



DETERMINACIÓN DE LA DOSIS GÉNICA EN CEPAS RECOMBINANTES DE *Pichia pastoris* MEDIANTE PCR CUANTITATIVO

Ana Lucía Herrera-Estala, Eddy Luz Cab-Barrera, Martha Guerrero-Olazarán, José María Viader-Salvadó
Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología
San Nicolás de los Garza, N.L., México C.P. 66455. jose.viadersl@uanl.edu.mx

Palabras clave: *Pichia pastoris*, qPCR, dosis génica.

Introducción. *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica ampliamente empleada para la producción de proteínas heterólogas debido a su fácil manipulación genética y a su capacidad para producir y secretar altos niveles de proteínas recombinantes (1). Los sistemas de *P. pastoris* se basan en la integración del cassette de expresión en el genoma de la levadura, resultando un número variable de copias integradas en las clonas generadas. De entre los diversos factores que incrementan los niveles de las proteínas producidas se encuentra el incremento de la dosis génica (1), sin embargo no hay suficiente información al respecto y además existen estudios donde el incremento de la dosis génica presentó un efecto negativo sobre la producción de la proteína heteróloga (2). Anteriormente para determinar la dosis génica se empleaba la técnica de Southern blot, pero esta técnica es imprecisa, laboriosa, y consume mucho tiempo. La Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR) se ha establecido como una técnica analítica cuantitativa ampliamente utilizada. Sin embargo existen muy pocos métodos de qPCR para determinar la dosis génica en sistemas de expresión de levaduras (3).

El objetivo de este trabajo fue implementar un método para determinar la dosis génica de secuencias codificantes heterólogas en cepas recombinantes de *P. pastoris* mediante qPCR y correlacionar la dosis génica con los niveles de producción de la proteína recombinante

Metodología. Se emplearon 10 clonas de la cepa KM71FTEII de *P. pastoris*, obtenidas mediante electroporación, las cuales contienen en su genoma una secuencia que codifica para una fitasa termoestable (FTEII) (4). Para la determinación de la dosis génica, se empleó la técnica de qPCR utilizando sondas de hidrólisis que amplifican fragmentos de 117 y 90 pb para los genes FTEII y GAP, respectivamente. Se empleó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para los cálculos de la dosis génica. Se obtuvieron preparaciones de DNA genómico de cada clona y se seleccionó una clona (6.a) como calibradora conteniendo una copia en base a GAP (gen normalizador). El DNA de la clona 6.a se empleó para obtener curvas de calibración y determinar la eficiencia de la reacción de PCR para ambos genes. Para determinar los niveles de producción de la proteína recombinante se realizaron cultivos en medio BMG para generar alta densidad celular y la inducción se realizó en

20 mL de medio BMM-CaCl₂ por 48 horas a 30°C. La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford y la actividad enzimática de fitasa por el método del ácido ascórbico (4).

Resultados. Los análisis de qPCR mostraron que el 80% de las clonas, poseen entre 4 y 5 copias del gen FTEII integrado en su genoma. Las concentraciones de proteínas extracelulares oscilaron entre 160.27±0.014 y 220.37±0.003 µg/mL, y los niveles de actividad de fitasa extracelular entre 1.22±0.032 y 1.92±0.032 U/mL. Sólo una de las clonas (10%) presentó un alto número de copias, 22 copias, con la cual se obtuvieron niveles de proteínas de 388.73±0.024 µg/mL y de actividad de fitasa de 5.44 ±0.062 U/mL, 2 y 3.5 veces más altos que las clonas con 4 y 5 copias. Además, los niveles de proteínas de la clona con 22 copias fueron 44 veces más altos que los obtenidos por la clona uni-copia (8.86±0.004 µg/mL) y la actividad de fitasa extracelular fue 13 veces más alta (0.42±0.010 U/mL). Tanto la concentración de proteínas como la actividad de fitasa mostraron una alta correlación con la dosis génica con valores de R² de 0.756 y 0.934, respectivamente.

Conclusiones. El método implementado en este estudio para determinar la dosis génica por qPCR en clonas de KM71FTEII mostró una correlación directa entre la dosis génica y los niveles de producción de fitasa, lo cual brinda una herramienta valiosa para facilitar la selección de cepas a través de un tamizaje rápido mediante la determinación de la dosis génica.

Agradecimientos. Los autores agradecen el apoyo del CONACYT (CB-2012-183840) y las becas otorgadas.

Bibliografía.

1. Sreerishna, K. (2010). *Pichia*, Optimization of protein expression. En: *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Flickinger M. Wiley, EUA. 1–16.
2. Sha, C, Yu, X, Li, F, Xu, Y. (2013). *Appl. Biochem. Biotechnol* 169(4): 1160-1172.
3. Abad, S, Kitz, K, Hörmann, A, Schreiner, U, Hartner, F, Glieder, A. (2010). *Biotechnol J*. 5(4): 413-420.
4. Viader-Salvadó, JM, Gallegos-López, JA, Carreón-Treviño, JG, Castillo-Galván, M, Rojo-Dominguez, A, Guerrero-Olazarán, M. (2010). *Appl. Environ. Microbiol*. 76(19): 6423-6430.