proteínas recombinantes se realizó el ensayo de western Blot hacia la etiqueta “FLAG” presente en muestras separadas previamente por SDS-PAGE de las proteínas recombinantes a evaluar, inicialmente se optimizó la concentración de muestra y anticuerpo a usar para cada ensayo en diluciones secuenciales (Muestra : anticuerpo) 1:1000, 1:100, 1:10 hasta obtenerse las condiciones adecuadas, una vez estandarizado el protocolo se realizó la observación de las muestras de interés.

Capítulo 5: Resultados

5.1 Diseño *in silico* del vector de expresión LipH8

5.1.1 Obtención de las secuencias a sintetizar

Para la elección de las secuencias a sintetizar se consideraron aquellas que habían sido previamente clonadas siendo la secuencia molde la correspondiente a la lignina peroxidasa H8 descrita en 1987 por Tien & Tu, sin embargo al realizar de las secuencias obtenidas un alineamiento múltiple mediante la herramienta Clustal Omega (figura 7), se observó que la secuencia reportada no correspondía a una secuencia funcional, los autores corrigieron el error en el artículo, pero no quedo enmendada en la bases de datos (NCBI: Y00262) por lo que se optó por usar como secuencia molde para la búsqueda las secuencias aminoacídicas reportadas como canónicas provenientes de la base de datos de proteínas Uniprot, obteniéndose al gen *LPOA* con el identificador **P06181** para **H8** y el gen *GLG4* con el identificador **P11542** para **H2**, usando las secuencias anteriormente mencionadas se realizó una búsqueda en genomas secuenciados de cepas de referencia de *Phanerochaete chrysosporium* para obtener y corroborar secuencias correspondientes a las copias de las isoenzimas elegidas.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
CAA68373.1_reporte_original      MAFKQLFAAISLALLLSAANAAAVIEKRATCSNGKTVGDASSCAWFDVLDLDDIQQNLFHGG
P06181_Ligninase_H8GN=LPOA      MAFKQLFAAISLALLLSAANAAAVIEKRATCSNGKTVGDASSCAWFDVLDLDDIQQNLFHGG
jgi|Phchr2|2989894|_H8_genoma_referencia MAFKQLFAAISLALLLSAANAAAVIEKRATCSNGKTVGDASSCAWFDVLDLDDIQQNLFHGG
*****.*****

CAA68373.1_reporte_original      QCGAEAHESIRLVFHDSIAISPAMEAQGKFGGGGADGSIMIFDDIETAFHPNIGLDEIVK
P06181_Ligninase_H8GN=LPOA      QCGAEAHESIRLVFHDSIAISPAMEAQGKFGGGGADGSIMIFDDIETAFHPNIGLDEIVK
jgi|Phchr2|2989894|_H8_genoma_referencia QCGAEAHESIRLVFHDSIAISPAMEAQGKFGGGGADGSIMIFDDIETAFHPNIGLDEIVK
*****

CAA68373.1_reporte_original      LQKPFVQKHGVT PGDFIAFAGRVALSNCPGAPQMNFFTGRAPATQPAPDGLVPEPFHTVD
P06181_Ligninase_H8GN=LPOA      LQKPFVQKHGVT PGDFIAFAGRVALSNCPGAPQMNFFTGRAPATQPAPDGLVPEPFHTVD
jgi|Phchr2|2989894|_H8_genoma_referencia LQKPFVQKHGVT PGDFIAFAGRVALSNCPGAPQMNFFTGRAPATQPAPDGLVPEPFHTVD
*****

CAA68373.1_reporte_original      QIINRVNDAGEFDELELVWMLSAHSVAAVNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRG
P06181_Ligninase_H8GN=LPOA      QIINRVNDAGEFDELELVWMLSAHSVAAVNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRG
jgi|Phchr2|2989894|_H8_genoma_referencia QIINRVNDAGEFDELELVWMLSAHSVAAVNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRG
*****

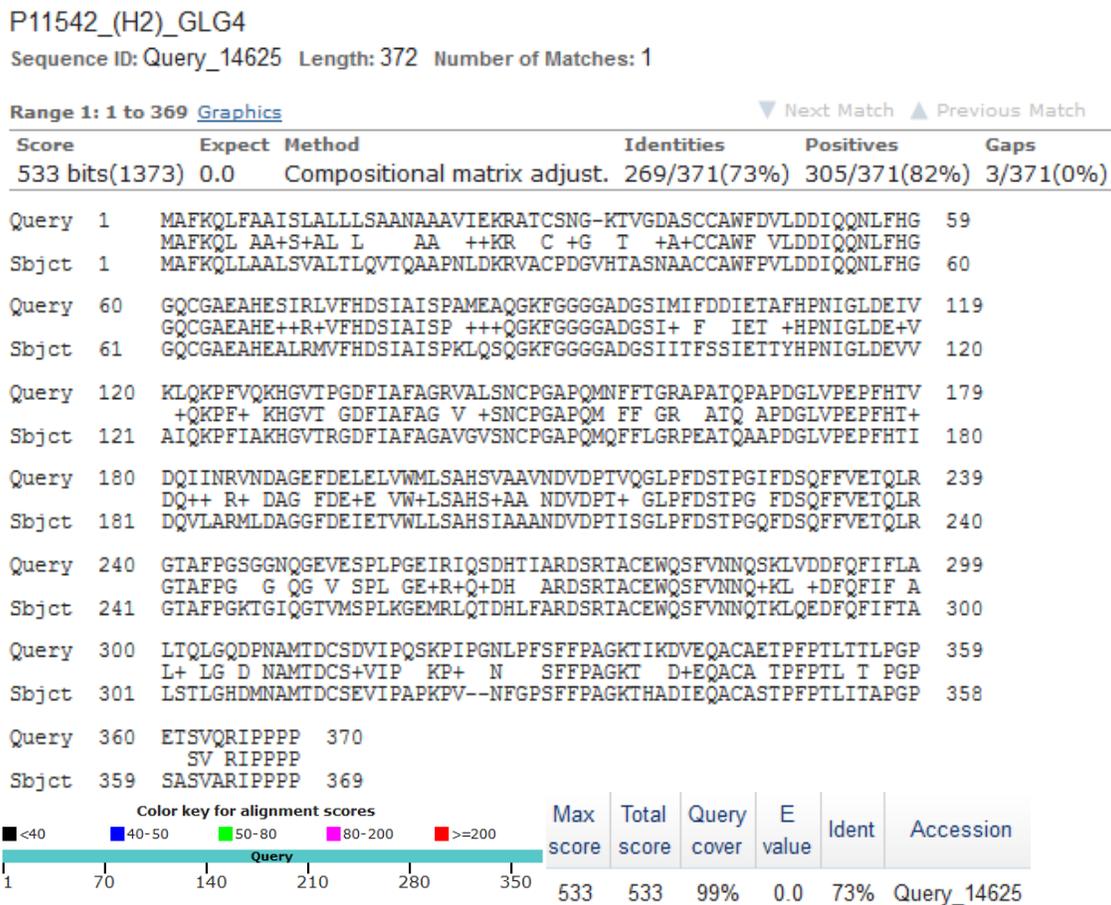
CAA68373.1_reporte_original      TAFPGSGGNQGEVESPLPGEIRIQSDHTIARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIFLAL
P06181_Ligninase_H8GN=LPOA      TAFPGSGGNQGEVESPLPGEIRIQSDHTIARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIFLAL
jgi|Phchr2|2989894|_H8_genoma_referencia TAFPGSGGNQGEVESPLPGEIRIQSDHTIARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIFLAL
*****

CAA68373.1_reporte_original      TQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLPFSPFPAG TIKDVEQACAESPFRLSPLSRAP-
P06181_Ligninase_H8GN=LPOA      TQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLPFSPFPAG TIKDVEQACAETPFPTLTLPGPE
jgi|Phchr2|2989894|_H8_genoma_referencia TQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLPFSPFPAG TIKDVEQACAETPFPTLTLPGPE
*****:.*

CAA68373.1_reporte_original      -----RRPSSASLRLRVLK
P06181_Ligninase_H8GN=LPOA      TSVQRIPPPPGA-----
jgi|Phchr2|2989894|_H8_genoma_referencia TSVQRIPPPPGA*-----
*.:
```

Figura 7.- Alineamiento múltiple de las secuencias comparando la secuencia “canónica” de H8 (uniprot P06181), la secuencia reportada por primera vez y un genoma de referencia (cepa RP 78). Los asteriscos denotan identidad en cuanto a la naturaleza del aminoácido, al final de la secuencia CAA68373.1 se puede observar como un cambio en la interpretación del marco de lectura modifica la secuencia correspondiente al extremo C-terminal, en contraste tanto la secuencia canónica, como la del genoma de referencia presentan la misma estructura.

Se realizó un alineamiento por el software blastP para definir la identidad entre ambas isoformas de la enzima, obteniéndose un 73% de identidad aminoacídica (figura 8) lo que denota características estructurales comunes para ambas isoenzimas, así como cambios de aminoácidos distintos, pero con la misma carga



neta denotados por un signo (+) durante el alineamiento.

Figura 8.- **Alineamiento aminoacídico de las isoenzimas lignina peroxidasa H2 y H8 realizado mediante la plataforma web: BlastP.** Imagen superior: se muestra el alineamiento, mostrándose en la línea intermedia entre las secuencias los aminoácidos conservados, denotándose con un signo “+” los aminoácidos distintos presentando la misma naturaleza funcional. Imagen inferior 1 (Izq.): longitud de homología entre las secuencias analizadas, observándose una homología mayor a 200 nucleótidos Imagen inferior 2 (der.): porcentaje de

cobertura de las secuencias evaluadas (Query coverage) y porcentaje de identidad entre las secuencias (Ident.).

En el alineamiento se puede observar como la secuencia que presenta una estructura aminoacídica distinta pertenece a la cepa ATCC 20696, por lo que se tomó como secuencia de referencia a la cepa de *Phanerochaete chrysosporium*

```

GENE_00013180-RA
jgi|Phchr2|1386770|CE386770_24262
sp|P11542|LIG4_PHACH
MSFCASRCGLWCHDQCLESFLPRMCTLSGEMAFSILWFAARLPDGVHTASNAACCAWF
-----MAFKQLLAALSV--ALTLQVTQAAPNLDKRVACPDGVHTASNAACCAWF
-----MAFKQLLAALSV--ALTLQVTQAAPNLDKRVACPDGVHTASNAACCAWF
... * * : * : ** * * *****

GENE_00013180-RA
jgi|Phchr2|1386770|CE386770_24262
sp|P11542|LIG4_PHACH
PVLDDIQQNLFHGGQCGAEAHEALRMVFDHSDIAISPQLQSQGFSGGGADGSIITFSSIE
PVLDDIQQNLFHGGQCGAEAHEALRMVFDHSDIAISPQLQSQGFSGGGADGSIITFSSIE
PVLDDIQQNLFHGGQCGAEAHEALRMVFDHSDIAISPQLQSQGFSGGGADGSIITFSSIE
*****

GENE_00013180-RA
jgi|Phchr2|1386770|CE386770_24262
sp|P11542|LIG4_PHACH
TTYHPNIGLDEVVAIQKPFIAKHGVTPGDFIAFAGAVGVSNCPGAPQMFFLGRPEATQA
TTYHPNIGLDEVVAIQKPFIAKHGVTPGDFIAFAGAVGVSNCPGAPQMFFLGRPEATQA
TTYHPNIGLDEVVAIQKPFIAKHGVTGRDFIAFAGAVGVSNCPGAPQMFFLGRPEATQA
*****

GENE_00013180-RA
jgi|Phchr2|1386770|CE386770_24262
sp|P11542|LIG4_PHACH
APDGLVPEPFHTIDQVLARMLDAGGFDEIETVWLLSAHSIAAANDVDPTISGLPFDSTPG
APDGLVPEPFHTIDQVLARMLDAGGFDEIETVWLLSAHSIAAANDVDPTISGLPFDSTPG
APDGLVPEPFHTIDQVLARMLDAGGFDEIETVWLLSAHSIAAANDVDPTISGLPFDSTPG
*****

GENE_00013180-RA
jgi|Phchr2|1386770|CE386770_24262
sp|P11542|LIG4_PHACH
QFDSQFFVETQLRGTAFPGKTIQGTVMSPKLGEMRLQTDHFLFARDSRTACEWQSFVNNQ
QFDSQFFVETQLRGTAFPGKTIQGTVMSPKLGEMRLQTDHFLFARDSRTACEWQSFVNNQ
QFDSQFFVETQLRGTAFPGKTIQGTVMSPKLGEMRLQTDHFLFARDSRTACEWQSFVNNQ
*****

GENE_00013180-RA
jgi|Phchr2|1386770|CE386770_24262
sp|P11542|LIG4_PHACH
TKLQEDFQFIFTALSTLGHDMNAMIDCSEVIPAPKPVNFGPSFFPAGKTHADIEQACAST
TKLQEDFQFIFTALSTLGHDMNAMIDCSEVIPAPKPVNFGPSFFPAGKTHADIEQACAST
TKLQEDFQFIFTALSTLGHDMNAMIDCSEVIPAPKPVNFGPSFFPAGKTHADIEQACAST
*****

GENE_00013180-RA
jgi|Phchr2|1386770|CE386770_24262
sp|P11542|LIG4_PHACH
PFPTLITAPGPSASVARIPIRRRPPIKLCCLWCSCRFYLVGIVARLSRVCIMYTCSWNIQS
PFPTLITAPGPSASVARIPIPPSPN*-----
PFPTLITAPGPSASVARIPIPPSPN-----
*****

GENE_00013180-RA
jgi|Phchr2|1386770|CE386770_24262
sp|P11542|LIG4_PHACH
GLSFSRTPCGGRP
-----
-----

```

RP78 (Figura 9).

Figura 9.- Comparativa entre la secuencia aminoacídica “canónica” para la enzima LiP H2 (P11542) y genomas de referencias de las cepas de *Phanerochaete chrysosporium* RP 78 (centro) y ATCC 20696 (superior) realizado con el programa en línea Clustal Omega.

Para la cepa de *Phanerochaete chrysosporium* RP:78, se consultó la base de datos del Broad Institute V2.2 con la siguiente URL: <https://genome.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Phchr2>, para la cepa ATCC 20696 se realizó la búsqueda en su base de datos correspondiente con la siguiente URL: <http://112.220.192.2/mpc/>, características de ambas localizaciones se pueden observar en la tabla 5.

En base a las secuencias obtenidas de dichas bases de datos para las enzimas H2 y H8 se realizó un alineamiento con el software Clustal Omega (versión 1.2.4) obteniéndose que las secuencias pertenecientes a la cepa RP:78 se apega con mayor fidelidad a la secuencia aminoacídicas reportadas como canónicas por lo cual esta cepa fue considerada como referencia para la obtención de las secuencias nucleotídicas (figura 9).

Tabla 5.- Localización genómica de los genes de H2 y H8 en genomas de referencia de *Phanerochaete chrysosporium*

Secuencia ref. canónica (P11542) - LiP H2 gen= <i>CLG4</i> , <i>LiPD</i> (H2, 1QPA), <i>GLG4</i>		
Genoma	Localización	Nombre
RP-78	scaffold_11:1416202-1418599, Protein ID 1386770	CE386770_24262 gen (M18743.1), Name: LiPD (H2, 1QPA)
ATCC 20696	3~2998(+) Length :2996, Contig 101	GENE_00013180-RA
Secuencia ref. canónica (P06181) - LiP H8 gen= <i>LPOA</i> , <i>CLG5</i>		
Genoma	Localización	Nombre
RP-78	<u>scaffold 19:373562-375615</u>	fgenesh1_kg.19_#221_#Locus12303v1rpm4.47 Name: LiPA (H8)
ATCC 20696	146193~149152(-) Length :2960, Contig 28	GENE_00010758-RA

5.1.2 Diseño y armonización de codones *in silico* de los genes lignina peroxidasa H2 y H8 sintetizados.

Para el diseño de los plásmidos a sintetizar se consideró como control de producción en *Pichia pastoris* al gen de la lignina peroxidasa H2 reportado previamente construido en el vector pPICZ α por Wang & Wei³⁷, para la lignina peroxidasa H8 secuencias modificadas integrando sustituciones en los aminoácidos 239 a 241 HTI \rightarrow FLL reportadas por Semba, Ishida, Yokobori & Yamagishi⁴⁰, debido a que se reportó una mejora en la actividad 4 veces mayor a la nativa con la intención de evaluar su producción recombinante en *Pichia pastoris* (figura 10).

Respecto al diseño de las secuencias para ambos genes se utilizó el vector de expresión pPIC9K integrando una etiqueta "FLAG" en el extremo Amino para su identificación por Western Blot con un anticuerpo Anti-Mouse con especificidad hacia la secuencia FLAG, también presenta un sitio de corte para la enzima enteroquinasa permitiendo la liberación del fragmento correspondiente a la proteína nativa.

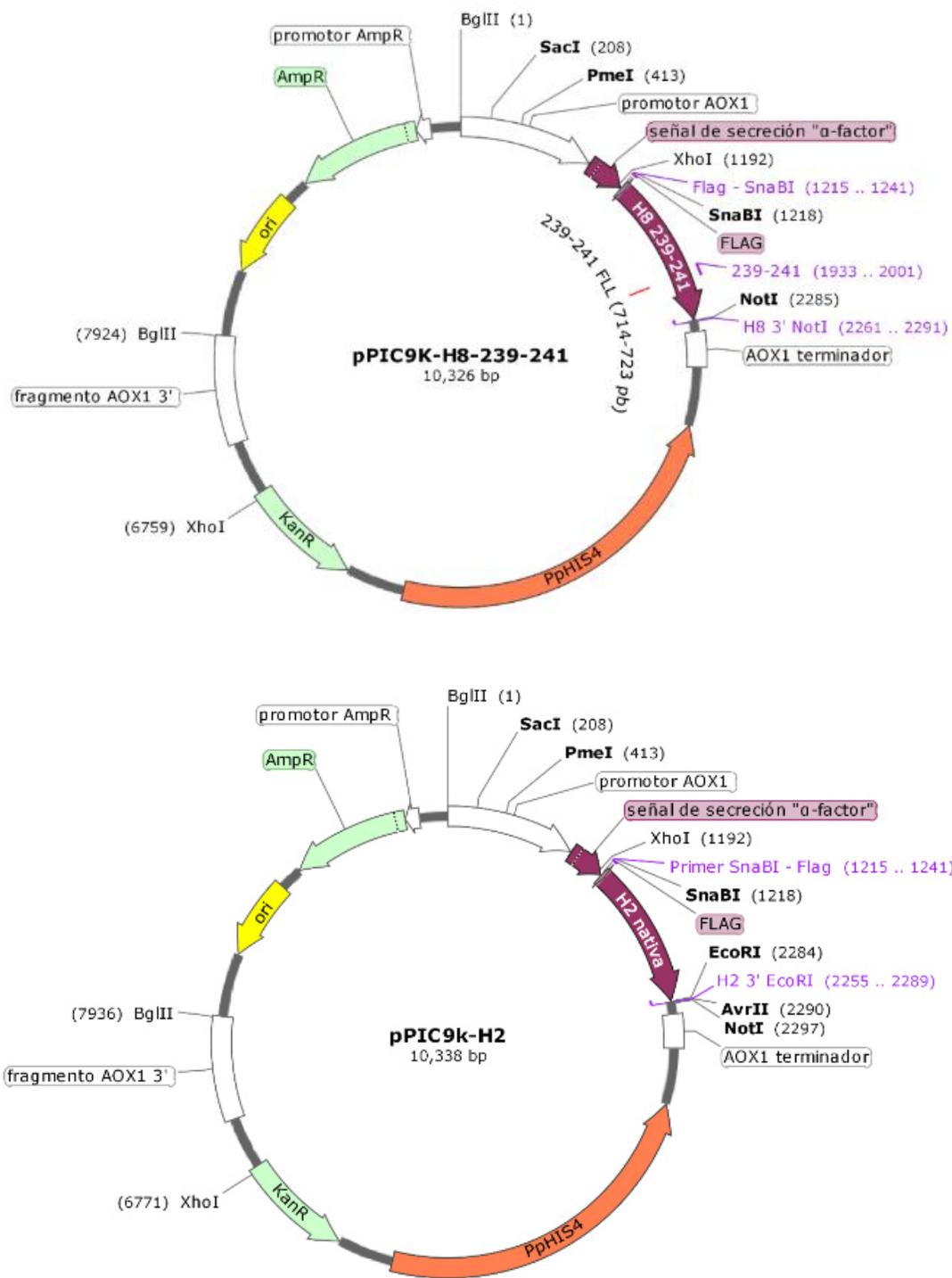


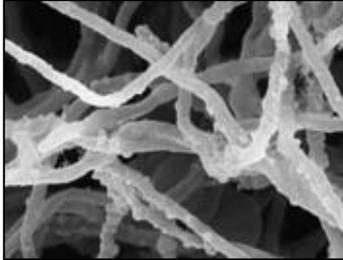
Figura 10.- Plásmidos sintetizados correspondientes a las enzimas LiP H2 y H8.

Una vez lista la secuencia para ser enviada a sintetizar se ajustó la frecuencia de uso de codones mediante el uso de la herramienta “Codon Harmonizer” la cual es un script alojado en el servidor web Galaxy, en la siguiente dirección web (URL: <http://codonharmonizer.systemsbioology.nl/>), en dicha herramienta uno alimenta la secuencia a “Armonizar”, acompañando de las tablas de uso de codones del organismo nativo a dicha secuencia, en el caso de este proyecto *Phanerochaete chrysosporium* cepa RP-78, adicionalmente se añade la tabla de uso de codones del organismo hospedero (*Pichia pastoris* GS115), en el caso del presente trabajo ambas fueron obtenidas de la base de datos HIVE-CUT, Codon Usage Database, alojada en el sitio: hive.biochemistry.gwu.edu/review/codon. Una vez facilitados el conjunto de información el programa genera una hoja de datos que integra la secuencia original, la secuencia “armonizada” y una serie de datos cuantitativos de la secuencia obtenida como se muestran en la figura 11, posteriormente las secuencias fueron analizadas mediante la Herramienta “Rare Codon Calculator: %MinMax” observándose el perfil de uso de codones (figura 12 y tabla 6).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Source Organism									
2	Target Organism	P. pastoris GS115								
3	Gene name:	H8								
4	Source Gene	ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGCCACCTGTTCCAACGGCAAGACCGTCGGCGATGCGTCGTGCTGCGCTTGGTTTCGACGT								
5										
6	Harmonized	ATGGACTATAAAGACGATGATGACAAAGCAACTTGCTCAAATGGAAAACTGTTGGAGACGCTTCTTGTGTGCCTGGTTTGATGTT								
7										
8			CHI:	0		CHI:	0.40201048		CHI:	0.03859468
9			CAI:	0.79280735		CAI:	0.6138345		CAI:	0.82896779

Figura 11. Imagen representativa de la secuencia nativa y armonizada obtenida por la herramienta “Codon Harmonizer Tool”. Incluye valores de parámetros para el índice de adaptación de codones de ambas secuencias (CAI).

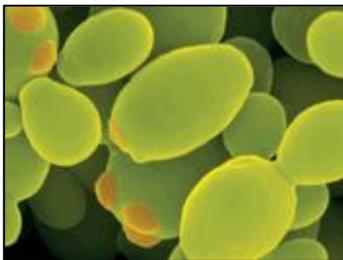
Organismo



Phanerochaete chrysosporium

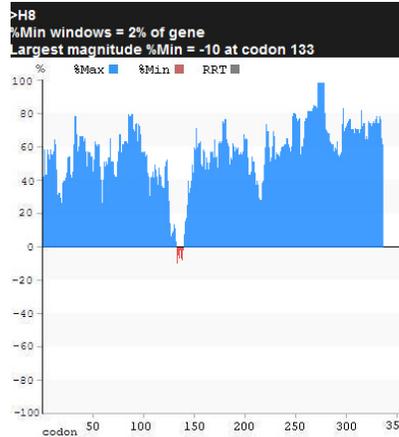


Pichia pastoris



Pichia pastoris

Perfil de uso de codones (%MinMax)



Alto uso de codones preferencial

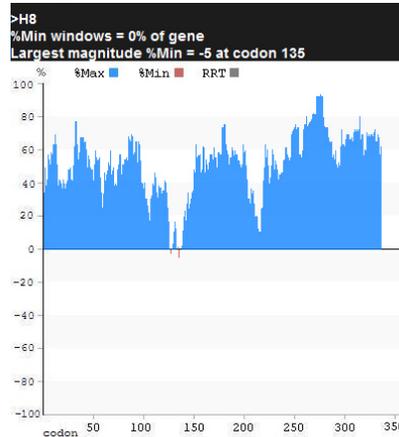
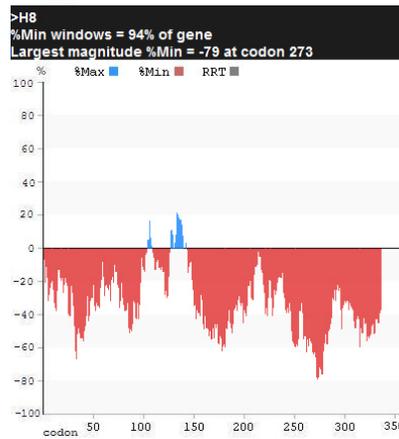


Figura 12.- Perfil de uso de codones para las secuencias evaluadas. Superior, preferencia de codones presente en la secuencia nativa comparada con la tabla de uso de codones de *Phanerochaete chrysosporium*, Centro e inferior, preferencia de codones presente en la secuencia nativa y armonizada comparada con la tabla de uso de codones de *Pichia pastoris* GS115.

Tabla 6.- Comparativa entre los parámetros de secuencias codificante usadas para la generación de las tablas de uso de codones.

Organismo	CDS	Codones	% GC
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	10,104	4,891,534	58.69
<i>Pichia pastoris</i> GS115	487	204,075	41.60

5.1.3 Transformación en *E. coli* y evaluación de integridad

Una vez sintetizados los plásmidos se procedió a transformar una cepa de *Escherichia coli* Top10'F mediante la técnica de electroporación con los plásmidos pPIC9K-H2 y pPIC9K-H8 239-241, al día siguiente se levantaron colonias y se crecieron en caldo selectivo LB-amp (Figura 13, tabla 7), se les realizó la técnica de lisis alcalina obteniéndose DNA plasmídico (Figura 14).

Los plásmidos construidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, posteriormente se caracterizaron las muestras con enzimas de digestión, siendo digerido el DNA plasmídico con las enzimas *Pst*I, *Ac*cI, *Sma*I y *Sna*BI y el producto amplificado de PCR hacia la iniciadores de la región *AOX1* del vector (figura 15), el cual posteriormente fue digerido con las enzimas de restricción *Nla*III, *Hph*I, *Ac*cI, *Bst*EII y visualizado en un gel de electroforesis en agarosa al 2% (figura 16 y 17).

Tabla 7.- Parámetros usados y valores de constante de tiempo obtenidos durante el proceso de electroporación en *E. coli* Top10^F.

Plásmido	Concentración	Constante de tiempo (Pulso)
PIC9K	8 ng / μ L	4.98
H2	4.6 ng / μ L	4.97
H8	6 ng / μ L	4.98
PUC19	12 ng / μ L	4.98

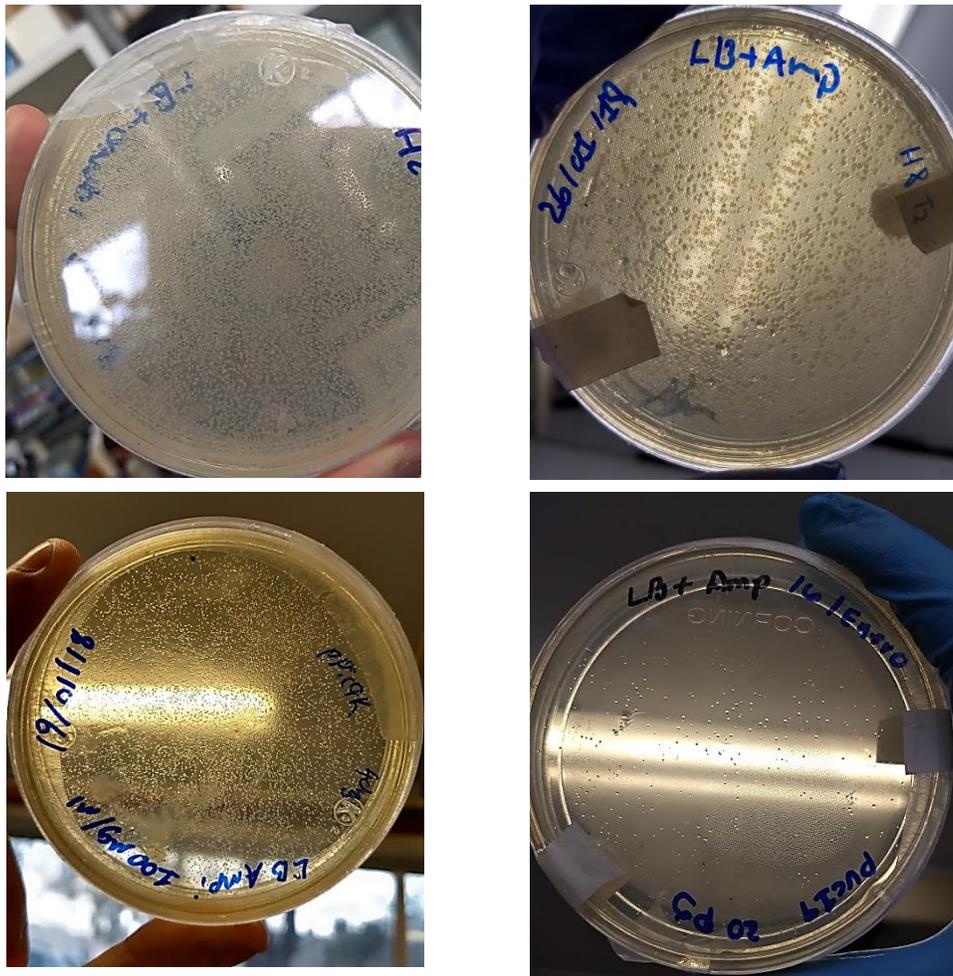


Figura 13.- Fotografías representativas de las placas obtenidas de la transformación con los plásmidos de la lignina peroxidasa H2 y H8 y plásmidos de referencia. Cepas transformadas de cepas Top10^F; superior izquierda Lignina peroxidasa H2, superior derecha Lignina peroxidasa H8, inferior izquierda pPIC9K (vector vacío), inferior derecha pUC19 (Control +).

ADN plasmídico aislado de cepas de *E. coli* top 10'F transformadas con el vector pPIC9 y pPIC9K-H8

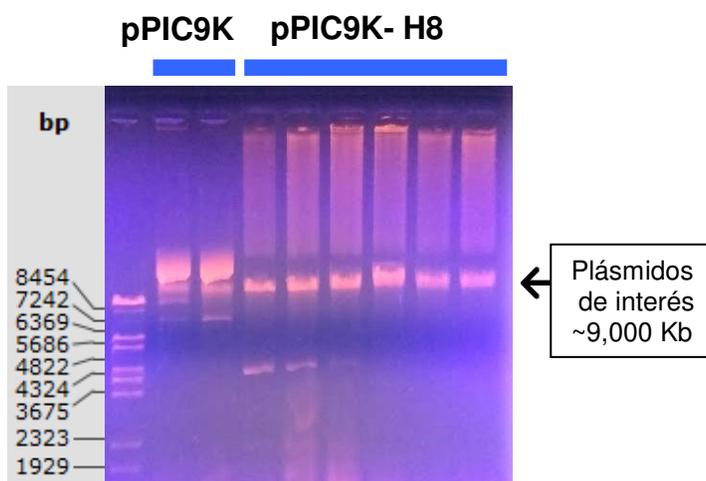


Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v representativo del DNA plasmídico de las cepas TOP10'F transformadas.

Restricción de los plásmidos generados pPIC9KpPIC9K-H2 y pPIC9KpPIC9K-H8

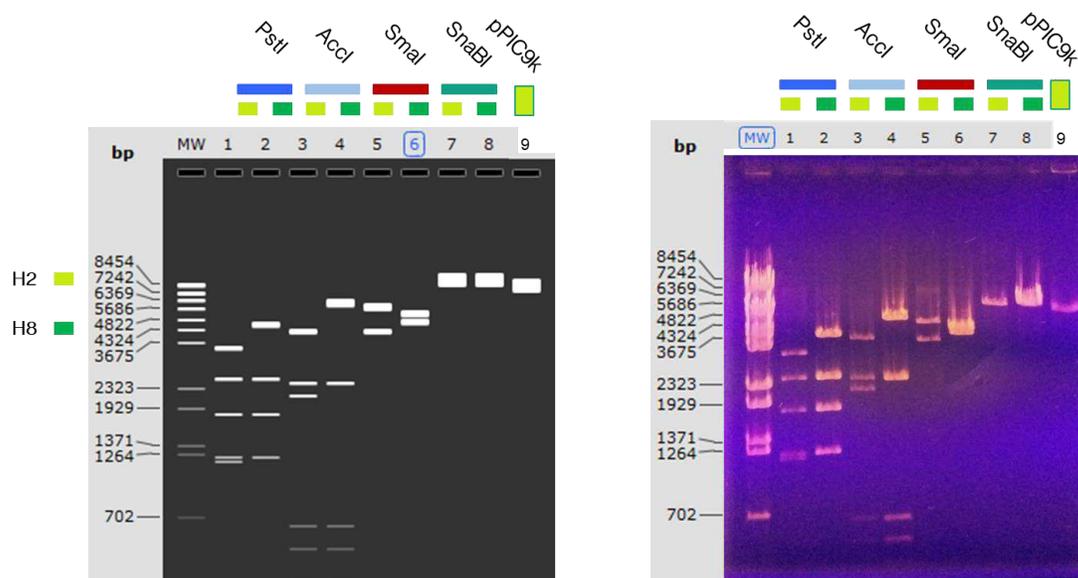


Figura 15.- Comparativa de electroforesis “*in silico*” y experimental de las digestiones de DNA plasmídico con las enzimas *PstI*, *AccI*, *SmaI* y *SnaBI*. Resultado en amarillo carriles correspondientes al plásmido H2 y verde al plásmido H8.

Electroforesis de fragmentos amplificados pPIC9K-H2 y pPIC9K-H8

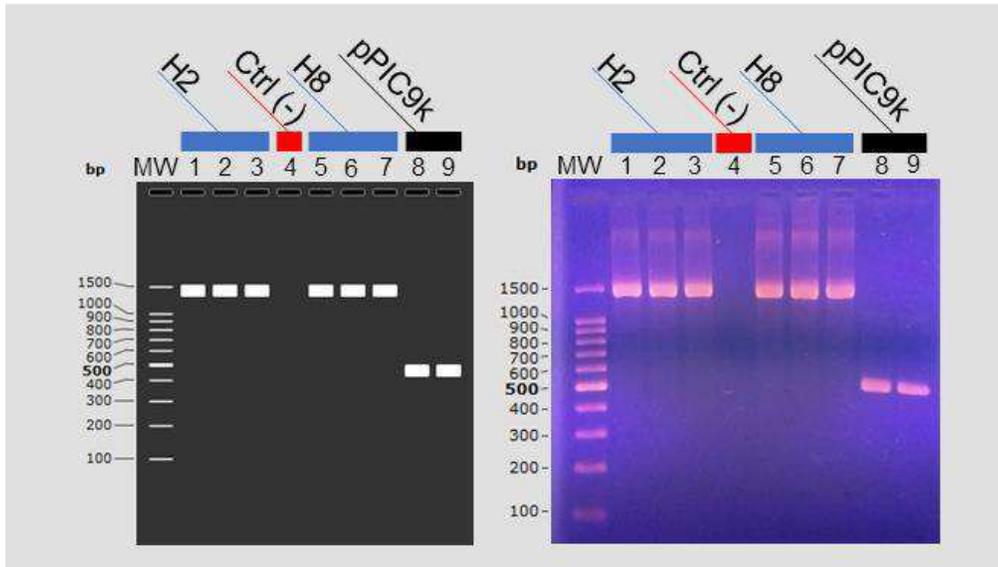


Figura 16.- Electroforesis *in silico* y experimental de productos amplificados por PCR en gel de agarosa al 2% PCR hacia los iniciadores AOX1.

Restricción de los fragmentos amplificados pPIC9K-H2 y pPIC9K-H8

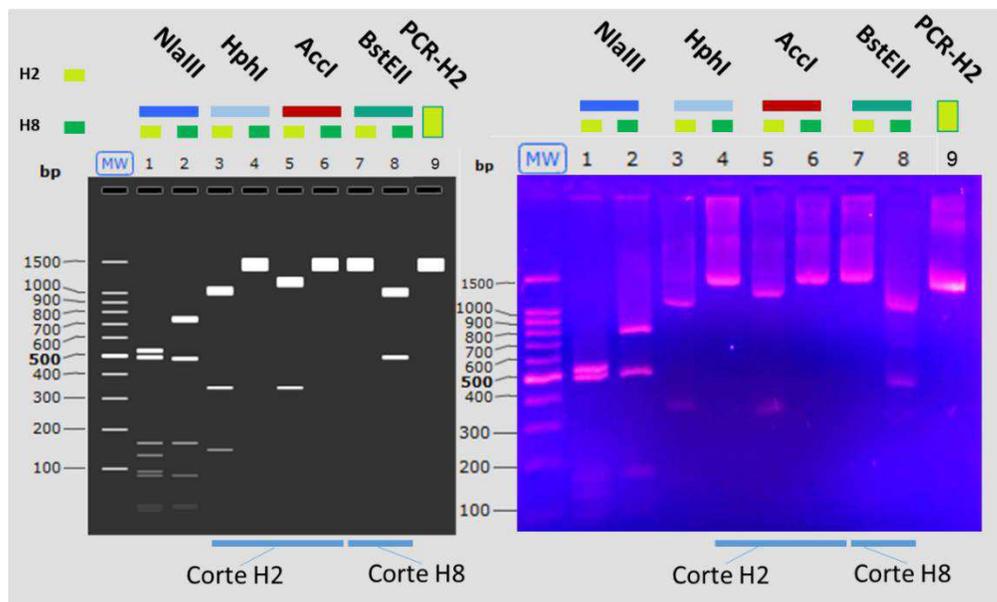


Figura 17.- Electroforesis *in silico* y experimental de digestiones con las enzimas *NlaIII*, *HphI*, *Accl*, *BstEII* de productos amplificados hacia los iniciadores AOX1 en productos amplificados de pPIC9K-H2 y H8.

5.2 Inserción por recombinación homóloga en la cepa GS115 de *Pichia pastoris*

5.2.1 Electroporación y evaluación del fenotipo de las cepas

Una vez caracterizadas las cepas de *E. coli* recombinantes se extrajo DNA plasmídico para H2, H8 y pPIC9K se procedió a linealizarlas sometiéndolas a digestión con la enzima de restricción *PmeI* en volúmenes de reacción de 20 μL , posteriormente los productos de digestión fueron cuantificados, una porción de dichas digestiones fue utilizada como DNA molde para el proceso de electroporación de una cepa de *Pichia pastoris* GS115 con distintas concentraciones de DNA plasmídico descritas en la tabla 8.

Tabla 8.- Comparativa de concentración de DNA usado para transformar la cepa *Pichia pastoris* GS115 y constantes de tiempo obtenidos para cada vector transformado.

Plásmido	Concentración	Constante de tiempo (Pulso)
pPIC9K	~1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4.98
H2	~2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4.97
H8	~4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4.98

5.2.2 Selección de cepas recombinantes mediante PCR

Cepas recombinantes para el gen LiP H2 y H8 mediante el proceso de electroporación fueron recuperadas a partir de medio de selección MD y evaluadas mediante amplificación de los fragmentos *AOX1* de las cuales se obtuvieron 40 colonias LiPH8 con fragmentos de 1544 pb evaluándose experimentalmente 23 encontrándose la presencia del fenotipo **Mut⁺** en 21 de las 23 colonias evaluadas mientras se obtuvieron 2 colonias **Mut^S** reemplazando el gen endógeno *AOX1* de *Pichia pastoris* (Figuras 18, 19 y 20), del gen H2 se obtuvieron 3 colonias las cuales todas presentaron el fenotipo **Mut⁺** (datos no mostrados).

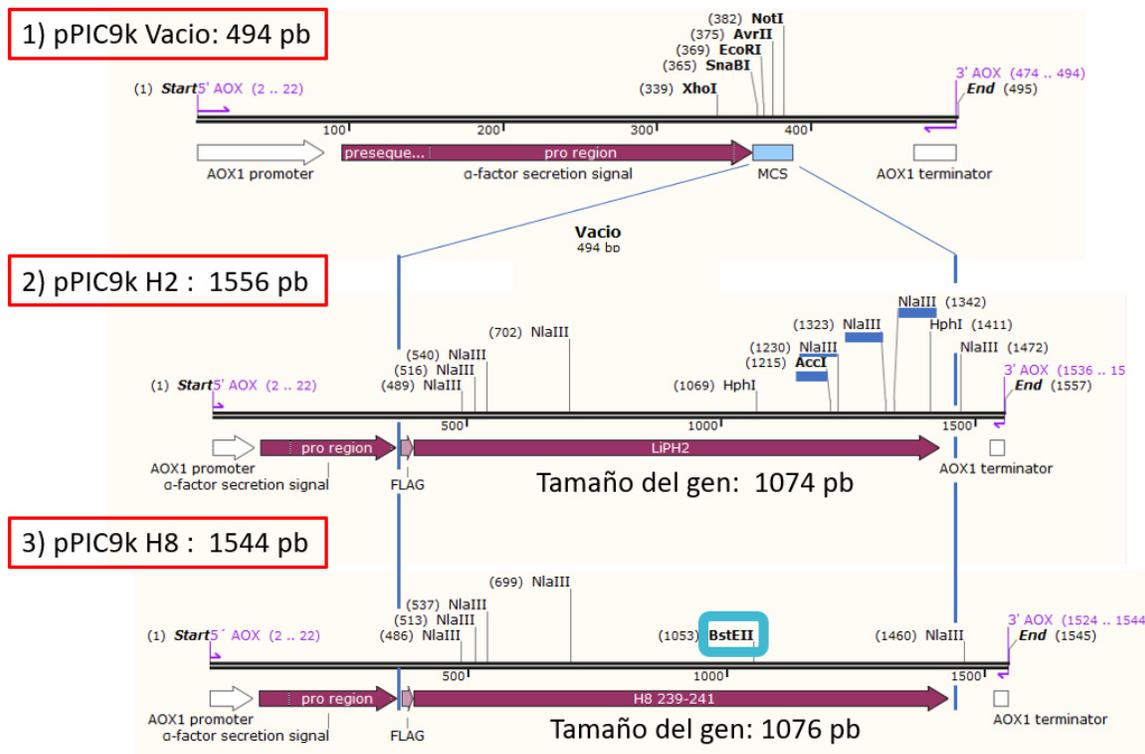


Figura 18.- Representación visual de los sitios de corte de enzimas de restricción y su posición relativa a los genes de LIP H2 y H8.

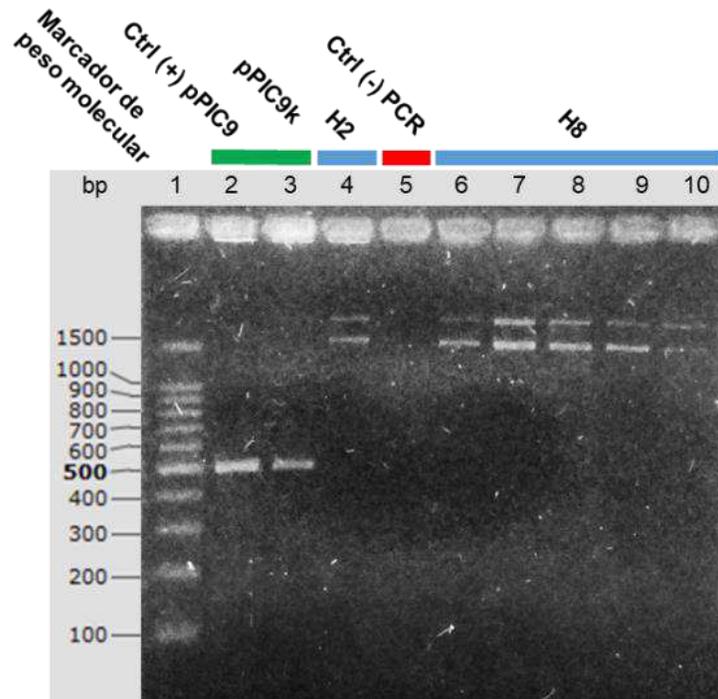
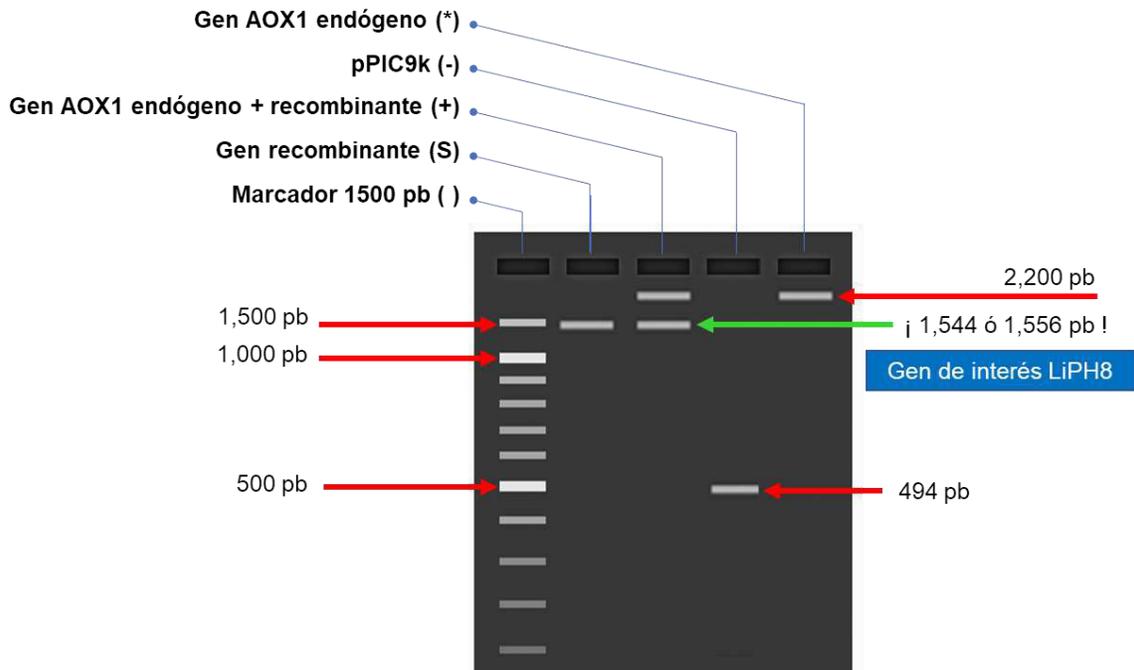


Figura 19.- Fenotipos de integración posibles por el evento de recombinación homóloga para el gen alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) y amplificación de locus *AOX1* en las cepas transformadas *P. pastoris* GS115. Se puede observar en las cepas de H2 y H8 la presencia de fragmentos esperados de 1556 y 1544 respectivamente.

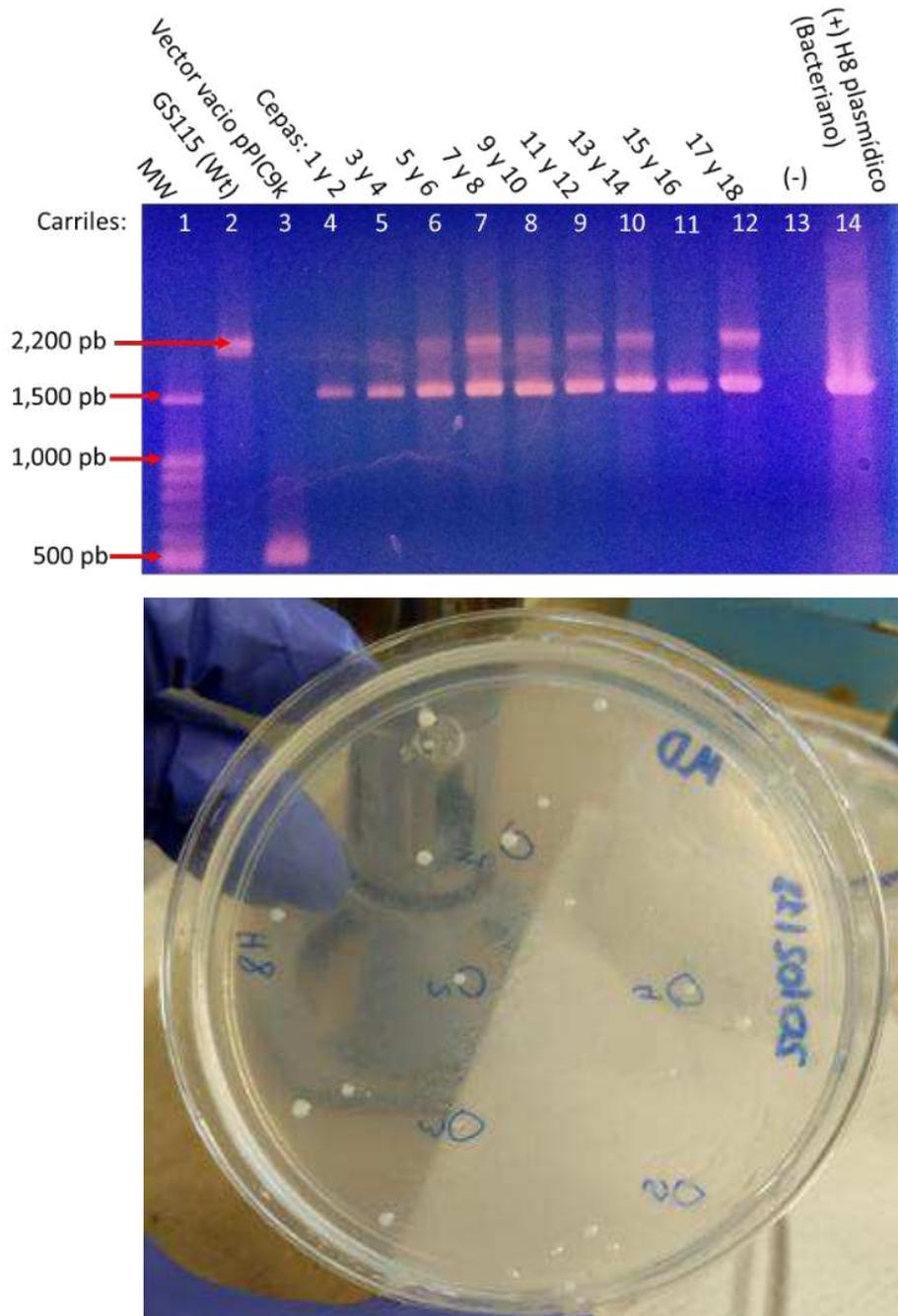


Figura 20.- Evaluación por amplificación de locus *AOX1* en 18 cepas transformadas H8. (Superior), gel representativo de la integración del gen de interés en la una cepa GS115 de *Pichia pastoris*. (Inferior), Colonias obtenidas de la transformación por recombinación homóloga en *Pichia pastoris* GS115.

5.3 Producción de las enzimas Lignina Peroxidasa H8

5.3.1 Crecimiento e inducción de cepas y producción de proteínas recombinantes

Se procedió a generar la producción de biomasa mediante la agitación en “Shaker” en tubos falcón de 50 mL con un contenido de 15 mL de medio de crecimiento YPD para cada una de las cepas y un control Wt como medición base durante 48-72h a temperatura ambiente, una vez transcurrido dicho tiempo la biomasa generada fue centrifugada a 1,500 rpm, 20 minutos y lavada con medio de inducción y vuelta a centrifugar (1,500 rpm, 20 minutos), se decantó el medio restante y se procedió a inducir con un volumen de 0.5 % metanol v/v cada 24 h durante 96 horas, transcurridas las 96 horas se dializaron las muestras en buffer PBS 1x durante 6 horas y se procedió a su separación mediante la técnica SDS-PAGE, la tabla 9 resumen los eventos del proceso y su duración en días.

Tabla 9.- Proceso de producción durante la generación de proteínas recombinantes mediante la inducción con metanol en *Pichia pastoris* GS115.

Evento	Días
Crecimiento – medio general – YPD 15 mL.	3
Centrifugado – lavado – centrifugado.	-
Cambio a medio de inducción - BMMY 15 mL (metOH 0.5% v/v).	1
Inducción 75 µL metOH (0.5% v/v) c/24 h.	4
Dializado y precipitación metanol-cloroformo.	2
SDS-PAGE.	1
Total	11

5.3.2 Cuantificación de la producción por el Método de Bradford

Se obtuvo la ecuación para determinar la concentración de 12 muestras representativas de la producción de proteínas recombinantes precipitadas representada en la figura 21, los valores de desviación estándar se describen en la tabla 10.

De las proteínas totales evaluadas se pudo observar un promedio de producción de 1.20 mg/mL de proteínas totales sin procesos adicionales de purificación ni concentración, con valores obtenidos entre 0.44 - 3.35 mg/mL (Figura 22, Tabla 11).

Tabla 10.- Desviaciones estándar de la curva estándar de proteína.

Tubo #	Desv. Est.
1	0.0027
2	0.0526
3	0.0658
4	0.0204
5	0.0131
Blanco	0.0288

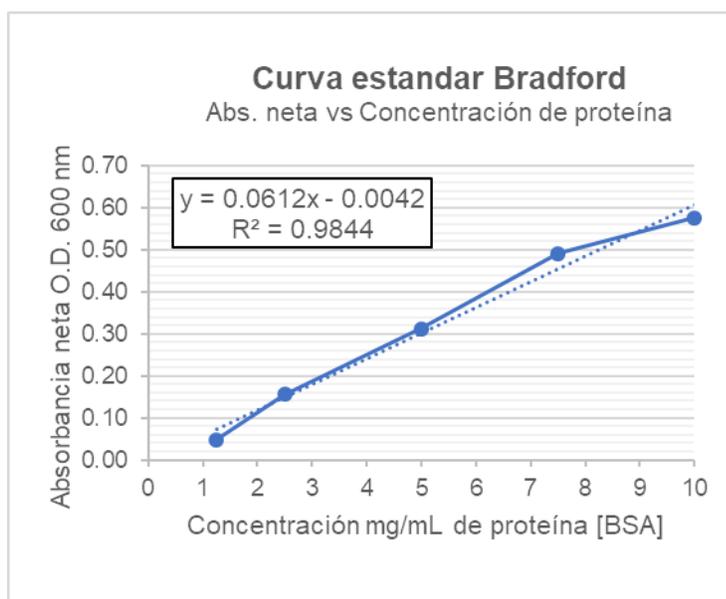


Figura 21.- Curva estándar de concentración de proteína por el método de Bradford. Se observa un coeficiente de determinación >0.98 por lo que existe linealidad para determinar la concentración de proteínas en base a los valores obtenidos de absorbancia para las muestras a 600 nm.

Tabla 11.- Valores de absorbancia, concentración y desviación estándar de proteínas totales de cepas pPIC9K-H8.

Tubo	Absorbancia D. O. 600 nm	Concentración (mg/mL)	Desv. Est.
1	0.0610	1.07	0.0110
2	0.1551	2.60	0.0342
3	0.0386	0.70	0.0277
4	0.1096	1.86	0.0087
5	0.0222	0.43	0.0125
6	0.0146	0.31	0.0119
7	0.0435	0.78	0.0102
8	0.2008	3.35	0.0309
9	0.0195	0.39	0.0520
10	0.0623	1.09	0.0561
11	0.0823	1.41	0.1144
12	0.0227	0.44	0.0181

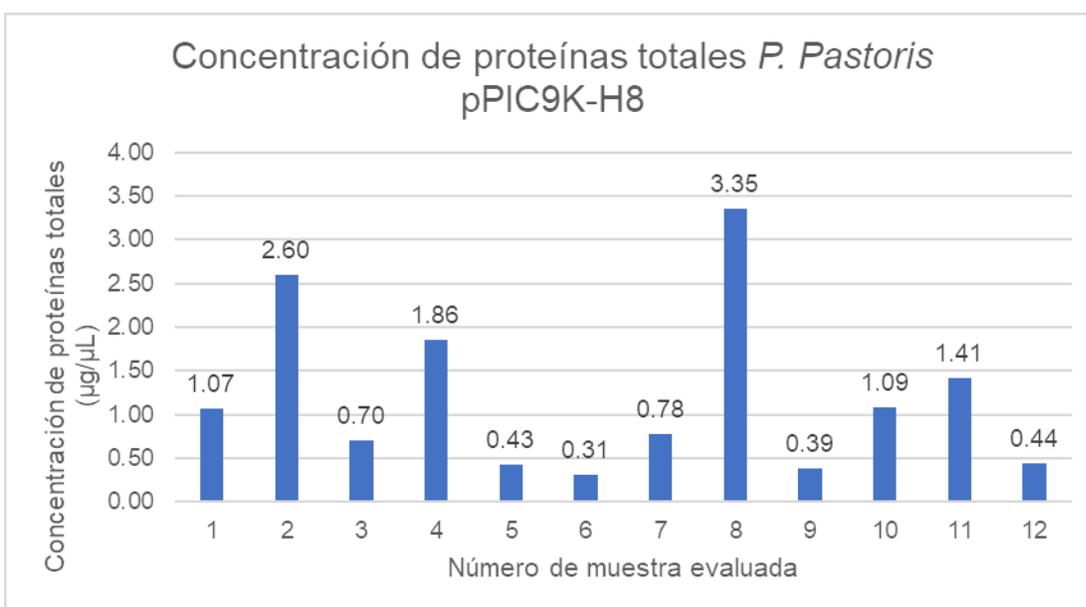


Figura 22. - Representación gráfica de la concentración de proteínas totales obtenidas durante la producción bajo inducción en metanol.

5.3.3 Evaluación de las proteínas obtenidas en el sobrenadante de las cepas recombinantes

Posteriormente las proteínas totales de 5 cepas fueron suspendidas en un volumen de buffer de lisis a completar 30 μ L y se procedió a separar las proteínas a 100v durante 3 horas, obteniéndose bandas tenues para la producción de proteínas con la tinción con azul de Coomassie, sin embargo, se pudo realizar la observación de bandas específicas hacia el anticuerpo marcado hacia la etiqueta presente en las proteínas recombinantes LiPH8 tanto en muestras con el fenotipo carente del gen endógeno *AOX1* (*Mut^S*) y en muestras concentradas por centrifugación de proteínas totales de cepas *Mut⁺* (Figura 23, carril Pool), presentando un peso molecular por encima del esperado, alrededor de 45 kDa, lo cual ha sido reportado en proteínas recombinantes causado por eventos de agregación y específicamente en *Pichia pastoris* por modificaciones postraduccionales de N-glicosilación.

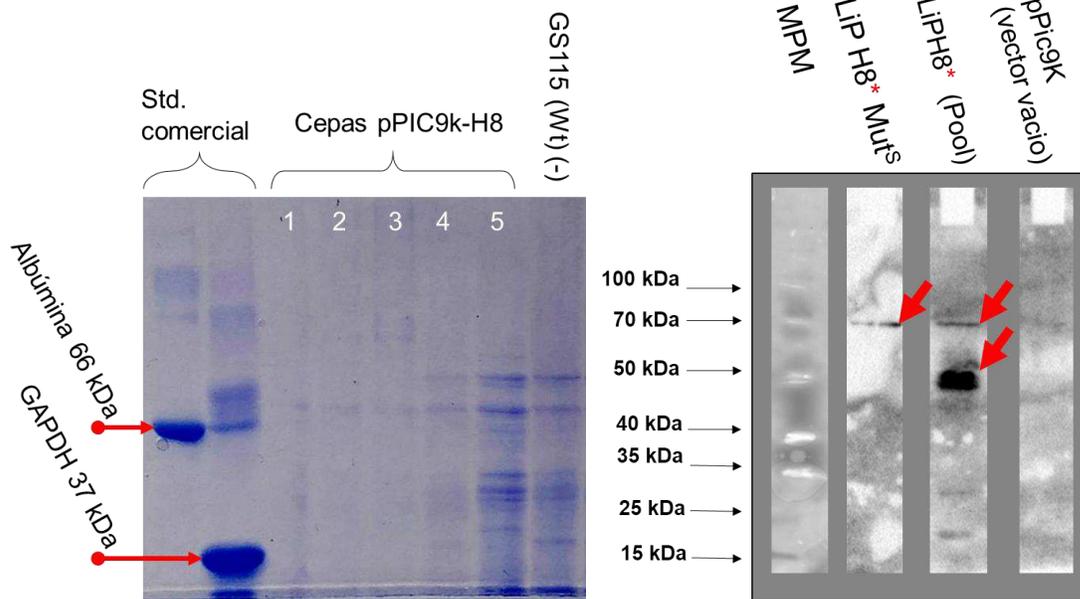


Figura 23.- Gel SDS-PAGE 12% de cepas recombinantes y Western blot de LiP H8. Membrana de nitrocelulosa, Ac. Primario: Anti-FLAG (1:5,000, 9 h), Ac. Secundario: Anti-Mouse (1:5,000, 2 h), Revelada por luminol + sustrato (1:1).

Capítulo 6: Discusión

6.1 Diseño *in silico* del vector de expresión LipH8

Se compararon secuencias aminoacídicas correspondientes a lignina peroxidasa H2 y H8 pudiendo encontrar sus secuencias nucleotídicas presentes en cepas de referencias obteniéndose así secuencias nucleotídicas molde codificantes completas presentes en dos cepas de hongos basidiomicetos de la especie *Phanerochaete chrysosporium* que representaran un uso de codones característico para estos organismos; a su vez se recuperaron tablas de uso de codones tanto para *Phanerochaete chrysosporium* como para *Pichia pastoris*, teniendo una diferencia de %GC amplia teniendo *Pichia pastoris* un porcentaje de ~42% mientras *Phanerochaete chrysosporium* presenta ~59% siendo esto un factor importante para la producción recombinante de proteínas ya que el uso de un GC% similar al de *Pichia pastoris* ha sido reportado como efectivo para el aumento en la producción¹⁷.

Respecto al diseño de los genes a sintetizar se optó por el uso del vector de expresión pPIC9K debido a la experiencia con este vector de expresión en el laboratorio y por la flexibilidad de generar cepas con múltiples integraciones en el genoma del gen de interés., se optó por modificar la secuencia del gen de interés H8 por una versión con mayor actividad en comparación con la nativa de *Phanerochaete chrysosporium*⁴¹ y se añadió una etiqueta FLAG con la facilidad de mediante un procedimiento opcional para la evaluación generar un corte peptídico con la enzima enteroquinasa para eliminar dicha etiqueta y evaluar así solamente la estructura nativa de la proteína, de igual manera se consideró un reporte previo de la producción en *Pichia pastoris* de la enzima lignina peroxidasa H2 en el vector de expresión pPICZ α consiguieron niveles bajos de expresión atribuyéndolo a una etiqueta C-myc en el extremo carboxilo³⁷.

Ambas secuencias fueron sometidas a un proceso de armonización de codones, el cual ha sido reportado como beneficioso para el aumento en la producción de

proteínas recombinantes como parte de afinamiento tradicional^{66,67}, mediante el “Codon harmonization tool” en la plataforma Galaxy y evaluadas con el “Rare Codon Calculator”⁷⁶ de lo cual para ambos genes se pudo observar un restablecimiento del perfil encontrado la secuencia nativa ahora en el organismo recombinante.

Del proceso de transformación por electrocompetencia en *E. coli* se obtuvieron colonias transformantes para los plásmidos de interés pPIC9K-H2, pPIC9K-H8, pPIC9K y como control pUC19, los plásmidos obtenidos fueron evaluados mediante digestión del plásmido completo y mediante la amplificación del gen de interés mediante oligonucleótidos presentes en los sitios de recombinación para el gen *AOX1* y posterior digestión de los fragmentos amplificados, de lo cual se obtuvieron perfiles idénticos a los predichos mediante el uso de las herramientas bioinformáticas Snapgene en su modalidad de PCR virtual y digestión virtual con enzimas de restricción, lo que genera un gel representativo correspondiente a las bandas generadas por la digestión con las enzimas de restricción ensayadas.

6.2 Inserción por recombinación homóloga en la cepa GS115 de *Pichia pastoris*

Una vez caracterizados los plásmidos recombinantes se linealizaron con el uso de la enzima *Pme* I y el producto digerido fue usado para el procedimiento de recombinación homóloga con la cepa GS115 de *Pichia pastoris*, durante los procedimientos de electroporación y posterior crecimiento en medio selectivo por auxotrofia se obtuvieron números de colonias recombinantes bajos <20 por placa, dichas colonias fueron evaluadas por PCR obteniéndose la confirmación de la integración siendo la mayoría de las cepas correspondientes al fenotipo Mut⁺, también se obtuvieron colonias que correspondían con el fenotipo de reemplazo génico (Mut^S) siendo este último fenotipo el de consumo lento del inductor metanol por lo que su evaluación es interesante con fines de establecer comparativas de producción entre los dos fenotipos posibles.

6.3 Producción de las enzimas Lignina Peroxidasa H8

El procedimiento de crecimiento se realizó mediante condiciones estándar de acuerdo con lo establecido en el manual "Pichia Expression Kit" por lo que se optó la evaluación de cada una de las cepas del gen de interés H8 en tubos falcon de 50 mL con 15 mL de medio de crecimiento YPD y posterior lavado e inducción en 15 mL de medio de inducción BMMY con una inducción cada 24 horas con 0.75% de metanol hasta las 96 horas, todo lo anterior bajo agitación constante.

Durante la expresión de proteínas se evaluaron 24 colonias recombinantes de las cuales se procedió a precipitar el sobrenadante obtenido tras la fase de producción y se visualizaron las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y western blot, de lo que se obtuvieron bajos niveles de expresión para las proteínas recuperadas del sobrenadante en promedio 1.20 mg/mL.

De estas solo una colonia presentó niveles apreciables de las proteínas producidas por *Pichia pastoris*, al ensayar las proteínas obtenidas de sobrenadantes se pudo observar una banda distintiva en muestras concentradas correspondientes a un pool de 5 colonias, presentando un tamaño mayor al esperado de 38-41 kDa.

El cambio de tamaño relativo se puede explicar debido a que los perfiles de expresión recombinantes pueden variar en gran proporción debido a efectos de glicosilación presentes en los sistemas de expresión, en el caso de *Pichia pastoris* "N-glicosilación", cambiando el tamaño esperado de la proteína en el ensayo de western blot⁶⁹.

La producción de enzimas Hemo peroxidasas recombinantes ha sido un reto desafiante ya que conllevan la incorporación de un grupo prostético Hemo, su producción en *Pichia pastoris* ha sido limitada por la baja disponibilidad presente internamente, esto se puede solucionar suplementando al medio de cultivo⁷⁰, esto podría explicar en parte los bajos niveles presentes de la LiP H8.

El uso de *Pichia pastoris* como modelo de expresión de proteínas recombinantes ha sido extensamente utilizado para la producción de proteínas de interés industrial siendo este uno de los sistemas heterólogos más usados, sin embargo, esto es uno de los retos que conlleva el uso del sistema de expresión de *Pichia pastoris*, ya que conlleva el monitoreo preciso de niveles de metanol para la expresión de los transgenes lo cual es un proceso impreciso sin las herramientas adecuadas, a la par de una transición de fuente de carbono de glucosa a metanol lo que afecta e inclusive puede inhibir la producción de proteínas recombinantes⁷¹.

La presencia de metanol en concentraciones altas puede ser demeritoria para la viabilidad celular del cultivo por lo cual es importante la monitorización de los niveles de metanol presentes en el medio de cultivo condición que no fue evaluada durante este trabajo, alternativas modernas para la evaluación individual de cada matraz de manera inalámbrica se han desarrollado por lo que serían opciones interesantes de implementar y evaluar⁷².

La relación entre los parámetros de la secuencia y la expresión final de un transgen son dependientes de la complejidad de la proteína, adaptación de uso de codones, estructura secundaria de RNAm, “efecto rampa” entre varios valores metabólicos por lo que aún no se ha podido establecer parámetros rigurosos que aseguren la expresión en buena medida de un transgen, avances al respecto en base a la secuencia se han realizado proponiendo parámetros como el CAI: Codon adaptation Index o el “relative synonymous codon usage” (RSCU) sin embargo en estudios evaluando su efectividad no existe una correlación directa entre dichos parámetros y una buena procesividad, por lo que actualmente se están desarrollando modelos predictivos que contemplen los procesos celulares como lo son la disponibilidad de ribosomas o la reducción en las tasas de elongación o iniciación durante la transcripción^{73,74,75}.

Las cepas transformantes de copia sencilla presentaron baja expresión aún y con la estrategia de optimización de codones en concordancia con resultados obtenidos bajo condiciones similares en la cepa de *Pichia pastoris* X-33³⁷, por lo que es de interés la generación de cepas multicopias bajo el uso del mismo vector

para corroborar si la expresión del gen es tóxica para *Pichia pastoris* o los niveles de producción monocopia no son adecuados para el gen de la lignina peroxidasa H8.

Reportes similares de bajos niveles de secreción han sido reportados en la literatura a los cuales se les atribuye los bajos niveles de expresión a una rápida formación de RNAm los cuales causan el “síndrome del codón hambriento” debido a altas concentraciones del cognato del RNAt causando una deficiencia de la disponibilidad de RNAt resultando en un incremento en los errores de traducción⁷⁶. La estructura secundaria del RNAm también juegan un papel importante durante el proceso de producción de proteínas en proteínas con el uso de codones alterados, un ejemplo de esto fue la producción de una cutinasa recombinante con el uso de codones adaptado a *E. coli* la cual tuvo niveles inferiores de producción debido a un aumento en la estabilidad de secuencias secundarias en el extremo 5' del RNAm⁷⁷.

Desde el punto de vista funcional la expresión de enzimas activas en carbohidratos en *Pichia pastoris* es dependiente del vector usado teniendo distintos niveles de expresión del mismo gen en distintos vectores⁷⁸.

Métodos modernos para la generación y evaluación de producción de grandes cantidades de cepas mediante evolución dirigida⁷⁹ o el cultivo en microplaca⁸⁰ han sido previamente han sido publicados, la desventaja de estos es el uso de técnicas es que conllevan costos altos de implementación inicial por el uso infraestructura de instrumental de precisión.

Trabajos previos en el grupo de investigación han dejado lecciones importantes al momento de establecer un modelo de expresión en *Pichia pastoris* como lo son:

La evaluación de las condiciones de pH durante la producción es importante para evitar la degradación de las proteínas por acción de proteasas ácidas por lo que la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* usualmente se realiza a pH 6, sin embargo los resultados son dependientes de la proteína a evaluar por lo que es importante realizar ensayos a distintos pH's como ejemplo claro tenemos el

antecedente de la producción de la hormona de crecimiento con etiqueta de histidinas en biorreactor la cual cuando fue producida en un pH inicial de 5 presentaba cantidades perceptibles menores que cuando el cultivo ocurría a pH 6⁴⁹.

El uso de métodos de secuenciación es importante para la corroboración de la correcta inserción en marco de lectura y con la secuencia completa de los genes de interés ya que esfuerzos previos de producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* como el caso de la hormona de crecimiento bovina fueron afectados por inserciones incompletas lo que repercutió en bajos o nulos niveles de expresión⁴⁸.

La capacidad de expresión de proteínas de *Pichia pastoris* es variable, siendo no siempre es el modelo de expresión más adecuado como es el ejemplo de la proteína GABA RhoI⁵⁴.

El uso de un ensayo funcional es importante para una evaluación veraz en las primeras etapas de desarrollo de la producción de proteínas recombinantes, en palabras de uno de los primeros impulsores del uso de *Pichia pastoris* como plataforma para la producción de proteínas recombinantes :“a functional (enzymatic) assay or a polyclonal antibody preparation against the protein product ...However, going into an expression effort with *P. pastoris* without such an assay is almost certainly a recipe for frustration and disappointment.”¹⁷.

Capítulo 7: Conclusiones

- Se diseñó un vector de expresión codificante mediante la estrategia de armonización de codones para la enzima degradadora de la madera lignina peroxidasa H8 en el vector de expresión pPIC9K.
- Se generaron colonias recombinantes de *E. coli* con secuencias armonizadas para LiP H8 y LiP H2 y se evaluó la integridad mediante digestión con las enzimas de restricción *Pst*I, *Acc*I, *Sma*I, y *Sna*BI (plásmidos), *Nla*III, *Hph*I, *Acc*I, *Bst*EII (PCR región AOX1).
- Se generaron cepas recombinantes de *Pichia pastoris* GS115 con versiones armonizadas hacia el uso de codones específico de *Pichia pastoris* del gen lignina peroxidasa H8 (N = 40) y se identificó por PCR el fenotipo Mut⁺ (23) o Mut^S (2), simultáneamente se clonó e identificaron colonias H2 Mut⁺ (3).
- Se cuantificaron en promedio 1.20 mg/mL de proteínas totales provenientes del proceso de inducción de las cepas recombinantes lignina peroxidasa H8.
- Se evaluó satisfactoriamente la expresión de la proteína recombinante H8 por la técnica de Western Blot hacia la etiqueta FLAG presente en la proteína.

Capítulo 8: Perspectivas

Para continuar con el avance de este proyecto sería importante realizar:

- Selección de colonias multicopias para el gen H8.
- Uso de métodos para concentración de proteínas.
- Cuantificación por qPCR de la transcripción.
- Evaluación de parámetros cinéticos

(Actividad catalítica, termoestabilidad, procesividad, evaluación de funcionalidad a distintos rangos de pH, comparativa vs comercial).

Para aumentar la producción de las cepas recombinantes

- Alternativas para mejorar la expresión de cepas recombinantes:
- Uso de vector de expresión distintos (pHIL-S1, pPIC3.5, pPICZ).
- Comparar con promotores distintos (Constitutivos: GAP, TEF1, PGK1, Inducibles: DAS, FLD1, ICL1, PHO89, ADH1).
- Añadir un gen reportero para corroborar la expresión del gen de interés.
- Modificación del péptido señal de expresión.
- Uso de un diseño factorial para evaluación de colonias mediante producción de las proteínas en formato de microplacas de 96 pocillos con profundidad de 2 mL.

Capítulo 9: Bibliografía

Introducción:

1. Bud, R. (1989). History of 'biotechnology'. *Nature*, 337, 10. doi: 10.1038/337010a0.
2. Fári, M. G., & Kralovánszky, U. P. (2006). The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science*, 12(1), 9-12. <https://doi.org/10.31421/IJHS/12/1/615>
3. Bud, R. (1991). Biotechnology in the Twentieth Century. *Social Studies Of Science*, 21(3), 415-457. doi: 10.1177/030631291021003002
4. Rao, C. K. (2008) Who coined the terms 'biotechnology' and 'genetic engineering', and when?, *Current science* 95(11):1512-1513
5. Bud, R. (2003). History of Biotechnology. In eLS, (Ed.). doi:10.1038/npg.els.0003086
6. Ligon, B. (2004). Penicillin: its discovery and early development. *Seminars In Pediatric Infectious Diseases*, 15(1), 52-57. doi: 10.1053/j.spid.2004.02.001
7. Dasilva, E. J. (2004). The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(3). doi: 10.2225/vol7-issue3.
8. Smith, E. T., Perry, E. T., Sears, M. B., & Johnson, D. A. (2014). Expression of Recombinant Human Mast Cell Chymase with Asn-linked Glycans in Glycoengineered *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 102, 69–75. DOI: 10.1016/j.pep.2014.08.005.
9. Laukens B., De Wachter C., Callewaert N. (2015) Engineering the *Pichia pastoris* N-Glycosylation Pathway Using the GlycoSwitch Technology. In: Castilho A. (eds) *Glyco-Engineering. Methods in Molecular Biology*, vol 1321. Humana Press, New York, NY.

10. Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39(2), 75–90. DOI: 10.1023/A:1022913015916
11. Lacroix, M. (2008), Persistent use of “false” cell lines. *Int. J. Cancer*, 122: 1–4. DOI:10.1002/ijc.23233
12. Neimark, J. (2015), Line of attack, *Science*. 347(6225), pp. 938-940 DOI: 10.1126/science.347.6225.938
13. Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012). Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. *Cell Journal (Yakhteh)*, 13(4), 203–212.
14. Brondyk, W. (2009). Chapter 11, Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. *Methods in Enzymology*, 463, pp.131-147, DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63011-1.
15. Sreekrishna K., Kropp K.E. (1996) *Pichia pastoris*. In: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 203-207.
16. Palma-Nicolás JP, Ascacio-Martínez JA, Revol. A, Barrera-Saldaña, H.A. (2005) Production of recombinant human placental variant growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 27:1695–1700.
17. Cregg J.M. (2007) Introduction. In: Cregg J.M. (eds) *Pichia Protocols*. *Methods in Molecular Biology*, vol 389. Humana Press.
18. Maccani, A., Landes, N., Stadlmayr, G., Maresch, D., Leitner, C., Maurer, M., ... Mattanovich, D. (2014). *Pichia pastoris* secretes recombinant proteins less efficiently than Chinese hamster ovary cells but allows higher space-time yields for less complex proteins. *Biotechnology Journal*, 9(4), 526–537. DOI: 10.1002/biot.201300305
19. Rebnegger, C., Vos, T., Graf, A. B., Valli, M., Pronk, J. T., Daran-Lapujade, P., & Mattanovich, D. (2016). *Pichia pastoris* Exhibits High Viability and a Low Maintenance Energy Requirement at Near-Zero Specific Growth Rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4570–4583. DOI: 10.1128/AEM.00638-16.

20. Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., & Madden, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5(12), 3376–3385.
21. Lin-Cereghino, J and GP Lin-Cereghino. (2007). Vectors and Strains for Expression in J. M. Cregg (Ed.) *Methods in Molecular Biology* (389) *Pichia* Protocols, 2nd edition. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 11-25
22. Struhl, K., Stinchcomb, D. T., Scherer, S., & Davis, R. W. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), 1035–1039.
23. Daly, R. & T.W. Hearn M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal Of Molecular Recognition*, (18): 119–138 DOI: 10.1002/jmr.687
24. Janusz, G. H. Kucharzyk, K. Magdalena Staszczak, A. P., J. Paszczyński, A. (2013) Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation, In *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 52(1), Pages 1-12, ISSN 0141-0229, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2012.10.003.

Antecedentes

25. Stewart, P., & Cullen, D. (1999). Organization and Differential Regulation of a Cluster of Lignin Peroxidase Genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, 181(11), 3427–3432.
26. Tien, M., & Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(8), 2280–2284.
27. Kirk, T. K, Croan, S., Tien M., Murtagh, K. E., Farrell. R. L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain, In *Enzyme and*

- Microbial Technology, Volume 8, Issue 1, 1986, Pages 27-32, ISSN 0141-0229, DOI: 10.1016/0141-0229(86)90006-2.
28. Hibbett D.S. & Donoghue M.J. (2001). Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Syst Biol.* 50(2): 215-42.
29. Zhou, L.-W., Wei, Y.-L., & Dai, Y.-C. (2014). Phylogenetic analysis of ligninolytic peroxidases: preliminary insights into the alternation of white-rot and brown-rot fungi in their lineage. *Mycology*, 5(1), 29–42. DOI: 10.1080/21501203.2014.895784
30. Kirk, T. K & Farrell. R. L. (1987), Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 465-501
31. Yu, G. C., Wen, X. H., Li, R., Qian. Y., (2006). In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from non-immersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, 41: 1987–1993.
32. Lambertz, C., Ece, S., Fischer, R., Commandeur, U. (2016). Progress and obstacles in the production and application of recombinant lignin-degrading peroxidases. *Bioengineered*, 0(0), 1–10 DOI: 10.1080/21655979.2016.1191705
33. Whitman, R. & Tien, M. (1996). Heterologous expression and reconstitution of fungal Mn Peroxidase, *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 333(2), 439 – 446,
34. Smith, A. T., Santama, N., Dacey, S., Edwards, M., Bray, R. C., Thorneley, R. N. F., and Burke, J. F. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 13335-13343.
35. Nie, G., Reading, N., & Aust, S. (1998). Expression of the Lignin Peroxidase H2 Gene from *Phanerochaete chrysosporium* in *Escherichia coli*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 249(1), 146-150. doi: 10.1006/bbrc.1998.9106
36. Aifa, M.S., Sayadi, S. & Gargouri, A. *Biotechnology Letters* (1999) 21: 849. DOI:10.1023/A:1005541206270

37. Wang, W., & Wen, X. (2009). Expression of lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium* by multi-copy recombinant *Pichia* strain. *Journal Of Environmental Sciences*, 21(2), 218-222. doi: 10.1016/s1001-0742(08)62254-8
38. Gu, L., Lajoie, C., & Kelly, C. (2003), Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in the Yeast *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 1403–1409.
39. Wang, H., Lu, F., Sun, Y. et al. *Biotechnology Letters* (2004) 26: 1569. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000045654.66689.b4>
40. Semba, Y. Ishida, M. Yokobori, S.-I. Yamagishi, A. (2015) Ancestral amino acid substitution improves the thermal stability of recombinant lignin- peroxidase from white-rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* strain UAMH 3641, *Protein Engineering, Design and Selection*, 28(7), Pages 221–230, DOI:10.1093/protein/gzv023
41. Pham, L. T. M., Kim, S. J., & Kim, Y. H. (2016). Improvement of catalytic performance of lignin peroxidase for the enhanced degradation of lignocellulose biomass based on the imbedded electron-relay in long-range electron transfer route. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 247. DOI: 10.1186/s13068-016-0664-1
42. Ayuso-Fernández, I., Martínez, A. T., & Ruiz-Dueñas, F. J. (2017). Experimental recreation of the evolution of lignin-degrading enzymes from the Jurassic to date. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 67. DOI:10.1186/s13068-017-0744-x
43. Akanuma, S. (2017). Characterization of Reconstructed Ancestral Proteins Suggests a Change in Temperature of the Ancient Biosphere. *Life*, 7(3), 33. DOI:10.3390/life7030033
44. Mendoza, R. (1996). *Hormona del crecimiento humana recombinante (HGHR) : biosíntesis, purificación y producción de anticuerpos monoclonales.* UANL, Monterrey, N.L. México.

45. Escamilla, L.L. (1996) Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHR) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. UANL, Monterrey, N.L. México.
46. Sánchez, C.N. (1998). Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de hormonas del crecimiento humana recombinante y evaluación de esquemas de purificación. UANL, Monterrey, N.L. México.
47. Reyes, J.M. (2000). Hormona del crecimiento caprino: construcción de un DNA que la codifica y su expresión en *Pichia pastoris*. UANL, Monterrey, N.L. México.
48. Gallardo, H.L. (1999). Construcción de cepas de *Pichia pastoris* portadoras del DNAC de la hormona del crecimiento bovino. UANL, Monterrey, N.L. México.
49. Rocha, M.R. (2005). Utilidad de una etiqueta de poli-histidina para la purificación de la hormona del crecimiento bovino recombinante. UANL, Monterrey, N.L. México.
50. Cab, E.L. (2000). Construcción de una cepa de *Pichia pastoris* sobreproductora de la isoforma de 20 kDa de la hormona del crecimiento humano. UANL, Monterrey, N.L. México.
51. Palma, J.P. (2002) Clonación molecular del DNAC de la hormona variante del crecimiento humano y su expresión en *Pichia pastoris*. UANL, Monterrey, N.L. México.
52. Ascacio-Martínez, J., & Barrera-Saldaña, H. (1994). A dog growth hormone cDNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone. *Gene*, 143(2), 277-280. doi: 10.1016/0378-1119(94)90110-4
53. Ascacio, J.A. (2004). Producción en biorreactor, purificación y bioensayo de hormonas recombinantes del crecimiento. UANL, Monterrey, N.L. México.
54. Reyes, J.M. (2005). Expresión funcional del receptor GABA p1 humano en levaduras. UANL, Monterrey, N.L. México.
55. Márquez, A.R. (2011). Establecimiento de un método de purificación de proteínas recombinantes, basado en etiquetas de histidina, producidas en *Pichia pastoris*. UANL, Monterrey, N.L. México.

56. Guerrero, G. (2014). Producción de la Proteína E2 del virus del papiloma humano tipo 16 en la levadura *Pichia pastoris*. UANL, Monterrey, N.L. México.
57. Alonso, L.A. (2015). Producción y caracterización de la superóxido dismutasa a (SodA) de nocardia brasiliensis en *Pichia pastoris*. UANL, Monterrey, N.L. México.
58. Luévano, A. (2011). Producción, purificación y bioensayo de prolactinas recombinantes. UANL, Monterrey, N.L. México.
59. Muza, C. (2014). Producción, caracterización y escalamiento de biorreactor de la isoforma de 23 kDa de la prolactina humana. UANL, Monterrey, N.L. México.
60. Díaz R., F. E. (2001) Estudio molecular y celular bajo la influencia de condiciones de cultivo durante la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*, Tesis de Maestría, UANL.
61. Wen, X., Jia, Y., & Li, J. (2009). Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* – A white rot fungus. *Chemosphere*, 75(8), 1003-1007. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.052
62. Rodriguez-Couto, S. (2013). Treatment of Textile Wastewater by White-rot Fungi: Still a Far Away Reality? *Textiles and Light Industrial Science and Technology (TLIST)*, 2, (3) Pp 113-119.
63. Alcalde, M. (2015). Engineering the ligninolytic enzyme consortium. *Trends in Biotechnology* 1–8, DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.12.007
64. Conesa A., J. Punt P., Van den Hondel C.A.M.J.J. (2002), Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. J Biotechnol.* 14; 93(2): 143-58.
65. Singh, H. (2006) Fungal Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, in *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
66. Claassens, N., Siliakus, M., Spaans, S., Creutzburg, S., Nijse, B., & Schaap, P. et al. (2017). Improving heterologous membrane protein

- production in *Escherichia coli* by combining transcriptional tuning and codon usage algorithms. PLOS ONE, 12(9), e0184355. doi: 10.1371/journal.pone.0184355
67. Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N., ur Rahman, S., Mustafa, M., Khan, S., & Patching, S. (2018). Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Protein Expression And Purification, 144, 12-18. doi: 10.1016/j.pep.2017.11.005
68. Clarke TF IV, Clark PL (2008) Rare Codons Cluster. PLoS ONE 3(10): e3412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003412>
69. Teh, S., Fong, M., & Mohamed, Z. (2011). Expression and analysis of the glycosylation properties of recombinant human erythropoietin expressed in *Pichia pastoris*. Genetics And Molecular Biology, 34(3), 464-470. doi: 10.1590/s1415-47572011005000022
70. Krainer, F., Capone, S., Jäger, M., Vogl, T., Gerstmann, M., & Glieder, A. et al. (2015). Optimizing cofactor availability for the production of recombinant heme peroxidase in *Pichia pastoris*. Microbial Cell Factories, 14(4). doi: 10.1186/s12934-014-0187-z
71. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M., McNeil, B., & Harvey, L. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast, 22(4), 249-266. doi: 10.1002/yea.1208
72. Vasala, A., Panula, J., Bollók, M., Illmann, L., Hälsig, C., & Neubauer, P. (2006). A new wireless system for decentralised measurement of physiological parameters from shake flasks. Microbial Cell Factories, 5(1), 8. doi: 10.1186/1475-2859-5-8
73. Ramón, A., & Marín, M. (2011). Advances in the production of membrane proteins in *Pichia pastoris*. Biotechnology Journal, 6(6), 700-706. doi: 10.1002/biot.201100146
74. Shah, P., Ding, Y., Niemczyk, M., Kudla, G., & Plotkin, J. (2013). Rate-Limiting Steps in Yeast Protein Translation. Cell, 153(7), 1589-1601. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.049

75. Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon Bias and Heterologous Protein Expression. *Trends In Biotechnology*, 22(7), 346-353. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.04.006
76. Huang, Y., Chen, Y., Mo, D., Cong, P., & He, Z. (2012). Attenuated Secretion of the Thermostable Xylanase xynB from *Pichia pastoris* Using Synthesized Sequences Optimized from the Preferred Codon Usage in Yeast. *Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 22(3), 316-325. doi: 10.4014/jmb.1109.09032
77. Griswold, K., Mahmooda, N., Llverson, B., & Georgiou, G. (2003). Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Elsevier Protein Expression And Purification*, 27(1), 134-142. doi: 10.1016/S1046-5928(02)00578-8
78. Haon, M., Grisel, S., Navarro, D., Gruet, A., Berrin, J., & Bignon, C. (2015). Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast *Pichia pastoris*. *Frontiers In Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01002.
79. Garcia-Ruiz, E., Mate, D. M., Gonzalez-Perez, D., Molina-Espeja, P., Camarero, S., Martínez, A. T., Ballesteros, A. O. and Alcalde, M. (2014) Directed Evolution of Ligninolytic Oxidoreductases: from Functional Expression to Stabilization and Beyond, in *Cascade Biocatalysis : Integrating Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions* (eds S. Riva and W.-D. Fessner), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. DOI: 10.1002/9783527682492.ch1
80. Mellitzer, A., Weis, R., Glieder, A., & Flicker, K. (2019). Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 11(61). doi: 10.1186/1475-2859-11-61

Referencias adicionales:

81. (User guide, Catalog Number K1710-01, Publication Number MAN0000012, Invitrogen®)

82. Plasmid Maps and Sequences. (2019). Retrieved from <https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/>

Capítulo 10: Anexos

Anexo 1: Protocolos usados

1.1: Visualización en geles de agarosa al 1% de productos amplificados.

1. Preparar la cámara electroforética con una solución de buffer TAE o TBE al 1x, seguido del secado y acomodo de molde para el gel contando con un “peine” para la formación de pocillos en el gel.
2. Pesaje del volumen de agarosa usado, para recamaras con un volumen de 30 mL se mide 0.3g (1%).
3. En un matraz pequeño ~120 mL mezclar la agarosa pesada con el volumen correspondiente de agua destilada, calentar en mechero de Bunsen, placa de calentamiento o en microondas por 45 segundos procurar un calentamiento uniforme, para evitar la formación de grumos o zonas no fundidas del gel.
4. Verter el gel líquido en el molde acomodado apropiadamente para su formación dentro de la cámara electroforética, dejar solidificar por 3 minutos aproximadamente.
5. Voltar el gel en posición de carga procurando que los pocillos se encuentren en el extremo aniónico.
6. Cargar el marcador de peso molecular y las muestras a observar procurando mezclar cada una con buffer de carga (1-3 μ L).
7. Conectar la cámara electroforética a una fuente de poder procurando que los cables estén conectados con la polaridad correcta, prender la fuente de poder ajustándola a 60 volts durante 5 minutos para que la muestra entre apropiadamente después de este lapso de tiempo aumentar el voltaje a 120 volts durante ~40-90 minutos.
8. Apagar la fuente de poder y transferir el gel a una solución de tinte con bromuro de etidio.
9. Enjuagado y lavado.
10. Visualización en transiluminador y análisis del gel.

TAE - Tris acetato con EDTA		
Solución stock, pH ~8.5	50 x	1 x
Tris base (40 mM) (MW 121.14)	242 g	4.84 g
Ácido acético glacial (40 mM)	57.1 mL	1.15 mL
EDTA (1 mM) (MW 372.24)	18.61 g	18.61 g
Agua destilada	Completar a 1 L	Completar a 1 L

TBE - Tris borato con EDTA		
Solución stock, pH ~8.5	10 x	1 x
Tris base (89 mM) (MW 121.14)	108 g	10.8 g
Ácido bórico (89 mM)	55 g	5.5 g
EDTA (1 mM) (MW 372.24)	7.44 g	0.744 g
Agua destilada	Completar a 1 L	Completar a 1 L

Rango de movilidad de DNA en distintos porcentajes de agarosa	
0.3	60 – 5.0 kb
0.5	30 – 1.0 kb
0.7	12 – 0.8 kb
1.0	10 – 0.5 kb
1.5	7.0 – 0.3 kb
2.0	4.0 – 0.2 kb
3.0	0.3 – 0.1 kb

Modificado a partir de: Chapter 5: Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis, Protocol 1 Agarose Gel Electrophoresis, Vol 1, 5.4-5.13. En: Sambrook, J., & Russell D., W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra Ed.) (3-Volume Set). New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

1.2: Extracción de DNA plasmídico (Miniprep).

1. Preparar soluciones stock de las 3 soluciones a usar tomando en cuenta que por cada 5 tubos de bacterias cultivadas se utilizarán 0.5 mL de solución I, 1 mL de solución II, 0.75 mL de solución III, 0.5 mL de cloroformo, 0.5 mL de fenol, 1 mL de etanol 100% y 0.6 mL de etanol 70% y 0.5 mL de buffer TE 1x.
2. Inocular colonias de bacterias transformadas (*E. coli* top 10'F) en 4 mL medio LB con el antibiótico correspondiente (ampicilina/kanamicina, etc). Incubar por 16 horas / 37°C con agitación. De cada tubo tomar 2mL del medio incubado y transferir a tubo Eppendorf de 2mL.
3. Centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.
4. Decantar el medio sin perder la pastilla y añadir 100µL de solución I fría (50mM glucosa, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8 almacenada en refrigeración).
5. Resuspender e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 200µL de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) preparada en el momento (la duración estable es de 1 semana a temp. ambiente); mezclar por inversión e incubar por 5 minutos en hielo (no vortexear).
7. Agregar 150µL de solución III (Acetato de sodio 3M, almacenada a temperatura ambiente) y mezclar por inversión; incubar 3-5 minutos en hielo.
8. Centrifugar por 6 minutos a 13,000 rpm y transferir el sobrenadante a tubos de 2mL. Añadir ½ volumen de fenol y ½ volumen de cloroformo.
9. Mezclar con vortex por 30 segundos. Centrifugar 4 minutos a 13,000 rpm y transferir la fase acuosa (capa superior) a tubos de 1.5mL.
10. Añadir 2 volúmenes de etanol (100%) frío, mezclar por inversión e incubar por 10 minutos a -20°C.
11. Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm y decantar sin perder la pastilla de ADN.
12. Añadir 600µL de etanol al 70% frío, mezclar por inversión.
13. Centrifugar 4 minutos a 13,000 rpm decantar sin perder la pastilla

14. Secar la pastilla a 50°C y resuspender en 50-100µL de agua libre de nucleasas (agua esterilizada en autoclave) o buffer TE 1x y almacenar a -20°C.

Nota: El fundamento de la técnica se basa en la desnaturalización del DNA lineal a pH en el rango de pH 12.0 – 12.5 mientras que el DNA circular cerrado covalentemente (CCC) permanece intacto, si el pH es mayor a 13 el DNA circular cerrado covalentemente se genera una desnaturalización irreversible del plásmido, esto combinado con lisis con SDS y NaOH.

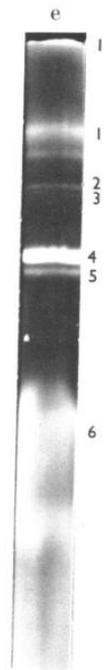
El uso de EDTA “secuestra” los iones de las proteínas lo que facilita su desnaturalización.

La alta concentración de acetato de sodio causa la precipitación de los complejos proteína-SDS y del RNA de alto peso molecular.

Una muestra típica de este tipo de extracción visualizada en gel se debe ver de la siguiente manera, donde la distribución de bandas es (1) contaminación de DNA genómico, (2) Dímeros de DNA CCC, (3) DNA circular abierto, (4) DNA CCC, (5) DNA CCC dañado irreversiblemente, (6) RNA de bajo peso molecular.

Modificado a partir de: Chapter 1: Plasmids and their usefulness in molecular cloning, Protocol 1 Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep 1.32-1.34 En: Sambrook, J., & Russell D., W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra Ed.) (3-Volume Set). New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

H.C. Birnboim, J. Dolly, (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucleic Acid Research, vol 7, number 6, 1513–1523.



1.3: Miniprep rápido.

1. Colocar 2.0 mL de cultivo de *E. coli* crecido por una noche centrifugar.
2. Agregar 0.5 mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (SEVAG) y 0.5 mL de buffer TE.
3. Mezclar en vortex a máxima velocidad por 1 min.
4. Centrifugar a 12,000g por 5 min. Durante la centrifugación, prepare tubos con 0.5 mL de isopropanol. Después de la centrifugación tomar cuidadosamente 0.45 mL de la fase acuosa superior sin remover la interfase, y añadirlo al isopropanol.
5. Mezclar bien y centrifugar inmediatamente a 12,000g por 5 min.
6. Decantar el sobrenadante, añadir cuidadosamente 0.5 mL de etanol 70% por la pared del tubo, mezclar y centrifugar a 12,000g por 5 min. Repetir el lavado.
7. Secar la pastilla y resuspender en 100 µL de TE.

Aproximadamente 5-10 microlitros de este ADN pueden cortarse con enzimas de restricción apropiadas para el análisis.

Consultado en: Chowdhury, K. (1991). One step "miniprep" method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 19(10), 2792.

1.4: Cuantificación de ácidos nucleicos en espectrofotómetro Nanodrop 2000

1.- Limpiar el Nanodrop pipeteando 2-3 μL de agua desionizada en la punta, bajar el brazo para asegurar la limpieza de la parte superior del pedestal, levantar el brazo, limpiar ambas superficies ópticas con un trapo de laboratorio sin pelusas.

2.- Abrir el software y elegir "Nucleic acid" (ácidos nucleicos).

3.- Calibrar con 1 μL de buffer y seleccionar el botón "blank" (blanco), limpiar ambas superficies ópticas como se indicó anteriormente.

4.- Elegir el tipo de muestra a cuantificar (DNA, RNA, DNAss, etc.)

5.- Colocar 1 μL de muestra, cerrar el brazo.

6.- Seleccionar el botón "Measure" (medir) y Tomar nota del resultado cuantificado.

*** Notas ***

- La aplicación calculará la concentración de DNA en $\text{ng}/\mu\text{L}$ mostrando también la absorbancia a 260 y 280 nm en una distancia de 10mm, mostrara la relación 260/280 donde el valor ideal para DNA es de ~ 1.80 y ~ 2.0 para RNA (basado en la absorción media ponderada de cada nucleótido) y la tasa de pureza 280/230 con un valor ideal de ~ 2.0 , en la relación 280/230 2.2 sería considerado un valor de alta pureza, sí el valor es menor es indicativo de presencia de contaminantes.
- Se recomienda purificar los ácidos nucleicos antes de cuantificar su concentración en nanodrop, Agentes como fenol, TRIzol, sales caotrópicas, y otros compuestos aromáticos pueden absorber en los rangos entre 200-230nm, la contaminación con dichos agentes podrían ser una causa de error en los procedimientos posteriores.
- El pedestal del nanodrop mide volúmenes desde $0.5\mu\text{L}$ - $2.0\mu\text{L}$ de muestra, cuantificando muestras desde 0.4 - $15,000 \text{ ng/mL}$ de dsDNA.
- Límite de detección: $0.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, Precisión: dentro del 2%, Reproducibilidad típicamente de $\pm 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ para muestras de dsDNA $\leq 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $\pm 2\%$ para muestras $> 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

- Protocolo de acuerdo a lo establecido por el fabricante en: "T042-TECHNICAL BULLETIN" y "NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, V1.0 User Manual".

1.5: Extracción de DNA genómico mediante técnica TSNT

Materiales:

- Puntillas para pipetas automáticas de 200 y 1000 μ L
- Microtubos de 1.5 mL, 2.0 mL
- Guantes estériles.
- Buffer de lisis TSNT (Triton/SDS Solution) (10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 2% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0).

Procedimiento

- 1.- Rellenar un tubo de 1.5 mL de un cultivo overnight de levaduras, centrifugar la muestra a 4,000g por 12 min y decantar el sobrenadante, rellenar cada tubo con la muestra correspondiente hasta 1.5 mL y centrifugar 4,000g por 12 minutos, decantar el sobrenadante.
- 2.- Agregar 200 μ L de buffer de lisis TSNT, mezclar en el vortex 30 segundos, a velocidad moderada.
- 3.- Agregar 500 μ L de fenol saturado, mezclar en el vortex a velocidad moderada por 30 segundos o más, hasta que se forme una suspensión café parda homogénea.
- 4.- Agregar 100 μ L de SEVAG, mezclar en el vortex a velocidad moderada por 1-3 min. Verificar la homogeneidad de la solución.
- 5.- Agregar 200 μ L de TE 1X y mezclar en el vortex por 30 s.
- 6.- Centrifugar 8 min/10,000 rpm.
- 7.- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 mL libre de nucleasas, cuidando de no llevarse el material de la interfase.
- 8.- Agregar 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Centrifugar 5 min/10,000 rpm.

9.- Decantar cuidadosamente el contenido y agregar a la pastilla de DNA 500 μ L de etanol 70% e invertir varias ocasiones (para lavar la pastilla). Se puede golpear el fondo del tubo para desprender la pastilla y hacer un mejor lavado.

10.- Centrifugar 10 min/10,000 rpm.

11.- Decantar el contenido (tratando de eliminar al máximo las gotas de etanol invirtiendo el tubo sobre una toalla de papel secante) y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente por aproximadamente 20 min o hasta que la pastilla sea transparente. Evitar secar más de 30 min ya que después será difícil resuspender el DNA.

12.- Agregar 100 μ L TE 1X y resuspender primero con golpecitos suaves, y después dejando en agitación durante toda la noche.

13.- Verificar que el tubo esté rotulado con los datos importantes para poder identificar la muestra (al menos Nombre, protocolo, fecha y concentración de DNA). Guardar el stock de DNA a 4°C.

Modificado a partir de: Protocol 11: Growth of *S. cerevisiae* and preparation of DNA, Vol 1, 4.67, Appendix 8: Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, Vol 3, 8.9-8.15 En: Sambrook, J., & Russell D., W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra Ed.) (3-Volume Set). New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

1.6: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

De una muestra con el fragmento a amplificar se depositarán alícuotas correspondientes a los tubos de la muestra con los componentes de la reacción de la siguiente manera:

1. En un tubo de 0.2 mL se realiza una mezcla de los reactivos indicados en la tabla.

Mix para PCR	
Reactivo	Volumen
H ₂ O MQ	7.7 µL
DNA plantilla	1.1 µL
Primer 5' (forward)	0.6 µL
Primer 3' (reverse)	0.6 µL
GOTaq mm (2x)	10.0 µL
Volumen final	20.0 µL

*** Notas ***

- La concentración de DNA a usar es variable, se recomienda usar:
1-10 ng de DNA plasmídico, 20 – 300 ng de DNA genómico (Ausebel, 2003)
1 µg de DNA de mamífero, 10 ng levadura, 1 ng bacteriano, 10 pg plasmídico (Sambrook, 2001).
- Procurar que en cada lote de reacciones amplificadas se cuente con un control positivo (secuencia y primer distinta a la que se desea amplificar) para hacer una comparación relativa de la eficiencia de la reacción y controles negativos (agua) para descartar posibles errores metodológicos.

2. Una vez completados los tubos de reacción se colocan en un termociclador y se procede a amplificar los ácidos nucleicos usando las siguientes temperatura y duración en cada ciclo:

Ciclo	Desnaturalización	Alineamiento	Polimerización
30 ciclos	94°C	55-58°C	72°C
Ultimo ciclo	94°C	55°C	72°C

3. Tras los 30 ciclos se recuperarán los tubos, opcionalmente se pueden purificar el producto de la amplificación, posteriormente se analizarán las muestras amplificadas por visualización en gel de agarosa.

Modificado a partir de: Chapter 8: In Vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction, Protocol 1 The Basic Polymerase Chain Reaction, Vol 2, 8.18-8.24. En: Sambrook, J., & Russell D., W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra Ed.) (3-Volume Set). New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

1.7: Transformación de *E. coli* por Shock térmico / calcio competencia

Medios y soluciones a utilizar

- Medio LB

Extracto de levadura 0.5%, Peptona 1%, Cloruro de sodio 1%.

- Medio SOC + Ampicilina (50 µg/mL)

Extracto de levadura 2%, Triptona 3.2%, Cloruro de sodio (NaCl) 0.5%, cloruro de potasio (KCl) 250 mM, H₂O MQ, Cloruro de magnesio (MgCl₂) 1 M, Glucosa 1 M (2%).

- Ampicilina (50 µg/mL)

- CaCl₂ 0.1 M (PM 84.16)

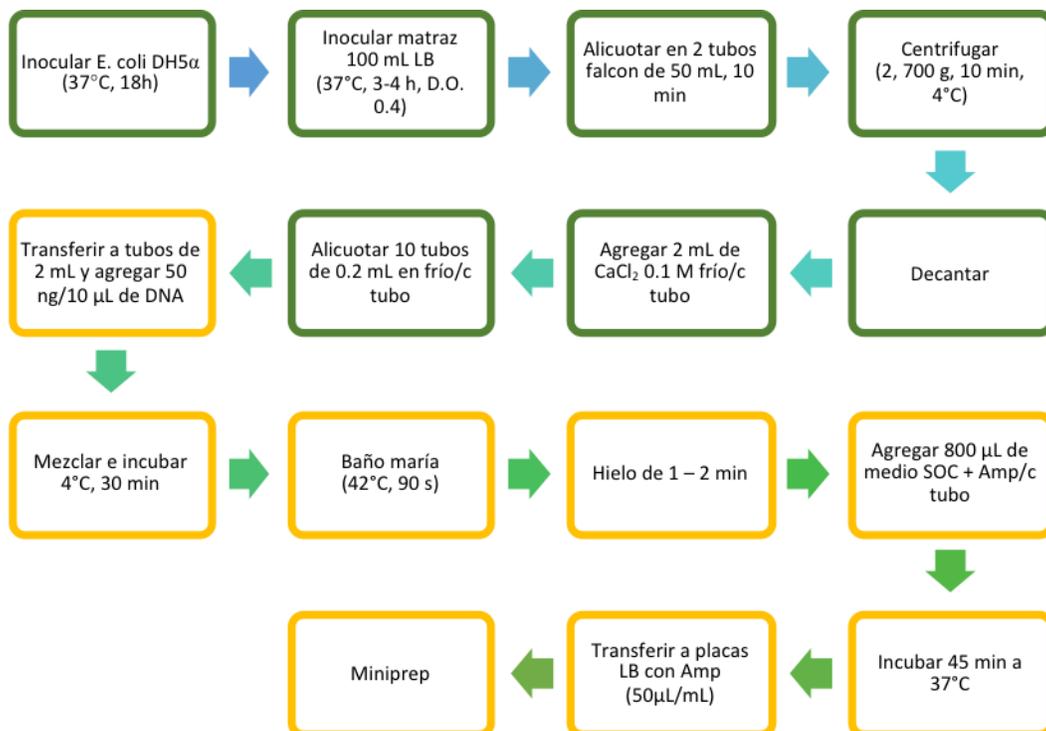
Preparación de células calcio-competentes

- 1.- Inocular *E. coli* DH5α/TOP10 a 37 °C, 18 h.
- 2.- Inocular en matraz con 100 mL de medio LB, 3-4 horas, 37°C hasta alcanzar una D.O. de 0.4. (del cultivo inicial sin inocular tomar 1 mL como referencia para el ensayo espectrofotométrico).
- 3.- Transferir a dos tubos Falcon de 50 mL, (enfriarlos previamente por 10 min).
- 4.- Centrifugar a 2, 700 e54g, 10 min a 4°C.
- 5.- Decantar.
- 6.- Agregar 2 mL de CaCl₂ 0.1 M frío en cada tubo.
- 7.- Alicuotar en 10 tubos de 0.2 mL en frío por cada tubo falcon de 50 mL.

** Las células calcio-competentes se pueden almacenar en ultracongelación a -70°C o se pueden utilizar al momento para transformar **

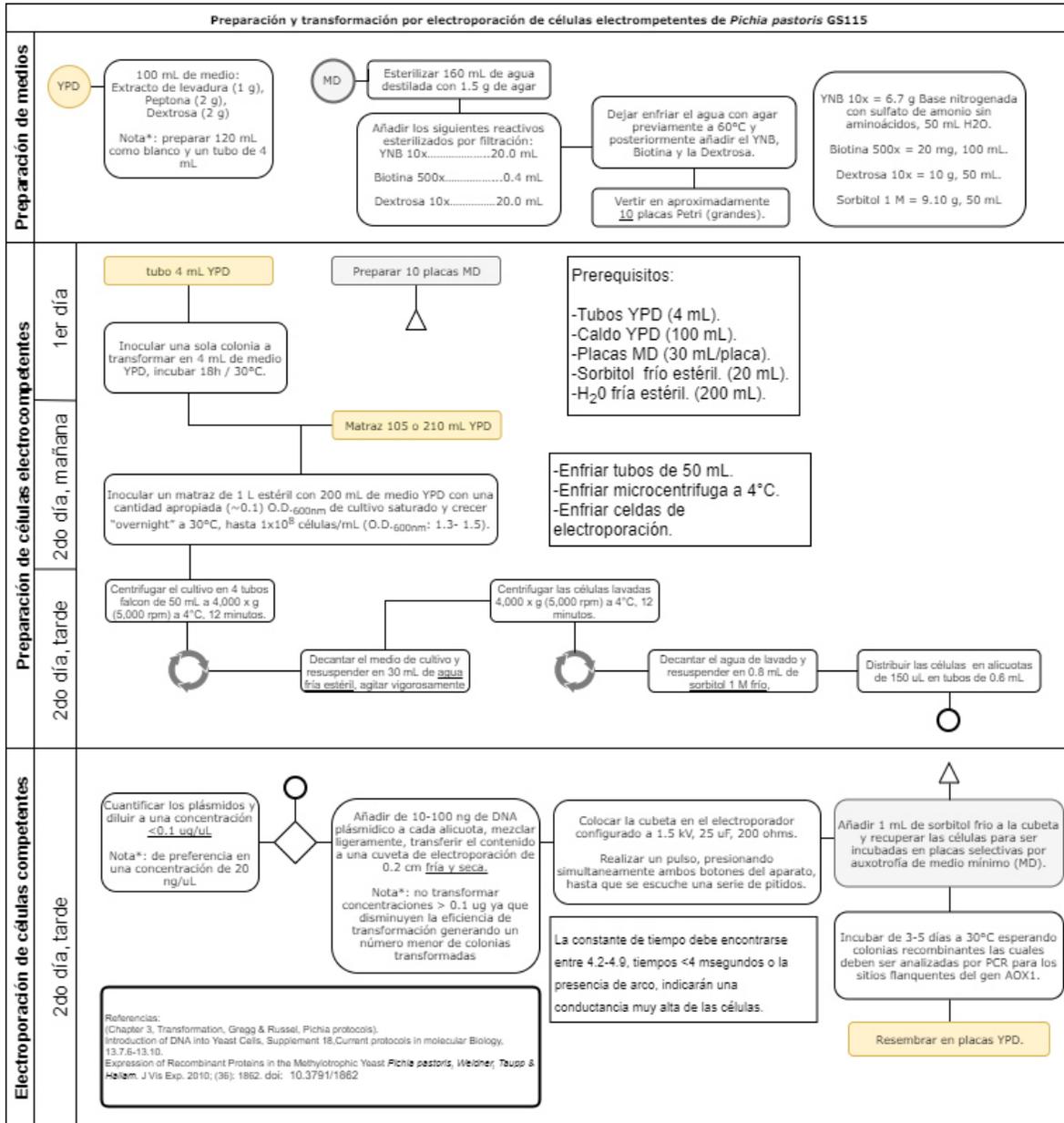
Transformación en *E. coli* por shock térmico

- 1.- Transferir a tubos de 2 mL y agregar 50 ng/10 µL de DNA.
- 2.- Mezclar e incubar 30 min, 4 °C.
- 3.- Colocar en baño maría a 42°C por 90 s.
- 4.- Colocar en hielo de 1 – 2 min.
- 5.- Agregar 800 µL de medio LB/SOC + Amp (50 µg/mL)/c tubo.
- 6.- Incubar 45 min a 37°C.
- 7.- Transferir a placas LB con Amp (50µg/mL).
- 8.- Las células pueden ser usadas en la técnica de miniprep.



Modificado a partir de: Protocol 25: Preparation and Transformation of competent *E. coli* using Calcium Chloride. Vol 1, 1.116-1.118. En: Sambrook, J., & Russell D., W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra Ed.) (3-Volume Set). New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

1.8: Transformación de *Pichia pastoris* por electroporación



1.9: Generación de biomasa e inducción de la producción en *Pichia pastoris*

1. Inocular colonias de *Pichia pastoris* GS115 transformadas con el gen recombinante de interés en 25 mL de medio YPD, incubar 24h/30 °C.
2. Centrifugar 10 min/4,000g y decantar el medio, evitando perder el pellet celular.
3. Lavar con 15 mL de medio BMMY estéril para eliminar los restos del medio de cultivo.
4. Centrifugar 10 min/4,000g y decantar el medio de lavado.
5. Resuspender el pellet en 15 mL de medio BMMY con un volumen inicial de 0.5%v/v de metanol (75 µL).
6. Incubar en agitación a 30 °C, cada 24 horas suplementar con 1% v/v de metanol (150 µL) durante 6 días.
7. Cada 24 horas tomar un volumen del medio de cultivo que posteriormente se dializarán y purificará para cuantificar la producción de la proteína recombinante.
8. Al finalizar los 6 días, recuperar el medio de cultivo en tubos de 15 mL para su almacenamiento a -20°C, trasladar el pellet celular a tubos de 1.5 mL siendo almacenados 4°C. ***

Consultado en: *Pichia* expression kit, Catalog Number K1710-01, Revision A.0
Publication Number MAN0000012.

1.10: Dializado de la biomasa inducida.

1. Tras la inducción de proteínas, recuperar el medio de cultivo por centrifugación (5 min / 4,000g), almacenar la pastilla celular (alternativamente se puede desechar si no se hará posterior de la pastilla).
2. Transferir el medio a membranas con valor de corte molecular de 12-14 kDa con una longitud de ~10 cm y un diámetro de 140 mm.
3. Colocar las membranas en agua destilada fría y en agitación constante durante 24 horas.
4. Cambiar el agua en intervalos de 2, 4 y 8 horas,
5. El dializado obtenido será almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

Modificado a partir de: Ascacio-Martínez, J., & Barrera-Saldaña, H. (2004). Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene*, 340(2), 261-266. doi: 10.1016/j.gene.2004.06.058.

Spectra/Por 1 to 7 Dialysis Membranes - Instruction Manual.

1.11: Precipitación de proteínas mediante el reactivo metanol-cloroformo.

1. Agregar 500 µL de muestra dializada o del medio de cultivo a un tubo de 2 mL.
2. Añadir 650 µL de metanol, mezclar por inversión y centrifugar 10 min/10,000g.
3. Añadir 400 µL de cloroformo, mezclar por inversión y centrifugar 2 min/10,000g.
4. Desechar el sobrenadante con una micropipeta de 1 mL, sin tocar la interfase.
5. Añadir 750 µL de metanol y agitar por inversión.
6. Centrifugar 5 min/10,000g, decantar el sobrenadante sin perder la pastilla.
7. Secar la pastilla a 50 °C o en un equipo de secado de muestras.

Adaptado de: Wessel, D. & Flügge, U. (1984). A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Analytical Biochemistry*, 138 (1), 141-143. DOI: 10.1016/0003-2697(84)90782-6

1.12: Cuantificación de proteínas por método de Bradford.

A. Standard 3.1 mL Assay Protocol Sigma-Aldrich®

(0.1 mL of a 0.1–1.4 mg/mL protein sample is used)

1. Mezclar el reactivo de Bradford y reposar hasta temperatura ambiente.
 2. Preparar estándares de proteínas de concentraciones apropiadas (los patrones de proteína pueden oscilar entre 0.1 y 1.4 mg/mL) en el mismo buffer que las muestras problema.
 3. Agregar 0.1 mL de la muestra de proteína y 3 mL del reactivo de Bradford.
 4. Mezclar suavemente en el vórtex.
 5. Dejar las muestras a incubar a temperatura ambiente por 5 – 45 min.
 6. Transferir las muestras a cubetas.
 7. Medir la absorbancia a 595 nm.
 8. Determinar la concentración de proteína por comparación de las muestras problemas con la curva estándar.
- Es posible hacer un ensayo directamente en una cubeta mediante la adición de sólo 1,5 mL de reactivo de Bradford a 0,05 mL de muestra
 - El agua desionizada puede sustituirse por el buffer, pero cualquier interferencia debida a los componentes del buffer no será compensada en los estándares de proteína.

B. Micro 2 mL Assay Protocol Sigma-Aldrich®

(1 mL of a 1–10 ug/mL protein sample is used)

1. Mezclar el reactivo de Bradford y reposar hasta temperatura ambiente.
2. Preparar estándares de proteínas de concentraciones apropiadas, en el mismo buffer que las muestras problema. (1–10 ug/mL) usando estándar BSA o una proteína estándar equivalente.
3. Agregar a un tubo 1 mL de buffer que será utilizado como blanco.
4. Agregar 1 mL de cada estándar en diferentes tubos.
5. Agregar 1 mL de cada muestra problema (con una concentración aproximada de 1–10 ug/mL) en diferentes tubos.
6. A cada tubo agregar 1 mL del reactivo Bradford y mezclar.
7. Incubar las muestras a temperatura ambiente por 5 – 45 min.
8. Transferir las muestras a las cubetas.
9. Medir la absorbancia a 595 nm.
10. Determinar la concentración de proteína por comparación de las muestras problemas con la curva estándar.

11.

C. 96 Well Plate Assay Protocol Sigma-Aldrich®

(5 μ L of a 0.1–1.4 mg/mL protein sample is used)

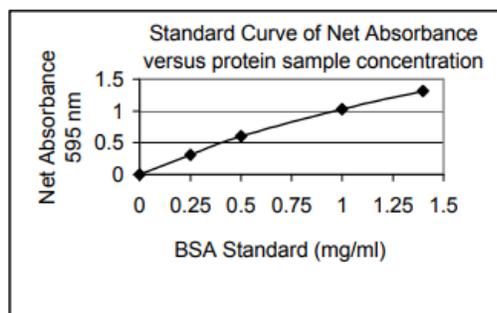
1. Mezclar el reactivo de Bradford y reposar hasta temperatura ambiente.
2. Preparar estándares de proteína en buffer (en un rango de 0.1 – 1.4 mg/mL) usando estándar BSA o un equivalente.
3. Añade 5 μ L de cada estándar de proteína en diferentes pocillos.
4. A los pocillos del blanco, añadir 5 μ L de buffer.
5. Preparar las muestras problema con una concentración aproximada de 0.1 – 1.4 mg/mL.
6. A cada pocillo utilizado, agregar 250 μ L de reactivo de Bradford y mezcla en un shaker por 30 segundos.
7. Incubar las muestras a temperatura ambiente por 5 – 45 min.
8. Leer la absorbancia a 595 nm.
9. Determinar la concentración de proteína por comparación de las muestras problemas con la curva estándar.
 - El complejo proteico es estable hasta 60 minutos. La absorbancia de las muestras debe registrarse antes del límite de tiempo de 60 minutos y dentro de los 10 minutos entre sí.
 - Crear una tabla de ensayo estándar.

Tubo #	Muestra (mL)	Estándar de proteína [BSA] (mg/mL)	Reactivo de Bradford
1	0.1	0.0	3
2	0.1	0.25	3
3	0.1	0.5	3
4	0.1	1.0	3
5	0.1	1.4	3
Muestra problema	0.1	---	3

- Crear una tabla con los resultados obtenido en el ensayo.
- Traza una curva con la absorbancia neta frente a la concentración de proteína de cada estándar

Tubo #	A ₅₉₅	NET A ₅₉₅	[Proteína] por ensayo (mg/mL)	Factor de dilución
1	0.433	0	0	1
2	0.724	0.308	0.25	1
3	1.036	0.602	0.5	1
4	1.463	1.029	1.0	1
5	1.750	1.316	1.4	1
6	1.245	0.811	0.75	2

Graph 1.
Standard Curve produced from Assay Data



1.13: SDS-PAGE [Laemmli] (Mini-PROTEAN® Tetra Cell).

Preparación del gel

1. Colocar el marco de polimerización con las abrazaderas de presión en una posición abierta.
2. Colocar una placa espaciadora del grosor apropiado, dependiendo su elección el volumen de muestras a cargar y colocar una placa corta de vidrio encima, deslizando ambas placas dentro del marco de polimerización procurando que ambos vidrios estén nivelados con referencia a una superficie plana para evitar fugas.
3. Apretar las abrazaderas para fijar ambos vidrios en el marco, colocar el peine apropiado y marcar a 1 cm debajo de los dientes del peine para indicar el nivel al que se añadirá el gel separador.
4. Preparar en un tubo de 50 mL el gel separador, el porcentaje dependerá de rango en kDa esperado de las proteínas a visualizar, añadiendo el TEMED al final y depositar la mezcla con micropipeta al marco de polimerización, se removerán las burbujas añadiendo isopropanol encima del gel, dejar polimerizar de 10-20 minutos.
5. Una vez polimerizado el gel separador remover el isopropanol y preparar el gel de apilamiento (concentrados o "stacking") a una concentración de 5%, y colocar el peine evitando la formación de burbujas.

Tabla de volúmenes usados para la preparación de geles de poliacrilamida en base al porcentaje de acrilamida.								
Stacking (Concentrador) Tris-HCl pH 6.8*		Resolving (Separador) Tris-HCl pH 8.8						
Concentración monómero de acrilamida de ~30-40% Poliacrilamida								
Reactivo	5%	8%	9%	10%	12%	15%	18%	20%
Agua destilada	5.7 mL	4.7 mL	4.4 mL	4.1 mL	3.4 mL	2.4 mL	1.4 mL	0.7 mL
Bis/Acrilamida (30% = 1:29)	1.7 mL	2.7 mL	3.0 mL	3.3 mL	4.0 mL	5.0 mL	6.0 mL	6.7 mL
Tris-HCl	2.5 mL*	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL

*El gel concentrador deberá llevar Tris-HCl pH 6.8

Volumen requerido por gel	
Grosor del gel (mm)	Volumen (mL)
0.5	2.8
0.75	4.2
1.0	5.6
1.5	8.4

Rangos de separación en geles SDS-PAGE (radio molar de bisacrilamida : acrilamida 1:29)	
Concentración de acrilamida (%)	Rango efectivo de separación (kDa)
15	10-43
12	12-60
10	20-80
7.5	36-94
5	57-212

Transferencia del gel a la cámara electroforética

1. Remover el peine del gel ya solidificado y el molde del soporte, después colocar el gel en el soporte para el tanque de electroforesis, el soporte debe estar con las manijas abiertas, permitiendo al gel con los vidrios de soporte entrar en una posición con ángulo de 30°, si se prepararán 1 o 3 geles se deberá usar la presa de buffer coincidiendo las letras del marco con el sentido de la cámara.
2. Asegurar el soporte para el tanque de electroforesis fijando las manijas en su lugar, comprobar el buen sellado del ensamblado añadiendo agua destilada al complejo, si no se encuentran filtraciones proceder al siguiente paso en caso contrario desmontar y repetir este paso.
3. Añadir una cantidad suficiente de buffer 1x hasta que el gel se encuentre completamente sumergido, (cámara interna 200 mL, cámara externa 550 mL) 750 mL totales para 2 geles y 1 L total para 4 geles tomando en cuenta el buffer que será añadido al ensamblado del gel, procurando evitar la formación de bolsillos de aire en los pocillos del gel.

Preparación y carga de muestras

1. Añadir a las muestras un volumen igual de buffer de carga 1x (buffer SDS 1x) y calentarlas entre 90 – 100 °C durante 5 minutos (o 1 hora, 45 – 55 ° C para evitar la precipitación o multimerización cuando son calentadas en un lapso corto de tiempo).
2. Añadir el buffer de corrida a la cámara de electroforesis y cargar 10 µL de las muestras con una micropipeta.
 - a. ** alternativamente se puede usar el doble de muestra y buffer de carga 1x para mejorar la capacidad de visualización en el gel.**
3. Colocar la tapa, encender la fuente de poder de 100 – 200 volts y dejar correr las muestras durante 30 – 45 minutos, o hasta que el recorrido de la banda inferior de las proteínas llegué al fondo de la cámara electroforética monitorizando que el circuito este cerrado y que el corrimiento sea uniforme.

4. Una vez separadas las muestras desconectar la cámara de electroforesis de la fuente de poder, recuperar el cassette de la cámara de electroforesis, recuperar el buffer para su posterior reutilización.
5. Separar con cuidado ambos vidrios (se puede remover el gel concentrador), posteriormente lavar 2 veces con agua bidestilada para remover el exceso de SDS.



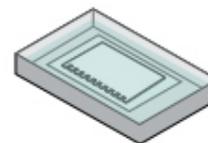
Volúmenes para la preparación de muestras		
	Reductor Laemmli	No reductor
Muestra	5.00 μL	5 μL
Buffer de carga para muestras	4.75 μL	5 μL
β - mercaptoetanol	0.25 μL	
Volumen total	10.00 μL	10 μL
Se recomienda diluir la muestra con una relación de al menos 1:2 con el buffer de carga y calentar a 95°C por 4 minutos.		

Consultado en: Appendices, 08 Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. En: Sambrook, J., & Russell D., W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra Ed.) (3-Volume Set). New York, Cold Spring Harbor Laboratory. Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Instruction Manual, Catalog Numbers, 165-8000, 165-8001, (n.d.).

A Guide to Polyacrilamide Gel Electrophoresis and Detection – Bulletin 6040.

1.14: Tinción de geles SDS-PAGE con azul de Coomassie brillante R-250.

1. Preparar solución de tinción: disolver 0.25 g de azul de Coomassie brillante R-250 por 100 mL de solución de metanol: ácido acético.
2. Colocar el gel en un recipiente de plástico con al menos 50 mL solución de tinte azul de Coomassie brillante (lo suficiente para que el gel se encuentre completamente sumergido), colocar en una plataforma de agitación y se dejar tiñendo durante un mínimo de 4 horas.
3. Transferir el gel a una solución metanol: ácido acético para desteñirlo, desteñir durante 4 – 8 horas.
4. Almacenar el gel en una solución de agua con 20% de glicerol o alternativamente se puede desecar el gel.



Solución de tinte para SDS -PAGE

Preparación solución Metanol: Ácido acético glacial (1 L)		
Metanol	500 mL	50 mL / 100 mL
H ₂ O	400 mL	40 mL / 100 mL
Ácido acético glacial	100 mL	10 / 100 mL

Preparación de solución de tinción azul de Coomassie R-250		
Azul de Coomassie	0.25 g	0.25 / 100 mL
Solución Metanol:	100 mL	100 mL / 100 mL
Ácido acético glacial		
Una vez mezclada filtrar la solución con papel filtro whatman No.1 para remover cualquier material particulado.		

Consultado en: Appendices, 08 Commonly Used Techniques in Molecular Cloning, Staining SDS-PAGE with Coomassie Brilliant Blue. En: Sambrook, J., & Russell D., W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra Ed.) (3-Volume Set). New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

1.15: Western blot.

Transferencia de las proteínas encontradas en el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda durante 1 hora, 100 volts usando el buffer de transferencia 1x.

Reactivos para la preparación del buffer de transferencia	
buffer de transferencia 10x - (solución stock)	
Reactivo	Cantidad
Tris	30g
Glicina	140g
ddH₂O	A completar a 1 L
buffer de transferencia 1x (1L) - (solución de trabajo)	
Reactivo	Volumen
Stock de transferencia 10x	100 mL
ddH₂O	700 mL
Metanol	200 mL
Su uso se realizará en frío con agitación constante durante el proceso de transferencia procurando previamente sumergir el gel de poliacrilamida a transferir durante 15 minutos previos a la transferencia y activar la membrana en buffer de transferencia.	

Una vez transferidas las proteínas a la membrana se procederá a bloquear la porción restante de la membrana con una solución de proteínas de leche sin grasa al 5% durante 1 hora.

Después del bloqueo se decantará la solución de bloqueo y se procederá a añadir una solución 1:5000 del anticuerpo primario "FLAG" resuspendido en leche 5% y se deberá dejar incubando al menos 12 horas, después de la incubación se recuperará el anticuerpo para su posterior reuso y realizará una serie de 3 lavados de 10 minutos en agitación con una solución "Tween-TBS".

Reactivos para la preparación del buffer TBS	
buffer TBS 10x - (solución stock)	
Reactivo	Cantidad
Tris	24.2g
NaCl	80g
ddH₂O	Completar a 1 L y ajustar a pH 7.6
buffer de lavado Tween-TBS 1x (1L) - (solución de trabajo)	
Reactivo	Volumen
TBS 10x	100 mL
Tween 20	1 mL
ddH₂O	900 mL

Una vez lavada la membrana se procederá a incubar bajo agitación constante durante 2 horas con una solución del anticuerpo secundario 1:10,000 se recuperará la solución del anticuerpo secundario y se realizarán 3 lavados bajo agitación con T-TBS y se decantará la solución de lavado.

La membrana será revelada por quimioluminiscencia mediante el uso en una proporción 1:1 de sustrato de luminol y peróxido de hidrogeno.

1.16: Almacenaje a largo plazo de cepas de *Pichia pastoris*.

Medio a utilizar

- Medio YPD + glicerol (15%) 100 mL

- 1.- Preparar 85 mL de YPD disolviendo 0.85 g de extracto de levadura, 1.7 g de peptona y 1.7 g de dextrosa en 85 mL de agua.
- 2.- Agregar 15 mL de glicerol.
- 3.- Esterilizar en autoclave.

Preparación

- 1.- Inocular una colonia de la cepa requerida en 4 mL de medio YPD, incubar de 24 – 48 h a 30°C en constante agitación. Hasta alcanzar una D.O._{600nm} 50 – 100.
- 2.- Transferir a tubos de 1.5 mL.
- 3.- Centrifugar a 13,000 rpm y decantar el medio, dejando solo la biomasa (repetir hasta utilizar los 4 mL).
- 4.- Resuspender en 1.2 mL de medio YPD con glicerol (15%).
- 5.- Homogeneizar los tubos por inversión.
- 6.- Colocar los tubos a -20°C por aprox. 10 min.
- 7.- Llevar a -70°C para su almacenamiento a largo plazo.

Consultado en: Tolstorukov, I., & Cregg, J. (2007). *Pichia* Protocols. *Methods In Molecular Biology*, Classical Genetic Manipulation, Long-term strain storage, 2, 192. Doi: 10.1007/978-1-59745-456-8

Anexo 2: Medios de cultivo generales

En un matraz del tamaño indicado a la muestra a procesar, teniendo un excedente en volumen a la proporción a usar, añadir los componentes en las proporciones mostradas del medio a usar y posteriormente añadir el volumen indicado de agua, excepto cuando estos sean sensibles a la degradación por calor, agitar el matraz hasta que los componentes se disuelvan, se puede calentar dejando el medio cultivo en una base magnética de agitación/calentamiento para disolver más rápido los componentes, si se van a preparar tubos de ensayo depositar 4 mL por tubo, posteriormente se esterilizará por medio de autoclave y posteriormente agregar antibiótico si es necesario.

Caldo LB Consultado en: Pichia expression kit, Catalog Number K1710-01, Revision A.0 Publication Number MAN0000012, 63.

Information panels Kanamycin, Ampicillin and Carbenillin, 1.145,1.148. En: Sambrook, J., & Russell D., W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra Ed.) (3-Volume Set). New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

2.1 Medios de cultivo para bacterias gram negativas (*E. coli*).

2.1.1 LB: Caldo de Lisogenia (Luria-Bertani)

Extracto de levadura 0.5%, Peptona 1%, Cloruro de sodio 1%.

Tabla de referencia para la preparación Medio de lisogenia						
# de placas x (25-30 mL)		~1	~1.3	~3	~10	25 – 30
# de tubos x (4 mL)*		7.5	10	25	37.5	250
Volumen H ₂ O	pH 7.0	30 mL	40 mL	100 mL	150 mL	1L
Extracto de levadura	0.5%	~0.15 g	0.2 g	0.5 g	0.75 g	5g
Peptona	1%	0.3 g	0.4 g	1 g	1.5 g	10 g
NaCl	1%	0.3 g	0.4 g	1 g	1.5 g	10 g
Para verter en placas de Petri añadir agar en las siguientes proporciones						
Agar	2.2%	0.66 g	0.88 g	2.2 g	3.3 g	22 g
Para añadir antibiótico al medio se deberá agregar después de esterilizar por autoclave y agitarse para una distribución homogénea, hasta una temperatura cercana a los 55 °C.						
Ampicilina Stock 100 mg/mL [100 µg/mL final]	0.1%	30 µL	40 µL	100 µL	150 µL	1 mL
Stock 100 mg/mL [50 µg/mL final]	0.5%	15 µL	20 µL	50 µL	75 µL	0.5mL
Stock Kanamicina 25 - 50 µg/mL	0.1%	30 µL	40 µL	100 µL	150 µL	1 mL
*para añadir Antibiótico a los tubos de ensayo esterilizados destapar los tubos bajo mechero procurando condiciones de esterilidad y añadir 2 ó 4 µL de antibiótico a cada tubo.						

2.1.2 SB: Superbroth

Extracto de levadura 2%, Triptona 3.2%, Cloruro de sodio (NaCl) 0.5%.

Tabla de referencia para la preparación Medio SB		
Extracto de levadura	2%	2 g / 100 mL
Triptona	3.2 %	3.2 g / 100 mL
NaCl	0.5%	0.5 g / 100 mL
El medio SB es usado para mejores producciones de plásmido o proteínas.		

2.1.3 TB: (Terrific broth)

Extracto de levadura 24%, Triptona 12%, glicerol 0.4%, buffer de fosfatos

Tabla de referencia para la preparación Medio TB		
Extracto de levadura	24 g	2.4 g / 100 mL
Triptona	12 g	1.2 g / 100 mL
Glicerol	4 mL	0.4 mL / 100 mL
H ₂ O	900 mL	90 mL / 100 mL
0.17 M K ₂ HPO ₄ y 0.72 M K ₂ HPO ₄ .	100 mL	10 mL / 100 mL
Se recomienda su uso para la preparación de Minipreps, el glicerol promueve un mayor crecimiento microbiano, mientras que el buffer de fosfatos evita la acidificación del medio.		

2.1.4 SOB: Super Optimal Broth

Extracto de levadura 2%, Triptona 3.2%, Cloruro de sodio (NaCl) 0.5%, cloruro de potasio (KCl) 250 mM, H₂O MQ, Cloruro de magnesio (MgCl₂) 1 M.

Tabla de referencia para la preparación Medio SOB		
Extracto de levadura	2%	2 g / 100 mL
Triptona	3.2 %	3.2 g / 100 mL
NaCl	0.5%	0.5 g / 100 mL
KCl (250 mM)	1,86 g en 10 mL	2.5 mM
H ₂ O MQ	80 mL	80 mL / 100 mL
Esterilizar por autoclave y enfriar a temperatura ambiente, posteriormente añadir:		
MgCl ₂ (1 M)	9.52 mg en 10 mL	10 mM
Es usado comúnmente para obtener células competentes de mayor eficiencia		

2.1.5 SOC: Super Optimal broth with Catabolite repression

Añadir 2 mL de glucosa 1 M a 100 mL de medio SOB

Tabla de referencia para la preparación Medio SOC		
Glucosa 1 M	2%	2 mL/ 100 mL
Medio SOB	100 mL	100 mL/ 100 mL
<ul style="list-style-type: none">• Se usa comúnmente después de la incubación en la transformación por shock térmico.• La glucosa es añadida como represor catabólico evitando el uso de fuentes de carbono distintas evitando así la expresión en <i>E. coli</i> de proteínas recombinantes dañinas al hospedero para las construcciones que se expresen en <i>E. coli</i>, Añadir 20 mM a cualquier medio para bacterias como LB resultará en eficacias de transformación similares a las del medio SOC.		

2.2: Medios de cultivo para levaduras (*Pichia pastoris*).

2.2.1 YPD: Yeast extract, Peptone, Dextrose:

0.5% Extracto de levadura, 1% peptona, 1% dextrosa

Tabla de referencia para la preparación Medio YPD							
# de placas x (25-30 mL)	<1	~1	~1.3	~3	~10	25	– 30
# de tubos x (4 mL)*	1	7.5	10	25	37.5	250	
Volumen H ₂ O pH 7.0	4 mL	30 mL	40 mL	100 mL	150 mL	1L	
Extracto de levadura	1%	0.04	0.3 g	0.4 g	1 g	1.5 g	10 g
Peptona	2%	0.008	0.6 g	0.8 g	2 g	3 g	20 g
Dextrosa	2%	0.004	0.6 g	0.8 g	2 g	3 g	20 g
Para verter en placas de Petri añadir agar en las siguientes proporciones							
Agar	2.2%	0.08	0.66 g	0.88 g	2.2 g	3.3 g	22 g
Para añadir antibiótico al medio se deberá agregar después de esterilizar por autoclave y agitarse de manera homogénea, a una temperatura de 55 °C.							
Ampicilina Stock 100 mg/mL [100 µg/mL final]	0.1%	4 µL	30 µL	40 µL	100 µL	150 µL	1 mL
Stock 100 mg/mL [50 µg/mL final]	0.5%	2 µL	15 µL	20 µL	50 µL	75 µL	0.5mL
Kanamicina 25 - 50 µg/mL	0.1%	4 µL	30 µL	40 µL	100 µL	150 µL	1 mL
*para añadir Antibiótico a los tubos de ensayo esterilizados destapar los tubos bajo mechero procurando condiciones de esterilidad y añadir 2 ó 4 µL de antibiótico a cada tubo							

Consultado en: Pichia expression kit, Catalog Number K1710-01, Revision A.0
Publication Number MAN0000012, 65.

2.2.2: Placas de medio selectivo para levaduras - mínimo dextrosa (MD).

Soluciones a utilizar

- Biotina 500x (0.02%) 100mL

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua.

- Dextrosa 10x (20%) 100 mL

Disolver 20 g de glucosa en 100 mL de agua

- YNB 10x (13.4% Base nitrogenada de levaduras con sulfato de amonio sin aminoácidos)

Disolver 13.4 g de base nitrogenada de levaduras con sulfato de amonio sin aminoácidos en 100 mL de agua, calentar la solución para disolver por completo.

** Alternativamente se puede usar 3.4 g de YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos y 10 g de sulfato de amonio. **

Preparación (1 L)

1.- Esterilizar 800 mL de agua con 15 g de agar.

2.- Esterilizar por filtración:

- YNB 10x.....100 mL
- Biotina 500x.....2 mL
- Dextrosa 10x.....100 mL

3.- Dejar enfriar el agua con agar previamente esterilizada hasta llegar aproximadamente a una temperatura de 60°C.

4.- Añadir 100 mL Dextrosa (10x), 2.0 mL Biotina (500x) y 100 mL YNB (10x).

5.- Verter inmediatamente en las placas.

Preparación placas medio selectivo para levaduras Mínimo Dextrosa – MD (100 mL)

1.- Esterilizar 80 mL de agua con 1.5 g de agar.

2.- Esterilizar por filtración:

- YNB 10x.....10.0 mL

- Biotina 500x.....0.2 mL

- Dextrosa 10x.....10.0 mL

3.- Dejar enfriar el agua con agar previamente esterilizada hasta llegar aproximadamente a una temperatura de 60°C.

4.- Añadir 10 mL Dextrosa (10x), 0.2 mL Biotina (500x) y 10 mL YNB (10x).

5.- Verter inmediatamente en las placas.

	Concentración en solución	Concentración final en el medio
YNB	10x (13.4%)	1.34 %
Biotina	500x (0.02 %)	4×10^{-5} %
Dextrosa	10x (20 %)	2 %

Consultado en: Pichia expression kit, Catalog Number K1710-01, Revision A.0
Publication Number MAN0000012, 68.

2.2.3: Medio de inducción BMMY - medio tamponado en complejo con metanol.

Soluciones a utilizar

- Buffer de fosfatos 1M pH 6.0 (100 mL)

Mezclar 13.2 mL de K_2HPO_4 1M y 86.8 mL de KH_2PO_4 y confirmar que el pH sea de 6.0 ± 0.1 . (** Usar ácido fosfórico (H_3PO_4) o hidróxido de potasio (KOH) si se requiere ajustar el pH. **)

- YNB 10x (100 mL)

Disolver 13.4 g de base nitrogenada de levaduras con sulfato de amonio sin aminoácidos en 100 mL de agua, calentar la solución para disolver por completo.

(** Alternativamente se puede usar 3.4 g de YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos y 10 g de sulfato de amonio. **)

- Biotina 500x (100 mL)

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua.

- Metanol 10x (5%) (100 mL)

Disolver 5 mL de metanol en 95 mL de agua

- **Preparación (100 mL)**

- 1.- Disolver 1 g de extracto de levadura y 2 g de peptona en 70 mL de H_2O estéril
- 2.- Esterilizar en autoclave.

- 3.- Esterilizar mediante filtración las soluciones stock de YNB, Buffer de fosfatos, biotina y metanol.
- 4.- Dejar enfriar el agua con extracto de levadura y peptona previamente esterilizado hasta alcanzar temperatura ambiente.
- 5.- Añadir 10 mL YNB (10x), 10 mL buffer de fosfatos (1M), biotina 0.2 mL (500x) y metanol 10x (5% v/v).
- -Base BMMY (ext. Lev, 1g+ Peptona,2g)....70.0 mL
- - YNB.....10.0 mL
- - Buffer de fosfatos.....10.0 mL
- - Metanol.....10.0 mL
- - Biotina.....0.2 mL
- 6.- Usar al momento para realizar lavados e inducción en las levaduras o almacenar a 4 °C.

Reactivo	Concentración en solución stock	Concentración final en el medio	volumen
Base BMMY (esterilizar por autoclave)			
Extracto de levadura		1 %	70 mL
Peptona		2 %	
Soluciones stock (esterilizar por filtración)			
Buffer de fosfatos	1 M	100 mM (pH 6.0)	10.0 mL
YNB	10x (13.4%)	1.34 %	10.0 mL
Metanol	10x (5 %)	0.5 %	10.0 mL
Biotina	500x (0.02 %)	4x10 ⁻⁵ %	0.2 mL
Total			100.2 mL

Consultado en: Pichia expression kit, Catalog Number K1710-01, Revision A.0
 Publication Number MAN0000012, pp 69.