

EXPRESIÓN DEL scFv-6009F EN *PICHIA PASTORIS* GS115 (*HIS4*, *Mut*⁺) y KM71 (*HIS4*, *Mut*^s) EMPLEANDO EL PLÁSMIDO PHIL-S1

Fernando Guzmán, Elba Cristina Villegas, Centro de Investigaciones en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209. elbav@uaem.mx

Palabras clave: Anticuerpo, Expresión, Levadura.

Introducción. Las moléculas de anticuerpos diseñados y sus fragmentos se explotan cada vez más como herramientas científicas y clínicas (1), existen diferentes tipos de fragmentos de anticuerpos que se pueden obtener mediante proteólisis, tal es el caso de los scFv que poseen ventajas sobre las inmunoglobulinas completas por su fácil difusión en el organismo, la neutralización específica en el sitio blanco y su rápida eliminación (2), por lo que se han creado fragmentos anticuerpos recombinantes contra venenos de escorpión considerados como una alternativa para producir nuevos antivenenos para el tratamiento de picaduras de escorpión(3), ya que el escorpionismo se considera un problema de salud pública, reportando a nivel mundial 1.5 millones de casos por año(4), por lo que se espera que el fragmento de anticuerpos de cadena sencilla "scFv-6009F" que reconoce 6 toxinas de escorpiones del genero *Buthidae* destacando la toxina Cn2 de *Centruroides noxius* el cual es considerado como el más peligroso para México (5). El objetivo de este trabajo es la expresión heteróloga del scFv 6009F en la levadura *Pichia pastoris* empleando el plásmido pHIL-S1 para la expresión de la proteína obteniendo un mayor rendimiento de producción sin perder la capacidad neutralizante hacia la toxina Cn2 y del veneno del escorpión *Centruroides noxius*.

Metodología. En este proyecto se utilizará la cepa de *E. coli* TOP10F para la transformación, clonación y propagación de los plásmidos pSyn1 y pHIL-S1, las cepas de *Pichia pastoris* GS115 (*HIS4*, *Mut*⁺) y KM71 (*HIS4*, *Mut*^s). Se utilizará el vector pSyn1 construido por Riaño-Umbarila en el 2005 el cual contiene el fragmento de interés scFv-6009F, este gen será extraído mediante PCR utilizando oligos diseñados con sitios de enzimas restricción EcoR1 y BamH, el producto de PCR se comprobará mediante el peso molecular en un gel de agarosa al 0.8%, posteriormente el fragmento scFv-6009F se ligará al plásmido pHIL-S1 con la enzima T4 ligase ADN (Thermo Scientific), obtenida la ligación, se transformarán *E.coli* TOP10F para su preservación y clonación, posteriormente se utilizarán oligos dirigidos al promotor AOX del plásmido pHIL-S1 para la confirmación de la contricción del nuevo vector y se rectificará la mediante peso molecular en un gel de agarosa al 0.8% y secuenciación. Confirmado el marco de lectura, se transformarán las cepas GS115 Y KM71 de *Pichia pastoris*, las transformaste seleccionadas en GS115 y KM71 continuaran con la expresión del anticuerpo scFv-6009F, empleando el medio BMMY e induciendo con metanol al 0.5% cada 24 h por 4 días, las muestras recolectadas serán analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot antes y después de la purificación por columnas de níquel empleando el protocolo Ni²⁺-NTA de QUIAGEN para la confirmación de la producción de nuestra

proteína de interés. Por último, se hará el reconocimiento del scFv 6009F contra la toxina Cn2 mediante la técnica de ELISA.

Resultados. Se transformo *E. coli* TOP10F con ambos plasmidos pSyn1 y pHIL-S1. Se amplificó y purifiqué el gen del anticuerpo scFv-6009F del plásmido pSyn1 con los oligos diseñados. Se obtuvo la construcción del anticuerpo scFv-6009F en pHIL-S1 y se transformó en *E. coli* Top10F (Figura 1)

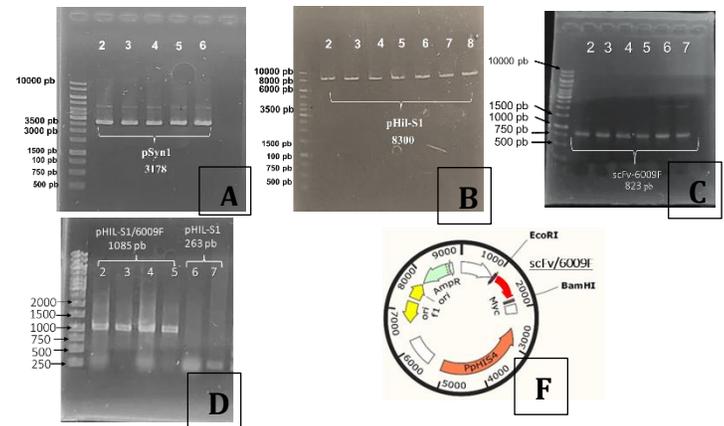


Fig. 1. Geles A y B purificación de los plásmidos de interés a partir de *E. coli* Top10F. Gel C extracción del scFv-6009F por PCR. Gel D confirmación de la construcción mediante amplificación del gen AOX por PCR. F análisis de la construcción a partir de una secuenciación.

Conclusiones. Se obtuvo la integración correcta del scFv-6009F en el plásmido pHIL-S1 así como la transformación en *E. coli* Top10F.

Agradecimientos. Agradezco al CEIB de la UAEM por su apoyo para realizar esta investigación, al Doctor Becerril y a CONACYT por la BECA otorgada.

Bibliografía.

- 1.- Verma, R., Boleti, E., & George A. J. (1998). *Journal of Immunological Methods*, 216(1-2), 165-181.
- 2.- Ahmad, Z. et al. (2012). *Clinical and developmental immunology*, 2012.
- 3.- Riaño-Umbarila, L. et al. (2019). *Toxins*, 11(1), 32.
- 4.- Chippaux, J. P., & Goyffon, M. (2008). *Acta tropica*, 107(2), 71-79.
- 5.- Riaño-Umbarila, L. et al.(2005). *The FEBS journal*, 272(10), 2591-2601.