

## *Pichia pastoris* COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN DEL scFv 6009F.

Mariel Adame<sup>1</sup>, Hilda Vázquez<sup>2</sup>, Gerardo Corzo<sup>2</sup>, Elba Villegas<sup>1</sup>.

Centro de investigación en Biotecnología<sup>1</sup>, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62210. Instituto de Biotecnología<sup>2</sup>, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210. adame.mary@outlook.es

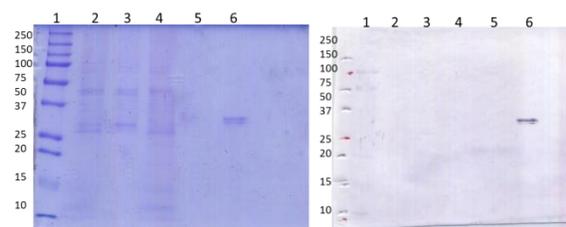
*Palabras clave:* antivenenos, Cn2 y alacrán.

**Introducción.** Las aplicaciones de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) son muy variadas y van desde el tratamiento y/o detección de células cancerosas, o su aplicación para neutralizar toxinas de animales ponzoñosos como arañas, serpientes o alacranes. En este sentido los antivenenos para tratar los eventos de picadura de alacrán han evolucionado a ser cada vez más eficientes y que su producción no dependa de animales para extracción de veneno y generación de los anticuerpos ya que estos se producen principalmente en caballos (1). El scFv 6009F es capaz de neutralizar 2 LD50 del veneno competo del alacrán *Centruroides noxius*, que es considerado el más tóxico de México y 2 LD50 de la toxina Cn2, dicha toxina es la más tóxica presente en el veneno de este alacrán (2,3). Además presenta reactividad cruzada con otras toxinas como la Cn3 de *C. noxius*, Ccs2 y Ccs4 de *C. suffusus suffusus*, lo que hace que este sea considerado un candidato para su aplicación terapéutica, sin embargo, su expresión en *E. coli* TG1 se han obtenido rendimientos de 1.1 mg/L lo que podría limitar su desarrollo (3,4).

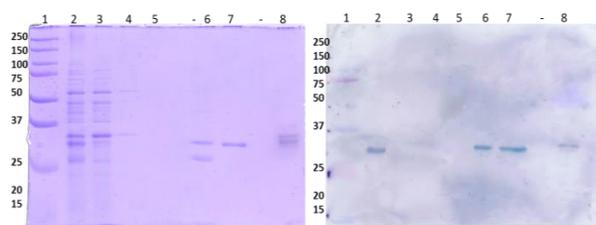
**Objetivo.** Obtener un mayor rendimiento de la proteína scFv 6009F en *P. pastoris* KM7.

**Metodología.** Se utilizó la cepa de *P. pastoris* KM71 (Mut<sup>s</sup>) y el plásmido pPIC9. Una vez realizada la construcción pPIC9/6009F, se linearizó con la enzima *Sal* I y se utilizó para transformar mediante electroporación la cepa KM71. La expresión de la proteína fue llevada a cabo en el medio BMMY (metanol 0.5%, 1% de Extracto de levadura, 2% de Peptona, 100 mM Buffer fosfatos y 1.34% YNB) pH 6, 28°C, 250 rpm, se añadió 1 % (v/v) de metanol durante 96 h que duro la expresión (5).

**Resultados.** Se obtuvo una concentración de 55 mg/L de proteína purificada a través de Ni-Nta agarosa (Quiagen), se logra confirmar la expresión además mediante Western-Blot utilizando anti-His. La proteína fue secretada al medio y se observaron pocas proteínas endógenas (**Fig. 1**), lo que facilita los procesos posteriores de purificación. Sin embargo, se observó una ligera diferencia de peso molecular de  $\approx$  3 kDa más con respecto a la obtenida en *E. coli* como se observa en la **figura 2**.



**Fig. 1.** SDS-PAGE y Western-Blot del scFv6009F obtenido en *P. pastoris* (se observa en el carril 1: Marcador, 2: Sobrenadante, 3: Recirculante, 4: Lavado con PBS, 5: Lavado con imidazol 25 mM, 6: Elución con imidazol 300 mM)



**Fig. 2.** SDS-PAGE y Western-Blot comparativo del scFv6009F obtenido en *E. coli* y *P. pastoris* (se observa en el carril 1: Marcador, 2: Sobrenadante, 3: Recirculante, 4: Lavado con PBS, 5: Lavado con imidazol 25 mM, 6: Elución con imidazol 300 mM).

**Conclusiones.** Se obtuvo 50 veces más proteína en el sistema de *P. pastoris* en comparación con *E. coli*, sin embargo, la diferencia de peso molecular podría sugerir que la proteína obtenida en *P. pastoris* se encuentra glicosilada, la secuencia de scFv6009F no presenta sitios probables de N-glicosilación, lo que podría sugerir que sea O-glicosilación, por lo que es importante determinar de manera experimental y evaluar así el efecto que estas modificaciones tengan en su actividad biológica

**Agradecimientos.** A CONACyT por el financiamiento con número 246924 Problemas Nacionales. Al Dr. Baltazar Becerril y la Dra Lidia Riaño del IBT-UNAM por la aportación del gen.

### Bibliografía.

- Alvarenga, L., *et al.*, (2014). *Toxins*, 6(8), 2541-2567.
- Possani, L. D., *et al.*, (1981). *Carlsberg Res Commun*, 46(4), 207-214.
- Riaño-Umbarila, L., *et al.*, (2011). *Journal of Biological Chemistry*, 286 (8), 6143-6151.
- Riaño-Umbarila, L., *et al.*, (2005). *FEBS Journal*, 272(10), 2591-2601.
- Invitrogen, A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*, Catalog No. K1710-01