



### MICROCULTIVOS E INMUNODETECCIÓN PARA EL TAMIZAJE DE CEPAS DE *PICHIA PASTORIS* SOBREPDUCTORAS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Carlos E. Espinosa-de la Garza, M. Magdalena Iracheta-Cárdenas, Miguel Castillo-Galván, José M. Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán

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, mguerrer@fcb.uanl.mx

Palabras clave: Tamizaje de *Pichia pastoris*, microcultivos, inmunodetección

**Introducción.** *Pichia pastoris* se emplea para la producción de proteínas recombinantes con fines de investigación y producción industrial. Esta levadura metilotrófica permite la integración del DNA heterólogo en su genoma y la expresión de éste mediante la regulación precisa de promotores sensibles a fuentes de carbono empleadas como sustrato. Debido a la alta frecuencia de variación clonal entre transformantes, una de las etapas medulares al trabajar con este sistema de expresión es la selección de cepas sobreproductoras.

En el presente trabajo, se implementó un método de cultivo a microescala y un método inmunológico con el fin de desarrollar un sistema de tamizaje para la selección de cepas de *Pichia pastoris* sobreproductoras de proteínas recombinantes empleando como modelo cepas portadoras del gen *phyC* que codifica para la fitasa C de *Bacillus subtilis* (1).

**Metodología.** Se usaron seis cepas recombinantes KM71 (*Mut<sup>S</sup>*) de *P. pastoris*, las cuales producen y secretan la fitasa C de *Bacillus subtilis*. Cada cepa se reactivó en YPD a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 6 a 8. Con cada cultivo reactivado se inoculó en 1 mL de BMG-CaCl<sub>2</sub> (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6],  $4 \times 10^{-5}$ % biotina, 2% de glicerol, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) a una  $DO_{600}$  inicial de 0.3 y se incubó a 30°C, 750 rpm por 24 h. Todas las células del cultivo en BMG-CaCl<sub>2</sub> se cosecharon y se cultivaron en 0.3 mL de medio BMM-CaCl<sub>2</sub> (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6],  $4 \times 10^{-5}$ % biotina, 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 0.75% de metanol) a 30°C y 750 rpm por 24 h.

Para los inmunodots se empleó como primer anticuerpo un IgG policlonal de conejo (anti-fitasa C), producido por *Genscript Ca.* a partir de un péptido sintético de 15 residuos de fitasa C de *B. subtilis* y conjugado con KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). Como control positivo y para la curva de calibración se empleó una preparación de fitasa C recombinante con una actividad de 40 U/mL y como control negativo albúmina de suero bovino (BSA). Tanto las muestras como los controles fueron diluidos en NaOH 0.2 M antes de su aplicación a la membrana. El primer anticuerpo (1:10000) en leche descremada al 1% (TBS-Tween 20 0.1%) se incubó con la membrana por 20 h a 4°C. Como segundo anticuerpo se usó un anti-IgG de conejo (1:2000) conjugado con fosfatasa alcalina y como sustrato se empleó NBT/BCIP. Se midió la intensidad de

cada señal empleando el sistema EDAS 290 y el programa Kodak 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co.). Se realizó una curva de calibración con las intensidades de las señales generadas y la cantidad de estándar aplicado a la membrana y se calcularon los niveles de producción de la fitasa C recombinante en cada microcultivo, expresada en mg/L y U/L.

**Resultados y discusión.** Los microcultivos mostraron un crecimiento celular en BMG-CaCl<sub>2</sub> en  $DO_{600}$  de  $20.4 \pm 1.4$  (46 g/L peso húmedo), mientras que en BMM-CaCl<sub>2</sub> prácticamente no hubo crecimiento celular durante las 24 h del cultivo manteniéndose los valores de  $DO_{600}$  en  $53.6 \pm 2.2$  (106 g/L peso húmedo). En la implementación del dot blot, la desnaturalización del antígeno con NaOH 0.2 M mostró ser efectiva para la generación de señales intensas. La alteración de la carga neta de la fitasa C y la exposición de su epítipo pudieron ser la causa del óptimo reconocimiento del antígeno por el anticuerpo. El uso del sistema del anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato NBT/BCIP mostraron las señales más intensas y estables al menor título del primer anticuerpo respecto a otros sistemas probados. Las señales generadas en el dot blot por los estándares de fitasa C fueron lineales ( $R^2 = 0.997$ ) en un intervalo de 15 a 350 ng de fitasa C empleando un gráfico doble logarítmico. Los niveles de producción calculados con la combinación de los dos métodos implementados para las seis cepas estudiadas, oscilaron entre 16 a 145 mg/L de fitasa C ó 191 a 1741 U/L en el medio de cultivo libre de células.

**Conclusiones.** Los microcultivos y el sistema de inmunodetección implementados en este trabajo ofrecen una alternativa sencilla, rápida y reproducible para el tamizaje de cepas de *Pichia pastoris* sobreproductoras de la proteína recombinante evaluada.

**Agradecimientos.** Agradecemos el apoyo por parte de los fondos CONACYT-SAGARPA (2003-02-141) y CONACYT-SNI-Estudiantes (103417). MCG agradece la beca del CONACYT.

#### Bibliografía.

- Guerrero-Olazarán, M., Rodríguez-Blanco, L., Carreon-Treviño, J.G., Gallegos-López, J.A., Castillo-Galván, M. y Viader-Salvadó, J.M. (2007). Bacterial phytase produced in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 131(2): S233-S234.