



CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES DE *PICHIA PASTORIS* PRODUCTORAS DE UN TRIPSINÓGENO QUIMÉRICO

José A. Fuentes-Garibay, Martha Guerrero-Olazarán, José M. Viader-Salvadó
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL,
Av. Pedro de Alba s/n, Col. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México, 66450.
(81) 83294000 ext. 6439, jmviader@yahoo.com.mx

Palabras clave: *Tripsinógeno quimérico*, *Pichia pastoris*, *Litopenaeus vannamei*

Introducción. La tripsina de camarón tiene mayor actividad específica que la tripsina humana y bovina (1) lo que la hace una candidata potencial para su producción en forma recombinante. Sin embargo, su síntesis en *Pichia pastoris* a través de su zimógeno causa toxicidad sobre su hospedero debido a una rápida autoactivación del tripsinógeno recombinante producido (2).

En el presente trabajo, se construyeron cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras de un tripsinógeno quimérico con probabilidad de tener una lenta autoactivación en comparación con el tripsinógeno de *L. vannamei*.

Metodología. Se sintetizó mediante PCR una secuencia nucleotídica quimérica formada por la secuencia codificante del péptido de activación del tripsinógeno humano y de la tripsina del camarón *Litopenaeus vannamei* (TgQ), con la cual se construyó el plásmido recombinante pGEMTgQ. A partir de este plásmido, se obtuvo el fragmento TgQ mediante digestión con las enzimas *XhoI* y *AvrII* y purificación en gel de agarosa con el sistema Wizard Clean Up (Promega). De forma similar, un vector de expresión en *P. pastoris* (pPIC9FTEII) se digirió con las enzimas *XhoI* y *AvrII* para obtener el fragmento correspondiente al vector pPIC9, el cual se purificó a partir de un gel de agarosa. Ambos fragmentos se ligaron con DNA T4 ligasa. Con el vector construido (pPIC9TgQ) se transformaron células de *Escherichia coli* JM109. Posteriormente, se realizó extracción de DNA plasmídico y se caracterizó con las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII* y por PCR empleando oligonucleótidos iniciadores específicos para la región codificante de tripsina de camarón. El plásmido pPIC9TgQ se linearizó con la enzima *SalI* para posterior transformación de células de *Pichia pastoris* KM71. Las colonias transformadas se seleccionaron por medio de auxotrofia a histidina, se crecieron en caldo YPD y se realizó extracción de DNA genómico, el cual fue caracterizado mediante PCR con iniciadores dirigidos hacia las regiones AOX. Tres de las cepas construidas (KM71pPIC9TgQ), se cultivaron en matraz en condiciones de inducción del gen heterólogo empleando metanol como única fuente de carbono y energía. Se verificó la expresión del gen heterólogo mediante la determinación de proteínas totales, y análisis en geles de

SDS-poliacrilamida y Western blot con anticuerpos específicos contra tripsina y tripsinógeno de *L. vannamei* de los medios de cultivo libres de células después de 72 h de inducción.

Resultados y discusión. La digestión con *XhoI* y *AvrII* de los plásmidos pGEMTgQ y pPIC9FTEII generaron los fragmentos de tamaños esperados: 750 pb para TgQ, 3014 pb pGEM, 7987 pb pPIC9 y 1080 pb FTEII. La digestión del plásmido pPIC9TgQ con *XhoI* y *AvrII* generó un fragmento de 750 pb correspondiente al DNAC quimérico y otro de 7987 pb que corresponde al vector sin inserto. En la caracterización por PCR del plásmido construido (pPIC9TgQ) se obtuvo una única banda de 738 pb correspondiente a la región del DNAC quimérico que codifica para la tripsina de *L. vannamei*. La caracterización por PCR de las cepas construidas mostró una única banda de 1212 pb confirmando la correcta integración de la secuencia codificante TgQ en el genoma de *P. pastoris*. Los análisis del medio de cultivo libre de células de los cultivos en condiciones de inducción mostraron una concentración de 30 mg/L de proteínas totales y una banda de 29 kDa que resultó positiva en el análisis de Western blot.

Conclusiones. En este trabajo se ha obtenido por primera vez una cepa recombinante de *Pichia pastoris* capaz de producir un tripsinógeno quimérico formado por el péptido de activación del tripsinógeno humano y la tripsina de camarón *Litopenaeus vannamei*.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo económico del fondo CONACYT-SEP (CB-2005-01-25618) y el apoyo técnico brindado por el Q.B.P. Juan A. Gallegos López y Eneida J. Hernández Vázquez. JAFG agradece la beca otorgada por el CONACYT.

Bibliografía.

1. Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. (1996). Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28(5): 551-563.
2. Guerrero-Olazarán, M., Escamilla-Treviño, L.L., Castillo-Galván, M., Gallegos-López, J.A., y Viader-Salvadó, J.M. (2009). Recombinant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Progr. (en impresión)*.