

## OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO scFv 6009F EN EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE *PICHIA PASTORIS* GS115 y KM71 CON EL PLASMIDO pPIC 3.5/6009F

Daniela Alexis López Galindo, Hilda Vazquez López, Elba Cristina Villegas Villarreal  
Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Chamilpa No. 1001 CP 62209, Cuernavaca, Morelos  
elbav@uaem.mx

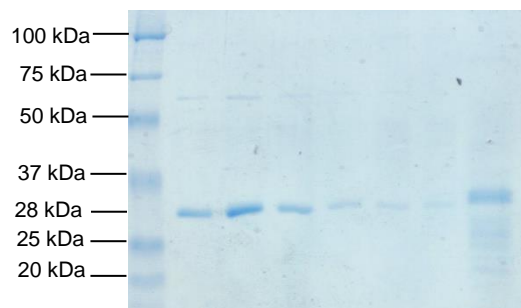
*Palabras clave: Pichia pastoris, alacrán, scFv*

**Introducción.** En los últimos años, la demanda de anticuerpos con fines terapéuticos ha aumentado por lo cual ha surgido una nueva tecnología para producción de anticuerpos, éste es el desarrollo de anticuerpos constituidos por fragmentos variables de cadena sencilla scFv (1). El fragmento scFv6009F reconoce a la toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius* el alacrán más peligroso en México. Este anticuerpo scFv 6009F se ha expresado en *E. coli* obteniendo una producción de 1.1 mg/L sin embargo, se requiere obtener cantidades de producción mayores para realizar otros estudios (2, 3). El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión del fragmento scFv 6009F en *Pichia pastoris*, utilizando las cepas GS115 y KM71 con el plásmido Ppic 3.5 que expresara la proteína intracelularmente.

**Metodología.** Se obtuvo la construcción del plásmido pPIC 3.5/6009F en *E. coli* TOP 10F, la cual fue linealizada con la enzima Sal 1 para poder transformarse en las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris*. Una vez obtenidas las clonas positivas se realizó la expresión en la cepa de *P. pastoris* KM71 en matraz de 500 ml con un cultivo de 50 ml del BMMY (0.5% de metanol, 1% extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM buffer de fosfatos y 1.34% YNB) a 200 rpm induciendo con metanol al 1% cada 24 h a 28°C por 4 días.

Se obtuvo el pellet para la realizar la lisis celular utilizando una prensa francesa, se dializó la muestra con PBS y después de procedió a realizar la purificación mediante cromatografía de afinidad Ni<sup>2+</sup> -NTA, las muestras se eluyeron con imidazol de 250 mM, se visualizó mediante geles de SDS-PAGE 12.5%.

**Resultados.** Se obtuvieron las clonas positivas de *P. pastoris* de las cepas GS115 y KM71. Se verifico mediante un PCR de colonia, las clonas positivas que fueron utilizadas para realizar la expresión la expresión en matraz. Se ha realizado la expresión del anticuerpo en *P. pastoris* cepa KM71 a nivel matraz, se obtuvo el pellet del sobrenadante y se obtuvo la proteína intracelular con una prensa francesa. Se realizo un gel de SDS electroforesis y en el se puede observar la proteína de interés en el anticuerpo scFv 6009F de un peso aproximado 28 kDa (Fig.1).



**Fig. 1.** Gel SDS-PAGE 12.5% se observa la banda de 28kDa correspondiente al fragmento scFv 6009F

**Conclusiones.** Se logro expresar el fragmento scFv 6009F de manera intracelularmente empleando la cepa de *Pichia pastoris* KM71. Mediante cromatografía de afinidad Ni<sup>2+</sup> -NTA, se purifico la proteína. Sin embargo, falta realizar un Western blot con un anticuerpo para reconocer el tag Histidinas y la evaluación de reconocimiento contra la toxina Cn2. Cabe mencionar se está llevando a cabo la expresión de la cepa GS115.

**Agradecimientos.** A la Dra. Elba Cristina Villegas y la Dra. Hilda Vázquez por el apoyo otorgado para este proyecto. A CONACyT por la beca otorgada 838404 y al proyecto Problemas Nacionales 246924 y al Dr. Baltazar Becerril.

### Bibliografía.

1. Stockwin L & Holmes S (2003) The role of therapeutic antibodies in drug discovery. *Biochem Soc Trans* 31(2): 433-436.
2. Riaño-Umbarila, L *et al.* (2005) A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* 272(10): 2591-2601.
3. Riaño-Umbarila, L *et al.* (2011) Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *J Biol Chem.* 286(8): 6143-6151.

