



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**“CONSTRUCCIÓN DE UN GEN SINTÉTICO POR PCR QUE
CODIFIQUE PARA UNA PROTEÍNA CON ALTO VALOR
BIOLÓGICO Y SU CLONACIÓN EN VECTORES DE
EXPRESIÓN”**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN NUTRICIÓN

P R E S E N T A :
MARINA IDALIA ROJO LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. GABRIEL BETANZOS CABRERA

PACHUCA DE SOTO, HGO.

MAYO 2007.

Sin afán de omitir a alguien, a todas aquellas personas que colaboraron mucho o poco en la realización de este trabajo, a aquellos que sirvieron de inspiración y apoyo, a los que en las buenas y en las malas estuvieron presentes, a los que soportaron mi mal humor y a los que compartieron los momentos de ocio y alegría... A mis padres, mis hermanos, mi futuro esposo, mi muy extensa familia y mis amigos.

AGRADECIMIENTOS:

Al personal encargado de los laboratorios de Nutrición Molecular, Microbiología y Bioquímica del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

A PROMEP por el apoyo económico brindado.

A los profesores investigadores que estuvieron siempre dispuestos a colaborar y orientar.

ABSTRACT

In México, the malnutrition is being an important problem of public health. The low uptake of proteins can be tolerated as much in adults as in children. But the protein deficiency is observed most frequently in children due the high requirements of protein and energy by kilogram of corporal weight its greater susceptibility to factors like infection (that increases protein requirements) and its incapacity to obtain food by their own means leaves them susceptible. Reason why it is necessary to find short term alternating to fight the infantile problem of malnutrition by deficiency of proteins of high quality. At the present time structure-function exists great inters in understanding relation of the nourishing proteins and, the engineer of proteins focuses towards the design of the structure of proteins in order to obtain a new biological property. Of such form, that the present work describes one application of the techniques of molecular biology, to create a synthetic gene that codifies for a protein with content balanced of amino acids and particularly rich in essential amino acids. Profit the amplification of the gene and the analyze, so by means of sequenciation being this and as the theoretical sequence, clones of both stocks and probe were obtained the presence of the inserted by PCR. The expression not profit of the awaited way by PAGE-SDS. The future experiments nave to find the way to do the expression and to find the facts to limit the gene expression.

Key words: *synthetic gene, malnutrition, protein, PCR, clone, expression.*

RESUMEN

En México, la desnutrición continúa siendo un problema de salud pública. La ingesta baja de proteínas la pueden tolerar tanto adultos como niños. Sin embargo, la deficiencia de proteínas se observa con mayor frecuencia en niños, especialmente porque son altos los requerimientos de proteína y energía por kilogramo de peso corporal. Esta condición, hace a los niños especialmente susceptibles a infecciones o padecer las consecuencias de la desnutrición. Por lo que es necesario encontrar a corto plazo, vías alternas para combatir el problema de la desnutrición infantil ocasionada por la deficiencia de proteínas de alta calidad. En la actualidad existe gran interés en entender la relación estructura-función de las proteínas alimentarias, la ingeniería de proteínas es un campo de la biología molecular que se enfoca hacia el diseño de proteínas a fin de obtener una propiedad biológica nueva. De tal manera, que el presente trabajo describe una aplicación de las técnicas de biología molecular, en donde se creó un gen sintético que codifica para una proteína con contenido balanceado de aminoácidos particularmente rica en los esenciales. El gen se logró sintetizar por PCR, según lo reveló los resultados de secuenciación del mismo. También se logró clonar en vectores de expresión. Sin embargo, los análisis por PAGE-SDS no muestran la expresión tanto de la bacteria como de la levadura. Por lo que futuros experimentos deberán conducirse para lograr la expresión y/o encontrar los factores que limitan la expresión del gen.

Palabras clave: *gen sintético, desnutrición, proteína, PCR, clonación, expresión.*

INDICE

<i>Contenido</i>	<i>Pagina</i>
Lista de tablas y figuras	VIII
Lista de abreviaturas.	X
1. MARCO TEORICO	1
1.1 Disponibilidad de Nutrientes a Nivel Mundial.	1
1.1.1 Seguridad Alimentaría.	2
1.2 Alimentación en México.	2
1.3 Requerimientos Nutricionales.	4
1.3.1 Requerimientos de Proteínas y Aminoácidos.	5
1.4 Importancia de las Proteínas y aminoácidos en la dieta.	6
1.5 Biotecnología.	8
1.5.1 La Biotecnología en la Nutrición	8
1.6 Relación en Cadena de la Polimerasa (PCR).	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
3. JUSTIFICACION	15
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo General.	18
4.2 Objetivos Especificos	18
5. MATERIALES Y METODOS	19
5.1 Materiales.	20
5.1.1 Vectores.	20
5.1.2 Cepas Microbianas.	21
5.1.3 Medios de Cultivo.	21
5.1.4 Antibióticos para el medio de cultivo.	22
5.2 Métodos.	22
5.2.1 Estrategias para la construcción del gen sintético.	22
5.2.2 Amplificación del gen sintético por PCR.	25
5.2.3 Electroforesis en el gel de agarosa.	26
5.2.4 Purificación del producto de PCR a partir del gel.	26
5.2.5 Secuenciación.	27
5.2.6.1 Clonación del producto de PCR en <i>Escherichia coil</i>	27
5.2.6.2 Extracción de plásmido.	29
5.2.6.3 PCR confirmatoria	29
5.2.6.4 Electroforesis en gel de agarosa.	30
5.2.6.5 Expresión.	30
5.2.6.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.	31
5.2.7.1 Clonación del producto de PCR en <i>Pichia pastoris</i> .	32
5.2.7.2 Ligación del Producto de PCR con el Vector pPICZA.	33
5.2.7.3 Transformación de células competentes.	33
5.2.7.4 Determinación de fenotipo mutado.	33
5.2.7.5 Análisis de clonas por PCR.	34

5.2.7.6	Expresión.	35
5.2.7.7	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	35
6.	RESULTADOS	36
6.1	Contracción del gen sintético.	36
6.2	Clonación del gen sintético en el plásmido pBAD TOPO.	39
6.3	Clonación del gen sintético en el plásmido pPICZA.	45
6.4	Determinación del Fenotipo Mut.	47
7.	DISCUSION	49
8.	CONCLUSIONES	54
9.	BIBLIOGRAFIA	55
10.	ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<i>TABLAS Y FIGURAS</i>	PÁGINA
Tabla 1. Consumo de proteína <i>per capita</i> en diferentes regiones del mundo.	7
Figura 1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.	12
Figura 2. Diagrama de flujo del trabajo realizado.	20
Figura 3. Mapa genético del plásmido pBAD TOPO®	21
Figura 4. Mapa genético del plásmido pPICZ ABC.	22
Figura 5. Primer estrategia para la construcción de un gen sintético de 321 pb de longitud.	24
Figura 6. Segunda estrategia de construcción del gen sintético.	25
Tabla 2. Composición de aminoácidos de la proteína sintética diseñada en este trabajo.	26
Figura 7. Amplificación de los segmentos A1A2 y B1B2.	38
Figura 8. Amplificación por PCR con temperatura de alineamiento en gradiente.	39
Figura 9. Amplificación del gen sintético por PCR.	41
Figura 10. Electroferograma del producto de PCR.	42
Figura 11. Alineamiento de secuencias.	43
Tabla 3. Código genético estándar.	43
Figura 12. Determinación de la presencia del inserto de dos clonas obtenidas después de la transformación.	44
Figura 13. Análisis de la expresión de la proteína sintética por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie.	45
Figura 14. Análisis de la expresión de la proteína sintética por SDS-PAGE teñido con Nitrato de plata.	46

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 15. Corte del producto de PCR con EcoRI y KpnI.	47
Figura 16. Corte del plásmido pPICZA con EcoRI y KpnI.	47
Figura 17. Determinación de la presencia del inserto en el plásmido pPICZA.	48
Figura 18. Crecimiento en medios sólidos MDH y MMH.	49

ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
ATP	Adenosin trifosfato
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxidonucleosido trifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetracetico
g	Gramos
h	Horas
HCl	Acido clorhídrico
Kb	kilobases
Kcal	kilocalorías
KCl	Cloruro de potasio
kDa	kilodaltones
kg	kilogramos
LB	Luria-Bertani
Log	Logarítmica
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
OD	Densidad Óptica
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
pmoles	Picomoles
PMSF	Persulfato de amonio
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Taq	Thernus aquaticus
TBE	Regulador de Tris-Borato-EDTA
TE	Regulador de Tris-EDTA
TEMED	N,N,N, N-tetrametilendiamina
YPD	Levadura peptona dextrosa
Zeo	Zeocina
βME	Betamercaptoetanol

1. MARCO TEÓRICO

El nuevo milenio ha brindado oportunidades sin precedentes para la investigación y el desarrollo de la nutrición. Los avances teóricos y metodológicos en las ciencias naturales, sociales y del comportamiento, están aportando el conocimiento y las herramientas necesarias para el entendimiento de las relaciones sinérgicas entre el consumo de alimentos, el metabolismo y el comportamiento humano, así como el desarrollo y la evaluación de programas de intervención ⁽¹⁾.

1.1. Disponibilidad de Nutrientes a Nivel Mundial

La inseguridad alimentaria y nutricional, afecta a un estimado de 815 millones de familias (la mayoría de países en vías de desarrollo). En la actualidad, en el mundo no predomina una alimentación y nutrición en forma segura; anualmente 30 millones de individuos nacen desnutridos, 10 millones de niños menores de 5 años mueren de enfermedades evitables, los que sobreviven, el 33% tienen retardo en el crecimiento y 27% tienen bajo peso. Mujeres y hombres también sufren mala nutrición, particularmente en edades reproductivas en el mundo desarrollado, y por otro lado un número creciente se convierte en obesos ⁽²⁾; dando como resultado enormes gastos sociales incluyendo disminución en las habilidades de aprendizaje en los niños, tasas de morbilidad y mortalidad elevadas, menor productividad y elevados costos de salud, factores que disminuyen el potencial humano y el desarrollo económico ⁽³⁾.

La seguridad alimentaria según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) es la condición, donde toda la gente en todo momento tenga acceso físico, social y económico a una nutrición adecuada, culturalmente aceptable, un suministro seguro de comida y el conocimiento de sus necesidades y preferencias para una vida saludable y activa ⁽⁴⁾.

1.1.1 Seguridad Alimentaria

La seguridad alimentaria y nutricional es el estado en el cual todas las personas gozan, en forma oportuna y permanente, de acceso a los alimentos que necesitan, en calidad y cantidad para su adecuado consumo y utilización biológica, garantizándoles un estado de bienestar que coadyuve al desarrollo humano. En esta definición se identifican la disponibilidad, accesibilidad, aceptabilidad y consumo de alimentos así como su utilización biológica como pilares básicos de la situación de la seguridad alimentaria y nutricional. Los alimentos deberían estar disponibles para toda la población. Sin embargo, en ciertos grupos de población, la inseguridad alimentaria está determinada por la falta de alimentos. En otros casos los alimentos pueden estar disponibles, pero no todos tienen acceso a ellos debido principalmente a limitaciones económicas, de distribución u otras. Además de la disponibilidad y accesibilidad existen factores de carácter cultural, social, educativo y biológico que afectan la aceptabilidad, consumo y aprovechamiento biológico de los alimentos. Para lograr una seguridad alimentaria y nutricional sostenible en los países en desarrollo es necesario integrar las acciones promovidas en cada uno de estos ámbitos, además de lograr condiciones ambientales adecuadas para su logro y sostenibilidad ⁽⁵⁾.

Entre las manifestaciones de la inseguridad alimentaria y nutricional se encuentran el inadecuado crecimiento físico y desarrollo mental, la morbilidad y mortalidad asociadas con la malnutrición, el rendimiento escolar deficiente y la baja productividad del adulto, que son a su vez causa del subdesarrollo humano ⁽⁵⁾.

1.2. Alimentación en México

En el ámbito nutricional, México es un país con cultura y tradición ancestral. Nuestros antepasados aprendieron a cultivar, procesar y consumir alimentos de gran aporte nutricional como: maíz, frijol, cacao, tomate, chile, etc., derivando productos como: el chocolate, la tortilla, los tamales, el mole, entre otros. Todos éstos son alimentos actualmente consumidos por la población ⁽⁶⁾.

En nuestro país existen marcadas diferencias socioeconómicas, donde destacan: los problemas de marginación, la falta de medios de comunicación, las carencias educacionales, entre otras. Esto provoca problemas como la desinformación nutricional que en combinación con la mezcla de cultura y tradiciones conducen a una mala alimentación ⁽⁶⁾.

La última Encuesta Nacional de Nutrición (ENN), efectuada por el Instituto Nacional de Salud Publica en el año de 1999 reportó que: la prevalencia de bajo peso en niños menores de cinco años fue del 7.5% y la de emaciación fue del 2% ⁽⁶⁾.

En México, la base del aporte promedio de calorías diarias para los hogares más pobres estriba en el consumo de cereales y de verduras, legumbres y leguminosas, mientras que en los que tienen más alto ingreso, la aportación de calorías la obtienen de la ingesta de cereales y carnes ⁽⁷⁾.

El aporte de proteínas para los hogares más pobres está en el consumo diario de cereales (78 g) seguido de verduras, legumbres y leguminosas (34 g). En los más ricos, la principal fuente de proteínas radica en el consumo de carne (111 g) y en segundo lugar el de cereales (74 g) ⁽⁷⁾.

Existe una discrepancia en la seguridad nutricional en los hogares mexicanos esto debido a que ocupan en la distribución del ingreso y según las distintas disponibilidades de alimentos a las que acceden, en cantidad y calidad. Así, en el 10% de los hogares más pobres, el consumo de alimentos proporcionó 66% de las calorías y 60% de las proteínas requeridas, mientras que en 10% de los hogares más ricos el suministro medio total fue de 95% de las calorías necesarias y de 117% de las proteínas ⁽⁷⁾.

En los hogares con ingresos altos y con mejor oportunidad para acceder a suministro alimentario, se consume casi dos veces más la cantidad de calorías y casi tres veces más de proteínas que las que se ingieren en los hogares más pobres ⁽⁷⁾.

Actualmente el gobierno aplica un gran número de programas de alimentación. A pesar de esto y por falta de presupuesto, no se cubren las necesidades nutricionales de la mayoría de la población. Por ello, algunas asociaciones civiles se han preocupado por esta problemática y han tratado de mejorar la calidad nutricional, proporcionando orientación y apoyo en las zonas más necesitadas ⁽⁶⁾.

1.3. Requerimientos Nutricionales

Los criterios y procedimientos para evaluar las necesidades nutricionales humanas han derivado principalmente de recomendaciones formuladas por organizaciones internacionales como la FAO y la OMS (Organización Mundial de la Salud) ⁽⁸⁾.

Para una evaluación cabal de las necesidades alimentarias y de nutrición es esencial conocer las necesidades de consumo humano de energía y de nutrientes, Esto permitirá a los gobiernos supervisar los programas de nutrición y en general, planificar las actividades de desarrollo ⁽⁹⁾.

Según expertos de organizaciones como la FAO y la OMS las necesidades de energía y proteínas de un individuo se definen como.

- a) Energía. "Las necesidades energéticas de un individuo son la dosis de energía alimentaria ingerida que compensa el gasto de energía, cuando el tamaño y composición del organismo y el grado de actividad física de ese individuo son compatibles con un estado duradero de buena salud, y permite el mantenimiento de la actividad física que sea económicamente necesaria y socialmente deseable. En los niños, mujeres embarazadas o lactantes las necesidades energéticas incluyen aquellas asociadas con la

formación de tejidos o la secreción de leche a un ritmo compatible con la buena salud".

- b) Proteínas. "Las necesidades proteínicas de un individuo se definen como la dosis más baja de proteínas ingeridas en la dieta que compensa las pérdidas orgánicas de nitrógeno en personas que mantienen el balance de energía a niveles moderados de actividad física. En los niños y en las mujeres embarazadas o lactantes, se considera que las necesidades de proteínas comprenden aquellas necesidades asociadas con la formación de tejidos o la secreción de leche a un ritmo compatible con la buena salud"⁽¹⁰⁾.

1.3.1 Requerimiento de Proteínas y Aminoácidos

Todos los cálculos de necesidades proteicas están referidos a dosis adecuadas de proteínas de alta calidad, equivalentes a las del huevo y la leche. Estos valores se deben ajustar por la eficiencia de utilización en la dieta por parte del organismo, tanto en términos de su digestibilidad real como de la cantidad de aminoácidos esenciales. Esta eficiencia de utilización expresa la relación entre las necesidades proteicas de referencia y la calidad promedio de las proteínas de la dieta⁽¹⁰⁾.

Generalmente, la mayoría de las proteínas animales contienen todos los aminoácidos esenciales en las cantidades requeridas por el cuerpo humano, por otro lado las proteínas vegetales carecen de uno o más aminoácidos esenciales y pueden en algunos casos ser difíciles de digerir⁽⁸⁾.

Según la RDA (Recommended Dietary Allowances), la recomendación diaria es de 0.8 g de proteína/kg·día. Así como reconoce la necesidad de incorporar otros aminoácidos además de los esenciales, leucina, lisina, isoleucina, metionina, cisteína, fenilalanina, treonina, triptofano y valina⁽¹¹⁾ (Ver **Anexo 1**).

El límite superior recomendado de proteínas del porcentaje total del consumo de energía no debe ser superior al 30%, para disminuir el riesgo de enfermedades crónicas, aunque no existen datos suficientes que lo sustenten para establecer un Nivel Superior Tolerable de Consumo (UL, por sus siglas en inglés *Tolerable Upper Intake Level*) ya sea de proteínas ó aminoácidos ⁽¹²⁾.

Las diferentes fuentes de proteína varían ampliamente en su composición química así como en su valor nutricional. La calidad de la fuente de proteína es la expresión de su habilidad de proveer el nitrógeno y los aminoácidos que se requieren para el crecimiento, mantenimiento y reparación. En sí, la calidad de la proteína está determinada principalmente por dos factores: la digestibilidad y la composición de aminoácidos de la proteína en cuestión. El segundo punto y en general el más importante de los factores que influyen en el valor nutricional de la fuente de proteína es el contenido relativo y la viabilidad metabólica de los aminoácidos esenciales a nivel individual. Ya que si el contenido de un aminoácido en la dieta es menor que el de los requerimientos del individuo, entonces se limitará la utilización de otros aminoácidos, así que se reduce la tasa de síntesis de proteínas aún cuando el consumo de nitrógeno total es el adecuado ⁽¹²⁾.

1.4. Importancia de las proteínas y aminoácidos en la dieta

Las proteínas son el mayor componente estructural de las células del cuerpo. Las proteínas pueden tener diversas funciones como enzimas, hormonas, transporte, estructurales en las membranas y por su composición de aminoácidos sirven como precursores de ácidos nucleicos, hormonas, vitaminas y otras moléculas importantes ⁽¹²⁾.

La proteína tiene un rendimiento promedio de energía de alrededor 4.2 kcal/g. Esta energía es derivada principalmente de carbonos reducidos. Las proteínas se obtienen de fuente animal tales como: carne, leche queso y huevos; y de otras fuentes tales como: cereales y leguminosas. Las proteínas animales proporcionan los aminoácidos que el cuerpo necesita. En contraste, una sola fuente vegetal a menudo carece de varios aminoácidos, en la mayoría de los vegetales siempre

hay alguno que no está presente en cantidades suficientes, especialmente en aminoácidos esenciales ⁽¹³⁾. Las proteínas son indispensables para el crecimiento y la actividad metabólica durante todos los estados de la vida.

La producción de proteína en el mundo en el año 2000 fue de 139 millones de toneladas de las cuales el 65% de éstas fue obtenido directamente de vegetales y el 35% fue de origen animal ⁽⁹⁾. En la Tabla 1 se muestra la cantidad de proteína consumida *per capita* en continentes desarrollados y subdesarrollados.

Tabla 1. Consumo de proteína *per capita* en diferentes regiones del mundo.

Región	Consumo de proteína total (g/día)
Europa	97.1
Norte América+	100.2
América Central	80.1
América del Sur	76.1
África	59.7
Resto del mundo	75.3

Fuente: FAO, 1999.

+México.

En Europa Occidental y en Estados Unidos, el consumo de proteína es alrededor de 1.5 a 2.0 veces mayor que la recomendaciones de ingesta, lo que se considera hasta ahora como inocuo. Se han reportado algunos estudios experimentales sobre los efectos del alto consumo de proteínas en donde son difíciles de evaluar las consecuencias a largo plazo o la ingesta crónica de este nutrimento ⁽¹⁴⁾.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que no hay indicadores que puedan ser aplicados en situaciones experimentales para evaluar la inocuidad de una proteína antes de detectar clínicamente cambios ocurridos. Esta declaración es igualmente pertinente para la determinación de niveles máximos

tolerables, particularmente, si se trata de estimar la ingesta de proteína en varias situaciones fisiológicas (mantenimiento, crecimiento, embarazo, lactancia) ⁽¹⁴⁾.

1.5. Biotecnología

La definición más simple de biotecnología es “biología aplicada”. Otra definición es: “el uso de organismos vivos para obtener un producto o llevar a cabo un proceso”. Para estas definiciones, las técnicas clásicas utilizadas para reproducir plantas y animales, y la purificación de enzimas se consideran parte de la biotecnología. Ejemplos de la aplicación de la biotecnología son: el empleo de bacterias para hacer yogurt, queso, vinagre, la utilización de técnicas de cruce y crecimiento en plantas y animales para producir variedades con características enriquecidas. Algunas personas usan el término biotecnología sólo para referirse a las nuevas técnicas de la ingeniería genética desarrollada desde 1973 ⁽¹⁵⁾.

En este contexto, la biotecnología puede ser definida como “el uso de métodos biotécnicos para modificar el material genético de células vivas para que produzcan nuevas sustancias o realicen nuevas funciones”. Los ejemplos incluyen la tecnología del DNA o recombinante, en la cual una copia de un fragmento de DNA que contiene uno o varios genes se transfiere o se recombinan con otro organismo ⁽¹⁵⁾.

1.5.1 La Biotecnología en la Nutrición

La biotecnología posee un potencial enorme para mejorar la calidad y valor nutrimental de los alimentos, así como para producir alimentos con características funcionales, para el consumo humano.

En este sentido la tecnología de DNA recombinante permite la manipulación de la información genética en un organismo para obtener productos deseados, nuevas características, y/o eliminar las no deseadas.

Inicialmente la manipulación genética se llevó a cabo en organismos procarióticos, hoy en día se aplica también a las plantas para producir alimentos con mejor composición, características funcionales y propiedades sensoriales. Las modificaciones genéticas han producido frutas que pueden ser maduras para darle al vino un mejor sabor y tener mayor vida de anaquel, evitando la degradación de pectina, o respuestas alteradas de la planta al óxido de etileno ⁽¹¹⁾. Se han generado plantas resistentes a enfermedades y condiciones ambientales, herbicidas y pesticidas ⁽¹⁵⁾. Un ejemplo claro de cómo la ingeniería genética puede ser de gran ayuda al obtener y expresar en mayor cantidad nutrimentos específicos es el caso del amaranto; en esta planta se expresó y purificó albúmina a partir de semillas maduras de *Amaranthus hypochondriacus* y la composición de aminoácidos de ésta proteína es comparable con la recomendación de la OMS de proteínas de alto valor ⁽¹⁶⁾.

A nivel mundial, se estima que la producción agropecuaria podría satisfacer probablemente la demanda esperada en el período hasta el 2030, incluso sin avances importantes en biotecnología. Sin embargo, la biotecnología puede ser una herramienta importante en la lucha contra el hambre y la pobreza, en los países en desarrollo. Debido a que puede proporcionar soluciones donde los enfoques de mejoramiento convencionales fracasen, también puede ser una gran ayuda en el desarrollo de variedades de cultivos capaces de sobrevivir en entornos difíciles en los que gran parte de la población pobre del mundo vive y se dedica a la agricultura. Actualmente se han conseguido algunos resultados prometedores en el desarrollo de variedades con características complejas como resistencia o tolerancia a la sequía, a la salinidad del suelo, a plagas y a enfermedades, lo que ha ayudado a reducir las pérdidas en las cosechas ⁽¹⁷⁾.

Por otra parte, dentro de las primeras aplicaciones de la biotecnología aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos) en la producción de animales, fue el uso de la proteína recombinante somatotropina bovina (bST) en vacas lecheras. bST, es una hormona proteica que se encuentra de manera natural en las vacas y es necesaria para la producción de la leche. Cuando la bST

se administra a la vacas lecheras bajo las condiciones de mantenimiento ideales, la producción de leche se incrementa entre 10% - 25%, sin cambios en la composición de la leche ⁽¹⁵⁾.

Otros usos de la biotecnología en animales incluyen: el desarrollo de vacunas para protegerlos de enfermedades, la inseminación artificial, la clonación, el incremento de la tasa de crecimiento y la rápida detección de enfermedades ⁽¹⁵⁾.

1.6. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction ⁽¹⁸⁾. Es una reacción en cadena efectuada por la DNA polimerasa, esta técnica fue descrita por Kary B. Mullis a principios de la década de los ochenta y, junto con la secuenciación del DNA, ha revolucionado la genética molecular ⁽¹⁹⁾.

Esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de DNA entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de DNA que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas. Puede ser por ejemplo: DNA nuclear total ⁽¹⁸⁾.

El método se basa, en su forma más simple en la realización de tres pasos sucesivos que se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces (Figura 1). El primer paso consiste en calentar la muestra hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el DNA original, lo que se conoce como desnaturalización.

En el segundo paso, la temperatura disminuye para permitir el apareamiento de cada una de dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos iniciadores) con cada una de las hebras separadas del DNA molde. Los oligonucleótidos iniciadores son segmentos de DNA de cadena simple, que se diseñan de manera tal que permiten definir los límites del tramo de DNA que se desea amplificar.

En el tercer paso, la enzima DNA polimerasa lleva a cabo la elongación a partir del extremo 3'OH de los iniciadores sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del DNA molde. Para ello, es necesario la reacción de los cuatro desoxidonucleósidos trifosfato (dNTPs). Típicamente la elongación se lleva a cabo a 72 °C. Al cabo del primer ciclo de tres pasos (desnaturalización, apareamiento, elongación) el segmento de DNA elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente duplicado en posteriores ciclos. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación logarítmica del segmento de DNA delimitado por los iniciadores ⁽²¹⁻²³⁾.

En un principio la amplificación de DNA era llevada a cabo por la DNA polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*. Pero debido a la termolabilidad era necesario agregar enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se cambió por la enzima de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. La DNA polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75°C y los 80°C y resiste temperaturas de 93°C por más de 2 horas. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados ⁽¹⁹⁾.

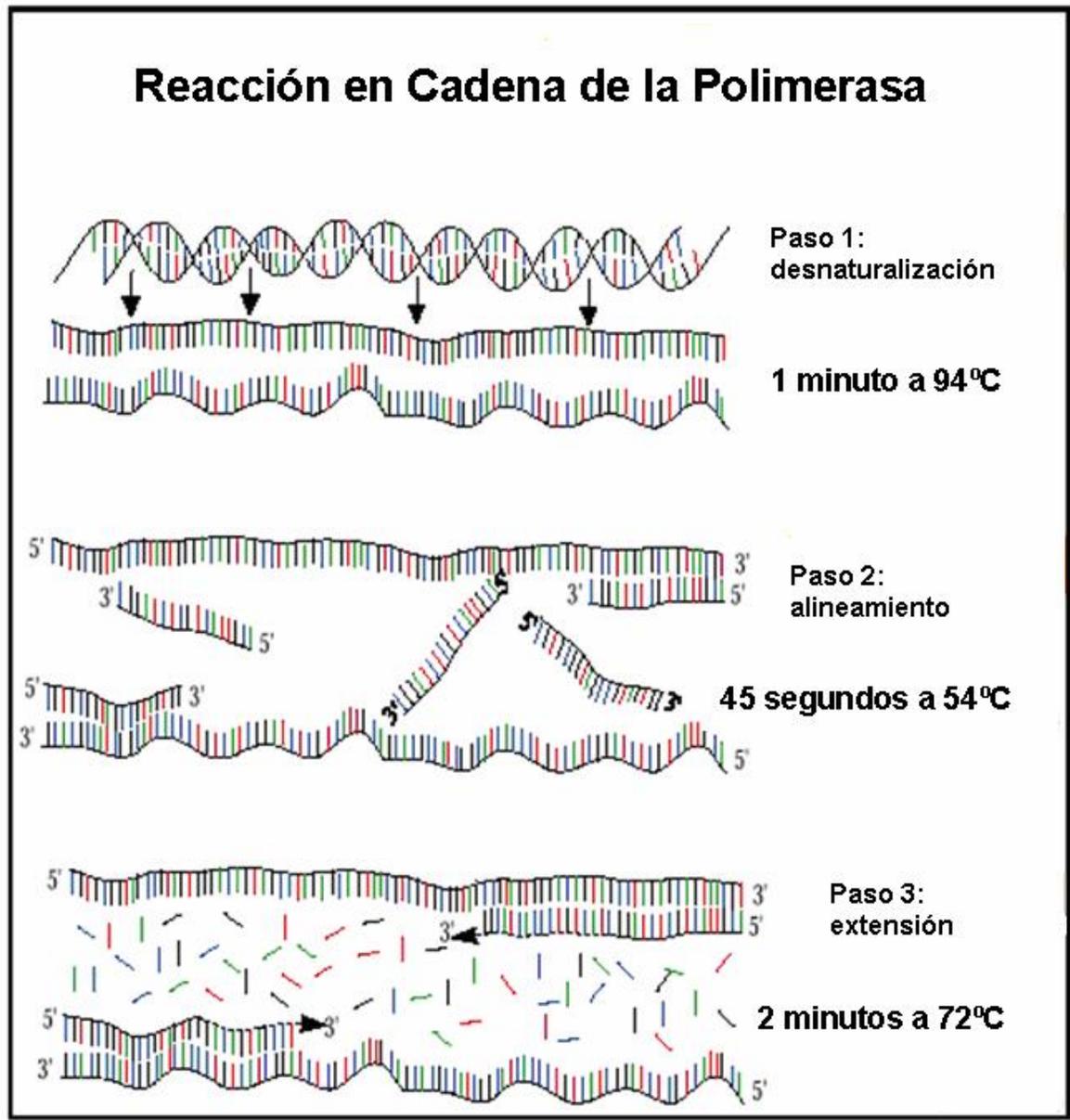


Figura 1. Reacción en Cadena de la Polimerasa. La reacción típicamente se emplea para amplificar segmentos específicamente de DNA situados entre los iniciadores que se ubican a ambos lados de la zona que se desee amplificar. Por lo general la reacción se lleva a cabo en repetidos ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión ⁽²⁰⁾.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México existe un rezago importante en cuanto a nutrición se refiere. Este rezago se debe a que un número importante de comunidades no cuentan con los recursos necesarios para adquirir alimentos de buena calidad y en cantidades necesarias para cumplir con los requerimientos mínimos de nutrimentos que les permitirían lograr un óptimo desarrollo nutricional.

En la actualidad, la desnutrición continúa siendo un problema importante de salud pública. La mala nutrición se asocia vigorosamente con defectos en diversas funciones y con aumento en el riesgo de varias enfermedades, por lo que la nutrición se considera como uno de los principales determinantes en el proceso salud-enfermedad. La desnutrición afecta principalmente a los niños durante los tres primeros años de vida, aunque la deficiencia de varios micronutrientes también se presenta durante la edad escolar y en mujeres en edad fértil.

La desnutrición puede ser resultado de: a) aporte deficiente de alimentos, b) un mal procesamiento de los nutrientes por las células del organismo, c) un aumento en los requerimientos o, más frecuentemente, d) de una combinación de todas estas condiciones.

La ingesta baja de proteínas puede tolerarse tanto en adultos como en niños, dependiendo de la calidad de proteína ingerida y del nivel de ingesta calórica. El gasto de nitrógeno urinario cae drásticamente con una ingesta baja de proteínas, indicando el efecto compensador del proceso de adaptación dentro del cuerpo. Después de 4 a 5 días de balance nitrogenado negativo, se restablece el equilibrio en un nivel menor. Sin embargo, más allá de un punto crítico, el cuerpo no puede adaptarse más y se desarrolla deficiencia de proteína con edema, pérdida de tejidos corporales, hígado graso, dermatosis, respuesta inmunológica disminuida, debilidad y pérdida del vigor. La deficiencia de proteína se observa con mayor frecuencia en niños debido a los altos requerimientos de proteína y energía por

kilogramo de peso corporal, su mayor susceptibilidad a factores como la infección (lo que aumenta sus requerimientos proteicos) y su incapacidad para obtener alimento por sus propios medios ⁽²⁴⁾.

Dentro de las conclusiones de la Encuesta Nacional de Nutrición realizada por el Instituto Nacional de Salud Pública en 1999, se señala que la desnutrición continúa siendo un importante problema de salud pública en México, la población menor de cinco años presenta un retardo severo en estatura, resultado de una inadecuada alimentación; entre el primer y segundo año de vida ocurre el retardo en estatura, el cual no se recupera posteriormente. Estos resultados marcan la importancia de los dos primeros años de vida en la génesis de la desnutrición ⁽⁶⁾. Ante tal situación es necesario encontrar a corto plazo vías alternas para combatir el problema de nutrición especialmente en la población infantil.

3. JUSTIFICACIÓN

La situación actual en el mundo en cuanto al abastecimiento de alimentos es alarmante; ya que su producción, distribución, transporte y almacenamiento resultan deficientes y limitados. En México, gran parte de la población no consume con frecuencia alimentos de origen animal la cual es una importante fuente de proteínas necesarias para enriquecer la nutrición. Aunque cada vez es mayor la producción de animales, también lo es el desarrollo poblacional, lo que provoca escasez de estos recursos.

La bacteria *Escherichia coli* se ha usado para producir hormonas humanas desde 1977. Aunque se encuentra en la parte baja de la escala filogenética en cuanto a complejidad, este microorganismo se perfiló como el actor más importante de la revolución biológica que marco el nacimiento de la tecnología del DNA recombinante ⁽²⁵⁾.

El empleo de las técnicas de DNA recombinante ha dado lugar a la aparición de productos con características diferentes de los tradicionales. Las técnicas permiten hacer diferentes tipos de modificaciones en la información genética de las plantas de importancia alimentaria, ya sea una transferencia de segmentos de DNA e incluso genes completos. Como resultado de esta transferencia, el organismo modificado genéticamente, pueden ahora contar con propiedades que no poseía en forma natural. En la actualidad existe gran interés en entender la relación estructura-función de las proteínas alimentarias y, la ingeniería de proteínas se enfoca hacia el diseño de la estructura de proteínas a fin de obtener una propiedad biológica nueva.

La manipulación genética de organismos con cualidades nuevas se presentó desde sus inicios, como una opción alternativa para contender con los problemas de explotación masiva de recursos naturales. Como la aplicación alimentaria de los recursos biológicos es la más importante, es obvio que las áreas de

producción, almacenaje, procesamiento y distribución de alimentos fueron objeto de importantes estudios y aplicaciones tecnológicas ⁽²⁵⁾.

Resulta necesario emplear los adelantos de la biología molecular en la solución de la carencia de alimentos a nivel mundial. De tal forma, que el presente trabajo describe una aplicación de las técnicas de biología molecular, para crear un gen sintético que codifique para una proteína con contenido balanceado de aminoácidos y particularmente rica en aminoácidos esenciales. La proteína sintética podría utilizarse como un suplemento alimentario en alimentos que normalmente la población mexicana consume, como la tortilla, pan, etc.

Actualmente se cuenta con suficiente evidencia que respalda el uso de técnicas de biología molecular para la solución de problemas. La producción de vitaminas y de precursores de vitaminas también se está beneficiando de los avances en ingeniería metabólica. Los microorganismos se emplean en la producción de biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, piridoxal, β -caroteno (provitamina A), tiamina (B₁), riboflavina (B₂), vitamina B₆, vitamina B₁₂, y ergosterol (provitamina D₂). Como ejemplo del potencial de la tecnología recombinante se ha conseguido llevar a cabo la síntesis de licopeno, β -caroteno, y astaxantina en la levadura *Candida utilis* tras la clonación de algunos genes de las bacterias *Erwinia uredova* y *Agrobacterium aurantiacum*. También mediante la aplicación de la Ingeniería Genética se pueden producir β -caroteno, zeaxantina, o astaxantina en células de *E. coli* recombinantes ⁽²⁶⁾.

Muchos aminoácidos y especialmente los que se utilizan en grandes cantidades en la industria agroalimentaria y farmacéutica se obtienen directamente mediante la combinación de las técnicas clásicas de mutagénesis con las de ingeniería metabólica. Por ejemplo, el efecto de la amplificación génica junto con la desregulación de enzimas claves de las rutas biosintéticas ha servido para aumentar la producción del L-triptófano en cepas recombinantes de *Corynebacterium glutamicum* ⁽²⁷⁾.

Investigadores de Universidad Nacional Autónoma de México diseñaron un gen sintético *HsCrATP6* con el objetivo de obtener una proteína ATP6 lo más parecido a la proteína humana para que conserve su función, pero disminuyendo un poco la hidrofobicidad de la proteína y añadiendo una presecuencia de direccionamiento a la mitocondria, de tal manera que sus nuevas características permitan realizar la expresión alotópica de la proteína, y lograr que sea correctamente ensamblado en el complejo de la ATPasa ⁽²⁸⁾.

Investigadores de la Universidad de Pennsylvania, en colaboración con otro de la Universidad de Harvard, crearon un gen sintético que codifica para la proteína IGF-I con el objetivo de alterar la función muscular. Teniendo en cuenta que las células musculares se caracterizan por su longevidad, al introducir el gene IGF-I en las células musculares de personas de avanzada edad, se mantendría activo el resto de su vida. Para insertar el gene utilizaron el virus adenoasociado (VAA), cuya ventaja principal reside en que infecta fácilmente los músculos humanos, pero no causa ninguna enfermedad conocida. Modificaron el virus con un gen sintético que producía IGF-I sólo en músculo esquelético ⁽²⁹⁾.

Diversos genes sintéticos se han logrado construir, clonar y expresar, tal es el caso de un gene sintético que codifica para la isoenzima peroxidasa C del rábano (HRP C), que ha sido sintetizado y expresado en *Escherichia coli*. Así mismo un gen sintético basado en la secuencia de aminoácidos de *Clostridium pasteurianum* rubredoxin fue construido, clonado y expresado en *Escherichia coli* ⁽³⁰⁾.

Se logro la expresión de un gene sintético que codifica para una proteína antígeno de unión de cadena simple (scFv) en plantas transgénicas de tabaco. El gene scFv fue creado por PCR, clonado y expresado primero en *Escherichia coli* y posteriormente insertado en plantas transgénicas de tabaco, logrando la expresión del gene ⁽³¹⁾.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Construir un gen sintético que codifique para una proteína con alto valor biológico y su expresión en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.

4.2 Objetivos Específicos

- 1.- Diseñar los oligonucleótidos iniciadores para la construcción del gen sintético.
- 2.- Construir el gen sintético por medio de la técnica de PCR.
- 3.- Clonar el gen en un vector de expresión para *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.
- 4.- Expresar la proteína sintética a nivel piloto en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la realización del presente trabajo, se hicieron uso de diversas técnicas de biología molecular para construir, clonar y tratar de expresar la proteína sintética con la composición de aminoácidos deseada. La estrategia experimental que se siguió se encuentra resumida en la Figura 2.

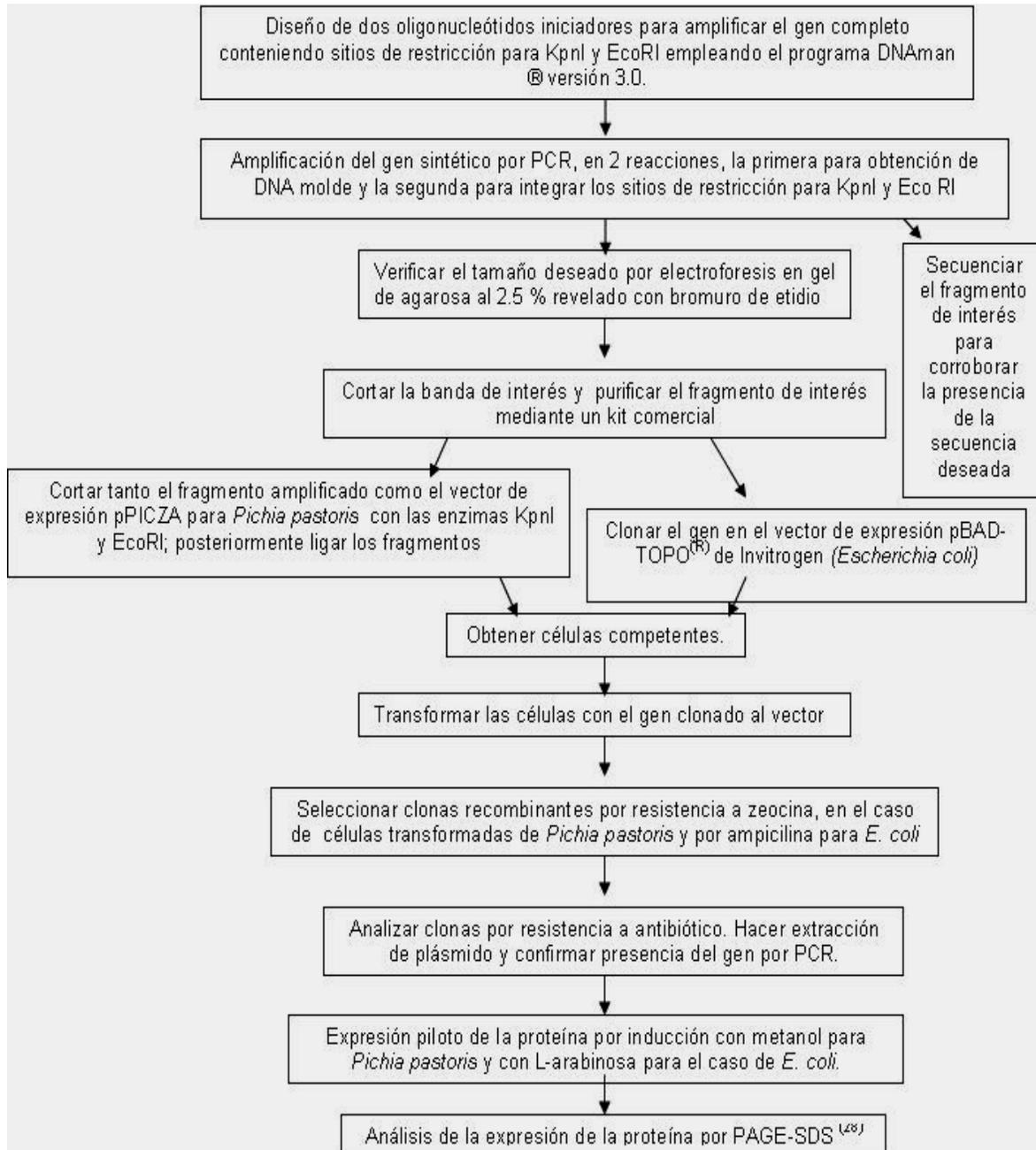


Figura 2. Diagrama de flujo del trabajo realizado.

5.1 Materiales

5.1.1 Vectores

Para la expresión de la proteína en *Escherichia coli* se utilizó el vector pBAD TOPO[®], mientras que la expresión en *Pichia pastoris* se utilizó el vector pPICZA. (Figura 3 y 4 respectivamente)

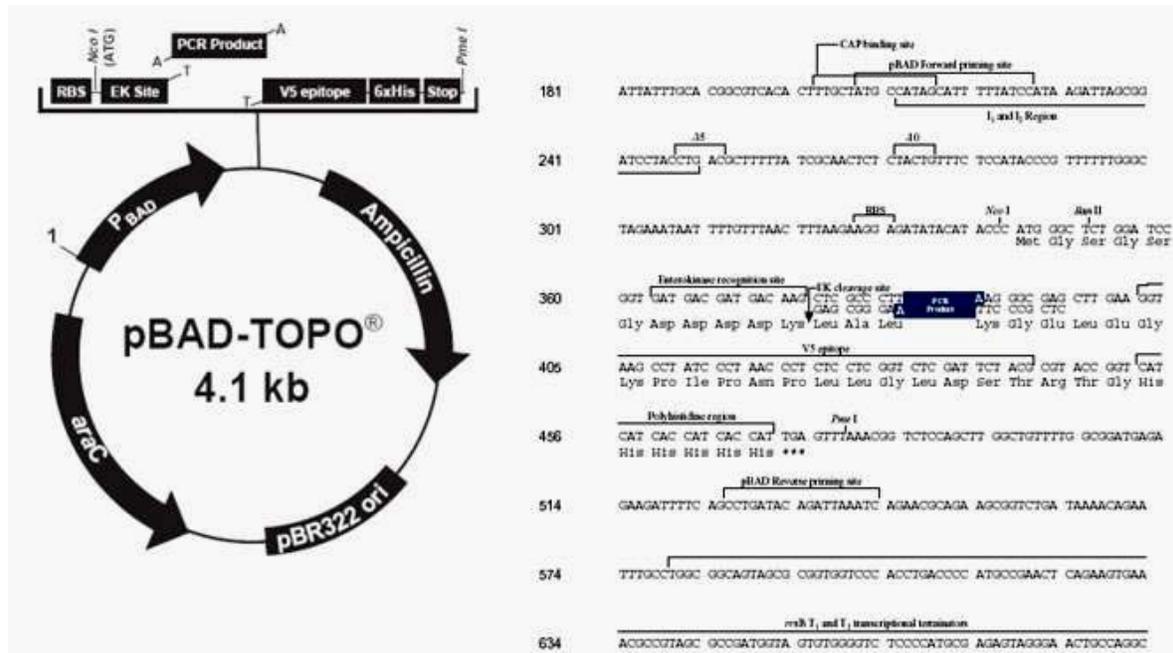


Figura 3. Mapa genético del plásmido pBAD TOPO[®] A) El plásmido pBAD-TOPO, es un vector de 4.1 kb y es útil para la clonación y expresión, en donde la expresión es regulada por el promotor de la L- arabinosa (*ara C*) que puede permitir la expresión de la proteína de interés en forma fusionada con sitio de reconocimiento de corte para enterocinasa (EK site) justo tres aminoácidos antes del sitio de clonación del fragmento ver figura B; epítipo V5 que sirve para detectar la proteína de fusión por análisis por Western Blot empleando anticuerpos Anti-V5 y una etiqueta de polihistidinas en la región C- terminal de la proteína de fusión para permitir la purificación de la proteína por una columna de Niquel ácido-nitril-tri-acético Ni-NTA. El plásmido, posee el gen de resistencia contra ampicilina para seleccionar clones. En la figura B) se puede observar la secuencia nucleotídica de los iniciadores pBAD sentido y PBAD antisentido que sirven para corroborar la orientación del inserto.

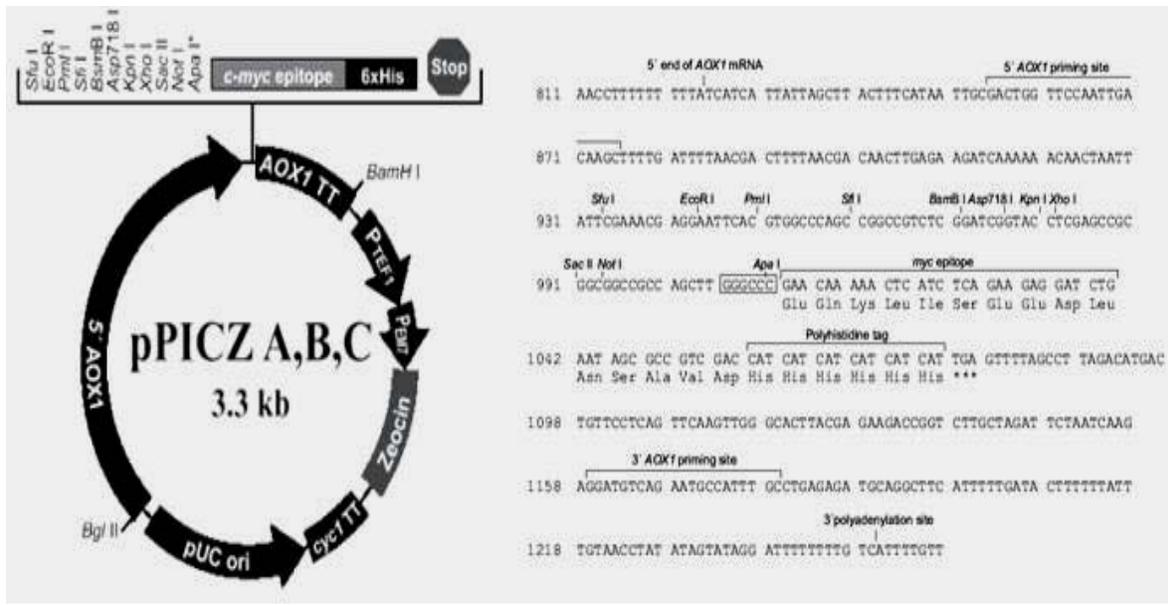


Figura 4. Mapa genético del plásmido pPICZ ABC. A) El plásmido pPICZABC, es un vector de 3.3 kb las diferencias entre A, B y C radica, en que el plásmido A contiene el sitio Apal, mientras que el B contiene el sitio Xba I y el C contiene el sitio SnaB. El plásmido es útil para expresión de proteínas principalmente de origen eucariótico. El plásmido codifica para el gen del alcohol oxidasa AOX1 y su expresión es regulada por metanol. Contiene un sitio de policlonación (Figura B) donde se encuentran los sitios de corte para Eco RI y KpnI, y que fueron seleccionados para este trabajo. De igual manera, que el plásmido pBAD TOPO® se puede permitir la expresión de la proteína de interés en forma fusionada con epítipo myc para detectar la proteína de fusión por análisis por Western Blot empelando anticuerpos Anti-myc y una etiqueta de polihistidinas en la región C– Terminal de la proteína de fusión para permitir la purificación de la proteína por una columna de Níquel ácido-nitril-tri-acético Ni-NTA. El plásmido, posee el gen de resistencia para zeocina y se puede observar la secuencia nucleotídica de los iniciadores 5´AOX1 priming site y 3´AOX1 priming site que sirven para corroborar la orientación del inserto.

5.1.2 Cepas microbianas

Las cepas que se emplearon en este estudio fueron las siguientes:

Cepa	Genotipo
<i>Escherichia coli</i> BL21	F mcrA
<i>Pichia pastoris</i> GS115,	his4.

5.1.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron el LB (Luria-Bertani), YPD (Yeast Peptone Dextrose), 10X YNB (13.4% Yeast Nitrogen Base con Sulfato de Amonio sin amino ácidos), YPDS + Zeocin™ Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (Medio de

extracto de levadura, peptona, dextrosa, sorbitol), MGY y MGYH Minimal Glycerol Medium + Histidina (Medio Mínimo de Glicerol y Medio Mínimo de Glicerol + Histidina), MD y MDH Minimal Dextrose Medium + Histidina (Medio Mínimo de Dextrosa + Histidina), MM y MMH Minimal Methanol + Histidine (Mínimo Metanol y Mínimo Metanol + Histidina)

5.1.4 Antibióticos para medio de cultivo

Ampicilina 100 mg/mL. Se pesaron 100 mg de ampicilina y se disolvieron en 1 mL de H₂O_d estéril, se hicieron alícuotas de 100 µL y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Zeocina 100 mg/mL. Se pesaron 100 mg de zeocina y se disolvieron en 1 mL de H₂O_d estéril, se hicieron alícuotas de 100 µL y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Estrategia para la construcción del gen sintético

Con la ayuda del programa de cómputo DNAMAN[®] versión 3.0 se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para la creación del gen sintético. Inicialmente, la estrategia consistió en el diseño de 12 oligonucleótidos iniciadores para obtener un producto de 321 pb después de la amplificación por PCR (Figura. 5).

En la segunda estrategia, se diseñaron 4 oligonucleótidos iniciadores más largos, bajo el mismo principio de estrategia 1 (Figura 6). En el diseño se consideró la inclusión de un codón de inicio, de tal manera que entrara en marco de lectura con el vector y un codón de término. En todos los diseños se tuvo especial cuidado en que los oligonucleótidos tuvieran termodinámicamente la capacidad de formar dúplex estables con el sitio blanco; que no formaran dúplex con otros oligonucleótidos especialmente en el extremo 3' para evitar la formación de dímeros, que no existiera alineación en otros sitios para evitar amplificaciones inespecíficas y que no existiera auto-complementariedad⁽²¹⁻²³⁾. El gen sintético diseñado codifica para una proteína de 107 aminoácidos donde sobresale un

alto contenido de los aminoácidos esenciales que fue principalmente el propósito de este estudio (Tabla 2).

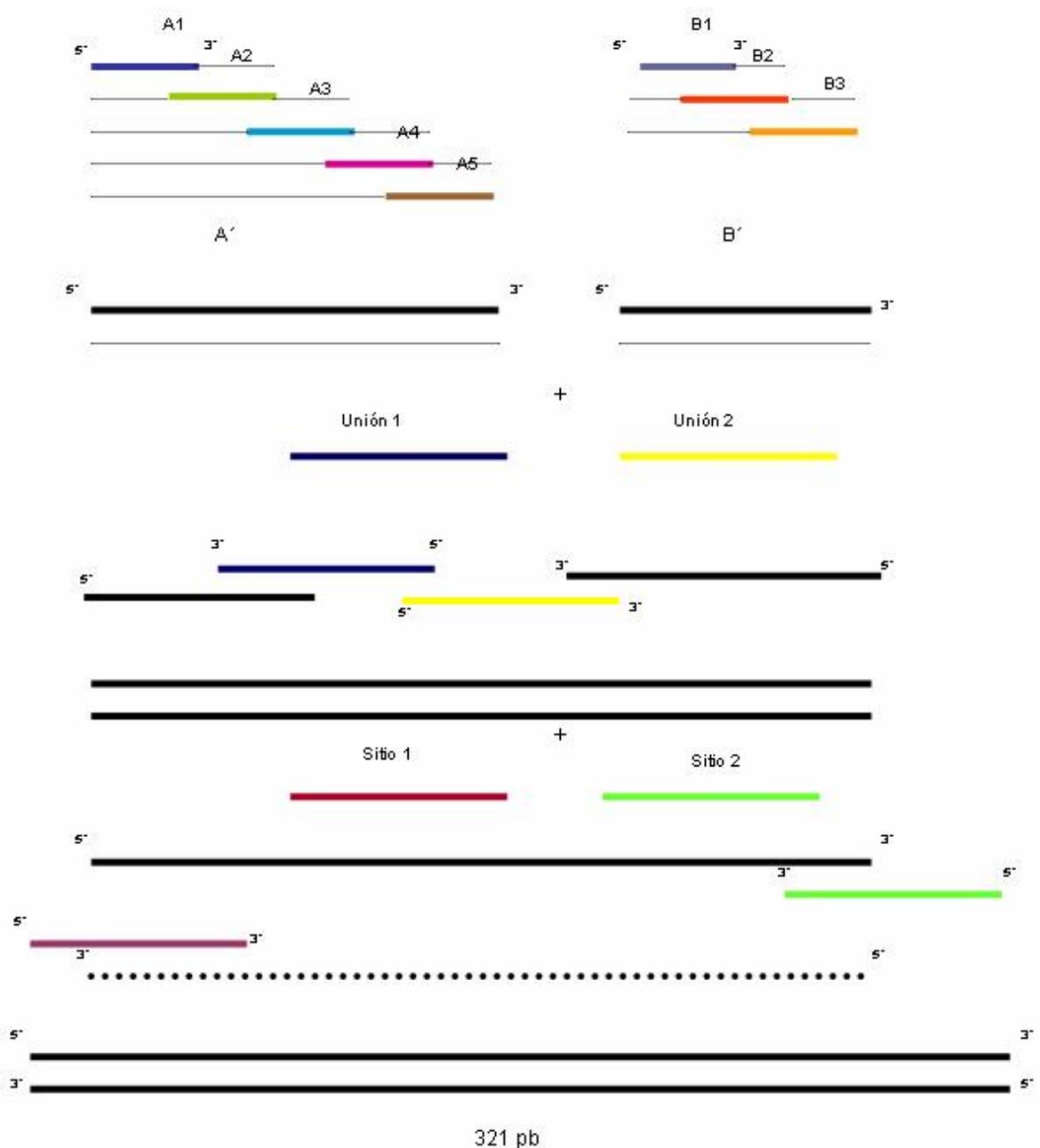


Figura 5. Primer estrategia para la construcción de un gen sintético de 321 pb de longitud. El grupo de oligonucléotidos A y B se diseñaron para construir dos fragmentos independientes denominados A' y B'. Los oligonucléotidos Unión 1 y 2 fueron diseñados para unir los fragmentos A' y B'; y finalmente los oligonucléotidos Sitio 1 y 2 se diseñaron para introducir sitios de corte para las enzimas Kpn I y Eco RI.

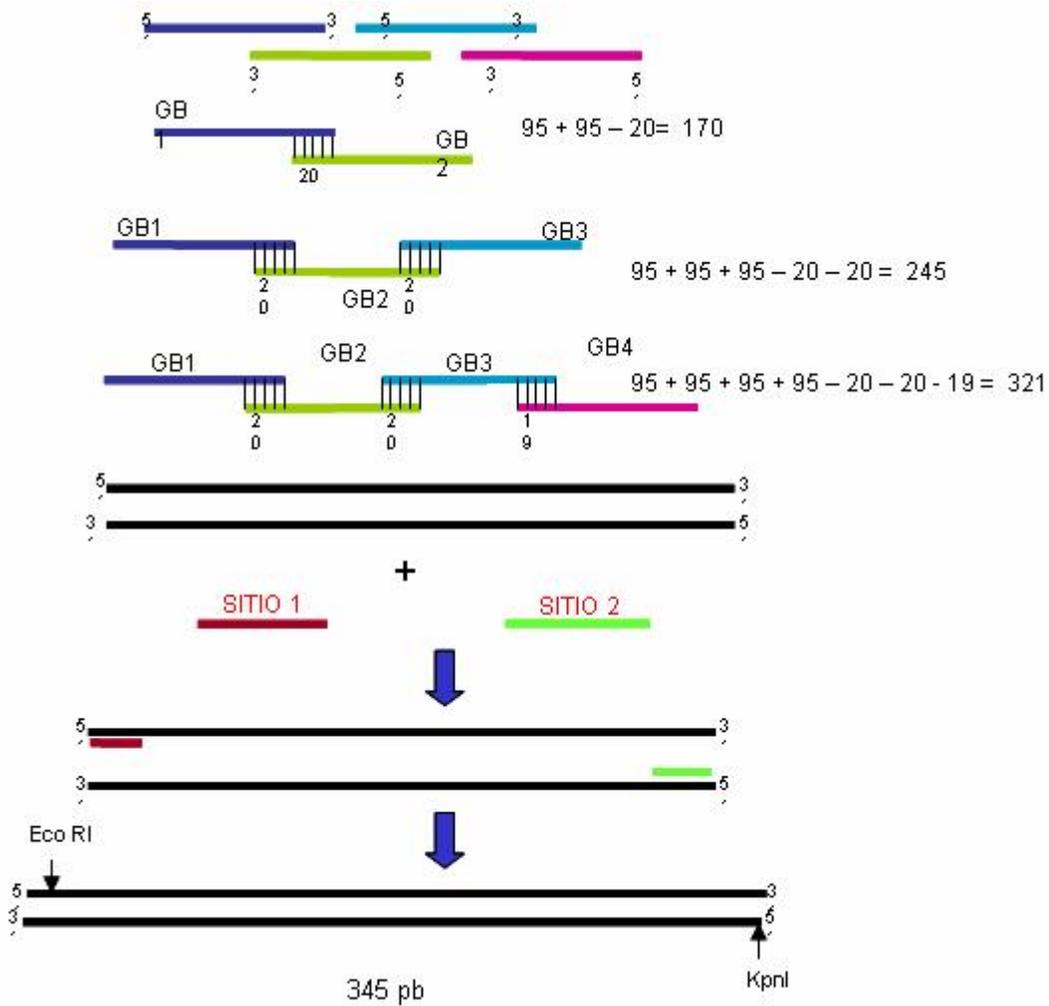


Figura 6. Segunda estrategia de construcción del gen sintético. Se diseñaron cuatro oligonucleótidos (GB1, GB2, GB3 y GB4) de 95 bases de longitud. El número de bases de alineamiento entre GB1-GB2 y GB2-GB3 es de 20 bases; mientras que en GB3 y GB4 es de 19 bases. Al unir los cuatro oligonucleótidos y el restar el número de apareamientos se genera un tamaño final de 321 pb. Finalmente se diseñaron los oligonucleótidos U1 y U2 para introducir sitios de restricción en ambos extremos para posteriormente clonar el fragmento en el plásmido pPICZa.

Tabla 2. Composición de aminoácidos de la proteína sintética diseñada en este trabajo.

Aminoácido	Número	% mol/mol
Alanina	3	2.80
Cisteina	3	2.80
Aspartato	3	2.80
Glutamato	3	2.80
*Fenilalanina	7	6.54
Glicina	3	2.80
Histidina	7	6.54
*Isoleucina	7	6.54
*Lisina	6	5.61
*Leucina	7	6.54
*Metionina	7	6.54
Asparagina	4	3.74
Prolina	3	2.80
Glutamina	6	5.61
Arginina	8	7.48
Serina	3	2.80
*Treonina	7	6.54
*Valina	9	8.41
*Triptófano	8	7.48
Tirosina	3	2.80
Total	107	100 %

*Aminoácidos esenciales.

5.2.2 Amplificación del gen sintético por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del gen se realizó en dos reacciones subsecuentes de PCR de acuerdo al método descrito por Dillon y Rosen ⁽²²⁾, debido a que no es posible amplificar el gen en una sola reacción. La primera reacción se realizó con la finalidad de generar una cantidad suficiente de DNA molde (gen sintético) para la segunda reacción ⁽²¹⁻²³⁾.

Primera reacción de PCR. La amplificación se realizó en un volumen final de 50µL que contenía: 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 4.3 pmoles de cada iniciador, mas 1.5 unidades de Taq

Polimerasa recombinante de Invitrogen. Se mezclaron todos los reactivos y la amplificación se realizó con un primer ciclo a 94°C por 4 min (desnaturalización inicial), seguido por 10 ciclos a 94°C por 1 min (desnaturalización), 60°C por 1 minuto (alineamiento) y a 72°C por 1 min (extensión), seguidos por una extensión final de 5 min a 72 °C usando un Termociclador Genius® Techne 512.

Segunda reacción de PCR: Se realizó en un volumen final de 100 µL que contenía: 1 µL de la primera reacción de PCR, 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 50 mM KCl, 200µM dNTPs, 100 pmoles de cada oligonucleótido Sitio 1 y Sitio 2, 1.5 U de Taq polimerasa. Se mezclaron todos los reactivos y la amplificación se realizó con un primer ciclo a 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y a 72°C por 1 min, seguidos por una extensión final de 5 min a 72°C usando un Termociclador Genius. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% ⁽²³⁾.

5.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó una solución de agarosa al 2.5% en amortiguador TRIS-Borato-EDTA TBE 1X, la cual se calentó en horno de microondas hasta su disolución total, se agregó 1 µL de bromuro de etidio (10 µg/mL) se mezcló bien y la solución se vertió en la charola molde, se colocó el peine para formar los pozos y se dejó gelificar a temperatura ambiente. Después se colocó la charola en la cámara de electroforesis y se agregó suficiente amortiguador TBE 1X. Por otro lado, la muestra o muestras a analizar, así como, marcadores de peso molecular conocidos se mezclaron con amortiguador de corrimiento e inmediatamente se cargaron en los pozos del gel. La electroforesis se realizó a 80 V y el gel se observó con un fotodocumentador UVP para la toma de imágenes.

5.2.4 Purificación del producto de PCR a partir de gel

La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el kit comercial “Perfectprep® Gel Cleanup” (Eppendorf). Para ello, se utilizó un transiluminador de luz UV y con ayuda de marcador de peso molecular conocido se ubicó la banda y

se cortó el gel con la banda de interés con una espátula y se colocó en un tubo Eppendorff. Posteriormente se purificó la banda siguiendo las instrucciones del manual de usuario que proporciona el fabricante, obteniendo un volumen final de de 30 μ L. Al finalizar la purificación, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, para verificar la pureza. Ver **Anexo 3**.

5.2.5 Secuenciación

Para confirmar la secuencia del gen sintético, el producto de PCR purificado se mandó a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, el cual se basa por el método de dideoxi (Sanger) y emplea un secuenciador de DNA de Applied Biosystems modelo 370^a. Las secuencias resultantes se alinearon con la secuencia teórica utilizando el programa de cómputo Clustalx versión 1.83.

5.2.6.1 Clonación del producto de PCR en *Escherichia coli*

Se clonaron los productos de PCR empleando el kit comercial TOPO[®] TA Cloning expresión ⁽³⁶⁾. El vector de (pBAD-TOPO[®]) Figura 4, está linearizado y contiene en su extremo 3' de cada cadena una timidina colgando así como la topoisomerasa I (de ahí el nombre de TOPO). Por otra parte, la Taq DNA Polimerasa tiene una actividad de transferasa terminal no dependiente del molde, que adiciona una desoxi-adenosina (A) al extremo 3' de los productos de PCR. Esto permite que los productos de PCR se ligen eficientemente con el vector, gracias a la topoisomerasa I se une al DNA dúplex en sitios específicos y rompe el enlace diésterfosfato después del 5'CCCTT en una cadena. La energía del enlace diésterfosfato se conserva para la formación del enlace entre el 3' fosfato de la cadena rota y el residuo de tirosina (Tir-274) de la topoisomerasa. El enlace fosfotirosil entre el DNA y la enzima puede subsecuentemente ser atacado por el 5'OH de la cadena original rota, revertiendo la reacción y liberando la topoisomerasa I.

La clonación del fragmento se hizo de acuerdo al protocolo que se indica enseguida.

Se emplearon 4 μ L de producto de PCR fresco, 1 μ L de solución de sal diluida (1:4), 1 μ L, agua estéril y μ L de vector TOPO. Esta solución se mezcló y se incubó por 5 minutos (dependiendo de las necesidades se puede incubar de 30 segundos a 30 minutos) a temperatura ambiente (22- 23 °C). Posteriormente se colocó la reacción en hielo y se procedió a la transformación.

Las células clonadas se obtuvieron utilizando la reacción de PCR de TOPO (paso anterior) un One Shot TOP 10 (células químicamente competentes de *E. coli* proporcionadas en el kit), medio S.O.C. (incluido en el kit), control positivo pUC19 (para verificar la eficiencia de la transformación), baño de agua a 42 °C, placas con medio LB que contengan 100 μ g/100 mL de ampicilina, e incubadora con movimientos a 37 °C.

Para cada transformación se necesitó un vial de One Shot de células competentes y dos placas selectivas.

Se colocó a temperatura ambiente el medio S.O.C., al igual que las placas de medio LB con ampicilina a 37°C por espacio de 30 min, se incubó en hielo un vial de One Shot Top 10 para cada transformación

Se agregaron 2 μ L de la primera reacción en el vial de One Shot Top 10 y se mezcló por vortex. Posteriormente se incubó en hielo por espacio de 5 a 30 min. Una vez transcurrido el tiempo se sometió a choque térmico las células por 30 seg a 42°C sin agitar, inmediatamente después se colocó en hielo el vial y se agregaron 250 μ L del medio S.O.C. a temperatura ambiente. Después se tomó cuidadosamente el tubo y se agitó horizontalmente a 200 rpm con una temperatura de 37 °C por 1 h. Posteriormente se tomaron 10 μ L de esta transformación y se sembró en las placas selectivas precalentadas y se incubó por toda la noche.

5.2.6.2 Extracción de plásmido

Se realizó extracción plasmídica mediante la técnica reportada por Birnborm y Doly⁽⁴⁰⁾. Ver **Anexo 5**, para confirmar la presencia del inserto se realizó una reacción de PCR, utilizando los iniciadores diseñados (sitio 1 o sitio 2).

5.2.6.3 PCR confirmatoria

Para comprobar si el plásmido tiene el inserto, se llevaron a cabo dos PCR en las cuales se emplearon los iniciadores proporcionados por el kit pBAD TOPO[®] TA Expression Kit y los iniciadores empleados para la creación del gen sintético. Se eligieron dos plásmidos al azar y se le denominaron Plásmido 1 y Plásmido 2, para los cuales se llevaron a cabo la Reacción 1 y Reacción 2 respectivamente.

La Reacción 1 se llevó a cabo con 1 μ L del Plásmido 1, 1 μ L del P Bad Fwd (Sentido) y 1 μ L P Bad Rev (Antisentido), estos reactivos se adicionaron a tubos para microcentrífuga que contenían las perlas del kit para PCR, las cuales ya tienen todos los amortiguadores para la Taq polimerasa.

La Reacción 2 se realizó con 1 μ L del Plásmido 2, 1 μ L del P Bad Fwd, y 1 μ L del Iniciador de Reversa de la reacción original del PCR (Sitio 1). Para esta reacción se emplearon las perlas del kit para PCR.

Ambas reacciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: un primer ciclo a 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y a 72°C por 1 min, seguido por una extensión final de 5 minutos a 72°C en el termociclador.

Para confirmar que el plásmido contiene el inserto y en la posición correcta se llevaron a cabo otras PCR de la siguiente manera.

La Reacción 1 se realizó en un volumen final de 14 μ L aproximadamente que contenía: 1 μ L del Plásmido 1, 1 μ L del Sitio 1, 1 μ L del Sitio 2, 5 μ L del Amortiguador de PCR 10X, 1 μ L de la mezcla de dNTP's, 1.5 μ L de Magnesio,

3 μ L de agua desionizada estéril y 0.5 μ L de Taq polimerasa. Se mezclaron todos los reactivos y la amplificación se inició con un primer ciclo a 94°C por 4 minutos, seguido por 10 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y a 72°C por 1 minuto, seguidos por una extensión final de 5 minutos a 72°C usando el termociclador.

La Reacción 2 se realizó en un volumen final de 14 μ L aproximadamente que contenía: 1 μ L del Plásmido 2, 1 μ L del Sitio1, 1 μ L del Sitio2, 5 μ L del Amortiguador de PCR 10X, 1 μ L de la mezcla de dNTP's, 1.5 μ L de Magnesio, 3 μ L de agua desionizada estéril y 0.5 μ L de Taq polimerasa. Se mezclaron todos los reactivos y la amplificación se realizó con un primer ciclo a 94°C por 4 minutos, seguido por 10 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y a 72°C por 1 minuto, seguidos por una extensión final d 5 minutos a 72°C usando el termociclador.

5.2.6.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para observar los resultados obtenidos de ambas reacciones se realizaron geles de agarosa en el primer caso al 7% empleando un marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb y en el segundo a 2.5% empleando MPM de 50 pb.

5.2.6.5 Expresión

Se sembraron las 5 colonias en tubos con 10 mL de medio LB, se tomó 1 mL de cada una de las 5 muestras en tubos para microcentrífuga y se centrifugaron por 30 segundos a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se congelaron los botones ó pellets a -20°C.

A los 9 mL restantes se les agregó arabinosa en diferentes concentraciones, quedando de la siguiente manera: 0.002%, 0.02%, 0.2%, 2.0%, 20.0% ^(29,30, 31).

Se dejaron incubando los tubos a 37°C por espacio de 4 h; una vez transcurrido el tiempo se tomó 1 mL de cada una de las muestras en tubos para microcentrífuga y

se centrifugó a 13,000 rpm por 30 segundos, se eliminó el sobrenadante y se congeló el botón a -20 °C ⁽³⁶⁾.

5.2.6.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó de acuerdo a protocolos ya descritos, ver **Anexo 6** ^(32, 33, 34, 35).

Para llevar a cabo la preparación de las muestras fue necesario un Amortiguador de Lisis, el cual se preparó con un inhibidor de proteasa, 0.1742 gr de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonil) en 1 L de agua desionizada estéril.

De las muestras tomadas en cada tiempo (24 h, 48 h y 72 h) y de un control (células sin inducción), se tomaron los botones celulares, a los cuales se les agregaron 100µL del Amortiguador de Rompimiento y se resuspendió el botón. Se le adicionó un volumen igual de perlas de vidrio (5 perlas aproximadamente) y se agitó en vortex por 30 segundos, se dejó reposar por 30 segundos en hielo y se repitió por un total de 8 ciclos el vortex y el reposo en hielo. Posteriormente se centrifugó a velocidad máxima por 10 min a 4°C, y se transfirió el sobrenadante a un tubo para microcentrifuga limpio. Se tomaron 50 µL del sobrenadante y se mezclaron con 50 µl del 2X SDS-PAGE amortiguador de carga (4.8 mL de agua, 1.2 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 1 mL de glicerol, 2 mL de SDS 10% y 0.5 mL de azul de bromofenol 0,1% y beta mercaptoetanol βME al 5%). Se llevó a ebullición por 10 minutos y se cargaron 20 µL de la muestra por pozo.

En el corrimiento del gel se aplicó corriente de 80 volts por 40 minutos y 100 por 120 minutos.

El gel se reveló con la tinción de plata.

5.2.7.1 Clonación del producto de PCR en *Pichia pastoris*

La digestión tanto del producto de PCR como del vector se llevó a cabo como muestra la siguiente tabla:

	Tubo 1	Tubo2
Producto de PCR purificado (μL)	20	-
Vector (20 μg / 30 μL)	-	1.5
Amortiguador 4 10X	2.5	2.0
Agua desionizada	1.5	5.5
Enzima KpnI U/ μL	1.0	1.0

Los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 3 h. Para inactivar la enzima, las reacciones se incubaron a 60°C por 10 min.

Posteriormente, se purificó el producto digerido por KpnI para poder ser sometido a digestión con EcoRI, el purificado se precipitó con acetato de sodio 3 M y se lavó con etanol al 70%, se dejó secar a 40 °C y se resuspendió utilizando 10 μL de agua desionizada estéril. Una vez purificado, se continuó la digestión con CPU.

	Tubo 1	Tubo2
Producto de PCR digerido con KpnI (μL)	30	-
Vector pPICZA digerido con KpnI (μL)	-	5.0
Amortiguador 3 10X	3.5	2.0
Agua desionizada	0.5	2.0
Enzima EcoRI U/ μL	1.0	1.0

Los tubos se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C durante otras 3 h. Para inactivar la enzima, las reacciones se incubaron a 60°C por 10 min.

5.2.7.2 Ligación del Producto de PCR con el Vector pPICZA

Tanto el producto de PCR y el vector pPICZA cortados con KpnI y EcoRI se ligaron en la siguiente mezcla de reacción:

Reactivos	Tubo 1	Tubo 2 (Control)
Producto de PCR digerido con KpnI y EcoRI	1 μ L	-
DNA de vector digerido con CPU y Eco RI	2 μ L (100 ng)	2 μ L
Amortiguador de ligación 10X	1 μ L	1 μ L
T4 DNA ligasa	1 μ L	1 μ L
Agua desionizada	5 μ L	6 μ L
Volumen final	10.0 μ L	10.0 μ L

Se corrieron las muestras por electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar diferencias entre el control y el blanco.

5.2.7.3 Transformación de células competentes

Para la transformación de células competentes de *Pichia pastoris* se empleo el kit EasyComp™ (Ver **Anexo 7**).

Se inoculó una caja de YPD con una cepa de *Pichia pastoris*, se dejó incubar a 28-30°C por 2 días ⁽⁴¹⁾.

5.2.7.4 Determinación de fenotipo mutado

En el genoma de *Pichia pastoris* existen dos genes alcohol oxidasa, denominados AOX1 y AOX2. Esto hace que se pueda obtener por recombinación cepas con diferentes fenotipos, las que tienen un crecimiento rápido en metanol Mut+, crecimiento lento Muts y las que no crecen sobre metanol Mut -. Cuando la levadura se crece sobre glucosa, glicerol o etanol, no se detecta la alcohol oxidasa en la célula. Sin embargo, cuando la levadura está creciendo sobre metanol, esta enzima llega a ser el 35% del total de la proteína celular ⁽⁴³⁻⁴⁷⁾.

La cepa GS115 se utilizó como célula huésped por lo que la transformación debe ser Mut⁺. Para confirmar al fenotipo esperado se debió llevar a cabo un escrutinio de Mut⁺ en GS115.

La cepa del hospedero contiene el alelo *his4* y cuando es transformada con los vectores pPICZ o pPICZ α requiere histidina para crecer en medio mínimo. La histidina se adicionó a concentración final de 0.004% para asegurar el crecimiento de las transformantes. Se emplearon cajas de agar con Dextrosa Mínima con Histidina (MDH), cajas de agar con Metanol Mínimo con Histidina (MMH) y mondadientes estériles y plantillas marcadoras.

Usando un palillo de dientes estéril, se tomó una colonia y se marcó una transformante Zeo^R en patrón regular en ambas cajas MMH y MDH, asegurándose de marcar la caja MMH primero. Se usó un nuevo palillo de dientes para cada transformante y se continuó hasta que 10 transformantes se marcaran. Se incubaron las placas a 30°C por 2 días.

Después de 2 días o más a 30°C, se analizaron las placas. Las cepas Mut⁺ crecieron normalmente en ambas placas, mientras que las cepas Mut^s crecieron normalmente en cajas con MDH pero crecieron muy poco o nada en cajas con MMH⁽⁴¹⁾.

5.2.7.5 Análisis de clonas por PCR

Se realizó una reacción de PCR para determinar la orientación del inserto. Para llevar a cabo la reacción se emplearon 5 μ L de Amortiguador de PCR 10x, 1 μ L de la mezcla de dNTP's (10 nM), 2 μ L del producto ligado, 6.4 μ L del oligo Sitio 1, 1 μ L del oligo del kit Primer Fwd, 0.5 μ L de Taq polimerasa, 1.5 μ L de Magnesio y 32.6 μ L de agua desionizada estéril.

Se mezclaron todos los reactivos excepto la Taq polimerasa, ya que ésta fue el último reactivo en adicionar. Posteriormente se incubó conforme a los siguientes

pasos: un primer ciclo a 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y a 72°C por 1 min, seguido por una extensión final de 5 min a 72°C en termociclador. Posteriormente se un corrió gel de agarosa al 0.7% con MPM de 1 Kb.

5.2.7.6 Expresión

A partir de una colonia previamente analizada, se inoculó en 25 mL de medio BMGY (ver **Anexo 8**) en un matraz estéril para 250 mL. Se dejó crecer a 28-30°C en incubadora con movimiento (150 rpm), hasta que el cultivo estuvo a una $OD_{600} = 0.2-0.6$, lo cual ocurre aproximadamente a 16 ó 18 horas. Se cosechan las células por centrifugación a 1500 – 3000 g por 5 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular a $OD_{600} = 1$, en medio BMMY para inducir la expresión, el recipiente se tapó con gasa estéril y se colocó de nuevo en la incubadora para continuar con el crecimiento.

Se adicionó metanol (a una concentración final de 0.5%) cada 24 horas para mantener la inducción.

La expresión se monitoreo a 24 h, 48 h y 72 h tomando alícuotas de 1 mL del cultivo, las células se precipitaron por centrifugación por 2 ó 3 min y el sobrenadante se guardó para análisis posterior ⁽⁴¹⁾.

5.2.7.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

El protocolo que se empleo para llevar a cabo la electroforesis y la tinción es el mismo que se describe para el caso de *Escherichia coli*, ver **Anexo 6**.

6. RESULTADOS

6.1 Construcción del gen sintético

De acuerdo con la primera estrategia mostrada en la Figura 4, las secuencias diseñadas de los oligonucleótido iniciadores al emplear el programa DNAMAN[®] se muestra a continuación:

Secuencia de 5'a 3'

1.- A1 45 pb

ATGGCTCGTAATGATTGTGAACAAGGTCATATTTTAAAAATGTTT

2.- A2 49 pb

TGGCTTAAAAGATGTGTGCGAACATACCAAGTAGAAGGAAACATTTTAA

3.- A3 48 pb

CGCGTACCATGTGAATAGCTGCCCTTGCTGACGTGATGGCTTAAAGAT

4.- A4 48 pb

GGCCAGTTACAATCCTCGACATCATTACATTGTACCGCGTACCATGT

5.- A5 48 pb

CCATGAGGGGGTATAGATTCCATGGTTAAGCATTTCGGCCAGTTACA

6.- B1 48 pb

CGTATCCATTTGTGGGTAACCATGAAATTCCACCTAATAACAGTACGT

7.- B2 48 pb

TAAGAAAATCGTGTGACGCCAGACCATCTTGAACCAACGTACTGTTAT

8.- B3 48 pb

CACCCGCATGTTGATGTGAAGGCGAGTCCAGAACACTAAGAAAATCGT

9.- Unión 1 50 pb

TCATGGTTACCCACAAATGGATACGCCATGAGGGGGTATAGATTCCATGG

10.-Unión 2 50 pb

AGTACCAATGGGTGTTTACCTATGCGGTACTCCCCATATCTAAGGTACC

11.-Sitio de corte 1 32 pb

CCGGAATTCCGGATGGCTCGTAATGATTGTGA

12.-Sitio de corte 2 32 pb

CGGGGTACCCCGCACCCGCATGTTGATGTGAA

Al amplificar los primeros segmentos A1A2 y B1B2 por separado, se obtuvieron amplificaciones del tamaño esperado (82, 84 pb respectivamente) Figura 7.

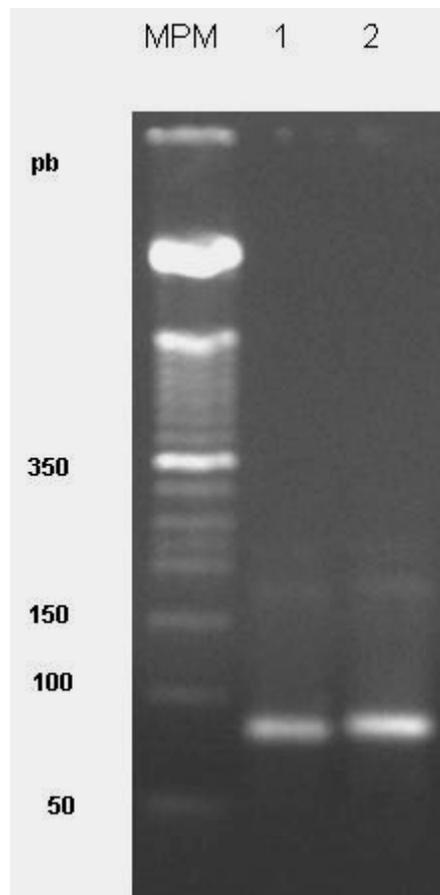


Figura 7. Amplificación de los segmentos A1A2 y B1B2. La amplificación por PCR de A1A2 (carril 1), y B1B2 (carril 2) dió dos en bandas de tamaño esperado según el marcador de peso molecular (carril M).

Pese a varios intentos realizados para amplificar el segmento A1A2A3, esto no fue logrado; por lo contrario en el segmento B1B2B3 hubo amplificación pero esta fue por su parte inespecífica. En la Figura 8 se muestra una fotografía, donde se realizó una PCR probando diferentes temperaturas de alineamiento, a fin de lograr amplificar los segmentos. Como se puede observar, no hubo ninguna amplificación en los carriles correspondiente al segmento A1A2A3, mientras que en el segmento B1B2B3 se aprecia una banda de baja intensidad del tamaño esperado (118 pb) a temperaturas de 55 y 60°C pero no a 50°C. Sin embargo, llama la atención una banda intensa por arriba de los 150 pb a 50°C y que se torno menos intensa a 55 y 60°C, lo que sugiere el alineamiento estable pero inespecífica de las cadenas entre si.

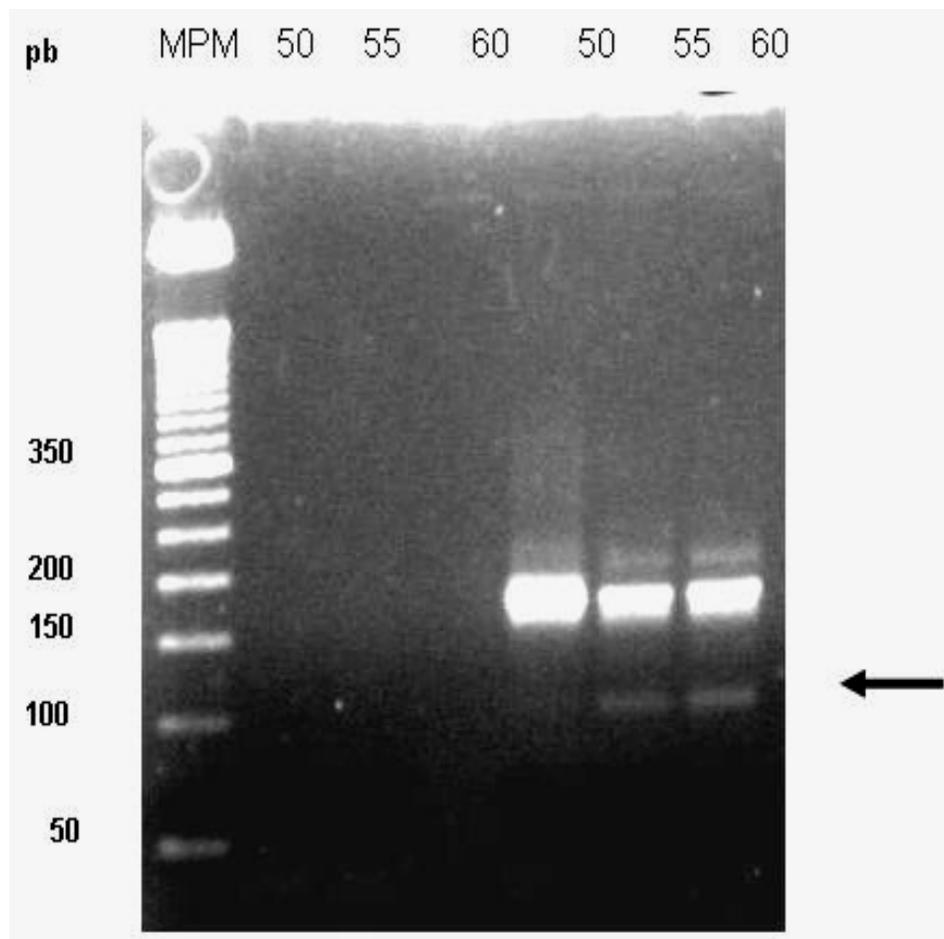


Figura 8. Amplificación por PCR con temperatura de alineamiento en gradiente. Se trato de amplificar los segmentos A1A2A3 y B1B2B3. Como se aprecia, no hay ninguna aplicación en los carriles del segmento A1A2A3. Para B1B2B3 se aprecia una banda intensa en los tres por arriba de los 150 pb, la banda es especialmente intensa a 50°C pero ésta disminuye de intensidad conforme aumenta la temperatura. Sin embargo, también se aprecia una banda mucho menos intensa por arriba de las 100 pb y la cual se piensa que se trata de la esperada (118 pb), a diferencia de la banda mas intensa, ésta aumenta de intensidad conforme la temperatura aumenta.

Debido a que no se logró la amplificación del segmento A1A2A3 el cual es esencial para la construcción del gen, se decidió desarrollar otra estrategia bajo el mismo principio que la primera, pero empleando oligonucleótidos mas grandes según se muestra en la Figura 6, la secuencia de los oligonucleótidos iniciadores diseñados fueron los siguientes:

GB1

5´ATGGCTCGTAATGATTGTGAACAAGGTCATATTTTAAAAATGTTTCCTTCTACTTGGTATGTTG
GACACATCTTTAAGCCATCACGTCAGCAAGG3´

GB2

5´CCATGTTTAAGCATTTCGGCCCAGTTACAATCCTCGACATCATTACATTGTACCGCGTACCATG
TGAATAGCTGCCCTTGCTGACGTGATGGCTT3´

GB3

5´GCCGAAATGCTTAAACATGGCATCTATACGCCGTCCTGGCGTATCCATTTGTGGGTAACCATGA
AATTCCACCTAATAACAGTACGTTGGTTCAA3´

GB4

5´CACCCGCATGTTGATGTGAAGGCGAGTCCAGAACCACCACCATTTTTTGTAAAGAAAATCGTGTGA
CGCCAGACCATCTTGAACCAACGTACTGTTA3´

Sitio 1 para EcoRI (G/AATTC)
CCGGAATTCCGGATGGCTCGTAATGATTGTGA

Sitio 2 para KpnI (GGTAC/C)
CGGGGTACCCCGCACCCGCATGTTGATGTGAA

6.2 Clonación del gen sintético en el plasmido pBAD TOPO

El alineamiento entre ellos con la polaridad correcta genera un fragmento de 321 pares de bases (bp). El fragmento se amplificó por PCR y el mismo fragmento se re-amplificó usando los oligos Sitio1 y Sitio 2 que introdujeron sitios de restricción para EcoRI y KpnI como se muestra en las secuencias, dando un fragmento total de 345 pb.

Como se aprecia en la Figura 9, se obtuvo un amplificado del tamaño esperado de 345 pb. Posteriormente, en un gel preparativo (Figura 9B) se cargó mas muestra con la finalidad de purificar la banda de interés y secuenciar el fragmento. Las secuencias del electroferograma de los resultados de secuenciación (Figura 10) fueron alineados en ambos sentidos con la secuencia teórica (Figura 11), revelando que la secuencia diseñada fue la obtenida.

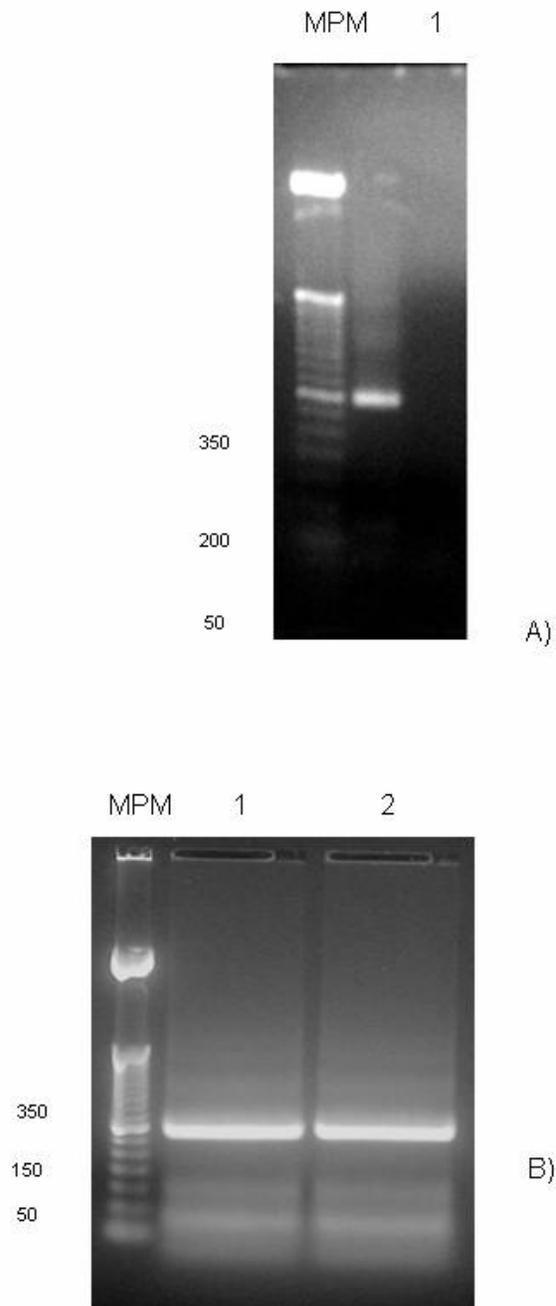


Figura 9. Amplificación del gen sintético por PCR. A) En el carril 1 se muestra la banda del amplificado del gen sintético al emplear los 4 oligonucleótidos GB como molde de la reacción. El tamaño del producto corresponde al esperado (345 pb) comparado con el marcador de peso molecular (carril M). B) Gel preparativo. Se cargaron en el carril 1 y 2 50 μ L respectivamente de reacción de PCR, a fin de aislar y purificar la banda del gel.

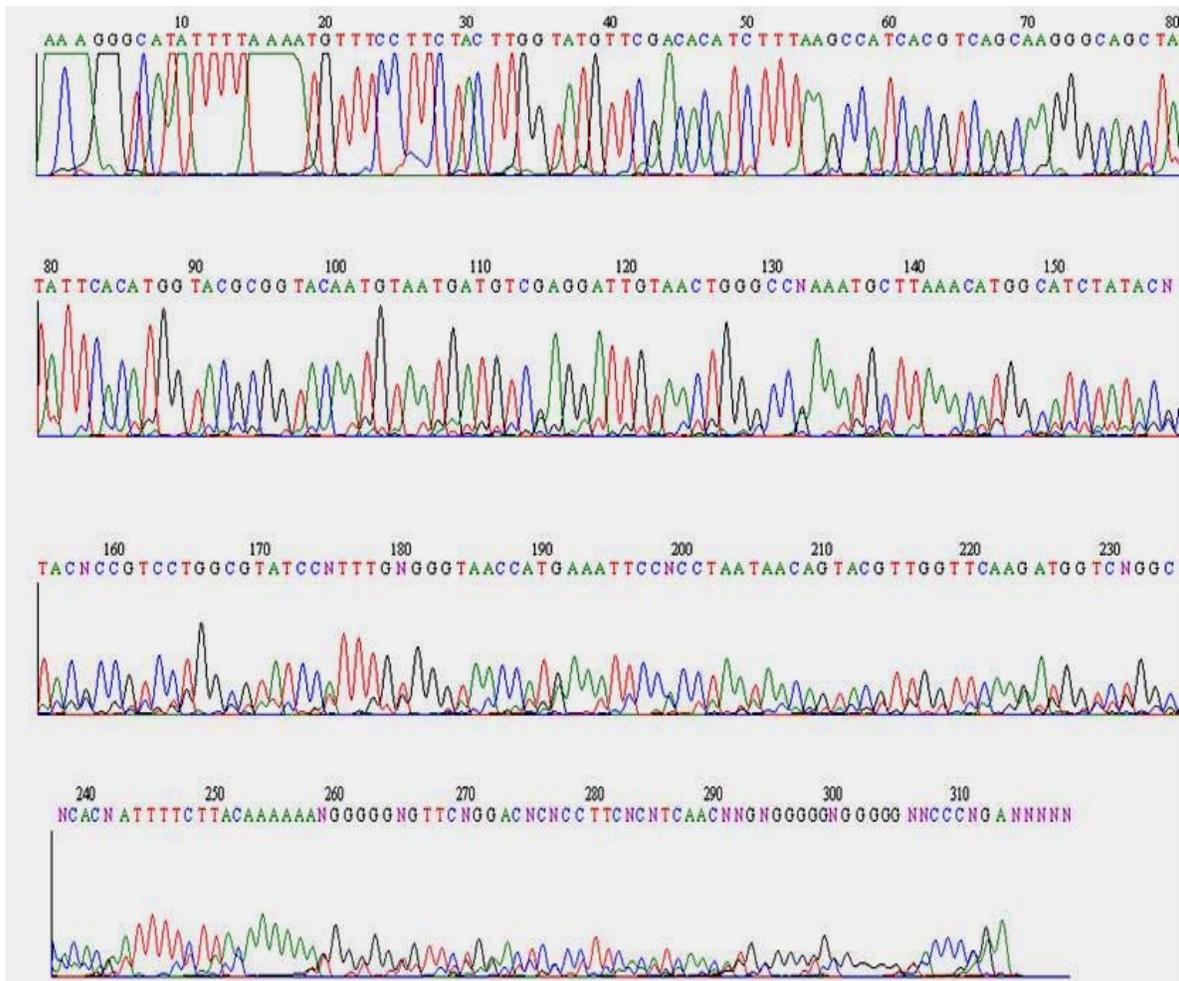


Figura 10. Electroferograma del producto de PCR.

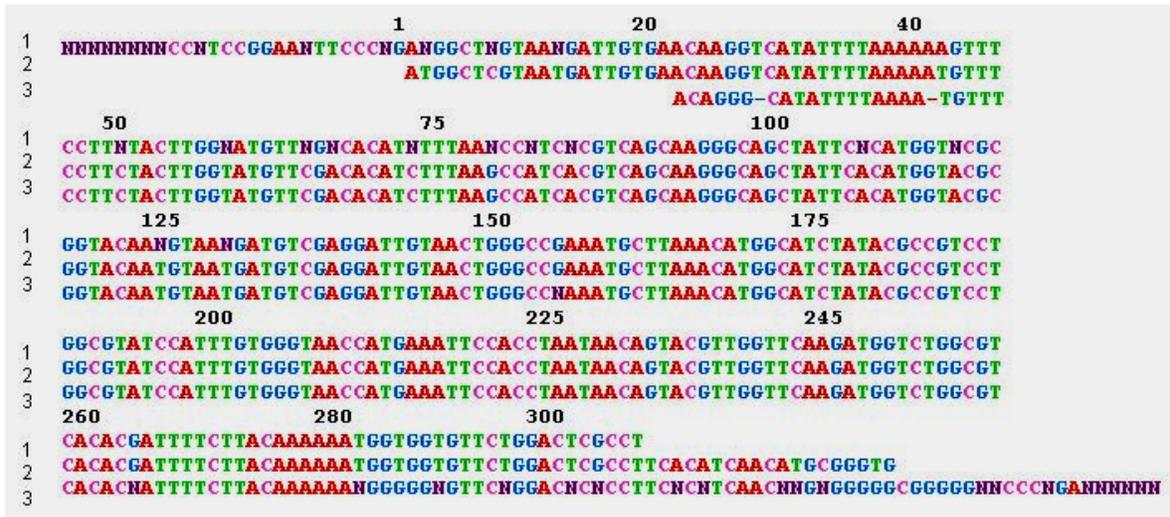


Figura 11. Alineamiento de secuencias. El alineamiento 5' 3' de la secuencia teórica con las secuencias sentido y contrasentido producto de las secuenciación automatizada se realizaron con el programa Clustax. La secuenciación en ambos sentidos permitió confirmar que el gen contiene la secuencia diseñada especialmente en aquellos donde se tuvo una indeterminación. 1 Secuenciación sentido; 2 Secuencia codificante; 3 Secuenciación antisentido.

La Tabla 3 muestra la secuencia nucleotídica codificante así como la secuencia de aminoácidos.

Tabla 3. Secuencia nucleotídica.

1	ATGGCTCGTAATGATTGTGAACAAGGTCATATTTTAAAAATGTTTCTTCTACTTGGTAT
1	M A R N D C E Q G H I L K M F P S T W Y
61	GTTCGACACATCTTTAAGCCATCACGTCAGCAAGGGCAGCTATTCACATGGTACGCGGTA
21	V R H I F K P S R Q Q G Q L F T W Y A V
121	CAATGTAATGATGTCGAGGATTGTAAGTGGGCCGAAATGCTTAAACATGGCATCTATACG
41	Q C N D V E D C N W A E M L K H G I Y T
181	CCGTCCTGGCGTATCCATTTGTGGGTAACCATGAAATTCACCTAATAACAGTACGTTGG
61	P S W R I H L W V T M K F H L I T V R W
241	TTCAAGATGGTCTGGCGTCACACGATTTTCTTACAAAAAATGGTGGTGTCTGGACTCGC
81	F K M V W R H T I F L Q K M V V F W T R
301	CTTACATCAACATGCGGGTG
101	L H I N M R V

Una vez efectuado el protocolo de clonación, se realizó la extracción plasmídica de 5 clonas seleccionadas al azar, posteriormente para demostrar la presencia del inserto, se realizó una reacción de PCR usando como DNA molde la extracción y los iniciadores Sitio 1 y sitio 2, que son los que se utilizaron para amplificar el gen completo. En la Figura 12 se muestra que 2 de las 5 clonas originalmente seleccionadas tuvieron el inserto.

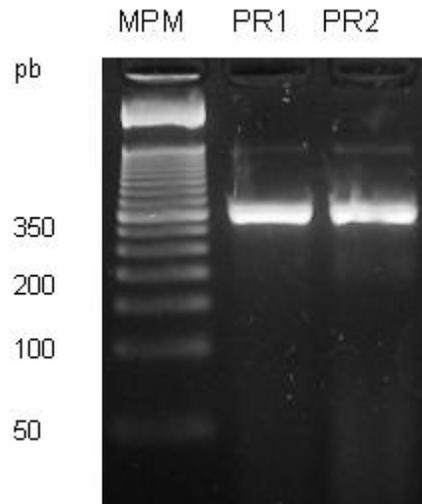


Figura 12. Determinación de la presencia del inserto de dos clonas obtenidas después de la transformación. En la foto se aprecia la amplificación en dos clonas al emplear los oligonucleotidos iniciadores Sitio 1 y Sitio2, con ello se demuestra que las clonas contienen el inserto.

Una vez comprobada la presencia del inserto, se procedió a hacer la inducción con L-arabinosa. Para ello, la inducción se realizó a nivel piloto y se probaron diferentes concentraciones de L-arabinosa con la finalidad de optimizar la expresión y encontrar la concentración adecuada de inductor. Las células fueron inducidas con L-arabinosa cuando éstas tuvieron ≈ 0.5 unidades de densidad óptica (fase log), las células se dejaron crecer por 4 h, posteriormente las células se recuperaron por centrifugación y el paquete se analizó por SDS-PAGE. La fotografía de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 13. Como se puede apreciar en ella, el patrón electroforético fue muy similar al compararse con células no transformadas que fueron utilizadas como testigo. No se aprecia ninguna banda de alrededor de 18 kDa diferente en los carriles de inducción. Al pensar que

el nivel de expresión fue bajo otro gel se tiñó con nitrato de plata, cuya tinción es 100 mas sensible que la que detecta el azul de Coomassie. Sin embargo los resultados fueron esencialmente los mismos (Figura 14).

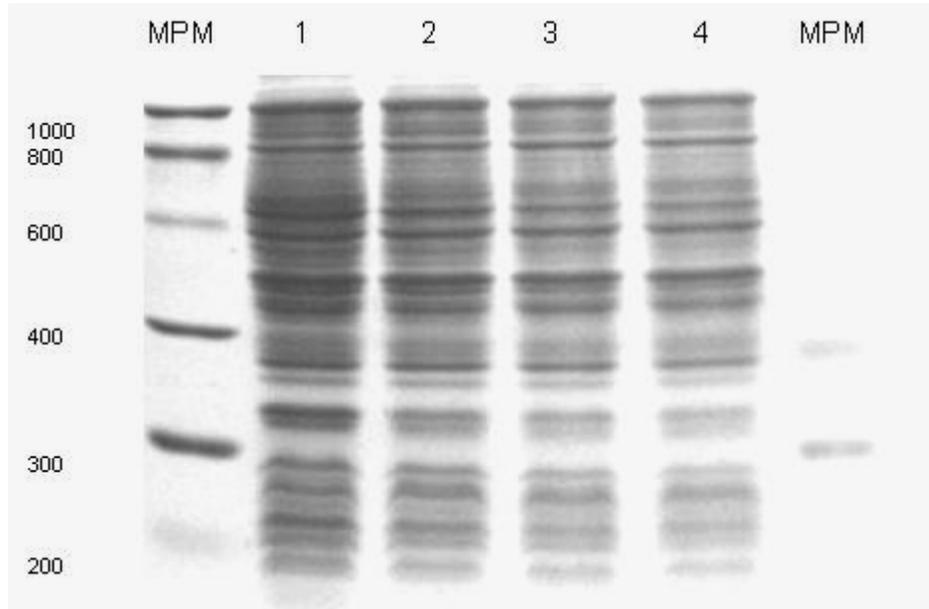


Figura 13. Análisis de la expresión de la proteína sintética por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. El corrimiento de las muestras se hizo en gel al 15% en condiciones desnaturalizantes. El gel se tiñó con azul de Coomassie. En el primer y último carril se encuentran los marcadores de peso molecular conocidos. El carril 1 corresponde a células sin transformar, mientras que en los carriles 2, 3, 4 las células fueron inducidas con concentraciones crecientes de L-arabinosa 0.02%, 0.2% y 2.0% respectivamente.

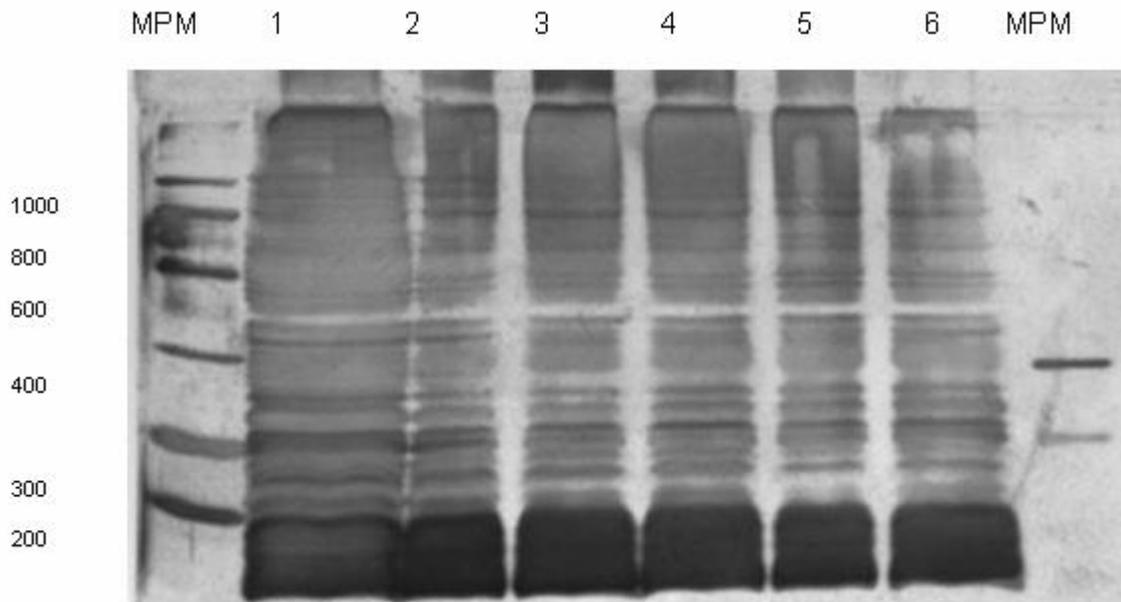


Figura 14. Análisis de la expresión de la proteína sintética por SDS-PAGE tenido con Nitrato de plata. Las condiciones del gel fueron básicamente iguales que las empleadas en el la figura 12, excepto que en este gel se incluyó como otro control, células transformadas pero sin inducir (carril 2); y una muestra inducida a concentración baja de arabinosa (0.002%, carril 0.002%). Al igual que en la figura 12, no se puede observar una expresión diferencial que compruebe que la proteína fue expresada.

6.3 Clonación del gen sintético en el plásmido pPICZA

Para la clonación del fragmento se digirió tanto el vector de expresión pPICZA como el producto de PCR con EcoRI y KpnI. En la Figura 15 y 16 se muestran fotografías de los cortes. En ambos casos se comprueba el corte por la diferencia de movilidad electroforética de los fragmentos.

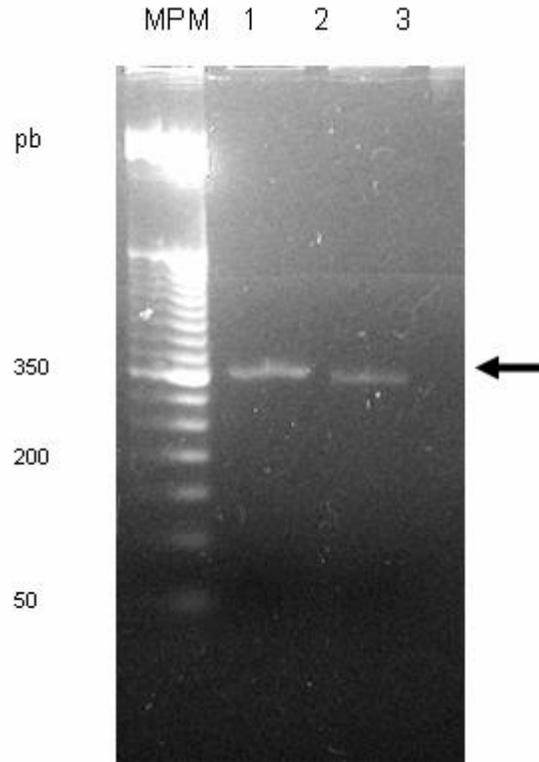


Figura 15. Corte del producto de PCR con EcoRI y KpnI. Carril MPM Marcador de Peso Molecular. Carril 1. Producto de PCR sin cortar, carril 2. Producto de PCR cortado con KpnI y EcoRI. Nótese que la banda del producto de PCR cortado por las enzimas de restricción esta ligero pero apreciablemente debajo del no cortado.

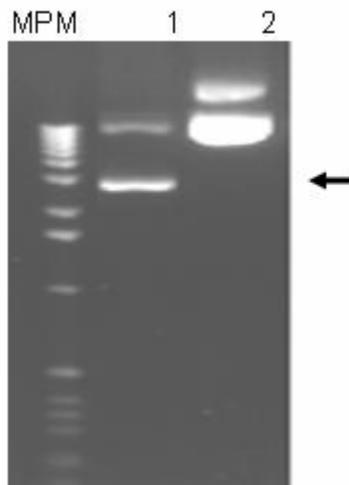


Figura 16. Corte del plásmido pPICZA con EcoRI y KpnI. Carril M Marcador de peso molecular. Carril 1 plásmido cortado con KpnI y Eco RI, carril 2 plásmido sin cortar. En el corte del plásmido se aprecia una banda intensa del tamaño esperado, aunque la digestión fue incompleta debido a que se observa una banda menos intensa en el mismo nivel que la banda sin cortar.

Los productos de digestión fueron purificados por separado y posteriormente ligados con ligasa T4. Células de *Pichia pastoris* GS115 fueron crecidas hasta alcanzar la fase semi-log y fueron transformadas con el producto de ligación. Para comprobar la presencia del inserto, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando como DNA molde el producto de la ligación y usando la combinación de iniciadores. En la reacción, se empleó el iniciador antisentido del kit y el iniciador Sitio1. El producto de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. El resultado fue el esperado ya que de acuerdo con el mapa genético del plásmido considerando el lugar de inserción del producto de PCR el tamaño de la amplificación fue la esperada (502 pb) como se aprecia en la Figura 17.

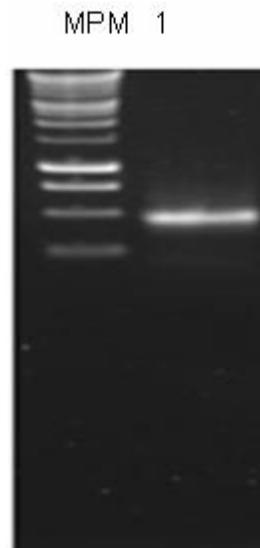


Figura 17. Determinación de la presencia del inserto en el plásmido pPICZA. El tamaño del producto de amplificación (502 pb) corresponde al esperado (carril 2).

6.4 Determinación del fenotipo Mut

Una vez confirmada la presencia del inserto en el vector, se procedió a hacer la transformación de *P. pastoris* cepa GS115 (His^- , Mut^+), para lo cual, se creció en medio YPD con zeocina de 48 a 72 hs a 30°C . Una vez formadas las colonias se seleccionaron 10 y se crecieron por replica en medios sólidos MDH y MMH para la diferenciación en fenotipo. Las colonias que crecieron al segundo día (siendo mejor el crecimiento en el medio MDH que en el medio MMH) fueron las 8, 9 y 10

como se muestra en la Figura 18. El crecimiento en ambos medios confirma que las clonas poseen el fenotipo Mut⁺ lo que significa que las clonas tienen la capacidad de metabolizar metanol como fuente de carbono debido a la presencia del plásmido que contiene a su vez el gen AOX1.

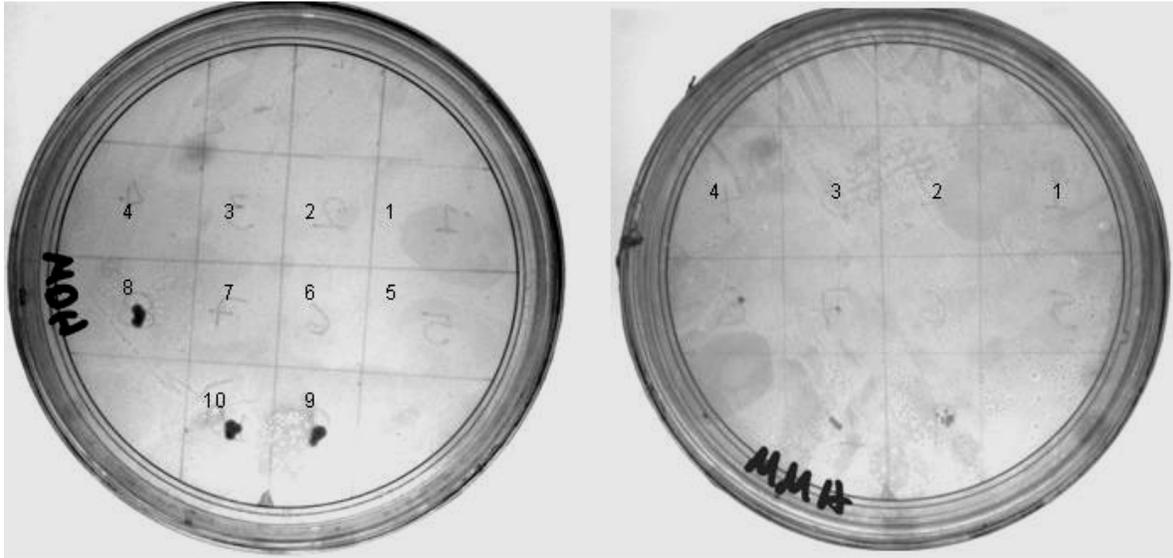


Figura 18. Crecimiento en medios sólidos MDH y MMH. En esta figura se muestra el análisis de fenotipo Mut⁺ en 10 clonas seleccionadas que fueron sembradas tanto en medio MDH y medio MMH. En la caja a) (medio MDH) se muestra un crecimiento evidente de las clonas 8, 9 y 10, mientras que en la caja b) se observa poco crecimiento con medio MMH. Cabe hacer notar que ninguna de las clonas de la 1 a la 7 crecieron en ambos medios.

Una vez confirmado el fenotipo, la clona 8 se creció e indujo con metanol para expresar la proteína sintética y se llevó a cabo una SDS-PAGE sin resultados contundentes. Sin embargo no fue posible demostrar la expresión de la proteína.

7. DISCUSIÓN

Desde que en 1978 se demostró que mediante la modificación genética de *Escherichia coli* se puede obtener grandes cantidades de insulina humana, se han probado más de cincuenta fármacos o vacunas de origen recombinante y hay en fase avanzada de estudio o pendiente de su aprobación, más de un centenar de productos ⁽⁴²⁾.

En el campo de la nutrición, este tipo de tecnologías son ampliamente utilizadas y aplicables como en el caso de la producción de vitaminas a gran escala partir de microorganismos modificados. En presente trabajo, tuvo como propósito crear mediante el empleo de técnicas de biología molecular una proteína sintética con todos los 20 aminoácidos y especialmente rica en los esenciales.

En la construcción, se tuvo especial cuidado en el diseño de los oligonucleótidos iniciadores, para que una vez construido el gen, éste no tuviera secuencias terminadoras de la transcripción, estuviera en marco de lectura al insertarse en los vectores de expresión, tuviera codón de inicio y sitios de restricción para su clonación.

Para ello, primeramente se incursionó con la primera estrategia mostrada en la figura 5, esta estrategia se enfocó en construir al gen mediante la creación de dos fragmentos independientes A' y B', donde posteriormente sería unido por otra reacción de PCR al emplear los oligonucleótidos iniciadores de unión. Según se muestra en las figuras 7 y 8, se logró amplificar el segmento B' compuesto por B1B2B3, mientras que pese a varias condiciones modificadas y probadas, sólo se logró obtener amplificado A1A2 del segmento A'. Por ejemplo, en la figura 8 se muestra el resultado al probar diferentes temperaturas de alineamiento 55, 60 y 65°C en la reacción de PCR, ninguna dio un producto de PCR, el cual se esperaba fuese de 118 pb. Nosotros consideramos la posibilidad que en esta reacción en particular, la mezcla de oligonucleótidos iniciadores pudieran resultar en la formación de estructuras secundarias relativamente estables interfiriendo con la reacción de PCR o que la múltiple interacción de los iniciadores no se formara el

molde correcto para la amplificación o quizás que la cantidad del producto de A1A2 (DNA molde) no fue la suficiente.

Debido a que esta estrategia no dio los resultados esperados entonces, se optó por seguir la segunda estrategia descrita en la Figura 6, en este caso se pensó en diseñar oligonucleótidos iniciadores de mayor tamaño con la finalidad de emplear un número grande de oligonucleótidos para evitar posibles interacciones entre ellos y por consiguiente reducir en sólo dos reacciones de PCR la síntesis del gen sintético. Al intentar esta estrategia, los resultados fueron diferentes, tal y como se muestra en la figura 9, se obtiene un amplificado de aproximadamente 345 pb, tamaño esperado según con el diseño teórico del gen. Sin embargo, para confirmar que el gen tenía la secuencia correcta, el fragmento de PCR se secuenció tanto en un sentido como el otro, para poder establecer claramente la secuencia, sobretodo en aquellos casos en donde el resultado hubiese sido incierto o donde hubiese sido marcado con una N, que significa cualquiera de las cuatro bases del DNA (A o C o G o T) tal y como ocurrió en pocos casos en la secuencia teórica. Al hacer el alineamiento por Clustax (Figura 11), se determinó en forma inequívoca que el gen sintético tuvo la secuencia nucleotídica con la que fue diseñado. Una vez creado el gen sintético, el siguiente paso consistió en clonar y expresar en plásmidos para *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.

Para el caso de *Escherichia coli*, la clonación del gen sintético se realizó en el plásmido pBAD TOPO[®]. Tal y como se detalla en la metodología, la clonación del fragmento ocurre a través de la inserción directa de este con el vector por la acción de la Topoisomerasa I, lo que evita el uso de endonucleasas de restricción y de ligasa para unir a los fragmentos. El producto de reacción de clonación se usó para transformar células químicamente competentes de *Escherichia coli* BL21. Después de dejar incubar las células en medio LB con ampicilina, se analizaron al azar colonias, para corroborar la presencia del inserto por PCR. La figura 12 muestra que de 5 clonas analizadas, 2 mostraron la presencia del inserto. Una vez comprobada la clonación en el plásmido pBAD TOPO[®] se realizó la inducción de la cepa *E.coli* BL21/pBADTOPO[®] proteína sintética en fase log con

concentraciones crecientes de L-arabinosa (0.02%, 0.2%, 2.0%). Al analizar la expresión de la proteína por PAGE-SDS (Figura 13), no se observó una banda diferencial e intensa que pudiera sugerir la proteína sintética. Pensando sobre que la proteína probablemente se expresaba en cantidades pequeñas indetectables por azul de Coomassie, se corrió otro SDS-PAGE pero esta vez teñido con tinción de plata (Figura 14); los resultados fueron esencialmente los mismos. Al respecto, se debe considerar que la visualización de la proteína expresada puede depender de factores tales como: el nivel de expresión, la solubilidad, el peso molecular, toxicidad celular, o bien que la proteína podría estar enmascarada por una proteína bacteriana abundante del mismo tamaño o aproximado. Estos factores incluso, pueden ser motivo de estudio para trabajos futuros sobre esta proteína donde el problema puede deberse a un factor o la combinación de varios. Quizá, el problema puede solucionarse simplemente con un ensayo tipo Western blot u otro ensayo más sensible para detectar a la proteína. Cabe señalar, que para el corrimiento de las muestras, el paquete celular se mezcló con amortiguador de carga de la muestra y se hirvió por 5 minutos. Probablemente este tratamiento no fue lo suficientemente necesario para romper por completo a las células, por lo que la proteína no fue liberada al medio. Esto sugiere, que debe emplearse un mejor método para romper células como por ejemplo tratar a las células mediante ultrasonicación. Sin embargo, debido a que la proteína es única, no se descarta la posibilidad a que ésta sea tóxica a la célula, por lo que será necesario determinar la viabilidad celular durante o después de la expresión. Por último, aunque se suelen utilizar inhibidores de proteasas como el fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) también podría haber la posibilidad que la bacteria degrade a la proteína por acción de proteasas propias, por lo que en este caso podría emplearse además una cepa proteasas (-).

Debido a que no se obtuvieron buenos resultados en la expresión con *E. coli*, se decidió intentar transformar a *Pichia pastoris*. Para ello, cabe recordar que en el gen sintético se incluyeron sitios de restricción a través de los iniciadores Sitio 1 y 2, los cuales también son sitios de corte ubicados en el sitio de policlونación del plásmido (Figura 4B). De tal manera que tanto el plásmido como el producto de

PCR fueron digeridos por separado con ambas enzimas y posteriormente los productos de ambas digestiones fueron ligados para así tener el gen clonado dentro del vector de expresión. Las figuras 15 y 16 muestran las fotografías de las digestiones tanto del plásmido como del producto de PCR con EcoRI y KpnI. Para el producto de PCR las movibilidades electroforéticas de los cortes son apenas apreciables debido a que EcoRI (G/AATTC) corta el producto de PCR a 4 bases del extremo 5' mientras que KpnI (GGTAC/C) corta a 8 bases del extremo 3', liberando un total de 12 bases por lo que en lugar de tener un producto de 345 pb se tiene uno de 333, el cual a su vez, en la electroforesis en gel de agarosa se mueve ligeramente que el producto sin cortar, tal y como se aprecia en la figura 15. Para el caso del plásmido, el tamaño del producto después de la digestión por ambas enzimas fue de 3567 pb aproximadamente debido a que 32 bases son liberadas según lo muestra el mapa genético de la figura 4B.

Una vez digerido el plásmido así como el producto de PCR, ambos fueron ligados, como se aprecia en la Figura 17, el producto de ligación se usó para transformar a las células químicamente competentes de la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. Después de inubar por 3 a 10 días a 30° C en medio YPD en presencia de zeocina. Se seleccionaron 10 clonas resistentes para confirmar el fenotipo Mut, esto es, se crecieron por replica en medios sólidos MDH y MMH para la diferenciación en fenotipo. Para esto se consideró las siguientes bases fenotípicas; la cepa GS115 es una cepa que debe ser Mut⁺ esto es que utiliza metanol debido a actividad de oxidasa codificada por el gene AOX1, cepas que sean Mut^s significa que perdieron la actividad de alcohol oxidasa y por lo tanto tienen baja utilización de metanol. Además la cepa GS115 es His⁽⁻⁾, esto es que es un marcador auxotrófico para histidina, por lo que se necesita adicionar histidina en el medio de cultivo. Por otra parte, Los medios MDH y MMH son medios mínimos en donde básicamente la diferencia entre ellos radica en que el MDH contiene glucosa y el MMH contienen metanol como fuente de carbono, por lo que células que crezcan en ambos medios significa que serán Mut⁺ y células que no lo hagan serán Mut^s esto hace que ambos medios sean útiles para determinar el

fenotipo Mut⁺. Las fotografías de la replica que se muestran en la figura 18, demuestran en forma clara que de las 10 colonias seleccionadas, las 8, 9 y 10 crecieron en ambos medios, mientras las clonas 1 al 7 no crecieron, esto probablemente debido a posibles recombinaciones que ocurrieron en el proceso de transformación que tuvieron como efecto la disrupción de genes esenciales que impidieron el crecimiento en los medios de composición mínima.

Una vez confirmado el fenotipo, se procedió a efectuar la expresión de la proteína, para este sistema, el inductor fue el metanol el cual induce la expresión del promotor P_{AOX1} (Figura 4A). La expresión en este caso, fue un tanto confusa pues no se aprecia claramente una banda intensa tras inducir con metanol. En base, a los resultados mostrados se propone para futuros trabajos la expresión de la proteína a gran escala y medir el rendimiento, su análisis con enzimas proteolíticas para estudiar la digestibilidad y toxicidad, debido a que de ser susceptible a las proteasas y de no poseer efectos tóxicos, podrá ser un aditivo alimentario.

8.CONCLUSIONES

- Se construyó un gen sintético por técnicas de biología molecular.
- Se clonó el gen sintético en los vectores de expresión pBAD TOPO[®] y pPICZA.
- La expresión fue prácticamente nula en ambas cepas al analizarse por PAGE.
- No se logró demostrar la expresión del gen sintético por análisis en SDS-PAGE.

9. BIBLIOGRAFÍA

1.- Allen, L. H., Bentley, M. E., Donovan, S. M. Ney, D. M., Strover, P. J. (2002) Security the Future of Nutritional sciences Through Integrative Graduate Education. *J. Nutr.* **132**:770-784.

2.- United Nations Administrative Committee on Coordination/Sub-Committee on Nutrition (ACC/SCN) in collaboration with International Food Policy Research Institute. (2000). Fourth Report on the World Nutrition Situation: Nutrition throughout the Life Cycle. UN ACC/SCN, Geneva, Switzerland.

3.- Welch, R. M., Graham, R. D. (2003). Genetics of Plant Mineral Nutrition: Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany.* **55** (396): 353-364.

4.- United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO)/International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders (ICCIDD). (1999). Progress Towards the Elimination of Iodine Deficiency Disorders (IDD). WHO/NHD/99.4, WHO, Geneva.

5.- Delgado, H. (2001) Inseguridad alimentaria y nutricional en Centroamérica: factores coyunturales y exclusión social. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* **10**(6): 419-421.

6.- La Nutrición Medida Preventiva o Curativa para la Salud.

<http://www.uaem.mx/noticias/notas/nutricion2.html>

Fecha de consulta: julio 2004.

7.- Martínez, I., Villezca, P. (2003). La alimentación en México: un estudio a partir de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares. Notas. *Revista de Información y análisis.* **21**: 26-37.

8.- Krajcovicova-Kudlackova, M., Blazicek, P., Kopcova, J., Bederova, A. y Babinska, K. (2000). Homocystein levels in vegetarians versus omnivores. *Ann. Nutr. Metab.* **44**:135-8.

9.- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
http://www.fao.org/es/ESN/nutrition/requirements_background_es.stm
Fecha de consulta: 14 de agosto 2005.

10.- Comisión Económica para América Latina y el Caribe determinación de las Necesidades de Energía Y Proteínas para la Población de diez Países Latinoamericanos. (1991). Este documento corresponde al Anexo 2 del libro "Magnitud de la Pobreza en América Latina en los Años Ochenta", CEPAL, LC/G.1653-P.

11.- Trumbo P., Schlicker S., Yates A. A., Poos M.(2002). Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *Journal of the American Dietetic Association.* **102** (11):1620-1630.

12.- Martínez, J. A. y Macarulla, M. T. (1991). Nutrición y tecnología de alimentos. Editado por la Universidad del País Vasco. San Sebastián, España.

13.- Koretz, R.L. (2002) Immunonutrition: Fact fantasy and future. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **4**:332-7.

14.- Cornelia C. Metges and Barth Ch.(2000) Metabolic Consequences of a High Dietary-Protein Intake in Adulthood: Assessment of the Available Evidence. *Journal of Nutrition.* **130**:886-889.

15.- Brewer, M. S., Kendall, P. (1995). Biotechnology and the future of food. *Journal of the American Dietetic Association*. **95**: 1429-1432.

16.- Raina Anjana, and Datta Asis (1992). Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Plant Biology*. **89**: 11774-11778.

17.- Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. (2005). Informe FAO.

18.- Satz, M., Satz, A. (1993). La Reaccion en Cadena de la Polimerasa: El método y sus aplicaciones. *Revista de Divulgación Científica y tecnológica de la Asociación de Ciencia Hoy*. **4**: 23.

19.- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich H.A. (1998). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science*. **239**: 487-491.

20.- Principle of the PCR: Andy Vierstraete (1999).

<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Fecha de revision agosto 2006.

21.- Watson J. D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M., (1992). Recombinante DNA, second edition. Scientific American Books, New York.

22.- Dillon P.J. and Rosen, C.A. (1993) In White, B.A. (ed.), PCR Protocols: Current Methods and Applications. Humana Press, Totowa, NJ, Vol. 15.

23.- Sambrook J., Fritsch, E. F. and Maniatis T. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory manual. Cold Spring harbor. 3rd ed. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA.

- 24.- Mahan, L. K., Escott-Stump, S. (2000) Nutrición y Dietoterapia de Krause. 9ª edición, Mc Graw Hill Interamericana, México, D. F. Pp 63-76.
- 25.- Balbsa, P. (2004). Organismos genéticamente modificados y bioética. *Cuadernos de Nutrición*. **27** (3): 130-135.
- 26.- Hancock R. D., Roberto, V. (2002) Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends Biotechnol.* **20**: 299-305.
- 27.- Andersen, D. C., Krummen, L. (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 117-123.
- 28.- Figueroa-Martínez F. J., Cortes-Hernández P., García J.J., González-Halphen D. (2005). Hacia la expresión alotópica del gen *atp6* del alga clorofícea *Chlamydomonas reinhardtii* en células humanas con mutaciones en el gen *atp6* mitocondrial. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.*
- 29.- Torrades, S.(2005). Dopaje génico. *OFFARM*. **24**:03.
- 30.- AT Smith, N Santama, S Dacey, M Edwards, RC Bray, RN Thorneley and JF Burke (1990). Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme. *J. Biol. Chem.* **265** (22): 13335-13343.
- 31.- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn B., Whitlam, G., (1992). Synthesis of a Functional Anti-Phytochrome Single-Chain F_v Protein in Transgenic Tobacco. *Bio/Technology*. **10**: 790 – 794.
- 32.- Deutscher (1990). Guide to Protein Purification.
- 33.- Bollag and Edelstein (1991). Protein Methods.

- 34.- Schleif, R. S. (1992). DNA Looping. *Ann. Rev. Biochem.* **61**:199-223.
- 35.- Benov, L. and Al-Ibraheem, J. (2002). Disrupting *Escherichia coli*: A comparison of Methods, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **35** (4): 428-431.
- 36.- Manual de Invitrogen: pBad- TOPO ® TA Expression kit: Five Minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products for regulated expression in *E. coli*. Version N. 13, April 2004, Carlsbad, California.
- 37.- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; **227**: 680-685
- 38.- Ogden, S., Haggerty, D., Stoner, C. M., Kolodrubetz, D., and Schleif, R. (1980). The *Escherichia coli* L-Arabinose Operon: Binding Sites of the Regulatory Proteins and a Mechanism of Positive and Negative Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 3346-3350.
- 39.- Zhou, C. And Yang and Jong. (1990). Miniprep in ten minutes. *Biotechniques*. **8**: 172-172.
- 40.- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- 41.- Manual de Invitrogen: Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ in *Pichia pastoris*.
- 42.- Kornblihtt, A. R. (2000). Biología Molecular y Medicina a fines del Siglo XX. *Medicina*. **60**: 9-16.
- 43.- Boze, H., Celine, L., Patrick, Ch., Fabien, R., Christine, V., Yves C. and Guy M., (2001). High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, **36**:907-913.

44.- Chauhan, A.K., Arora, D. and Khanna, N., (1999). A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Proc. Biochem.* **34**:139-145.

45.- Chiruvolu, V., Cregg, J.M., Meagher, M.M., (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Tehcnol.*, **21**:277-283.

46.- Clare, J.J., Rayment F.B., Ballnatine, S.P., Sreekrishna, K. and Romanos, M.A., (1991). High-level expression of tetanus toxin fragment C en *Pichia pastoris* systems containing multiplety tandem integrations of the gene. *Bio/Technology*, **9**: 445- 460.

47.- Cregg, J. M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. and Madden K.R., (1985). *Pichia Pastoris* as a host system for transformations. *Moll. And Cell. Biol.*, **5(12)**: 3376-3385.

ANEXOS

1. Requerimiento diario de aminoácidos para seres humanos.

Amino Ácido	mg/g "proteína" (a)	g/g N	
Histidina	18	114	
Isoleucina	25	156	(a)Proteína=nitrogenox6.25.
Leucina	55	341	
Lisina	51	320	
Metionina+cisterna	25	156	
Fenilalanina+tirosina	47	291	
Treonina	27	170	
Triptofano	7	43	
Valina	32	199	

Fuente: Trumbo P., Schlicker S., Yates A. A., Poos M.(2002). Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *Journal of the American Dietetic Association*. **102** (11):1620-1630.

2. Medios de cultivo

El cultivo bacteriano se realizó en medio Luria-Bertani (LB), cuya composición está dada por 10 g de bactotriptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl disueltos en 1 L de agua destilada. La mezcla de componentes se esterilizó a 121 °C 15 lb/pg² por 15 minutos.

El crecimiento de la levadura se realiza en medio YPD (Yeast Peptone Dextrose), cuya composición fue 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 mL de agua, la mezcla se esteriliza en autoclave a 121 °C 15 lb/pg² por 15 minutos y posteriormente se le adicionaron 100 mL de 10x D (Dextrosa).

3. Electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa se prepara de acuerdo con la concentración necesaria. Entre mayor sea la concentración de agarosa, menor será el tamaño de los poros a través de los cuales migrará el DNA.

Para una concentración de 2.5% de agarosa se necesitan 0.625 mg de agarosa y 30 mL de TBE 1x (Tris Boratos-EDTA). Se mezclan los componentes por medio de calor y agitación. Una vez que la mezcla es homogénea, se deja enfriar un poco para adicionar 1 µl de bromuro de etidio (que a la exposición con luz UV fluoresce).

Antes de enfriarse por completo y solidifique la mezcla se coloca en un recipiente formado por una placa transparente de plástico que sirve como base y dos gomas negras que forman las paredes del receptáculo; se le coloca un peine con la cantidad de pozos necesarios. Una vez armado el recipiente y colocado el peine deseado, se vacía la mezcla y se deja solidificar. En cuanto se solidifica, se retiran las gomas negras y el peine, siempre de preferencia ya dentro de la cámara con el líquido de corrimiento, para evita que al extraer el peine se rompan los pozos.

La cámara en la cual se lleva a cabo la reacción de electroforesis debe contener líquido de corrimiento, el cual puede estar compuesto por TAE ó TBE 1X. La reacción se corre a un voltaje de 75 a 100 volts.

4. Células competentes de *Escherichia coli*

Para hacer células competentes se prepara cloruro de calcio de la siguiente manera: se pesa 2.9404 g de CaCl₂ 0.1 M y se colocan en un matraz para aforar a

200 mL; se toma una asada de la cepa BL21 de *Escherichia coli* y se siembra en una placa con agar LB y se deja incubar por toda una noche.

Del cultivo fresco se pica una colonia e inocular en 3 mL de medio líquido LB y se deja incubar a 37°C con agitación por toda una noche. Posteriormente se siembran 250 mL de medio LB con 200 mL del “overnight” y se coloca el cultivo en agitación (250 rpm) a 37°C hasta que haya crecimiento de 0.4 a una densidad óptica de 600 nm ya que ésta es aproximadamente la fase logarítmica del crecimiento bacteriano.

Posteriormente se vierte en cultivo en recipientes para centrifuga de 250 mL y se centrifuga a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se decanta. El pellet formado se resuspende suavemente con cloruro de calcio 0.1M hasta aproximadamente la mitad del recipiente hasta que la mezcla es lo más homogénea posible.

Se centrifuga a 4500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet nuevamente con CaCl₂ 0.1 M de la misma manera. Una vez homogénea la mezcla se incuba en hielo por espacio de 2 horas agitando con suavidad ocasionalmente. Transcurrido el tiempo se transfiere la muestra a tubos falcon de 50 mL estériles y se centrifuga a 4500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se resuspende suavemente con CaCl₂ 0.1 M y glicerol al 15% frío hasta homogenizar completamente. La muestra se reparte en alícuotas de 200 µL y se congelan inmediatamente a -70°C ⁽³⁶⁾.

Las células congeladas se descongelan en hielo y se colocaron 100 µL en tubos para microcentrifuga y se le agregan 2 µL de las células TOPO, se dejan incubando en hielo por 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se colocan en baño de agua a 42°C por 1 minuto. Inmediatamente después se colocan en hielo por 2 minutos y se le agregan 150 µL de medio SOC. Se deja incubar por 2 horas en agitación suave a 37°C. Después se siembra en placas con medio LB y ampicilina (100µg/mL) y se deja incubar a 37°C toda la noche.

De las clonas que aparecen en las placas se pican 5 colonias y se crecen por 4 horas en medio 30 mL de medio LB líquido con ampicilina ^(36,37 38).

5. Extracción de plásmido

Se coloca 1 mL del cultivo y se centrifuga por 1 minuto a 10 000 rpm. Se decanta el sobrenadante y se procede a un lavado de células, resuspendiendo en aproximadamente $\frac{1}{4}$ del volumen inicial de cultivo con tris 50mM pH 8.0 EDTA 10 mM y se centrifuga nuevamente bajo las mismas condiciones. Se decanta el sobrenadante y se resuspende con 100 μ L de una solución de glucosa 50 mM tris 25mM pH 8.0 EDTA 10 mM. Se centrifuga nuevamente 10 000 rpm por espacio de 10 minutos y se decanta. Posteriormente se procede a un lavado de células con NaOH 0.2 N SDS 1%, se le agregaran 200 μ L de esta solución y se agita ocasionalmente en vortex hasta resuspender por completo y se deja incubar 5 minutos a -4°C.

Transcurrido el tiempo se procede a precipitar las proteínas con 150 μ l de SDS y Acetato de sodio 3M pH 4.8 , y se deja reposar durante 5 minutos a -4°C.

El producto precipitado se centrifuga a 12 000 rpm por espacio de 1 minuto. El sobrenadante se recupera en tubos para microcentrífuga limpios.

Posteriormente se procede a la precipitación del DNA con 270 μ L de isopropanol y se deja reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se recupera el DNA por centrifugación a 12 000 rpm por 10 minutos, se elimina el sobrenadante y se hacen 2 lavados con 500 μ L de etanol al 70% a 12 000 rpm por 10 minutos y se pone a secar en incubadora a menos de 30°C. Una vez secado por completo se resuspende con 35 μ l de agua ultrapura ^(39, 40).

6. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

Dos placas de vidrio de 120 mm/100 mm y 100 mm/100 mm se lavan perfectamente y se limpian. La cámara se arma empleando separadores de 0.5 mm de ancho.

Se prepara la mezcla del gel separador de acrilamida al 12% con 3.25 mL de la solución Acrilamida/Bisacrilamida (3%), 1.029 mL del Buffer 3M (Tris-HCl pH 8.8), 81.25 μ l de la solución de SDS al 10% y 2.58 mL de agua, se mezclan perfectamente procurando evitar formación de burbujas, se adicionan 54.16 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5.41 μ l de TEMED. Se mezcla y se vierte la mezcla en el armazón se deja reposar hasta que el gel se polimerizar y en seguida se prepara el gel concentrador con 0.86 mL de la solución Acrilamida/Bisacrilamida (3%), 1.625 mL del Buffer 0.5 M (Tris-HCl pH 6.8), 65 μ l de SDS al 10% y 3.9 mL de agua, se mezclan perfectamente y se agregan 65 μ l de persulfato de amonio al 10 % y 10.8 μ l de TEMED. Esta mezcla se vierte hasta el borde del armazón del gel y se introduce el peine. El gel se deja reposar y una vez polimerizado se saca el peine, para posteriormente llenar los pozos con las muestras. Se agrega buffer de corrimiento (3gr de Tris, 14.4 g de glicina y 1 gr de SDS para un litro) a la cámara pequeña con SDS al 0.1% ^(21, 22, 23,32).

7. Preparación de Células Competentes de *Pichia pastoris*: Se inoculan 10 mL de YPD con una sola colonia de la cepa de *Pichia pastoris*. Se deja crecer toda la noche a 28-30°C en incubadora con movimiento (250-300 rpm). Las células del cultivo de toda la noche se diluyen a OD₆₀₀ de 0.1-0.2 en 10 mL de YPD. Esto toma aproximadamente 4-6 horas. Posteriormente se forma pellet de células por centrifugación a 500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se resuspende el pellet de células en 10 mL de la solución I. A continuación se forma pellet de células por centrifugación as 500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 1 mL de solución I. Las células en este punto son competentes. Se alicuotan 50-200 μ l de las células competentes dentro de un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL con tapa y

etiqueta. Nota: 50 μ l de células se usan por cada transformación. Las células pueden congelarse y descongelarse varias veces sin pérdidas significantes en la eficiencia de transformación.

En este punto, las células pueden tenerse a temperatura ambiente y ser usadas directamente para la transformación o congelarse para su futuro uso. Para congelar las células, se colocan los tubos en una caja envueltos en varias capas de toallas de papel y se colocan en congelador de -80°C . Es importante que las células se congelen lentamente. No se debe intentar congelar las células en nitrógeno líquido.

Para cada transformación se descongela un tubo de células competentes a temperatura ambiente y alicuotan 50 μ l en un tubo para microcentrífuga estéril. Se adicionaron 3 μ g de DNA del vector de expresión de *Pichia* linearizado a las células competentes. Se adiciona 1 mL de la Solución II a la mezcla DNA/células y se mezcla por vortex. Las reacciones de transformación se incuban por 1 hora a 30°C en baño de agua. Se mezcla la reacción cada 15 minutos con vortex. Se da choque térmico a las células en baño de agua a 42°C por 10 minutos. Se dividen las células en 2 tubos para microcentrífuga (aproximadamente 525 μ l por tubo) y se adiciona 1 mL de medio YPD a cada tubo. Se incuban las células a 30°C por 1 hora para permitir la expresión de resistencia a Zeocina. Se forma pellet de células por centrifugación a 3000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante. Se resuspende cada tubo de células en 500 μ l de la Solución III y se combinan las células dentro de un tubo. Se forma pellet de células por centrifugación a 3000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente y se elimina el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 100 o 150 μ l de Solución III. Se siembran totalmente la transformación en las cajas apropiadas, empleando un esparcidor estéril. Se incuban las placas por 3 a 10 días a 30°C ⁽⁴¹⁾.

8. Expresión de *Pichia pastoris*

Pichia pastoris es una levadura metanofílica, capaz de metabolizar metanol como fuente de carbono. El primer paso en el metabolismo del metanol es la oxidación del metanol a formaldehído, usando oxígeno molecular por la enzima alcohol oxidasa. En adición al formaldehído, esta reacción genera peróxido de hidrógeno. Para evitar la toxicidad por peróxido de hidrógeno, el metabolismo del metanol toma lugar con el organelo celular llamado peroxisoma, el cual secuestra los productos tóxicos y los elimina de la célula. La alcohol oxidasa tiene una pobre afinidad por el O₂, y *Pichia pastoris* lo compensa con la generación de grandes cantidades de la enzima.

La expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* requiere la preparación de diferentes medios.

Soluciones Madre

10X YNB (13.4% Yeast Nitrogen Base con Sulfato de Amonio sin amino ácidos)

Disolver 134 g de YNB (nitrógeno base de levadura) con sulfato de amonio sin aminoácidos en 1000 mL de agua filtrada esterilizada. Calentar la solución para disolver el YNB completamente en agua. Almacenar a +4°C. Alternativamente, usar 34 g de YNB sin sulfato de amonio y aminoácidos en 100 g de sulfato de amonio. La vida de anaquel de esta solución es de un año aproximadamente.

500X B (0.02% Biotina)

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua filtrada y esterilizada. Almacenar a +4°C. La vida de anaquel de esta solución es de aproximadamente un año.

100X H (0.4% Histidina)

Disolver 400 mg de L-histidina en 100 mL de agua. Calentar la solución, si es necesario, a no más de 50°C para disolver. Esterilizar por filtrado y almacenar a +4°C. La vida de anaquel de esta solución es de aproximadamente de un año.

10X D (20% Dextrosa)

Disolver 200 g de D-glucosa en 1000 mL de agua. Esterilizar en autoclave por 15 minutos, ó esterilizar por filtración. La vida de anaquel de este solución es de aproximadamente un año.

10X M (5% Metanol)

Mezcle 5 mL de metanol con 95 mL de agua. Esterilizar por filtración y almacenar a +4 °C. La vida de anaquel de esta solución es de aproximadamente dos meses.

10X GY (10% Glicerol)

Mezcle 100 mL de glicerol con 900 mL de agua. Esterilizar ya sea por filtración ó por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente. La vida de anaquel de esta solución es mayor de un año.

1 M Buffer de fosfato de potasio, pH 6.0:

Combinar 132 mL de 1 M K₂HPO₄, 868 mL de 1 M KH₂PO₄ y confirmar que el pH sea de 6.0 ± 0.1 (si se necesita ajustar el pH, use ácido fosfórico o KOH). Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente. La vida de anaquel de esta solución es mayor de un año.

YPD o YEPD Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (Medio extracto de levadura peptona dextrosa) para 1 litro:

1% extracto de levadura

2% peptona

2% dextrosa (glucosa)

1. Disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 mL de agua.

Nota: Adicione 20 g de agar si quiere hacer placas.

2. Autoclave por 20 minutos.

3. Agregar 100 mL de 10x D.

El medio líquido se puede almacenar a temperatura ambiente. Las placas se deben almacenar a +4 °C. La vida de anaquel es de algunos meses.

YPD (+ Zeocin™) Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (Medio de extracto de levadura + Zeocina) para 1 litro:

1% extracto de levadura

2% peptona

2% dextrosa (glucosa)

+ 2% agar

+ 100 µg/mL Zeocin™

1. Disolver lo siguiente en 900 mL de agua: 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptone.

2. Incluir 20 g de agar si desea hacer placas de YPD.

3. Autoclave por 20 minutos.

4. Enfríar la solución a ~60°C y agregar 100 mL de 10X D. Agregar 1.0 mL de 100 mg/mL Zeocin™, si lo desea.

El medio líquido sin Zeocin™ puede ser almacenado a temperatura ambiente. El medio que contenga Zeocin™ debe ser almacenado a +4°C en la oscuridad. Las placas de YPD deben ser almacenadas a +4°C.

La vida de anaquel de este medio es de algunos meses. El medio que contenga Zeocin™ tiene vida de anaquel de una a dos semanas.

YPDS + Zeocin™ Agar

Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (Medio de extracto de levadura, peptone, dextrose, sorbitol) para 1 litro:

1% extracto de levadura.

2% peptona

2% dextrosa (glucosa)

1 M sorbitol

2% agar

100 µg/mL Zeocin™

1. Disolver lo siguiente en 900 de agua:

10 g de extracto de levadura

182.2 g sorbitol

20 g de peptona

2. Agregar 20 g de agar.

3. Autoclave por 20 minutos.

4. Agregar 100 mL de 10X D

5. Enfriar la solución a ~60°C y agregar 1.0 mL of 100 mg/mL Zeocin™ .

Almacenar las placas de YPDS que contengan Zeocin™ a +4°C en la oscuridad.

La vida de anaquel es de una a dos semanas.

MGY y MGYH Minimal Glycerol Medium + Histidina (Medio Mínimo de Glicerol y Medio Mínimo de Glicerol + Histidina), para 1 litro:

1.34% YNB

1% glicerol

4 x 10⁻⁵ % biotina

+ 0.004% histidina

1. Combinar asépticamente 800 mL de agua esterilizada con 100 mL de 10X YNB, 2 mL de 500X B, y 100 mL de 10X GY.

2. Para crecimiento de la cepa *his4* en este medio, se puede hacer una versión que contenga histidina (llamado MGYH) con la adición de 10 mL de 100X H solución stock.

Almacenar a +4°C. La vida de anaquel de esta solución es de aproximadamente dos meses.

MD y MDH Minimal Dextrose Medium + Histidina (Medio Mínimo de Dextrosa + Histidina) para 1 litro:

1.34% YNB

4 x 10⁻⁵ % biotina

2% dextrosa

1. Para medio, autoclave 800 mL de agua por 20 minutos.

2. Enfriar a aproximadamente a 60°C y después adicionar:

100 mL de 10X YNB

2 mL de 500X B

100 mL de 10X D

3. Para hacer MDH, adicionar 10 mL de 100X H solución stock. Mezclar y Almacenar a +4°C.

4. Para placas, adicionar 15 g de agar a el agua en el paso 1y continuar.

5. Para placas, vertir la solución de inmediato.
Se pueden almacenar por varios meses a +4°C.

MM y MMH Minimal Methanol + Histidine (Mínimo Metanol y Mínimo Metanol + Histidina) para 1 litro:

1.34% YNB

4 x 10⁻⁵ % biotina

0.5% metanol

1. Para medio, autoclave 800 mL de agua por 20 minutos.

2. Enfriar el agua a aproximadamente 60°C y agregar:

100 mL de 10X YNB

2 mL de 500X B

100 mL de 10X M

3. Para hacer MMH, adicionar 10 mL de 100X H solución stock. Mezclar y Almacenar a +4°C.

4. Para placas, adicionar 15 g de agar al agua en el paso 1 y continuar con el procedimiento.

5. Después de mezclar, viertir la solución a las placas de inmediato. MM y MMH se pueden almacenar por varios meses a +4°C.

Breaking Buffer (Buffer de Rompimiento) 50 mM de fosfato de sodio, pH 7.4

1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride ú otro inhibidor de proteasas)

1 mM EDTA

5% glicerol

1. Preparar una solución stock del inhibidor de proteasas y Almacenar apropiadamente.

2. Para 1 litro, Disolver lo siguiente en 900 mL de agua desionizada:

6 g de fosfato de sódio (monobásico)

372 mg EDTA

50 mL glicerol

3. Usar NaOH para ajustar pH y alcanzar el volumen de 1 litro. Almacenar a +4°C.