



CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris* CAPAZ DE EMPLEAR LACTOSA COMO FUENTE DE CARBONO Y PRODUCIR UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE INDUCIDA CON METANOL

Francisco de Jesús Balderas-Cisneros, María Magdalena Iracheta-Cárdenas, José María Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán

Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología San Nicolás de los Garza, N.L., México C.P. 66455. martha.guerreroool@uanl.edu.mx

Palabras clave: Pichia pastoris, β -galactosidasa.

Introducción. *Pichia pastoris* es un hospedero actualmente muy usado para la producción de proteínas heterólogas, las cuales con frecuencia se producen como glicoproteínas con residuos de manosa. Esta característica frecuentemente es limitante en proteínas con fines terapéuticos en humanos. El suero de leche es considerado el contaminante más importante encontrado diariamente en aguas residuales, no solo por su alto contenido orgánico, sino también por el volumen generado. Utilizando leche de vaca se producen 800 mL de suero de leche por cada 9.86 Kg de queso (1).

En este trabajo se construyeron y caracterizaron cepas Mut^s portadoras de los DNAc que codifican para las proteínas maduras de β -galactosidasa, lactosa permeasa y la isoforma de 22 kDa (HGH-22K) de la hormona del crecimiento humano.

Metodología. Se partió de los vectores pPIC9TgQ y pUC57-HGHgs para construir el vector pPIC9HGHgs portador del DNAc que codifica para la proteína madura de la isoforma de 22 kDa de la hormona del crecimiento humano, el cual posteriormente fue linerizado con la enzima *Sall* para transformar la cepa KM71 (Mut^s) de *P. pastoris*, por electroporación. El vector pGAPzALac412 portador de los DNAc que codifican para las proteínas maduras de β -galactosidasa y lactosa permeasa fue linearizado con la enzima *AvrII* para transformar la cepa KM71HGH de *P. pastoris*, por electroporación. Las colonias transformadas y portadoras de los genes heterólogos fueron crecidas en YPD + zeozina (100 μ g/mL) a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 9-10. Con este cultivo se inocularon 100 mL de BM lactosa (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6], 4x10⁻⁵% biotina, 1% de lactosa) partiendo de una DO₆₀₀ de 0.3 y se incubó a 30 °C, 250 rpm por 11 h hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 6-7. Todas las células del cultivo en BM lactosa se cosecharon y se cultivaron en 20 mL de medio BMM (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6], 4x10⁻⁵% biotina y 0.75 % de metanol) a 30 °C, 250 rpm por 48 h y adición de metanol a las 0 y 24 h de cultivo.

El sobrenadante de cada cultivo fue desalado y concentrado de 20 veces en unidades de ultrafiltración (Ultrafree-0.5, Millipore). El sobrenadante directo fue

analizado por ELISA (IMMULITE immunoassay system) y el sobrenadante concentrado fue analizado por SDS-PAGE. Para el Western y el dot blot se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para la isoforma 22 kDa. Como segundo anticuerpo se usó un anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa y BCIP/NBT como sustrato. Proteínas totales fueron determinadas por Bradford.

Resultados. El medio de cultivo libre de células de la cepa KM71Lac412HGH dio positivo en la prueba de ELISA y presentó una concentración de proteínas de 50 μ g/mL. En el análisis de SDS-PAGE de las proteínas extracelulares mostró una banda mayoritaria de 22 kDa que resultó positiva por Western blot y que corresponde a la forma monomérica de la hormona de crecimiento humano.

Conclusiones.

La cepa de *Pichia pastoris* KM71Lac412HGH fue capaz de consumir lactosa y producir HGH-22K utilizando metanol como inductor del promotor AOX1.

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

Bibliografía.

1. Carvalho, F., Prazeres, A.R. & Rivas, J., (2013). *Science of the Total Environment*, 445-446: pp.385-396.