



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**“EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F EN LAS CEPAS  
KM71 Y GS115 EN *Pichia pastoris* USANDO EL  
PLÁSMIDO pPICZA $\alpha$ ”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

**P R E S E N T A:**

**BIÓL. AMEZCUA CASTILLO MÓNICA**

**CODIRECTORES:**

**DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL**

**DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**OCTUBRE, 2019**

## INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	III
INDICE DE TABLAS .....	IV
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Alacranismo .....	4
2.2 Composición del veneno.....	4
2.2.1 Toxina Cn2 .....	5
2.3 Síntomas por envenenamiento por picadura de alacrán.....	5
2.4 Tratamiento para la picadura de alacrán.....	6
2.4.1 Producción de antivenenos.....	7
2.5 Características de anticuerpos .....	8
2.6 Sistemas de expresión de anticuerpos .....	12
2.6.1 Sistemas procariontes .....	13
2.6.2 Sistemas eucariontes.....	13
3. JUSTIFICACIÓN .....	19
4. HIPÓTESIS .....	20
5. OBJETIVOS.....	20
5.1 Objetivo general.....	20
5.2 Objetivos particulares.....	20
6. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	21
6.2 Material biológico .....	23
6.3 Propagación de los plásmidos .....	23
6.4 Construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F.....	23
6.5 Ligación del fragmento 6009F al plásmido pPICZA $\alpha$ .....	25
6.6 Secuenciamiento .....	27
6.7 Transformación de <i>Pichia pastoris</i> .....	28
6.8 Análisis de las células transformantes de las cepas de <i>Pichia pastoris</i> .....	28
6.9 Expresión del fragmento 6009F en <i>Pichia pastoris</i> .....	29
6.10 Purificación del fragmento 6009F .....	29
6.11 Electroforesis de proteínas y Western blot.....	29

6.12 Evaluación de reconocimiento de scFv 6009F frente a Cn2.....	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1 Propagación de los plásmidos .....	31
7.2 Amplificación del fragmento 6009F .....	32
7.3 Ligación del fragmento 6009F al plásmido pPICZA $\alpha$ .....	34
7.4 Secuenciamiento .....	36
7.5 Transformación de las cepas KM71 y GS115 de <i>Pichia pastoris</i> .....	37
7.6 Expresión y purificación del fragmento 6009F en <i>Pichia pastoris</i> .....	39
7.7 Evaluación de reconocimiento de scFv 6009F frente a Cn2.....	46
8. DISCUSION .....	47
9. CONCLUSIONES .....	49
10. PERSPECTIVAS .....	50
11.BIBLIOGRAFÍA .....	51
12. ANEXOS .....	57

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de un anticuerpo, la molécula está formada por dos cadenas pesadas (H) unidas por puentes disulfuro y dos cadenas ligeras (L) unidas a las cadenas H por uniones covalentes y no covalentes. Contiene dos zonas variables que confieren la especificidad de unión. ....	9
<b>Figura 2.</b> Esquema de anticuerpos y fragmentos obtenidos por digestión enzimática o técnicas recombinantes. ....	10
<b>Figura 3.</b> Estructura del anticuerpo scFv mostrando la cadena ligera $V_L$ , cadena pesada $V_H$ . ....	11
<b>Figura 4.</b> Secuencia de las toxinas presentes en <i>C. noxius</i> y <i>C. suffusus</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> Mapa del plásmido pSyn1. ....	21
<b>Figura 6.</b> Mapa del plásmido pPICZA $\alpha$ . ....	22
<b>Figura 7.</b> Secuencia del fragmento scFv 6009F con los oligos que se diseñaron para la amplificación del fragmento a partir del plásmido pSyn 1. ....	25
<b>Figura 8.</b> Mapa de construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F, recuadro azul se muestran los oligos que AOX específicos del plásmido, en el recuadro rojo se muestran los oligos que amplifican el fragmento 6009F y en el recuadro verde muestra la enzima de restricción Sac I que ayuda a linealizar el plásmido. ....	27
<b>Figura 9.</b> Crecimiento de células <i>E. coli</i> transformadas con plásmido A) pSyn1, B) pPICZA $\alpha$ . ....	31
<b>Figura 10.</b> Geles de agarosa en el que se muestran las bandas correspondientes a la purificación de los plásmidos a) pPICZA $\alpha$ y b) pSyn1 .....	32
<b>Figura 11.</b> Gel de agarosa al 0.8% en el que se visualiza la amplificación del gen 6009F, la banda corresponde al peso de 738 pb. ....	33
<b>Figura 12.</b> Gel de agarosa se puede visualizar la purificación del gen scFv 6009F con el kit de PCR. ....	33
<b>Figura 13.</b> Doble digestión de amplificación del fragmento 6009F y del plásmido pPICZA $\alpha$ . ....	34
<b>Figura 14.</b> Gel de agarosa con muestras de PCR de colonia, se muestra la amplificación de la banda que corresponde a 1266 pb en los carriles 3,5 y 6. ....	35
<b>Figura 15.</b> Gel de doble digestión para visualizar la liberación del fragmento 6009F de la construcción obtenida con el plásmido pPICZA $\alpha$ . ....	36
<b>Figura 16.</b> Alineamiento de la secuencia obtenida de la construcción pPICZA $\alpha$ /6009F con el fragmento scFv 6009F reportada por Riaño-Umbarila et., al 2011. ....	37
<b>Figura 17.</b> Secuencia de la construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F .....	37
<b>Figura 18.</b> Gel de agarosa en el que se visualiza la extracción genómica de las cepas transformadas de KM71 y GS115. ....	38
<b>Figura 19.</b> Amplificación positiva de la transformación de las cepas <i>Pichia pastoris</i> GS115 y KM71. ....	38
<b>Figura 20.</b> Gel de acrilamida en el que se observa la proteína 6009F purificada. ....	40
<b>Figura 21.</b> Membrana de Western blot en el que se visualiza el reconocimiento de la proteína 6009F con el anticuerpo Anti-his en el carril 8, .....	41

<b>Figura 22.</b> Gel de SDS 12.5% en el que se muestra la expresión con las segundas condiciones de la proteína scFv 6009F.....	42
<b>Figura 23.</b> Gel de SDS 12.5% que contiene las muestras de elución 300 mM de la purificación. ..	42
<b>Figura 24.</b> Membrana de Western blot de las muestras de la segunda expresión del fragmento scFv 6009F. ....	43
<b>Figura 25.</b> Gel de acrilamida en el que se muestra la producción de la proteína scFv 6009F tomada cada 24 h.....	44
<b>Figura 26.</b> Gel de SDS en el que se observan las muestras de la purificación por columna de níquel del sobrenadante de la cepa GS115.....	44
<b>Figura 27.</b> Gel de acrilamida en el que se muestra la proteína scFv 6009F purificada con un peso de 28 kDa. ....	45
<b>Figura 28.</b> Membrana de Western blot en el que se visualiza el reconocimiento de la proteína con el anticuerpo Anti-his en el carril 1. ....	46
<b>Figura 29.</b> Placa de Elisa de reconocimiento de la toxina Cn2, veneno de <i>C.noxius</i> y <i>C. limpidus</i> contra las proteínas scFv 6009F obtenidas en el grupo de trabajo. ....	47

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>P. pastoris</i> utilizadas en la expresión de proteínas heterólogas.....	15
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos disponibles para expresión en <i>Pichia pastoris</i> .....	16
<b>Tabla 3.</b> Proteínas expresadas en <i>Pichia pastoris</i> . ....	18
<b>Tabla 4.</b> Características del plásmido pSyn1. ....	21
<b>Tabla 5.</b> Características del plásmido pPICZA $\alpha$ . ....	22
<b>Tabla 6.</b> Oligos para la amplificación de scFv 6009F. ....	24
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de PCR de amplificación del fragmento 6009F. ....	24
<b>Tabla 8.</b> Composición del mix de reacción de PCR. ....	25
<b>Tabla 9.</b> Oligos específicos para el plásmido pPICZA $\alpha$ utilizados en PCR de colonia. ....	26

## RESUMEN

Los alacranes provocan picaduras en los seres humanos, siendo niños y ancianos los más susceptibles y en quienes se presentan los síntomas más graves. Las picaduras por alacrán representan un problema sanitario por la toxicidad de sus venenos, ya que producen reacciones como parálisis muscular que afecta la movilidad y la visión, causando convulsiones pudiendo llegar a provocar paro respiratorio y cardíaco que terminan en muerte (Pastrana *et al.*, 2003). En este trabajo se usaron dos cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71 transformadas con el plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F. El plásmido es de expresión extracelular ya que contiene el péptido señal de excreción  $\alpha$  de *S. cerevisiae*. Se verificó la construcción mediante secuenciación del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F con oligonucleótidos específicos para el plásmido pPICZA $\alpha$ . A la secuencia obtenida se le realizó un BLAST los resultados indicaron que el gen de interés tiene un 100% de similitud con la secuencia depositada en el Genebank del scFv 6009F. Una vez verificada la construcción, se obtuvieron las transformantes de *P. pastoris* GS115/pPICZA $\alpha$ /6009F y KM71/pPICZA $\alpha$ /6009F que fueron seleccionadas mediante resistencia a Zeocina. Usando cultivos de *P. pastoris* GS115 pPICZA $\alpha$ /6009F y KM71/ pPICZA $\alpha$ /6009F en matraces bafleados de 500 ml con 50 ml de medio BMMY, a tres diferentes temperaturas de incubación 26, 28 y 30 °C y a dos velocidades distintas de agitación 150 y 250 rpm. Se obtuvo la proteína soluble en el sobrenadante del medio de cultivo en ambas expresiones de las cepas *P. pastoris* KM71 y GS115. El medio se centrifugó a 7,200 rpm para obtener el sobrenadante, éste fue concentrado, dializado y purificado en columna de níquel y se visualizó la proteína correspondiente al scFv 6009F en geles de SDS-Page y por Western blot con anti-His. Lo anterior confirmó la producción del scFv 6009F de manera extracelular y soluble por el sistema de expresión en *Pichia pastoris*. Sin embargo, a las condiciones de expresión de 250 rpm y 30 °C la proteína se obtiene glicosilada en *P. pastoris* GS115, pPICZA $\alpha$ /6009F, el tamaño de la banda es mayor al esperado de 28 kDa. Empleando 250 rpm y 28 °C en la expresión *P. pastoris* GS115, pPICZA $\alpha$ /6009F, se observó la proteína en el gel de SDS, de un tamaño de

aproximadamente 26 kDa lo que sugiere que no tiene el tag de His+, lo que se comprobó en el Western blot ya que no se observó reconocimiento de la banda, lo que sugiere que el tag de His+ no está accesible o fue cortada de la proteína. Para ambas construcciones *P. pastoris* GS115 y KM71 pPICZA $\alpha$ /6009F la mejor condición de expresión fue usando 150 rpm y 26 °C, debido a que la proteína se obtiene de con un peso molecular de 28 kDa y fue reconocida en el Western Blot por el anti His+. La proteína fue cuantificada durante el proceso de purificación y se obtuvieron 40 mg/L usando ambas construcciones es decir en *P. pastoris* GS115 y KM71. El scFv 6009 obtenido en la *P. pastoris* GS115, pPICZA $\alpha$ /6009F reconoce la toxina Cn2, y los venenos de *C. noxius* y *C. limpidus*, mediante ensayos de Elisa usando concentraciones 1:10 veneno: anticuerpo y el reconocimiento fue detectado mejor usando el tag de c-myc que con el His+. Para *P. pastoris* KM71 pPICZA $\alpha$ /6009F, se está evaluando la concentración de proteína final y el reconocimiento.

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la fauna mundial se puede encontrar una gran variedad de animales venenosos ricos en compuestos bioactivos, de los cuales se puede destacar serpientes, arañas, abejas, avispa, medusas, caracoles y alacranes. Su veneno les ayuda a capturar e inmovilizar a sus presas y defenderse de los depredadores. Muchos de estos animales son capaces de causar envenenamiento por medio de su mordedura o picadura causando dolor, daño en el tejido, patologías sistémicas incluso en algunos casos muy graves la muerte (Zavala *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2014).

Uno de los principales artrópodos que causa envenenamiento por medio de su picadura es el alacrán; considerados unos de los animales más antiguos, presentes en el planeta desde hace unos 400 millones de años, tiempo en el que han desarrollado mecanismos de defensa contra sus agresores y al mismo tiempo la capacidad de poder capturar las presas para su alimentación. Los alacranes se distribuyen en casi todo el mundo, en todos los ambientes ecológicos, con excepción de la Antártida, áreas boreales y algunas islas oceánicas, se les encuentra principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de la tierra, adaptándose a ambientes desérticos de clima caliente de hasta cincuenta grados, tienen hábitos nocturnos y durante el día permanecen ocultos en lugares oscuros. (Possani, 2005).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Alacranismo

México es uno de los países en riesgo debido a su creciente incidencia de envenenamientos reportándose alrededor de 300,000 casos de picadura de alacrán al año, que pertenecen a la familia Buthidae. Las especies de alacranes toxicas se encuentran dentro del género *Centruroides*, que cuenta con 30 especies de las cuales las más importantes son *C. noxius*, *C. suffusus*, *C. infamatus*, *C. tecomanus*, *C. elegans*, *C. hirsutipalpus*, *C. villegasi*, *C. sp. nov. "A"* (Huajuapán), *C. ornatus*, *C. meisei*, *C. limpidus*, *C. sp.nov." B"* (Cumpas), *C. sculpturatus*, *C. balsasensis* distribuidos principalmente en los estados que colindan con el océano Pacífico (Chiappaux, 2012; Palomera-Ávila *et al.*, 2016; Riaño-Umbarila *et al.*, 2017), sin embargo, es común encontrar algunas de las especies fuera de su rango normal de distribución provocado principalmente por la migración en equipaje, cajas, ropa y así ser transportados involuntariamente a otros estados.

### 2.2 Composición del veneno

La composición del veneno de los alacranes les permite capturar a sus presas y/o defensa ante depredadores. El veneno es inoculado directamente a la víctima por vía subcutánea y se disemina por el sistema circulatorio (Zavala *et al.*, 2004). Este veneno es una mezcla de varios componentes químicos principalmente agua, polipéptidos, enzimas proteolíticas, aminoácidos y los más importantes son las toxinas que actúan en muchos organismos como; insectos, arácnidos y mamíferos incluyendo al hombre, estas son las responsables de los síntomas de envenenamiento que se observan después de la picadura, incluso el veneno de un mismo alacrán puede llegar a presentar múltiples toxinas que pueden interactuar entre sí, modulando la respuesta de los canales involucrados y dando lugar a los síntomas (Chiappaux, 2012).

El sistema nervioso central y periférico son responsables de la transmisión de los impulsos nerviosos, el efecto fatal de las toxinas sobre los canales  $\text{Na}^{+2}$  se relaciona con el deterioro de esta transmisión que afecta algunas funciones vitales, que puede conducir a la muerte, lo cual depende de la abundancia y toxicidad. Estas toxinas se pueden dividir en dos grupos las  $\alpha$  y  $\beta$  según sus propiedades de enlace, las  $\alpha$ -toxinas se unen al sitio 3 y las  $\beta$ -toxinas se unen al sitio 4 del canal de sodio de vertebrados inhibiendo la corriente de sodio. La activación de los canales de sodio por las  $\beta$ -toxinas provoca la liberación presináptica de diferentes neurotransmisores, lo cual provoca los efectos fisiológicos producidos en el proceso de envenenamiento (Pintar *et al.*, 1999).

### **2.2.1 Toxina Cn2**

La toxina Cn2 es el componente tóxico principal que se encuentra representando el 6.8% en el veneno del alacrán *C. noxius* considerado el más tóxico en el país. Esta es una pequeña toxina constituida por 66 aminoácidos, gracias a su tamaño pequeño se pueden distribuir rápidamente en el cuerpo a través del torrente sanguíneo llegando a sus sitios blanco, mostrando una  $\text{LD}_{50}$  de 0.25  $\mu\text{g}$  por 20 g de ratón por inyección intraperitoneal. En análisis proteómicos se ha encontrado que la toxina Cn2 modifica la expresión y función de algunas proteínas dentro de las células que están relacionadas con la protección de la apoptosis (Zamudio *et al.*, 1992).

### **2.3 Síntomas por envenenamiento por picadura de alacrán**

En general se considera que la acción de las neurotoxinas en el veneno da lugar a una descarga masiva de catecolaminas, neurotransmisores que se vierten al torrente sanguíneo en respuesta a la acción de la toxina en los canales de sodio y potasio lo que provoca la pérdida del equilibrio en el espacio intracelular y extracelular con una entrada desmedida del sodio hacia la célula y expulsión de

potasio, con lo que se altera de manera significativa el potencial de membrana y el funcionamiento de la célula (Manual dirección general de epidemiología, 2012).

Los síntomas por envenenamiento del alacrán se desarrollan rápidamente en cuestión de pocas horas dando lugar a una gama de cuadros clínicos según la especie de alacrán; el primer síntoma es dolor localizado debido a la penetración del veneno en más del 95% de los casos, asociado con edema y eritema en 20% de los casos. Se puede presentar otros trastornos como irritabilidad, dolor en el cuerpo, sensación extraña en la garganta, escurrimiento nasal, fiebre, dificultades para respirar, náuseas, vómitos, diarrea y en casos muy graves colapsos vasculares, fallas cardíacas incluso la muerte (Chiappaux, 2012; Dehesa-Dávila & Possani, 1994).

La sintomatología es diversa pudiendo ser local o sistémica de acuerdo al grado de envenenamiento que se clasifican en: Grado I: envenenamiento leve, el paciente podría estar asintomático o solo con dolor local y eritema. Grado II: envenenamiento moderado, donde el paciente presenta síntomas locales y algún síntoma sistémico como ardor, sensación de pelos en la garganta, disfagia, irritabilidad, taquicardia, fiebre o hipotermia. Grado III: envenenamiento severo, en el que se llega a presentar dolor abdominal, hipotensión, vómitos frecuentes, convulsiones, edema pulmonar, falla cardíaca y coma (Jaramillo-Serna *et al.*, 2007).

## **2.4 Tratamiento para la picadura de alacrán**

Una persona que ha sido picada por un alacrán y que presenta los síntomas generalizados debe acudir cuanto antes al centro hospitalario, en general las primeras horas son decisivas para salvar la vida de un paciente; las personas más afectadas son niños y ancianos (Possani, 2005). La diseminación intravenosa de los componentes del veneno varía de 4-7 horas y la eliminación total podría ser de 4-13 horas, el tratamiento que se utiliza para neutralizar el veneno circulante es un antisuero de origen animal, estos antisueros son anticuerpos neutralizantes contra el veneno de algunas especies de alacranes, el suero generalmente se aplica

cuando el paciente llega a presentar más de uno de los síntomas descritos anteriormente (Dehesa-Dávila & Possani, 1994).

#### **2.4.1 Producción de antivenenos**

La terapia sérica convencional es uno de los tratamientos específicos para el envenenamiento por picadura o mordedura, cualquiera que sea su origen: como serpientes, arañas, algunos animales marinos y los alacranes, implica la aplicación de anticuerpos para poder inactivar las toxinas involucradas y así eliminar los componentes de veneno del sistema de la víctima. Desde los inicios del siglo XIX hasta casi la década de los años 30 se inició el uso de la terapia con sueros antivenenos, que fueron descubiertos por Von Behring y Kitasato en 1890. Ellos se dieron cuenta que la transferencia de los anticuerpos a partir de la sangre de animales infectados podría proporcionar inmunidad. Para la producción industrial de antivenenos, se comenzaron a usar sueros de oveja, que gradualmente fueron sustituidos por equinos ya que estos producen una mayor cantidad de suero; en ese entonces los sueros eran crudos por que contenían una gran cantidad de sustancias antigénicas, las cuales eran responsables de reacciones adversas que llegaban a causar la muerte de los pacientes susceptibles, al provocar en ellos un choque alérgico mediado casi siempre por la presencia de anticuerpos de tipo IgE, por lo cual en ocasiones es recomendable la administración de un antihistamínico junto con el antisuero, a estos sueros se les conoce como de primera generación de antivenenos (Alvarenga *et al.*, 2014).

Posteriormente se dio lugar a la segunda generación de los sueros con la purificación de inmunoglobulinas, lo que originó menos reacciones adversas en pacientes empleando altas concentraciones de IgG (Figura 1). Posteriormente se originó una tercera generación de antivenenos, conocidos como faboterápicos que consisten en una digestión limitada de las inmunoglobulinas con pepsina o papaína para obtener  $F(ab')_2$  o fragmentos Fab que reconocen los determinantes antigénicos. Los  $F(ab')_2$  poseen una alta especificidad neutralizante y no provocan

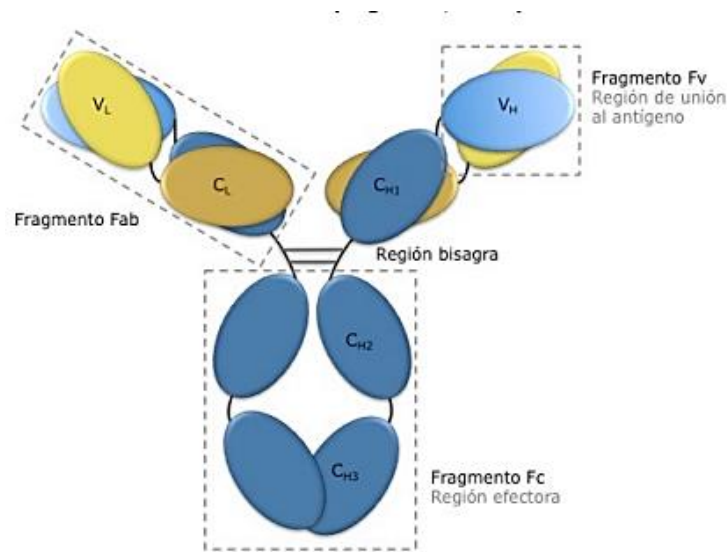
las reacciones adversas como los antivenenos de la primera generación disminuyendo la inmunogenicidad (Zavala *et al.*, 2004).

A nivel mundial se puede encontrar alrededor de 19 antivenenos para el tratamiento de picaduras de alacrán para uso humano. En México se puede encontrar el antiveneno antialacrán producido por la compañía Bioclon subsidiada de la compañía Silanes S.A de C.V, y también producido a menor escala por la paraestatal BIRMEX. El antiveneno antialacrán es comercializado en México y América Latina por el Instituto Bioclon conocido como Alacramyn, el cual está constituido por fragmentos F (ab')<sub>2</sub> de inmunoglobulina G (Figura 2), que fueron obtenidas a través de la hiperinmunización de caballos con veneno de varios alacranes del género *Centruroides*, los cuales en raras ocasiones llegan a provocar reacciones adversas en pacientes, estas reacciones pueden ser de hipersensibilidad de tipo 1 mediada por IgG (Laustsen *et al.*, 2016). En Estados Unidos de América existe un homólogo denominado como Anascorp de *Centruroides* F (ab ' )<sub>2</sub> aprobado por la FDA. Sin embargo, existen diferentes tratamientos para atenuar y disminuir los signos clínicos de envenamamiento de escorpión; está indicado iniciar el tratamiento lo antes posible en pacientes que presentan los signos clínicos antes mencionados. Para adultos la dosis inicial indicada es infundir tres viales cada 60 minutos para determinar si los síntomas están resueltos; en el caso de niños está indicado usar dosis adicionales si es necesario en intervalos de 30-60 minutos.

## **2.5 Características de anticuerpos**

Los únicos medicamentos adecuados disponibles para contrarrestar el problema de salud pública del alacranismo es el uso de antivenenos, por medio de la utilización de anticuerpos como antídoto para eludir el envenenamiento y así poder contrarrestar la actividad biológica del veneno. Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas que ayudan a eliminar elementos extraños que ingresan al organismo como bacterias, toxinas, virus o algunos parásitos; estas proteínas son producidas

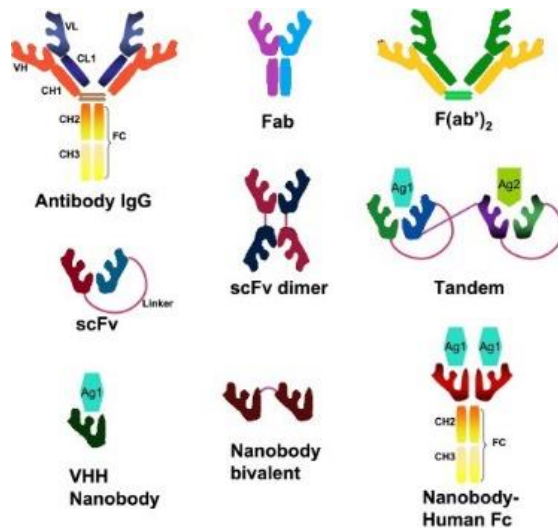
en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo, presentan forma de Y conformada por cuatro cadenas polipeptídicas, formando el dominio Fc que es la parte constante o cristalizable (formado por  $C_L$  cadenas constantes ligeras y  $C_H$  cadenas constantes pesadas) de los anticuerpos y el dominio variable ( $V_L$  cadena variable ligera y  $V_H$  cadena variable pesada) estas cadenas se encuentran unidas mediante enlaces disulfuros, además de las regiones constantes se puede observar la región de fragmento de unión al antígeno o Fab donde se encuentran las regiones determinantes de complementariedad CDRs (Figura 1) los cuales proporciona la capacidad de combinarse específicamente con un antígeno o un inmunógeno (Malpiedi *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Estructura de un anticuerpo, la molécula está formada por dos cadenas pesadas (H) unidas por puentes disulfuro y dos cadenas ligeras (L) unidas a las cadenas H por uniones covalentes y no covalentes. Contiene dos zonas variables que confieren la especificidad de unión. (Malpiedi *et al.*, 2013).

Como se sabe los antivenenos que son usados actualmente son de origen equino y aunque han sido efectivos para neutralizar el veneno de los alacranes, tales antisueros derivados de animales presentan ciertas desventajas debido a la naturaleza heteróloga de los anticuerpos presentes en el antiveneno, lo que ha llevado a la búsqueda de la cuarta generación de antivenenos para generar anticuerpos y/o fragmentos recombinantes (Becerril *et al.*, 2014). Estos

fragmentos son mas pequeños que el anticuerpo IgG y sin embargo tienen la capacidad de unirse al antígeno. Estos fragmentos están disponibles en diversos formatos y son generados a partir de inmunoglobulinas purificadas (IgG), entre ellos se encuentran los  $F(ab')_2$ , Fab, scFv, o sus diferentes disposiciones como dímeros de scFv, tándem, nanocuerpos, entre otros más (Figura 2). Una característica importante sobre estos fragmentos de anticuerpos es que conservan sus sitios de unión al antígeno, lo que los hace efectivos para reconocer a su blanco y así producir el efecto protector esperado, son solubles y se distribuyen más rápido en el organismo (Espino-Solís *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Esquema de anticuerpos y fragmentos obtenidos por digestión enzimática o técnicas recombinantes (Espino-Solís *et al.*, 2009).

Se ha generado la búsqueda de anticuerpos y fragmentos pequeños humanizados para encontrar un producto novedoso a partir del RNA obtenido de linfocitos B de sangre humana de pacientes que han sido picados por alacranes. Mediante despliegue en fagos y evolución dirigida, se han desarrollado algunos formatos de expresión como los fragmentos de anticuerpos scFv (Batra *et al.*, 2002). Se obtuvieron un total de  $1,1 \times 10^8$  miembros diferentes de scFv de los cuales se identificaron dos scFv anti-Cn2 específicos, 3F y C1 que reconocen la toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius*. Sin embargo, estas clonas no mostraron la afinidad necesaria para poder neutralizar la toxina, mediante evolución dirigida y despliegue en fagos se desarrolló la maduración de estos scFv. Luego de tres ciclos de

evolución dirigida del scFv 3F se obtuvo la variante scFv 6009F, con un nivel de afinidad adecuado y mayor capacidad de neutralización sobre 2LD<sub>50</sub> del veneno completo de *C. noxius* lo que indica que es funcionalmente estable (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005).

Uno de los fragmentos de anticuerpos obtenidos a través del despliegue de animales inmunizados con veneno o madurados *in vitro* que ha demostrado tener la capacidad de proteger contra efectos de venenos; es el fragmento variable de cadena sencilla (scFv) (figura 3) que consisten en el dominio de unión a antígeno funcional más pequeño de un anticuerpo (~ 30 kDa) en el cual las cadenas variables pesadas (V<sub>H</sub>) y ligeras (V<sub>L</sub>) se unen mediante un enlazador peptídico flexible o *linker* formado generalmente de quince aminoácidos que contiene residuos hidrófilos como glicina y serina ((G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>) los cuales proporcionan flexibilidad y mayor solubilidad al fragmento (Van Dijk & Van De Winkel, 2001; Monnier *et al.*, 2013). Estos anticuerpos tienen varias ventajas en las prácticas clínicas, tales como una mejor penetración en tumores, una depuración sanguínea más rápida, menor tiempo de retención en los tejidos y una inmunogenicidad reducida, hoy en día los scFv se han aislado con éxito y se muestran como fragmentos en diversos sistemas de expresión (Ahmad *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Estructura del anticuerpo scFv mostrando la cadena ligera V<sub>L</sub>, cadena pesada V<sub>H</sub> (Espino-Solís *et al.*, 2009).

Se sabe que el anticuerpo scFv 6009F presenta reactividad cruzada contra otras toxinas de alacrán como C<sub>ss2</sub>, C<sub>ss4</sub> que se encuentran en el veneno del escorpión *C. suffusus*, C<sub>n2</sub> y C<sub>n3</sub> presentes en el veneno de *C. noxius*, debido a que estas



toxinas presentan una alta homología (Figura 4), lo que explica por qué algunos anticuerpos pueden reconocer antígenos como diferentes toxinas con alta homología e identidad estructural, aunque con diferente afinidad por su antígeno principal (Riaño-Umbarila *et al.*, 2011). El fragmento scFv 6009F se ha considerado uno de los anticuerpos scFv con capacidad de reconocer el veneno de *Centruroides noxius* y a las toxinas presentes en las especies de alacranes de importancia medica como Cn2, Cn3, Css2 y Css4, considerado uno de los mejores neutralizantes con una disociación menor y mayor afinidad, presentando un rendimiento de expresión en *E. coli* TG1 de 1.1 mg/L (Riaño-Umbarila *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Secuencia de las toxinas presentes en *C. noxius* y *C. suffusus* (Riaño-Umbarilla *et al.*, 2011).

## 2.6 Sistemas de expresión de anticuerpos

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden expresarse en células procariontas o eucariotas, cuando el DNA de estas proteínas se introduce en plásmidos o vectores para transformar dichas células. La expresión depende mucho de la estructura de la proteína y los cambios postraduccionales de cada tipo de célula. Es difícil hacer una comparación entre los sistemas de expresión existentes porque no se ha expresado la misma proteína en cada uno de ellos.

En el caso particular de los fragmentos de anticuerpos recombinantes se han producido en diversos sistemas de expresión como bacterias, células de mamífero, insectos, levaduras y plantas, los rendimientos, solubilidad y actividad biológica de las proteínas son muy diferentes, ya que dependen de varios factores como: tamaño de la proteína, plegamiento y estabilidad; por lo que el sistema óptimo muchas veces depende del tipo de moléculas que se desea expresar, su secuencia, plegamiento,

solubilidad así como la cantidad requerida y la pureza del producto (Verma *et al.*, 1998).

### **2.6.1 Sistemas procariontes**

Las células procariotas como *E. coli* son diferentes a las células eucariotas como plantas, levaduras, células de insecto o células CHO de mamíferos, por lo que ofrecen diferentes ventajas y desventajas en relación con la expresión de anticuerpos (Berlec y Strukeli, 2013). *E. coli* es el sistema procarionte que generalmente se utiliza para la expresión de fragmentos de inmunoglobulinas teniendo como ventaja la capacidad de producción de proteínas en grandes cantidades. Además, la bacteria presenta un rápido crecimiento en comparación con otras células, lo que da la oportunidad de obtención y purificación de la proteína expresada en un tiempo corto. Sin embargo, *E. coli* carece de enzimas para realizar modificaciones postraduccionales como la glicosilación y procesos de plegamiento, una desventaja más es que la bacteria expresa los fragmentos de anticuerpos en el ambiente reductor del citoplasma conduciendo a la formación de cuerpos de inclusión lo que hace necesario el desarrollo de protocolos para recuperar la proteína soluble y activa (Wells & Robinson, 2017). A pesar de que existen cepas modificadas de *E. coli* para expresar proteínas en periplasma y con modificaciones para prevenir proteólisis e inducir plegamiento no siempre se obtiene un mayor rendimiento con estas cepas de *E. coli* modificadas; esto depende mucho de la secuencia y de la proteína. Se sabe que los sistemas bacterianos más utilizados como hospedadores son *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, entre otras cepas y, lo más importante, *E. coli* BL21 y *E. coli* K12 y sus derivados (Terpe, 2016).

### **2.6.2 Sistemas eucariontes**

En los sistemas de expresión de tipo eucarionte se pueden encontrar las células de insecto, células de mamíferos y levaduras; en el sistema de expresión de células de

insecto se han reportado grandes cantidades de proteína activa; sin embargo, el éxito de la expresión depende de algunos factores como la disponibilidad de un buen medio de cultivo y cuidado de las células durante el crecimiento lo que conlleva a generar altos costos de producción, además de que la mayor parte de los reportes están enfocados hacia la producción de vacunas terapéuticas, que en ocasiones no son de alta demanda como anticuerpos (Gómez-Sebastián *et al.*, 2014).

La principal ventaja de la expresión de células de mamíferos es que las señales para la síntesis, procesamiento y secreción de proteínas eucariotas son reconocidas de forma adecuada y eficiente por las células de mamíferos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que existen diferencias entre las especies, una desventaja es que muchas veces son susceptibles a contaminación por virus y en ocasiones existe una secreción pobre de proteína al igual que el sistema de expresión en células de insecto podría generar altos costos (Verma *et al.*, 1998).

Otro sistema de expresión son levaduras que combinan las propiedades de las células eucariotas con un tiempo de generación corto, medios simples, altos niveles de producción de proteínas, estas células han desarrollado un aparato avanzado de plegamiento postraduccional, también secretan y pliegan las proteínas al medio de cultivo, son una opción atractiva en la expresión de anticuerpos y fragmentos, (Horwitz *et al.*, 1988). Las levaduras más utilizadas como hospederos han sido *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*. En la producción de glicoproteínas terapéuticas destinadas al uso en humanos, las levaduras han sido menos útiles por su incapacidad para modificar proteínas con estructuras de glicosilación similares a las humanas. La glicosilación de levadura es del tipo de alto contenido de manosa, que confiere una vida media corta en vivo a la proteína y puede hacerla menos eficaz o incluso inmunogénica. Se han probado varias formas de humanizar las glucoproteínas derivadas de la levadura, incluidas la modificación enzimática de proteínas *in vitro* y la modulación de las vías de glicosilación del huésped *in vivo*. Los avances recientes en la glicoingeniería de levaduras y la expresión de glicoproteínas terapéuticas en levaduras humanizadas han mostrado una promesa

significativa y están desafiando el predominio actual de la producción de proteínas terapéuticas basadas en el cultivo de células de mamíferos. Sin embargo, *P. pastoris* ha mostrado una mejor capacidad para la producción y secreción de proteínas heterólogas que *S. cerevisiae* (Frenzel *et al.*, 2013).

*Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica, lo que significa que tiene un promotor fuerte que es inducible mediante metanol, para la expresión de una proteína se requiere la inserción del gen en un vector para introducirlo al genoma. Existen dos promotores de alcohol oxidasa AOX1 y AOX2 lo que ayuda a la recombinación de cepas con diferentes fenotipos: MUT<sup>+</sup> las que tienen crecimiento rápido en metanol, MUT<sup>s</sup> crecimiento lento en metanol y MUT<sup>-</sup> las que no tienen crecimiento en metanol (Córdoba *et al.*, 2003).

Se han diseñado herramientas para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* como: vectores de expresión, métodos de transformación, marcadores de selección, modificación de las condiciones de cultivo y cepas, con el propósito de explotar el potencial productivo de la levadura. Entre las cepas de *P. pastoris* que han sido modificadas para inhibir la actividad proteolítica y adicionar marcadores de selección se muestran seis de ellas en la Tabla 1 (Serrano-Rivero *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Cepas de *P. pastoris* utilizadas en la expresión de proteínas heterólogas.

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Características
<b>Y-11430</b>	Silvestre	Silvestre	Consumo de metanol alto
<b>X-33</b>	Silvestre	Silvestre	Consumo de metanol alto
<b>GS115</b>	<i>his4</i>	Mut <sup>+</sup> ,His <sup>-</sup>	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina
<b>KM71</b>	<i>his4, arg4aox1: ARG4</i>	Mut <sup>s</sup> ,His <sup>-</sup>	Consumo de metanol bajo, auxótrofa a histidina
<b>SMD1168</b>	<i>pep4, his4</i>	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup> deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa
<b>SMD1165</b>	<i>prb1, his4</i>	Mut <sup>+</sup> His <sup>-</sup> deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa

Al igual que las cepas existe una gran variedad de plásmidos los cuales presentan diferentes elementos que depende del tipo de expresión ya sea extracelular que permite la secreción de productos solubles con plegamiento correcto y la intracelular en el que la proteína queda en el interior de la célula, así como el tipo de marcadores de selección Tabla 2.

**Tabla 2.** Plásmidos disponibles para expresión en *Pichia pastoris* (Lin-Cereghino & Lin-Cereghino, 2007).

Vector	Marcador seleccionable	Características
<b>Vectores para expresión intracelular</b>		
<b>pHIL-D2</b>	HIS4	Sitio NotI para el remplazo del gen AOX1
<b>pPIC3.5</b>	HIS4	Sitio de clonación múltiple para inserción de genes, selección con Ampicilina
<b>pPICZ</b>	Ble	Sitio de clonación múltiple para inserción de genes, fusión de la proteína a las etiquetas c-myc y His 6; Selección con zeocina
<b>pPIC6</b>	Bsd	Similar a pPICZ excepto la resistencia a blasticidina
<b>pGAPZ</b>	Ble	Expresión controlada por el promotor GAP, sitio de clonación múltiple, selección de zeocina
<b>pFLD</b>	Ble	Expresión controlada por el promotor FLD1 para la expresión inducible con metilamina
<b>Vectores para expresión extracelular</b>		
<b>pHIL-S1</b>	HIS4	Promotor AOX1 fusionado a la señal de secreción de PHO1, sitios XhoI, EcoRI y BamHI disponibles para inserción de genes.
<b>pPIC9</b>	HIS4	Promotor AOX1 fusionado a la secuencia señal de $\alpha$ -MF, sitios de EcoRI, NotI, SnaBI y AvrII disponibles para inserción de genes.
<b>pPICZ<math>\alpha</math></b>	Ble	Promotor AOX1 fusionado a la secuencia señal de $\alpha$ -MF, sitio de clonación múltiple etiquetas c-myc y His6, selección de cepas por zeocina.
<b>pPIC6<math>\alpha</math></b>	Bsd	Similar a pPICZ $\alpha$ excepto la resistencia a blasticidina
<b>pGAPZ<math>\alpha</math></b>	Ble	Promotor GAP fusionado a la secuencia de señal de $\alpha$ -MF, selección con zeocina

El sistema de expresión en *E. coli* y *Pichia pastoris* se han utilizado para la producción de una variedad de diferentes proteínas heterólogas. En algunos casos se ha utilizado el sistema de expresión en *Pichia pastoris* para aumentar la producción de las proteínas expresadas en sistemas procariontes, en comparación con *E. coli*. Se muestran a continuación algunos reportes utilizando *Pichia pastoris* y *E. coli* (Tabla 3); Gurramkonda *et al.*, 2010 reportan la expresión de un precursor de insulina en *P. pastoris* utilizando la cepa X-33 y el plásmido pPICZA $\alpha$  reportando 1.5 g/L de insulina humana recombinante lo que aumentó la eficiencia de la fabricación de insulina; también hay reportes de expresión en *Pichia pastoris* para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) uno de ellos se basó en la clonación del anticuerpo scFv  $\alpha$ -ED-B de la isoforma  $\beta$ -fibronectina que está en los vasos sanguíneos en la angiogénesis tumoral, utilizando el vector de levadura pPICZA $\alpha$  obteniendo un rendimiento de la proteína de 5-20 mg/L de medio de cultivo (Marty *et al.*, 2001). Li *et al.* (2017), expresaron la proteína C reactiva humana que es utilizada como un marcador inflamatorio y predictor de enfermedades cardiovasculares, los genes se clonaron en el plásmido pPICZA $\alpha$  expresado en la cepa de *P. pastoris* X-33 obteniendo el mayor rendimiento aproximadamente 3 mg/L con respecto al obtenido en *E. coli* 0.027 mg/mL Tanaka *et al.* (2002). Rahbarizadeh *et al.* (2006) reportan la expresión de un anticuerpo scFv para una mucina asociada al cáncer MUC1 utilizando la cepa GS115 con el plásmido pPIC9 en el que se produjo aproximadamente 10-15 mg/L del anticuerpo aumentando la producción que se obtuvo en el 2004 al utilizar la cepa TG1 de *E. coli*, reportando 1-5 mg/L del anticuerpo. Omidfar *et al.* (2007), expresaron un anticuerpo de camello (VHH) ORB1-83 que reconoce la presencia externa del dominio EGFR mutante que se encuentra presente en algunos tumores humanos en el vector de expresión pPICZC utilizando la cepa X-33 y del cual se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 8-10 mg/L, la expresión que se había realizado anteriormente en la cepa de TG1 de *E. coli* reportó un rendimiento de 0.5-2.5 mg/L. Ezzine *et al.* (2012) realizaron la construcción de un anticuerpo VHH (NbAahl'<sup>22</sup>) dirigido contra la toxina de alacrán *Androctonus australis* Hector conocida como Aahl utilizando como vector el plásmido pPICZA $\alpha$  en las células de *P. pastoris* X-33 del cual reportaron un

rendimiento de aproximadamente 17 mg/L de la proteína. Damasceno *et al.* (2004) reportaron la expresión de un anticuerpo scFv A33 que reconoce una glicoproteína expresada en cáncer de colon utilizando el sistema de *Pichia pastoris* con un rendimiento de 4 g/L utilizando la cepa GS115 con el vector pPIC9k.

**Tabla 3.** Proteínas expresadas en *Pichia pastoris*.

Cepa	Vector	Proteína	Producción <i>P. pastoris</i>	Producción <i>E. coli</i>	Referencia
GS115	pPICZA $\alpha$	scFv $\alpha$ -ED-B de la isoforma $\beta$ -fibronectina	5 -20 mg/L	ND	Marty <i>et al.</i> , 2001
6S115	pPIC9k	scFv A33 contra glicoproteína en cáncer de colon	4 g/l	ND	Damasceno <i>et al.</i> , 2004
GS115	pPIC9	scFv contra mucina asociada a cáncer MUC1	10-15 mg/L	1-5 mg/L	Rahbarizadeh <i>et al.</i> , 2004, 2006
x-33	pPICZA $\alpha$	Anticuerpo (NbAahl'22) contra toxina Aahl	17 mg/L	3 mg/L	Ezzine <i>et al.</i> , 2008, 2012
x-33	pPICZA $\alpha$	Insulina	1.5 g/L	ND	Gurramkonda <i>et al.</i> , 2010
x-33	pPICZA $\alpha$	Proteína C	3 mg/L	0.027 mg/L	Li <i>et al.</i> , 2017, Tanaka <i>et al.</i> , 2002
x-33	pPICZC	Anticuerpo ORB1-83	8-10 mg/L	0.5-2.5 mg/L	Omidfar <i>et al.</i> , 2007

No se reporta si son activas

Debido a que el rendimiento obtenido en la expresión del fragmento scFv 6009F en *E. coli* es de 1.1 mg/L se busca mejorar la cantidad de proteína soluble y activa en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran incidencia de envenenamiento en México por picaduras de alacrán, es necesario el desarrollo de antivenenos más eficientes con una mayor estabilidad, mejor difusión tisular y que sean más específicos contra las toxinas responsables del envenenamiento, por lo que entre los sistemas de expresión mencionados anteriormente la levadura *Pichia pastoris* se ha empleado en la expresión de proteínas heterólogas incluyendo anticuerpos, teniendo como ventajas crecimiento rápido con alta densidad celular, altos niveles de producción de proteínas, fácil manipulación de la proteína secretada al medio de cultivo y son menos susceptibles a contaminaciones, por lo que se consideró la utilización de las dos cepas de *Pichia pastoris* KM71 y GS115 con ayuda del plásmido pPICZA $\alpha$  para la expresión del anticuerpo scFv 6009F de forma extracelular con el fin de cuantificar el rendimiento de producción en proteína pura y su capacidad de reconocimiento contra la toxina Cn2 del alacrán *C. noxius*.



#### **4. HIPÓTESIS**

El sistema de expresión de *Pichia pastoris* permitirá obtener una mayor producción del fragmento scFv 6009F en que en el sistema de expresión de *E. coli*.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Expresar el anticuerpo scFv 6009F en *Pichia pastoris* de forma extracelular, determinar su producción y su actividad.

##### **5.2 Objetivos particulares**

- ✓ Expresar el gen del fragmento scFv 6009F en las cepas KM71 y GS115 de *P. pastoris*
- ✓ Comparar la producción del anticuerpo scFv 6009F en ambas cepas
- ✓ Determinar el reconocimiento del fragmento por el veneno y la toxina Cn2

## 6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

El vector de expresión pSyn1 (Anexo A) contiene el gen del scFv 6009F que fue donado por el Dr. Baltazar Becerril IBT-UNAM, este vector permite la expresión del segmento clonado bajo el control del promotor *lac*, contiene una etiqueta C-myc y una etiqueta de Histidinas en el extremo C-terminal y contiene una resistencia a ampicilina para la selección (Figura 5 y Tabla 4). Se cortó el fragmento scFv 6009F del plásmido pSyn1 y se insertó en el plásmido pPICZA $\alpha$  para la transformación de las cepas de *P. pastoris*, este plásmido tiene promotor AOX1 inducible por metanol, factor  $\alpha$  como señal de secreción, etiqueta C-myc, etiqueta de histidinas y un gen de resistencia a zeocina (Figura 6 y Tabla 5).

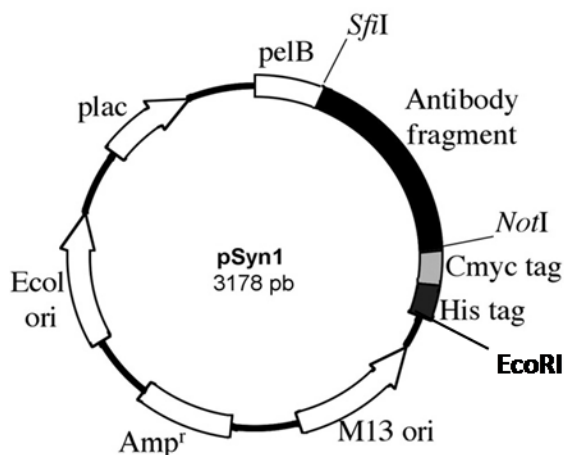


Figura 5. Mapa del plásmido pSyn1.

Tabla 4. Características del plásmido pSyn1.

Característica	Función
<b>Plac</b>	Promotor lac
<b>pelB</b>	Secuencia señal de secreción periplasmica, pectato-liasa B
<b>Antibody fragment</b>	Fragmento 6009F
<b>Cmyc tag</b>	Es una etiqueta de epítipo para la detección de la expresión recombinante.
<b>His tag</b>	Contiene una cola de histidinas que permite la purificación de la proteína mediante el uso de una columna NI-NTA
<b>M13 ori</b>	Origen de replicación del fago filamentoso M13
<b>Amp<sup>r</sup></b>	Confiere resistencia a ampicilina
<b>Ecol ori</b>	Origen de replicación

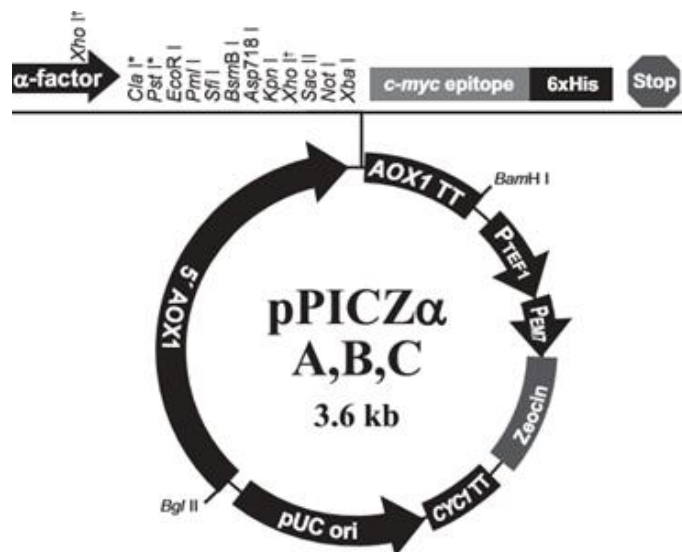


Figura 6. Mapa del plásmido pPICZα.

Tabla 5. Características del plásmido pPICZα.

Característica	Función
<b>AOX1 TT</b>	Terminación de la transcripción y la señal de poliadenilación
<b>TEF1 promoter</b>	Promotor del gen del factor de elongación de transcripción de <i>S. cerevisiae</i>
<b>EM7 (synthetic prokaryotic promoter)</b>	Promotor procariota que dirige la expresión en <i>E. coli</i>
<b>Zeocin</b>	Gen de resistencia a zeocina, permite selección de transformantes
<b>CYC1 TT</b>	Región de terminación de la transcripción
<b>pUC ori</b>	Permite replicación y mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i>
<b>5' AOX1</b>	Contiene el promotor que permite la expresión de alto nivel inducible por metanol del gen de interés en <i>Pichia</i>
<b>MCS</b>	Sitio de multiclonaje contiene señal de secreción del factor α, etiqueta de histidinas y c-myc.

## **6.2 Material biológico**

Se utilizó las cepas químiocompetentes *E. coli* TOP10F para la transformación, propagación y purificación de los plásmidos pSyn1 y pPICZA $\alpha$ . También se utilizaron las cepas KM71 y GS115 de *Pichia pastoris*, ambas cepas utilizadas con vectores de expresión que presentan un genotipo His4 en el caso de KM71 para generar un fenotipo MUT<sup>s</sup> y para GS115 un fenotipo MUT<sup>+</sup>, estas cepas se utilizaron para la transformación con el vector pPICZA $\alpha$  que contiene inserto del fragmento scFv 6009F.

## **6.3 Propagación de los plásmidos**

Para la propagación del plásmido pSyn1 se realizaron células químiocompetentes de *E. coli* TOP10F (Anexo C) y se transformaron de acuerdo al protocolo de Invitrogen (2010), después de la transformación se seleccionó las células transformadas en medio LB (Anexo B1) con 100 mg/ml de ampicilina y 10  $\mu$ g/ml de tetraciclina se crecieron a 37°C por 24 h, de las células seleccionadas se realizó una purificación de plásmido con el Kit Gene JET Plasmid Miniprep. Una vez obtenida la construcción del plásmido pPICZA $\alpha$  las células de *E. coli* TOP10F se transformaron y seleccionaron de la misma forma en medio LB con 25  $\mu$ g/ml del antibiótico de zeocina y 10  $\mu$ g/ml de tetraciclina.

## **6.4 Construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F**

Para la construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F se amplificó el fragmento scFv por medio de oligos específicos a partir del plásmido pSyn1 al cual se le adicionó los sitios de restricción de la enzima EcoR I y la Not I que realiza un corte antes de la tag Cmyc y la cola de histidinas del plásmido pSyn1, una vez obtenido el fragmento que tiene un peso alrededor de 720 pb se visualizó en un gel de agarosa al 0.8% que fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml. Para

la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del scFv 6009F se diseñaron los oligonucleótidos específicos en el extremo 5´ el oligo Forward GTA **GAA TTC** GAG GTG CAG CTG GTG G que contiene el sitio para la enzima EcoRI (GAATTC) y para el extremo 3´ al oligo Reverse **TGC GGC CGC** ACG TTT GA para la enzima Not I (GCGGCCGC) (Tabla 6) lo que permitió realizar la inserción del fragmento al plásmido pPICZA $\alpha$ , para la amplificación del fragmento 6009F por PCR se usaron las condiciones que se muestran en la Tabla 7, en la figura 7 se muestra los sitios en los que amplifican los oligos diseñados a partir del plásmido pSyn 1.

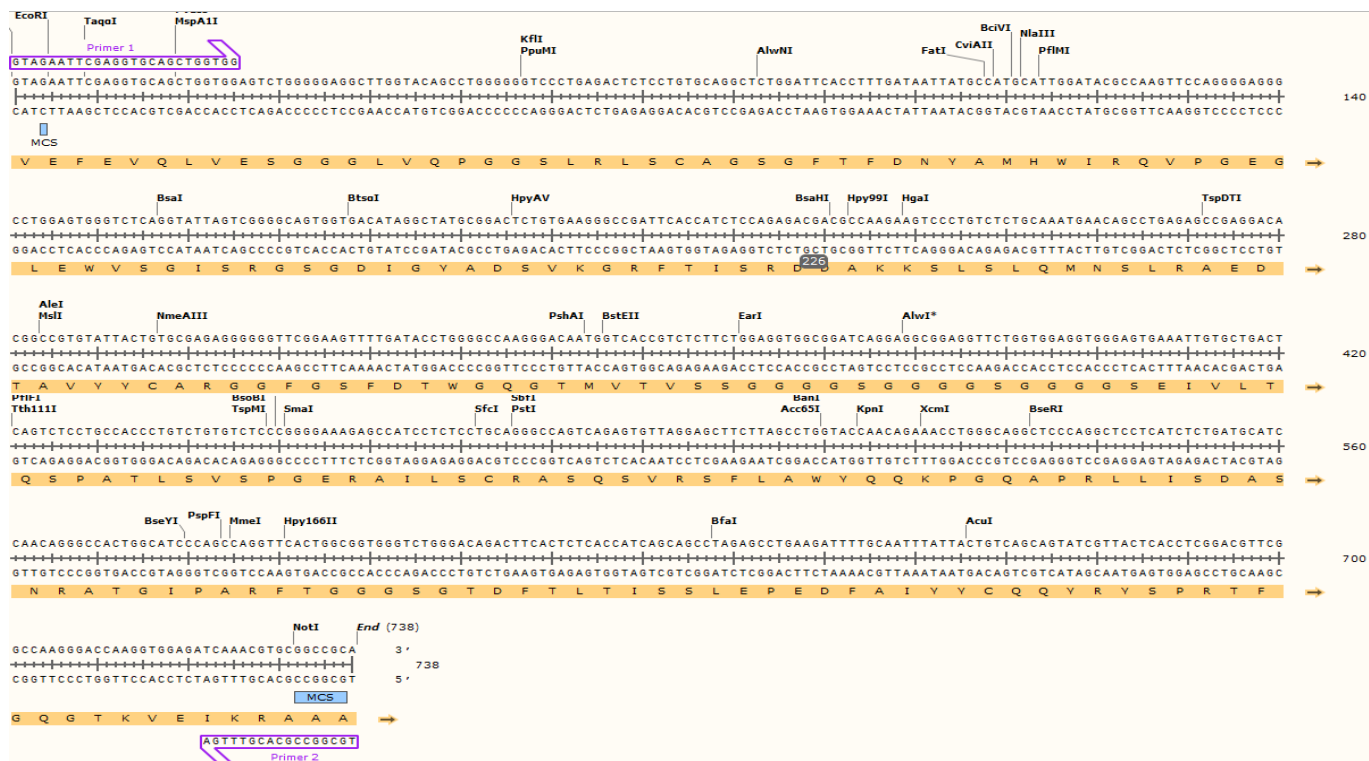
**Tabla 6.** Oligos para la amplificación de scFv 6009F.

Nombre	Oligos	Especificaciones
Fwr	5´GTA <b>GAA TTC</b> GAG GTG CAG CTG GTG G3´	En negritas sitio de restricción EcoRI.
Rev	5´ <b>TGC GGC CGC</b> ACG TTT GA 3´	En negritas sitio de restricción Not I

**Tabla 7.** Condiciones de PCR de amplificación del fragmento 6009F.

Temperatura °C	Tiempo(s)	Ciclos
95	45	1
95	40	
68	35	30
72	60	
72	600	1

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 50  $\mu$ L, la composición del mix de reacción se muestra en la tabla 8.



**Figura 7.** Secuencia del fragmento scFv 6009F con los oligos que se diseñaron para la amplificación del fragmento a partir del plásmido pSyn 1.

**Tabla 8.** Composición del mix de reacción de PCR.

Componente	Volumen (µl)	Concentración
Buffer Taq	5	-
DNTP'S	5	2 mM
Oligo Fw	0.75	1 µM
Oligo Rv	0.75	1 µM
MgCl <sub>2</sub>	5	4 mM
Muestra DNA	3	1 µg
Taq Polimerasa	0.2	1.25 U
Agua	30.3	-

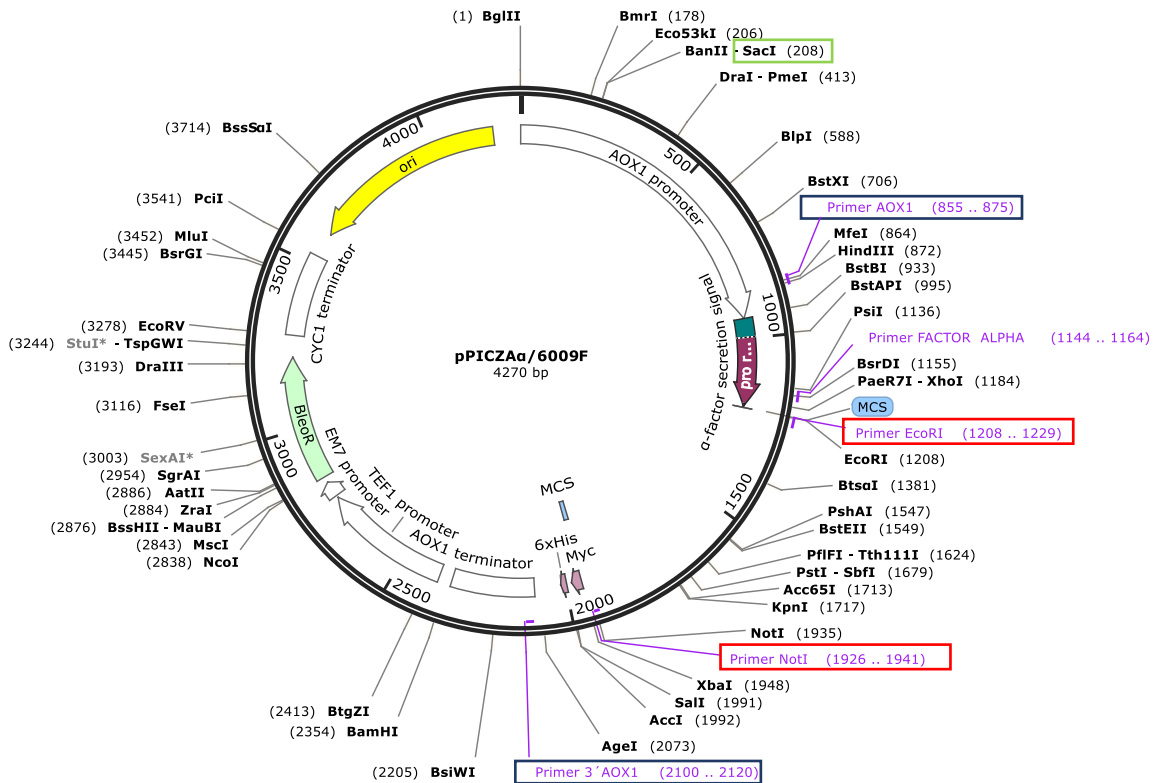
### 6.5 Ligación del fragmento 6009F al plásmido pPICZAα

Para la ligación del fragmento scFv 6009F al plásmido pPICZAα se utilizaron las enzimas de restricción EcoR I y Not I sometiendo a una doble digestión. En el caso

del gen scFv 6009 F para eliminar aquellas bases que se encuentren de más, y en el vector para cortar los segmentos en donde se insertó el gen. La doble digestión se llevó a cabo a 37°C por dos horas, se inactivo a 65°C por 20 minutos y se cuantificó la concentración del fragmento 6009F y del vector para realizar los cálculos que se utilizaron para la ligación los cuales se hicieron con ayuda el servidor NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). Las ligaciones se realizaron con ayuda de la enzima T4 ligase ADN con las proporciones de vector: inserto de 1:3 y 1:5, la reacción se realizó a 16°C por 16 h. Estas ligaciones se transformaron en células químicocompetentes de *E. coli* TOP10F y fueron seleccionadas en placas de agar LB con zeocina (25 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml). Las colonias crecidas se seleccionaron para realizar un PCR de colonia con los oligos específicos del plásmido pPICZAα (Tabla 9) y así rectificar la inserción del fragmento al plásmido. Se envió a secuenciar la construcción pPICZAα/scFv 6009F y una vez confirmada la correcta construcción del plásmido se linealizó por medio de la enzima Sac I para así integrar el plásmido a el genoma de las cepas de *Pichia pastoris*, en la figura 8 se muestran los sitios de amplificación de los oligos, así como el sitio de restricción de la enzima Sac I.

**Tabla 9.** Oligos específicos para el plásmido pPICZAα utilizados en PCR de colonia.

Nombre	Oligos
Fw 5´AOX1	5´-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3´
Rev 3´AOX1	5´-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3´



**Figura 8.** Mapa de construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F, recuadro azul se muestran los oligos que AOX específicos del plásmido, en el recuadro rojo se muestran los oligos que amplifican el fragmento 6009F y en el recuadro verde muestra la enzima de restricción Sac I que ayuda a linealizar el plásmido.

## 6.6 Secuenciamiento

Las clonas obtenidas de la cepa *E. coli* Top10F que contienen la construcción de plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM para la confirmación de la correcta inserción del fragmento 6009F al plásmido y que se encontrara en fase. Las muestras se cuantificaron en el nanodrop y se enviaron con los Oligo Fw y RV del plásmido pPICZA $\alpha$  y con los Oligos Fw y Rv del gen 6009F, una vez obtenidas las secuencias se realizó un análisis BLAST para ser comparada con la secuencia del gen 6009F que se encuentra en la plataforma de NCBI que fue reportada por Riaño-Umbarila *et al.*, 2011.



## **6.7 Transformación de *Pichia pastoris***

La transformación en las cepas de expresión GS115 y KM71 se realizó mediante electroporación (Anexo D) con el plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F linealizado, se utilizó 80  $\mu$ l de células Electrocompetentes de cada una de las cepas y plásmido linealizado, se dio un pulso de 1.5 Volts en el electroporador, después se agregó 1 ml de sorbitol para la recuperación y se incubó por 3 h a 30°C, después de la incubación fueron sembradas en cajas Petri con medio YPD/ Zeocina (100  $\mu$ g/ml) (Anexo B2) y fueron incubadas a 30°C por tres o cuatro días hasta obtener colonias aisladas; el vector linealizado se integró dentro de la región 5'AOX1 del huésped (Invitrogen 2010).

## **6.8 Análisis de las células transformantes de las cepas de *Pichia pastoris***

Para el análisis de confirmación de la integración del gen 6009F de las transformantes de las cepas de *Pichia pastoris* se realizó una extracción de ADN genómico de colonias al azar de cada una de las transformaciones, como control se utilizó colonias transformadas de *P. pastoris* con el vector pPICZA $\alpha$  sin el fragmento 6009F. Una vez realizada la extracción de ADN genómico (Anexo E) de las colonias se corrió un gel de agarosa al 0.8% para verificar la correcta extracción de ADN, el análisis de las células transformadas se realizó por medio de PCR de colonia en el que se utilizó como templado cada una de las extracciones de las colonias obtenidas, se utilizaron los oligos específicos del plásmido pPICZA $\alpha$  (Tabla 9) y las amplificaciones fueron visualizadas en un gel de agarosa al 0.8%.

## **6.9 Expresión del fragmento 6009F en *Pichia pastoris***

Las colonias transformadas de las cepas GS115 y KM71 que contienen el fragmento 6009F se cultivaron en matraces bafleados de 500 ml con 50 ml del medio BMGY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 1% glicerol) (Anexo B4) que contiene glicerol como fuente de carbono, se incubó a 30°C por 24 h en agitación 180 rpm, posteriormente pasadas las 24 h de crecimiento se centrifugó el cultivo a 7,500 rpm por 10 minutos este pellet fue inoculado en 50 ml del medio BMMY (1% extracto de levadura, 2% peptona, 0.5% metanol, 100 mM Buffer fosfatos) pH 6 (Anexo B4) en matraces bafleados de 500 ml con una D.O<sub>600nm</sub> de 2.0 el cual contiene metanol como fuente de carbono e inductor, se incubó a 26°C a 150 rpm durante 96 h. Para la inducción de la expresión se agregó metanol al 1.5 % cada 24 h por cuatro días de incubación tomando muestra de 1 ml a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de las cuales se analizó la expresión de la proteína (Invitrogen 2010).

## **6.10 Purificación del fragmento 6009F**

Una vez que transcurrió las 96 h de expresión se centrifugó el cultivo a 7,500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue concentrado y después dializado utilizando buffer PBS 1x (Anexo F) a 4°C por toda la noche, la purificación se realizó en una columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA (Quiagen, Hilden, Germany) realizando lavados con PBS e imidazol al 30 mM para eliminación del resto de las proteínas que no son la de interés, la proteína de interés contiene una cola de Histidina que tiene alta afinidad con la columna de Níquel, la elución de la proteína se realizó utilizando imidazol al 300 mM.

## **6.11 Electroforesis de proteínas y Western blot**

El análisis de la expresión de la proteína se realizó mediante electroforesis (Anexo G) a cada una de las muestras obtenidas, cada una de las muestras fueron

centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos quedándose solo con el sobrenadante, se cargaron 20  $\mu$ L de muestra junto con 5  $\mu$ L de buffer de carga, estas muestras se sometieron a 100°C por 5 minutos y fueron cargadas en los geles de SDS al 12.5 %. La electroforesis se realizó a 60 V mientras las muestras migraban en el gel concentrador, después a 120 V hasta que las muestras llegaron al límite inferior del gel separador, posteriormente los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

Para la realización del Western blot se realizaron dos geles SDS para la separación de proteínas mediante electroforesis, uno que se utilizó para llevar a cabo la transferencia a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel y el otro que fue teñido con azul de Coomassie. Para llevar a cabo la transferencia se utilizó una membrana de nitrocelulosa a la cual se le colocó el gel de poliacrilamida, ambos elementos fueron colocados entre papel filtro el cual fue humedecido con buffer de transferencia y las proteínas fueron transferidas por electroforesis en la cámara de transferencia que tuvo una duración de 20 minutos con un voltaje de 20 V, una vez llevada a cabo la transferencia se incubó con el anticuerpo anti-His de conejo con buffer TBST 1x y leche polvo al 0.5 % por toda la noche, posteriormente se realizaron lavados con buffer TBST, y se reveló con TMB peroxidasa colocándolo sobre la membrana durante unos segundos hasta obtener el desarrollo de las bandas.

## **6.12 Evaluación de reconocimiento de scFv 6009F frente a Cn2**

Después de la purificación de la proteína se procedió a la evaluación de reconocimiento del fragmento 6009F frente a la toxina Cn2 y veneno completo de *Centruroides noxius* y el veneno completo de *C.limpidus* mediante una placa de ELISA con 0.5  $\mu$ g de toxina en buffer de carbonatos (pH 9.5) que se incubó durante toda la noche a 4°C, después se realizaron tres lavados con NaCl/Pi y Tween (0.1% v/v), se bloqueó con 0.5 % (p/v) BSA en NaCl/Pi por 2 h a 37°C (Riaño-Umbarila *et al.*, 2005), se colocó el scFv 6009F obtenido de la expresión de la cepa GS115/pPICZA $\alpha$ /6009F en una relación 1:10 toxina:anticuerpo el cual se incubó por

2 h a 37°C, la detección se realizó con Anti-myc-HRP Antibody y con Anti-his (Invitrogen™).

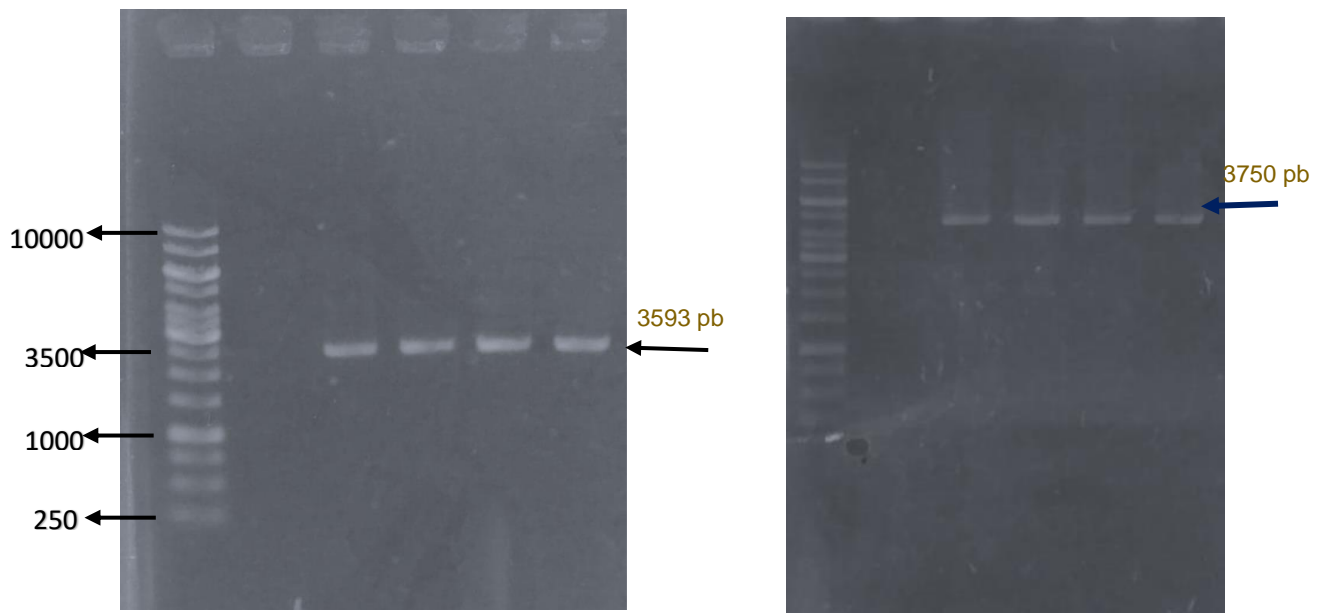
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Propagación de los plásmidos

En la figura 9A y 9B se observa las colonias crecidas en medio LB de los plásmidos pSyn1 y pPICZA $\alpha$ . Se realizó una purificación de cada plásmido tomando colonias crecidas de cada uno de los cultivos, en la figura 10 se observa el gel de agarosa al 0.8% con los resultados de la purificación del plásmido pSyn1 y pPICZA $\alpha$  respectivamente, se observa en el carril 1 el marcador de PM Gene ruler 1 Kb, las muestras de interés en los carriles 2,3 y 4 para el caso del plásmido pSyn 1 con un peso de 3178 pb y para el plásmido pPICZA $\alpha$  3593 pb.



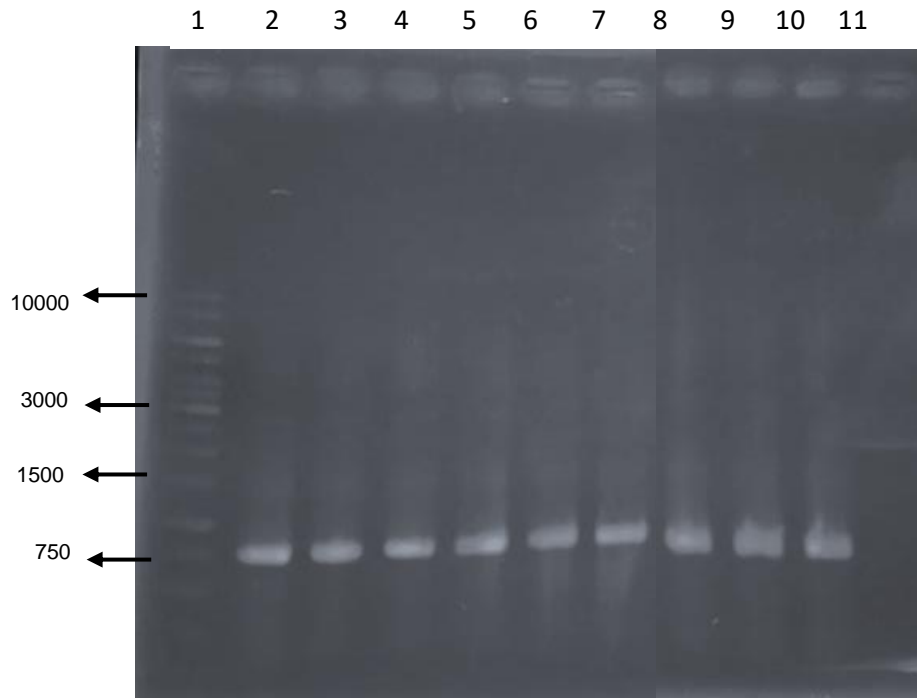
**Figura 9.** Crecimiento de células *E. coli* transformadas con plásmido A) pSyn1, B) pPICZA $\alpha$ .



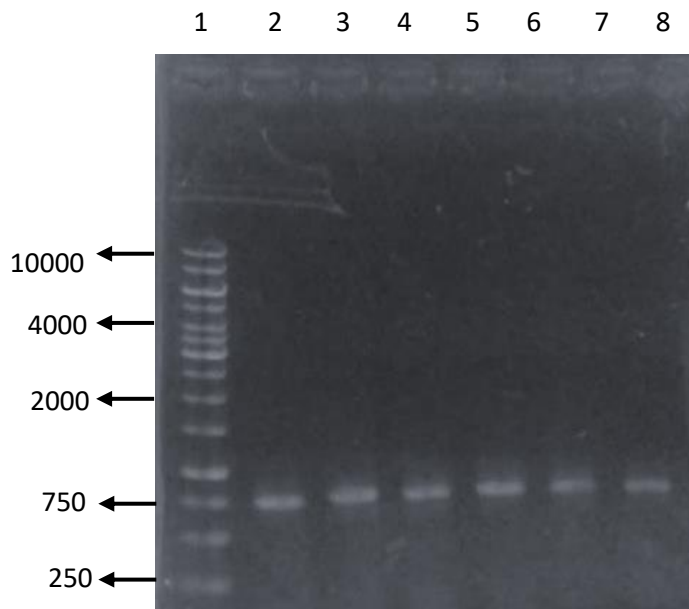
**Figura 10.** Geles de agarosa en el que se muestran las bandas correspondientes a la purificación de los plásmidos a) pPICZAα y b) pSyn1

## 7.2 Amplificación del fragmento 6009F

El plásmido pSyn1 purificado se utilizó para amplificar el fragmento 6009F con los oligos que se diseñaron para añadir las secuencias que corresponden a los sitios de las enzimas de restricción EcoR I y Not I (Tabla 7). Los geles en el que se visualiza la banda correspondiente a la amplificación del fragmento 6009F se muestran en la figura 11, en el carril 1 el marcador de PM de 1 kb y en los carriles del 2 al 10 la banda que corresponde a la amplificación del fragmento scFv 6009F que tiene un peso de 738 pb. Cabe mencionar que no se visualizan bandas inespecíficas lo que demuestra que los oligos no están amplificando otras regiones del plásmido y si la correspondiente al fragmento 6009F. Una vez confirmada la amplificación del fragmento se purificaron las muestras usando el Kit de GenJET para eliminación de restos de la reacción de PCR. El resultado se muestra en la figura 12 en el carril 1 se puede observar el marcador de peso molecular, carril 2 al 8 las muestras de purificación con el kit de PCR.



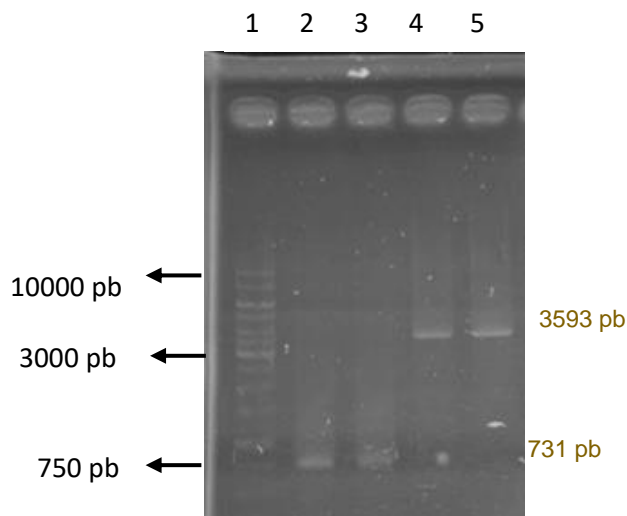
**Figura 11.** Gel de agarosa al 0.8% en el que se visualiza la amplificación del gen 6009F, la banda corresponde al peso de 738 pb.



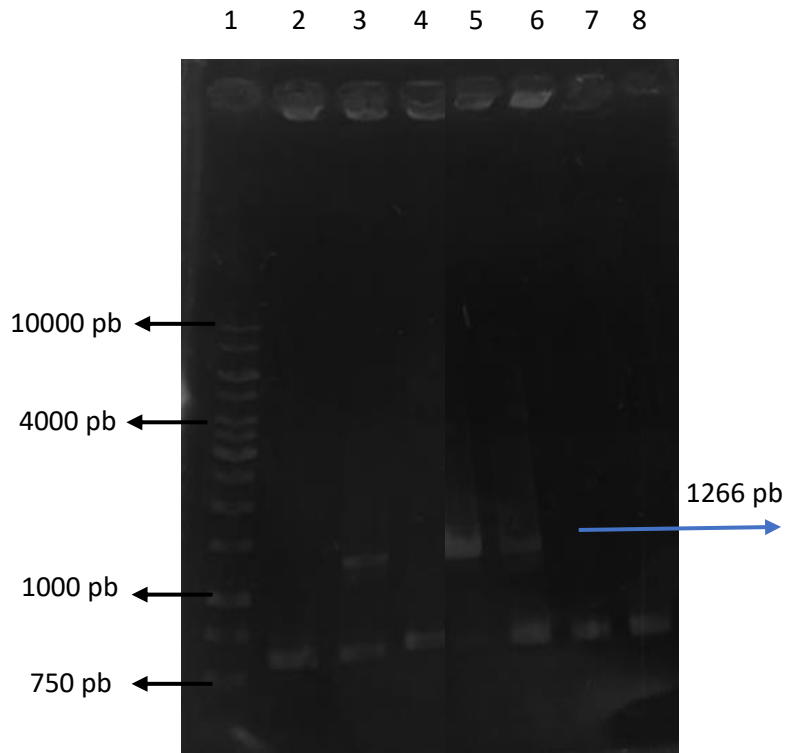
**Figura 12.** Gel de agarosa se puede visualizar la purificación del gen scFv 6009F con el kit de PCR.

### 7.3 Ligación del fragmento 6009F al plásmido pPICZA $\alpha$

Una vez obtenido el fragmento y el plásmido pPICZA $\alpha$  purificado se sometieron a una doble digestión usando las enzimas de restricción EcoR I y Not I. Se realizó la doble digestión a 37°C por dos horas y se inactivó a 65°C por 20 minutos, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% para observar que las muestras se encuentren en buen estado, en el carril 1 se muestra el marcador de PM de 1 Kb, en los carriles 2 y 3 doble digestión del fragmento 6009F, carril 4 y 5 doble digestión del plásmido ver Figura 13. Después de la doble digestión de la amplificación del fragmento 6009F y del vector pPICZA $\alpha$  se cuantificó la concentración en el nanodrop obteniendo del fragmento 6009F 60 ng/ $\mu$ l y del vector pPICZA $\alpha$  25 ng/ $\mu$ l, datos que se utilizaron para la ligación. De las colonias crecidas se seleccionaron algunas para realizar un PCR de colonia, los resultados del PCR de colonia dieron como positivo tres clonas que tienen la construcción pPICZA $\alpha$ /scFv 6009F esperada de 1266 pb, que corresponde al número de pares de bases del fragmento scFv 6009F = 731 pb más 535 pb que corresponde a la amplificación del vector que abarca parte del promotor AOX del plásmido, factor alpha y terminador (Figura 14).



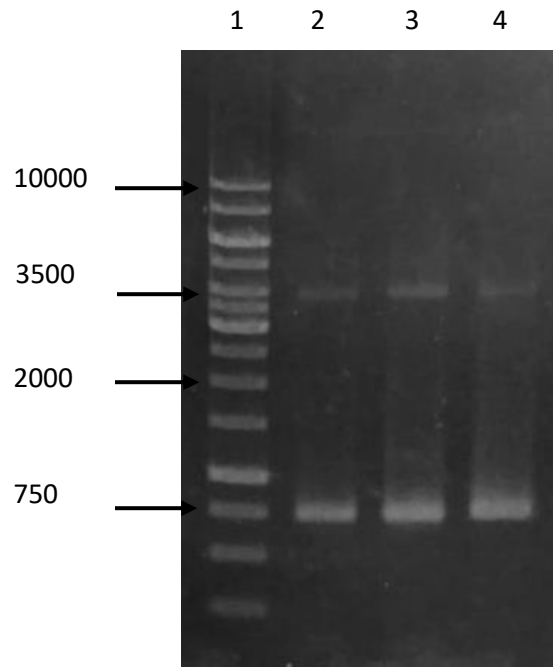
**Figura 13.** Doble digestión de amplificación del fragmento 6009F y del plásmido pPICZA $\alpha$ .



**Figura 14.** Gel de agarosa con muestras de PCR de colonia, se muestra la amplificación de la banda que corresponde a 1266 pb en los carriles 3,5 y 6.

Las clonas que dieron positivo a la amplificación se purificaron con el Kit Gene JET Plasmad Miniprep y se utilizaron para realizar una doble digestión con las enzimas Not I y EcoR I, para visualizar la liberación del fragmento de la construcción (Figura 15). En el gel se puede observar en el carril 1 el marcador de PM, en los carriles 2,3 y 4 las muestras de la doble digestión en el que se puede ver la liberación del gen 6009F con un peso de 731 pb y el peso del plásmido sin el inserto que es 3593 pb.





**Figura 15.** Gel de doble digestión para visualizar la liberación del fragmento 6009F de la construcción obtenida con el plásmido pPICZA $\alpha$ .

#### 7.4 Secuenciamiento

En la figura 16 se presenta el alineamiento que se realizó con la secuencia que se obtuvo de las clonas transformadas con la construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F, una vez obtenida la secuencia completa se realizó un BLAST (Figura 16) en el cual se obtuvo una identidad del 100% respecto a la secuencia del gen scFv 6009F reportada en NCBI por Riaño-Umbarila y colaboradores en el 2011.

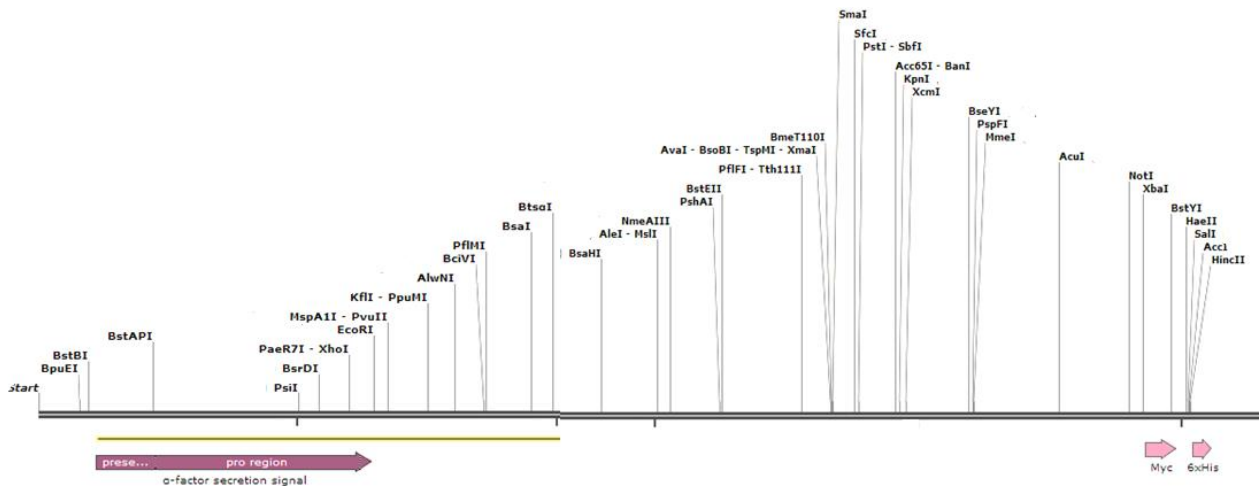
Con ayuda del programa snap gene se rectificó que la secuencia del fragmento 6009F esté integrada en fase y no tenga mutaciones en el plásmido pPICZA $\alpha$  (Figura 17).

single chain Fv antibody 6009F, partial [synthetic construct]  
 Sequence ID: [AAX11169.1](#) Length: 240 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 240 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
484 bits(1245)	3e-172	Compositional matrix adjust.	240/240(100%)	240/240(100%)	0/240(0%)
Query 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFDNYAMHWIRQVPGEGLWVSGISRGSGDIGY			60	
Sbjct 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFDNYAMHWIRQVPGEGLWVSGISRGSGDIGY			60	
Query 61	ADSVKGRFTISRDDAKKSLSLQMNLSRAEDTAVYYCARGGFGSFDTWGQGTMTVSSGGG			120	
Sbjct 61	ADSVKGRFTISRDDAKKSLSLQMNLSRAEDTAVYYCARGGFGSFDTWGQGTMTVSSGGG			120	
Query 121	GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGERAILSCRASQSVRSFLAWYQQKPGQAPRLLI			180	
Sbjct 121	GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVSPGERAILSCRASQSVRSFLAWYQQKPGQAPRLLI			180	
Query 181	SDASNRTGIPARFTGGGSGTDFTLTISLLEPEDFAIYYCQYRYSPTFGQGTKEIKR			240	
Sbjct 181	SDASNRTGIPARFTGGGSGTDFTLTISLLEPEDFAIYYCQYRYSPTFGQGTKEIKR			240	

**Figura 16.** Alineamiento de la secuencia obtenida de la construcción pPICZA $\alpha$ /6009F con el fragmento scFv 6009F reportada por Riaño-Umbarila *et. al* 2011

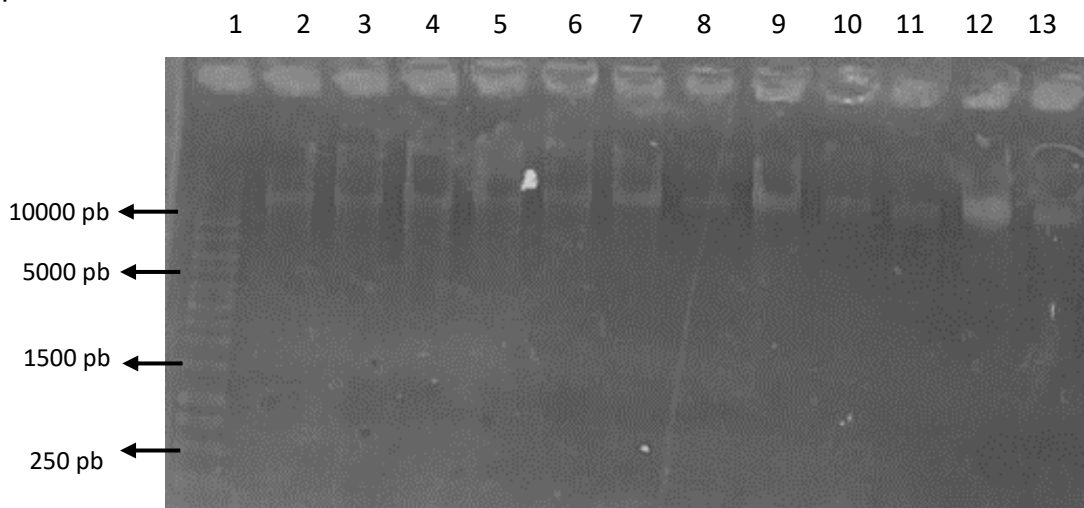


**Figura 17.** Secuencia de la construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F

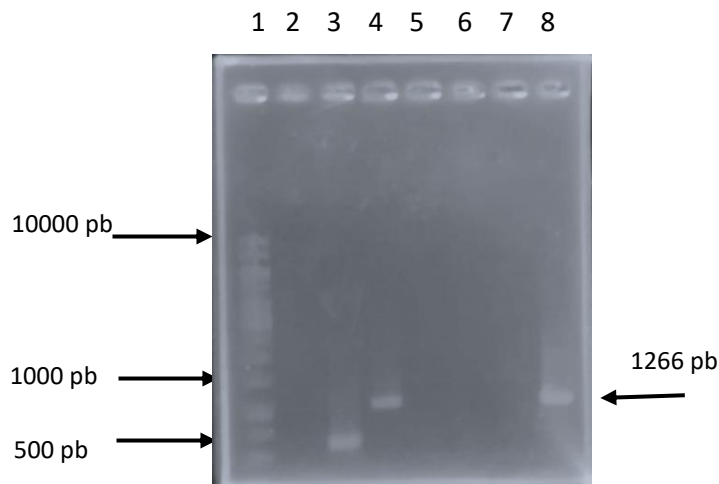
## 7.5 Transformación de las cepas KM71 y GS115 de *Pichia pastoris*

Se realizó la transformación de la cepa GS115 y KM71 con la construcción del plásmido linealizado pPICZA $\alpha$ /6009F con una concentración de 1.2  $\mu$ g/ml para ambas cepas, se obtuvieron colonias crecidas al tercer día de las cuales se realizó extracción genómica para obtener el DNA las cuales se pueden visualizar en la figura 18, en el carril se encuentra el marcador de PM, en los carriles del 2 al 7

muestras de extracción genómica de clonas transformadas de la cepa KM71 y en los carriles del 8 al 13 las muestras de extracción genómica de las clonas transformadas de la cepa GS115, una vez que se obtuvo la extracción genómica se realizó un PCR de colonia con los oligos del plásmido pPICZA $\alpha$ . Se obtuvo la amplificación de una clona positiva para ambas cepas que se puede visualizar en la figura 19, en el carril 1 se encuentra el marcador de PM, en los carriles 2, 5, 6 y 7 clonas que no amplificaron, en el carril número 3 el control negativo, en los carriles 4 y 8 las clonas positivas de KM71 y GS115 respectivamente con un peso de 1266 pb.



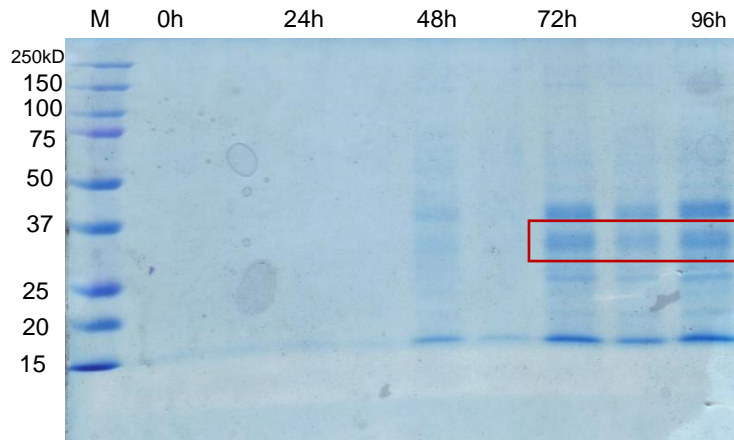
**Figura 18.** Gel de agarosa en el que se visualiza la extracción genómica de las cepas transformadas de KM71 y GS115.



**Figura 19.** Amplificación positiva de la transformación de las cepas *Pichia pastoris* GS115 y KM71.

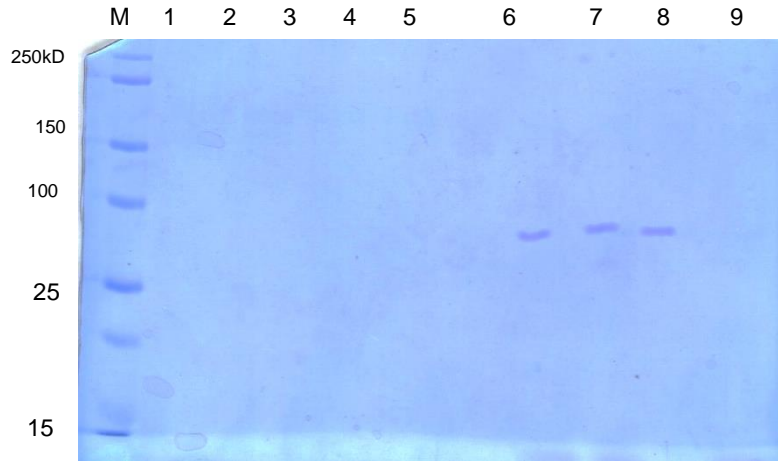
## 7.6 Expresión y purificación del fragmento 6009F en *Pichia pastoris*

Se realizaron varios experimentos de expresión hasta obtener la proteína scFv 6009F soluble y pura. Se evaluó la expresión de la cepa *P. pastoris* GS115 en unos matraces bafleados de 500 ml con 50 ml del medio BMMY. Los cultivos se incubaron a 30, 28 y 26 °C a 150 y 250 rpm. La primera expresión se llevo a cabo a 30 °C y 250 rpm por 96 h induciendo con metanol al 0.5 % cada 12 h. En la figura 20, se presenta un gel de SDS al 12.5 % con las muestras obtenidas cada 24 h en el que se observó la expresión del scFv a partir de las 48 h hasta las 96 h, con un peso aproximado de 28 kDa.



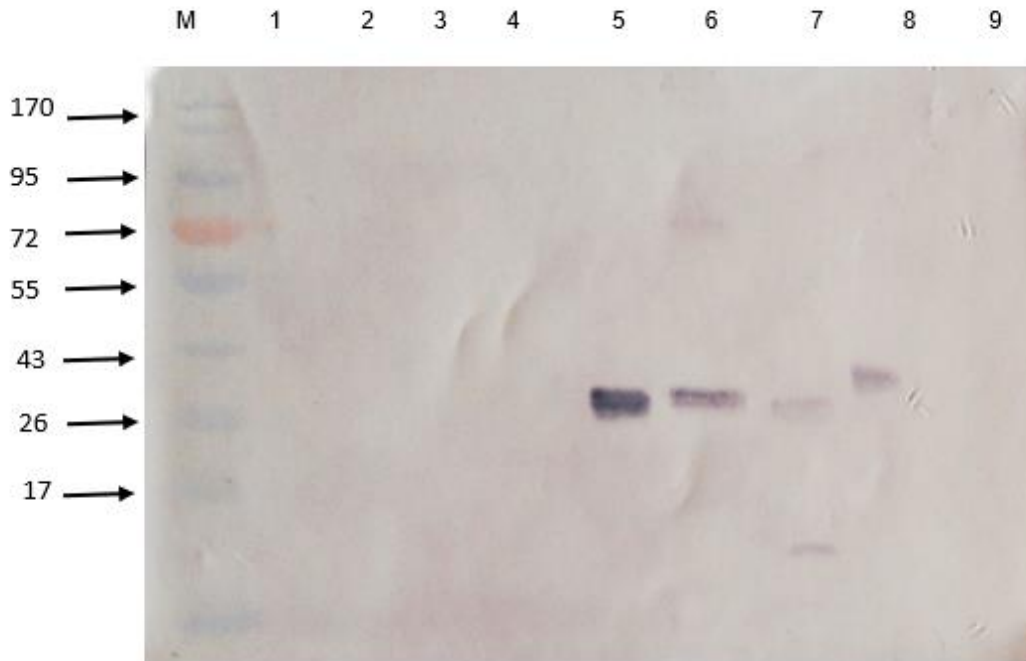
**Figura 20.** Gel SDS al 12.5 % de la cepa GS115 en el que se ve la expresión de la proteína cada 24 h.

Una vez observada la expresión de la proteína se concentraron y después se dializaron los sobrenadantes con buffer PBS 1x, posteriormente se purificaron en la columna de Níquel. En la figura 21, se observan en un gel SDS PAGE mostrando los resultados de la purificación, las eluciones con la proteína de interés scFv 6009F se pueden observar en los carriles 6, 7 y 8 la elución se realizó con 300 mM de Imidazol.



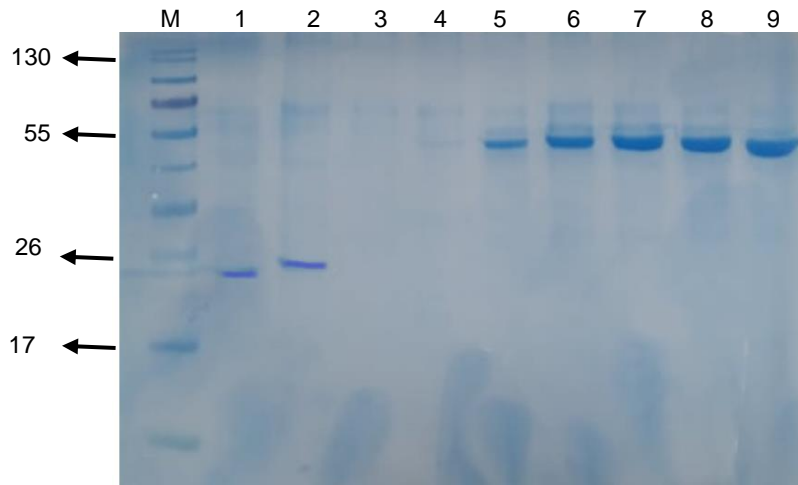
**Figura 20.** Gel de acrilamida en el que se observa la proteína 6009F purificada.

Una vez que se logró observar la purificación de la proteína se hizo un Western Blot y se reveló con anticuerpo anti-His para confirmar a la proteína de interés scFv 6009F. Los resultados del Western Blot se muestran en la figura 21, en el carril 1 y 2 muestra de pellet de la construcción en *Pichia pastoris* KM71/pPIC3.5/6009F y GS115/pPIC3.5/6009F como control (Daniela López), en los carriles 3 y 4 las muestras de sobrenadante de la construcción KM71/pPIC3.5/6009F y GS115/pPIC3.5/6009F como control (Daniela López), en los carriles 5 y 6 muestras de purificación de la construcción *P. pastoris* KM71/pPIC9/6009F como control (Mariel Adame), en el carril 7 se encuentra la muestra de sobrenadante construcción *P. pastoris* GS115/pHIL-S1/6009F como control (Fernando Guzmán), en el carril 8 se encuentra la muestra de purificación de expresión de la cepa GS115 con las construcción de plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F. Las muestras de los carriles 5, 6 y 8 tienen un PM arriba de 28 kDa por lo que se supone que podrían estar glicosiladas en comparación con la muestra del carril 7 con PM de 28 kDa que no parece estar glicosilada por último se encuentra la muestra del sobrenadante de la expresión en la construcción de *P. pastoris* X-33 pPICZA $\alpha$ /6009F, parece ser que no reconoce el Anti-his, lo que sugiere que podría haber perdido la tag de His o no esta disponible para el reconocimiento.

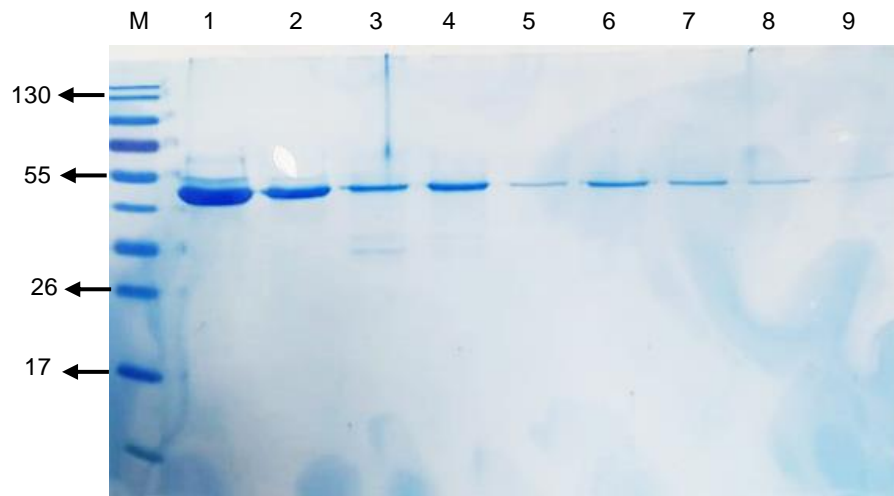


**Figura 21.** Membrana de Western blot en el que se visualiza el reconocimiento de la proteína 6009F con el anticuerpo Anti-his en el carril 8,

Una vez que se observó la expresión de la proteína en el sobrenadante del medio de cultivo en estas condiciones, se procedió a realizar otro cultivo expresar el scFv 6009F, se utilizó matraces bafleados de 500 ml con 50 ml del medio BMMY, se incubaron 28°C a 250 rpm, induciendo con metanol al 1 % cada 24 h para observar si aumentaba la expresión de la proteína. En gel de la figura 22, se muestran los resultados en el carril 1 tenemos la muestra concentrada y dializada, en el carril 2 es la muestra recirculante al pasarla por la columna de Niquel, en los carriles del 3 al 9 son lavados de PBS e imidazol 25 mM, en donde se observa la proteína por debajo del PM de 26 kDa, en la figura 23 se muestra el gel SDS en el que cargo las eluciones con imidazol 300 mM en los carriles del 1 al 9 en el que se observa unas proteínas con el peso aproximado de 50 kDa que no pertenece al peso correspondiente a la proteína scFv 6009F, por lo que no hay presencia de la proteína scFv 6009F, se piensa que la proteína no contiene el tag de histidinas o no se encuentra accesible por lo que no se puede purificar la proteína, también se realizó un Western blot para rectificar el reconocimiento mediante el anticuerpo anti-his.



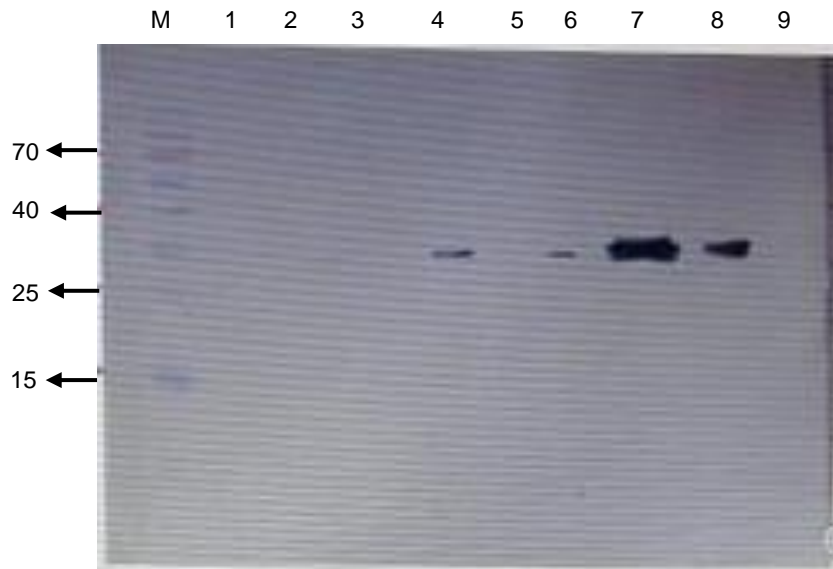
**Figura 22.** Gel de SDS 12.5% en el que se muestra la expresión con las segundas condiciones de la proteína scFv 6009F.



**Figura 23.** Gel de SDS 12.5% que contiene las muestras de elución 300 mM de la purificación.

En la figura 24 se muestra la membrana del Western blot realizado con las muestras obtenidas de la expresión con las condiciones de 28°C y 250 rpm, en el carril 1 se colocó la muestra correspondiente al circulante de la cepa GS115/pPICZA $\alpha$ /6009F, en el carril 2 se colocó la muestra de sobrenadante de la cepa GS115 con la misma construcción obtenida a las 96 h de expresión, en el carril 3 se encuentra la proteína expresada con la construcción de la cepa KM71/pPICZA $\alpha$ /6009F de sobrenadante

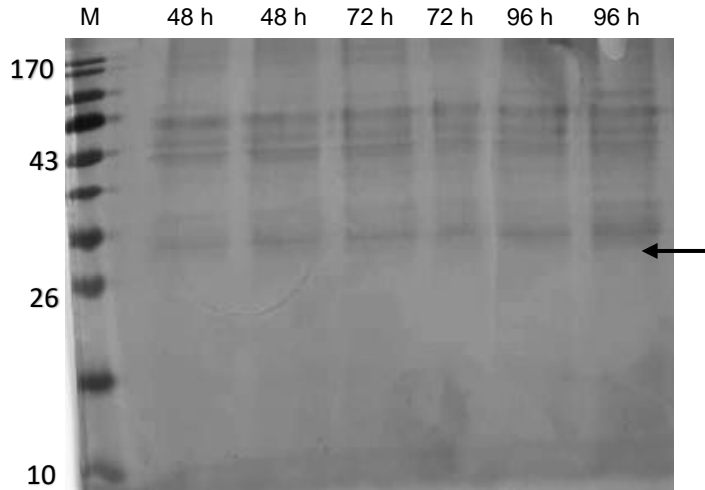
a las 96 h, en el carril 4 se encuentra como control la proteína expresada a partir de la cepa *E. coli* TG1, en el carril 5 y 6 muestras de pellet de la construcción obtenida de *P. pastoris* KM71/pPIC3.5/6009F como control, en el carril 7 la muestra de sobrenadante de la construcción de la cepa KM71/pHIL-S1/6009F como control, en el carril 8 la muestra obtenida del sobrenadante de la expresión de la proteína obtenida a partir de la construcción de la cepa KM71/pPIC9/6009F como control y por último la muestra de sobrenadante de la expresión obtenida con la construcción de la cepa X-33/pPICZA $\alpha$ /6009F; por lo que al no ver reconocimiento de las proteínas con el anti-His se confirma que las proteínas no cuentan con el tag de His y por lo cual no puede ser purificada por medio de la columna de Niquel.



**Figura 24.** Membrana de Western blot de las muestras de la segunda expresión del fragmento scFv 6009F.

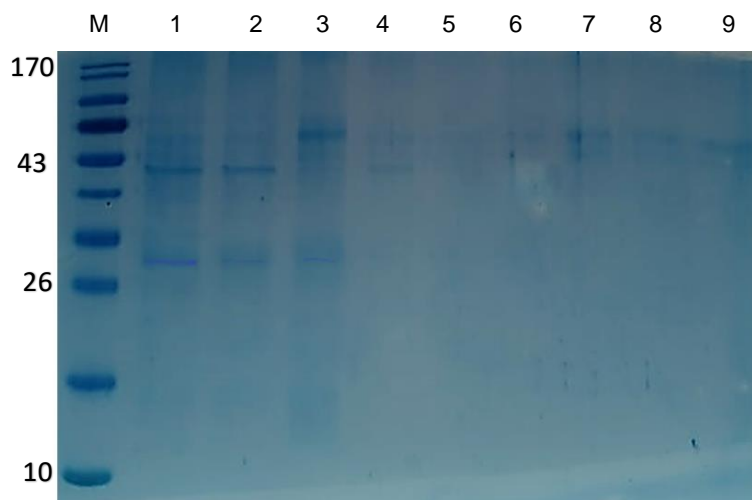
Por último se presentan los geles SDS de la expresión de la cepa GS115/pPICZA $\alpha$ /6009F en matraces bafleados de 500 ml con 50 ml del medio BMMY que se incubó a 26°C en incubadora orbital a 150 rpm, la expresión se llevó a cabo por 96 h induciendo con metanol al 1% cada 24 h, en la figura 25 se presenta el gel SDS de las muestras tomadas cada 24 h a partir de las 48 h.





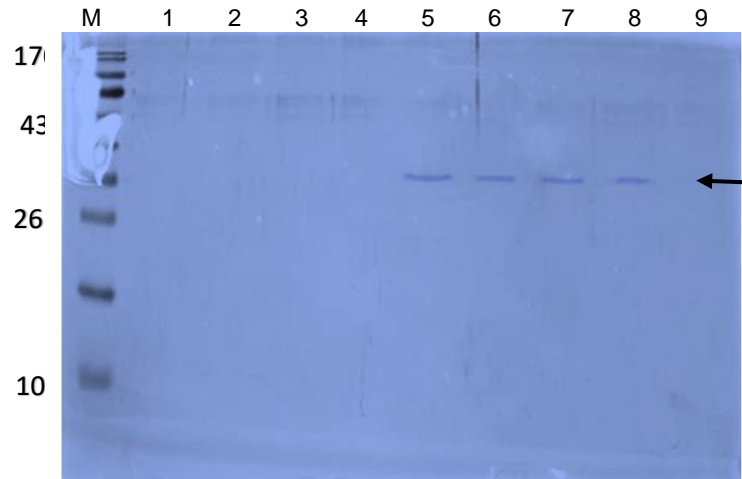
**Figura 25.** Gel de acrilamida en el que se muestra la producción de la proteína scFv 6009F tomada cada 24 h.

Una vez que se visualizó la producción de la proteína scFv en el de las muestras tomada cada 24 h, se concentró y se dializo la muestra a 4°C por toda la noche con buffer PBS 1x, en la figura 26 se muestra el gel de SDS con las muestras de la purificación por la columna de Níquel, en el carril 1 se encuentra la muestra dializada, en el carril 2 la muestra de circulante, en el carril 3 muestra de lavado con PBS, en los carriles del 4 al 9 se encuentran las muestras que corresponden a lavado con imidazol al 25 mM.



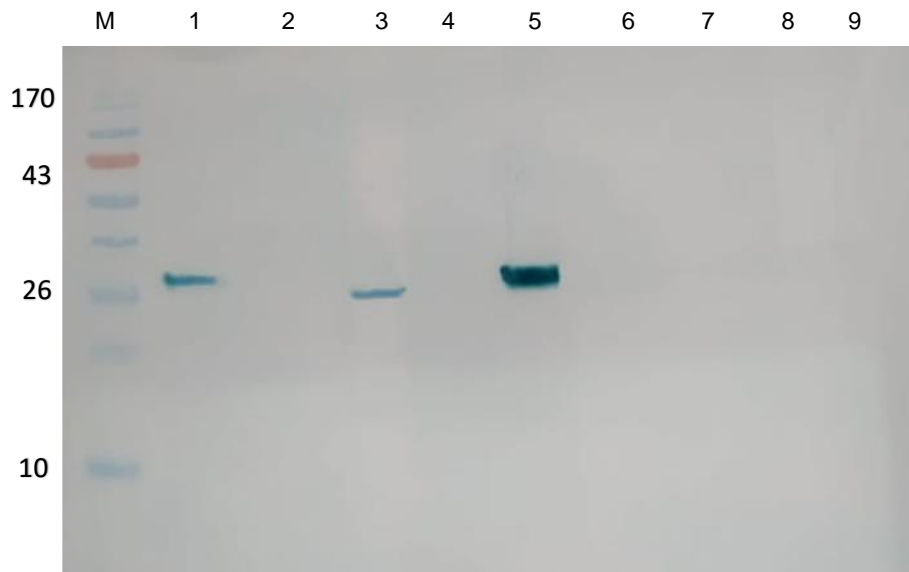
**Figura 26.** Gel de SDS en el que se observan las muestras de la purificación por columna de níquel del sobrenadante de la cepa GS115.

En la figura 27, se presenta el gel de SDS con las muestras de elución con imidazol 300 mM en el que se observa la proteína scFv 6009 purificada con un peso aproximado de 28 kDa.



**Figura 27.** Gel de acrilamida en el que se muestra la proteína scFv 6009F purificada con un peso de 28 kDa.

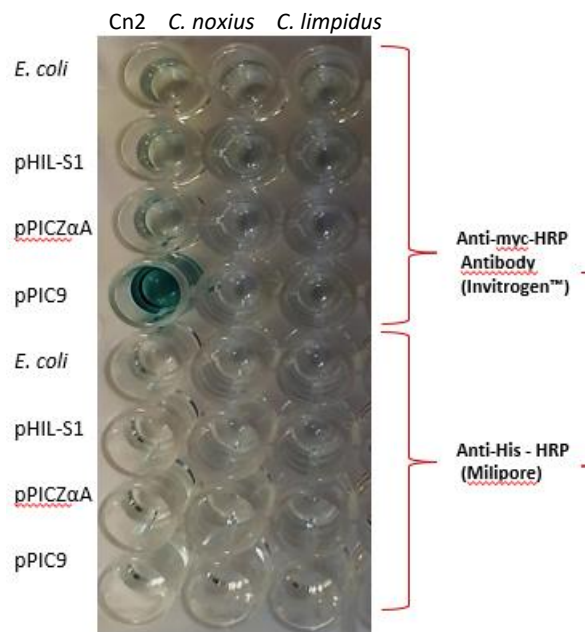
Una vez que se logró visualizar la proteína purificada se realizó un Western blot para confirmar que se trata del fragmento 6009F, se reveló con el anticuerpo Anti-his para la confirmación de la proteína, en la figura 28 se puede visualizar la membrana del Western blot en el carril 1 se muestra el reconocimiento positivo de la proteína purificada scFv 6009F obtenida a partir de la cepa GS115 con la construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F, en el carril 3 se muestra el reconocimiento positivo de la proteína purificada del fragmento 6009F obtenida a través de la expresión de *E. coli* TG1 con el plásmido pSyn 1 como control, en el carril 5 se muestra el reconocimiento positivo de la proteína obtenida a partir de la cepa KM71 con la construcción del plásmido pPIC9/6009F como control y en los carriles 2,4,6,7 y 8 son muestras que se obtuvieron de la expresión de la proteína con otras cepas y construcciones de plásmido como control que no presentaron reconocimiento con el anticuerpo Anti-his.



**Figura 28.** Membrana de Western blot en el que se visualiza el reconocimiento de la proteína con el anticuerpo Anti-his en el carril 1.

### 7.7 Evaluación de reconocimiento de scFv 6009F frente a Cn2

En la figura 29 se muestra la placa de Elisa que se realizó para determinar el reconocimiento del anticuerpo scFv 6009F obtenido de la expresión de la cepa *P. pastoris* GS115 con la construcción pPICZA $\alpha$ /6009F contra la toxina y el veneno completo de *C. noxius* y el veneno completo de *C. limpidus*, en el que se observa que solo tiene reconocimiento la proteína control obtenida de la construcción KM71/pPIC9/6009F, probablemente por tener el correcto plegamiento que le ayuda al reconocimiento de la toxina Cn2 del alacrán *C. noxius*.



**Figura 29.** Placa de Elisa de reconocimiento de la toxina Cn2, veneno de *C. noxius* y *C. limpidus* contra las proteínas scFv 6009F obtenidas en el grupo de trabajo.

## 8. DISCUSION

Se obtuvo la construcción del plásmido pPICZAα/6009F lo que permitió expresar el fragmento scFv 6009F en *P. pastoris* GS115 y KM71 que son inducibles por metanol para la expresión de proteínas la primera de bajo consumo y la segunda de alto consumo. Con estas construcciones se realizaron varias expresiones en 50 ml de medio de cultivo usando matraces bafleados de 500 ml. Además, se varió la agitación entre 150 y 250 rpm, así como, la temperatura de incubación de 30, 28 y 26 °C. En la primera condición de expresión en matraz bafleado de 500 ml con 50 ml de medio de cultivo a 30 °C y 250 rpm, se obtuvo proteína glicosilada y se detectó la presencia del scFv 6009 por cola de His. Debido a la posible glicosilación que presenta el scFv 6009 F podría cambiar el reconocimiento por el ligando la toxina Cn2, además las manosas pueden ser inmunogénicos, por lo cual glicoproteínas derivados de levaduras pueden ser inadecuadas como agentes terapéuticos. Sin embargo, en caso de estar glicosiladas existen algunos métodos que podría ayudar

a la desglicosilación, Ezzine *et al.* (2012) reportan la expresión de un nanocuerpo en la cepa de X-33 con el plásmido pPICZA $\alpha$ , al realizar el gel de acrilamida se observó un aumento en el PM de 15 kDa a un peso aproximadamente de 23 kDa, en el cual se reportó que el peso adicional podría atribuirse a la adición de una N-glicosilación posterior a la traducción, debido a esto realizaron una desglicosilación enzimática con PNGasa-F con la cual obtuvieron el peso esperado de 15 kDa..

En la segunda condición se usaron matraces bafleados de 500 ml con 50 ml de medio de cultivo y se disminuyó solo la temperatura a 28°C, se obtuvo la proteína sin glicosidar, pero no se detectó con el anticuerpo anti His, lo que sugiere un procesamiento proteolítico que remueve el tag de His o porque la proteína pudo haber sido degradada por proteólisis a tiempos largos de producción durante la fase estacionaria de crecimiento, otra razón es que esta la proteína pero al no tener el tag de His accesible al anticuerpo no lo reconoce. Amhad *et al.*, 2014 y Zahrl *et al.*, 2017 reportaron que quizá se esté expresando una proteasa que remueve la cola de histidinas o puede ser que la forma de plegarse de la proteína no deje accesibles el sitio de la cola de Histidina. Sinha *et al.*, en el 2004 reportaron que el estrés oxidativo provocado por el metabolismo de metanol en la biomasa y como inductor, es probable que afecte el crecimiento celular, provocando una actividad de proteasas elevada, estos autores evaluaron la actividad proteolítica durante la expresión de un interferón ovino, utilizando cultivos con dos fuentes de carbono distintas, metanol y glicerol, reportan que en ambos cultivos existen las mismas proteasas pero en metanol están en mayor cantidad debido a la acción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el formaldehído. El problema de usar estas condiciones es que, aunque se puede ver la proteína en geles de SDS no se puede purificar ni cuantificar. En nuestro grupo de investigación estamos produciendo un anticuerpo de conejo anti scFv 600F para poder cuantificar la producción de proteína. Al expresar en matraz bafleado de 500 ml con 50 ml de medio de cultivo a la temperatura a 26 °C y agitación a 150 rpm, se logró obtener la mayor cantidad de proteína y se puede reconocer por Western Blot con el anti His con un PM de 28 kD correspondiente al scFv 6009 lo que sugiere que no está glicosidada, en ninguna de las cepas de *P. pastoris*.

Además, se puede purificar por columna de Ni, es soluble, se obtuvieron 40mg/L de proteína pura 36,3 veces más proteína que en *E. coli* 1.1 mg/L y el anticuerpo reconoce a la toxina Cn2 y al veneno completo de *C. noxius* y *C. limpidus*.

## 9. CONCLUSIONES

- Se obtuvo la construcción del plásmido pPICZA $\alpha$ /6009F, así como también su correcta transformación en las cepas KM71 y GS115 de *Pichia pastoris*.
- Se expresó la proteína 6009F en la cepa de GS115 y KM71 en el matraz de 500 ml con 50 ml en medio BMMY a 150 rpm y 26 °C
- La proteína se encuentra soluble en el sobrenadante y en buffer PBS.
- Fue posible la purificación de la proteína a través de la columna de níquel lo que indica que tiene cola de Histidinas y no sufrió glicosilación, ni procesamiento proteolítico, en *P. pastoris* GS115 y KM71.
- Fue posible reconocer la proteína por medio de un Western blot lo que confirma la producción de este anticuerpo por el sistema de expresión en *Pichia pastoris*.
- Se obtuvieron 40 mg/L del anticuerpo scFv 6009F puro expresado en cada una de las cepas *Pichia pastoris* GS115 y KM71, por lo que en este caso no hubo diferencia significativa con estos sistemas.
- El anticuerpo scFv 6009F producido en ambas cepas de *Pichia pastoris* GS115 no fue capaz de reconocer a la toxina Cn2, los venenos de *C. noxius* y *C. limpidus*

## 10. PERSPECTIVAS

- Determinar la glicosilación del scFv que se obtuvo glicosilado
- Realizar análisis de Dicroísmo circular para comparar el plegamiento de las proteínas con los de Mariel Adame cuya proteína de *P. pastoris* expresada en KM71 tiene el mayor reconocimiento de la toxina Cn2
- Mejorar los ensayos de reconocimiento del anticuerpo scFv 6009F a partir de la expresión de la cepa KM71 ante la toxina Cn2.
- Escalar la expresión de la proteína en ambas cepas de *P. pastoris* en el tanque agitado.
- Evaluar el anti scFv 6009F que se ésta produciendo en conejo

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M. (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical and developmental immunology*, 2012.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12), 5301-5317.
- Alvarenga, L. M., Zahid, M., Tommaso, A. D., Juste, M. O., Aubrey, N., Billiald, P., & Muzard, J. (2014). Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. *Toxins*, 6(8), 2541-2567.
- Batra, S. K., Jain, M., Wittel, U. A., Chauhan, S. C., & Colcher, D. (2002). Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Current opinion in biotechnology*, 13(6), 603-608.
- Becerril Luján, B., Riaño, L., & Possani, L. (2014). Bancos de anticuerpos recombinantes de origen humano: una fuente ideal de antivenenos modernos contra la picadura de alacrán. *Tema del mes*.
- Chippaux, J. P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug design, development and therapy*, 6, 165.
- Córdoba Ruiz, H., Algecira Encizo, N., Poutou Piñales, R., & Barrera Avellaneda, L. A. (2003). *Pichia pastoris*, una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentac. *Revista colombiana de biotecnología*, (2).
- Damasceno, L. M., Pla, I., Chang, H. J., Cohen, L., Ritter, G., Old, L. J., & Batt, C. A. (2004). An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 37(1), 18-26.



De Pourcq, K., De Schutter, K., & Callewaert, N. (2010). Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(5), 1617-1631.

Dehesa-Dávila, M., & Possani, L. D. (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 32(9), 1015-1018.

Domingos Possani, L. (2005). El alacrán y su piquete.

Espino-Solis, G. P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., & Possani, L. D. (2009). Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. *Journal of proteomics*, 72(2), 183-199.

Ezzine, A., M'Hirsi el Adab, S., Bouhaouala-Zahar, B., Hmila, I., Baciou, L., & Marzouki, M. N. (2012). Efficient expression of the anti-Aahl'scorpion toxin nanobody under a new functional form in a *Pichia pastoris* system. *Biotechnology and applied biochemistry*, 59(1), 15-21.

Frenzel, A., Hust, M., & Schirrmann, T. (2013). Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in immunology*, 4, 217.

Gómez-Sebastián, S., López-Vidal, J., & Escribano, J. M. (2014). Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette. *PloS one*, 9(5), e96562.

Gurramkonda, C., Polez, S., Skoko, N., Adnan, A., Gäbel, T., Chugh, D., ... & Rinas, U. (2010). Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial cell factories*, 9(1), 31.

Horwitz, A. H., Chang, C. P., Better, M., Hellstrom, K. E., & Robinson, R. R. (1988). Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(22), 8678-8682.

Invitrogen, A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ $\alpha$  in *Pichia pastoris*, Catalog No. K1740-01.

- Jaramillo-Serna, R., & Ávila-Reyes, R. (2007). Dra. Rocío Isabel Camacho-Ramírez, Enf. M. Hilda Sánchez-Zapata<sup>1</sup>, Biólogo. *Archivos de Investigación Pediátrica de México*, 10(1), 22.
- Laustsen, A. H., Solà, M., Jappe, E. C., Oscoz, S., Lauridsen, L. P., & Engmark, M. (2016). Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development. *Toxins*, 8(8), 226.
- Li, J., Sun, C., Chen, L., Sun, L., Duan, L., Zheng, Q., & Hu, X. (2017). Optimization of the secretory expression of recombinant human C-reactive protein in *Pichia pastoris*. *3 Biotech*, 7(5), 291.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 142(2), 105-124.
- Lin-Cereghino, J., & Lin-Cereghino, G. P. (2007). Vectors and strains for expression. In *Pichia Protocols* (pp. 11-25). Humana Press.
- Malpiedi, L. P., Díaz, C. A., Nerli, B. B., & Pessoa Jr, A. (2013). Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. *Process Biochemistry*, 48(8), 1242-1251.
- Marty, C., Scheidegger, P., Ballmer-Hofer, K., Klemenz, R., & Schwendener, R. A. (2001). Production of functionalized single-chain Fv antibody fragments binding to the ED-B domain of the B-isoform of fibronectin in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 21(1), 156-164.
- Monnier, P. P., Vigouroux, R. J., & Tassew, N. G. (2013). In vivo applications of single chain Fv (variable domain)(scFv) fragments. *Antibodies*, 2(2), 193-208.
- Omidfar, K., Rasaee, M. J., Kashanian, S., Paknejad, M., & Bathaie, Z. (2007). Studies of thermostability in *Camelus bactrianus* (Bactrian camel) single-domain antibody specific for the mutant epidermal-growth-factor receptor expressed by *Pichia*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 46(1), 41-49.

Pastrana, J., Blasco, R., Erce, R., & Pinillos, M. A. (2003). Picaduras y mordeduras de animales. In *Anales del sistema sanitario de Navarra* (Vol. 26, pp. 225-241). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.

Pintar, A., Possani, L. D., & Delepierre, M. (1999). Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a  $\beta$ -scorpion neurotoxin acting on sodium channels<sup>1</sup>. *Journal of molecular biology*, 287(2), 359-367.

Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., & Mattanovich, D. (2011). Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(4), 939-948.

Potapov, V., & Ong, J. L. (2017). Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PloS one*, 12(1), e0169774.

Rahbarizadeh, F., Rasaei, M. J., Forouzandeh, M., & Allameh, A. A. (2006). Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular immunology*, 43(5), 426-435.

Riaño-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juárez, C., Corzo, G., Possani, L. D., & Becerril, B. (2011). Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6143-6151.

Riaño-Umbarila, L., Juárez-González, V. R., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Possani, L. D., & Becerril, B. (2005). A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. *The FEBS journal*, 272(10), 2591-2601.

Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., ... & Gertler, F. B. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature genetics*, 33(3), 401.

Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., & Fando-Calzada, R. (2016). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 47(2).

Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M., & Meagher, M. M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- $\tau$ . *Biotechnology and bioengineering*, 89(1), 102-112.

Tanaka, T., Horio, T., & Matuo, Y. (2002). Secretory production of recombinant human C-reactive protein in *Escherichia coli*, capable of binding with phosphorylcholine, and its characterization. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(1), 163-166.

Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211.

Van Dijk, M. A., & Van De Winkel, J. G. (2001). Human antibodies as next generation therapeutics. *Current opinion in chemical biology*, 5(4), 368-374.

Verma, R., Boleti, E., & George, A. J. T. (1998). Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of immunological methods*, 216(1-2), 165-181.

Wells, E., & Robinson, A. S. (2017). Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement. *Biotechnology journal*, 12(1).

Zahl, R. J., Peña, D. A., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2017). Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS yeast research*, 17(7), fox068.

Zamudio F, Saavedra R, Martín BM, Gurrola-Briones G, Herion P, Possani LD. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal

antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur J Biochem* 1992; 204:281–92

Zavala, T., Díaz, J. G., Sánchez, J. T., Castillo, L., Ruiz, D., & Calderón, L. (2004). Picaduras por alacranes y arañas ponzoñosas de México. *Rev Fac Med UNAM*, 47(1), 6-12.

Zhang, Y., Liu, R., & Wu, X. (2007). The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annals of Microbiology*, 57(4), 553.

## 12. ANEXOS

### A. Secuencia de scFv 6009F en nucleótidos

#### Número de acceso GenBank: AY781341.1

>AY781341.1 Synthetic construct single chain Fv antibody 6009F gene, partial cds

```
GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
TCCTGTGCAG GCTCTGGATT CACCTTTGAT AATTATGCCA TGCATTGGAT ACGCCAAGTT
CCAGGGGAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTAGTCGGG GCAGTGGTGA CATAGGCTAT
GCGGACTCTG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACG ACGCCAAGAA GTCCCTGTCT
CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGGGGGG
TTCGGAAGTT TTGATACCTG GGGCCAAGGG ACAATGGTCA CCGTCTCTTC TGGAGGTGGC
GGATCAGGAG GCGGAGGTTT TGGTGGAGGT GGGAGTGAAA TTGTGCTGAC TCAGTCTCCT
GCCACCCTGT CTGTGTCTCC CGGGGAAAGA GCCATCCTCT CCTGCAGGGC CAGTCAGAGT
GTTAGGAGCT TCTTAGCCTG GTACCAACAG AAACCTGGGC AGGCTCCCAG GCTCCTCATC
TCTGATGCAT CCAACAGGGC CACTGGCATC CCAGCCAGGT TCACTGGCGG TGGGTCTGGG
ACAGACTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTA GAGCCTGAAG ATTTTGCAAT TTATTACTGT
CAGCAGTATC GTTACTCACC TCGGACGTTC GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT
```

#### Secuencia de scFv 6009F en aminoácidos

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAGSGFTFD NYAMHWIRQV PEGGLEWVSG ISRSGDIGY
ADSVKGRFTI SRDDAKKSLs LQMNSLRAED TAVYYCARGG FGSFDTWGQG TMVTVSSGGG
GSGGGGSGGG GSEIVLTQSP ATLSVSPGER AILSCRASQS VRSFLAWYQQ KPGQAPRLLI
SDASNRATGI PARFTGGGSG TDFTLTISL EPEDFAIYYC QQYRYSPTF GQGTKVEIKR
```

### B. Medios de cultivo

#### 1. Medio LB (Luria Bertani)

Preparación para 1 litro con agua estéril

5 gr Cloruro de sodio  
5 gr Extracto de levadura  
10 gr Peptona de caseína

Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### 2. Medio YPD

Preparación para 1 litro con agua estéril

1% Extracto de levadura  
2% Peptona  
2% Dextrosa  
100 µg/ml Zeocina

Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### **3. Medio BMGY**

Preparación para 1 litro

1% Extracto de levadura  
2% Peptona  
100 mM Fosfato de potasio, pH 6.0  
1.34 % YNB  
1 % Glicerol

Disolver el extracto de levadura y la peptona en agua destilada, esterilizar por 20 minutos a 121 °C, dejar enfriar y adicionar el fosfato de potasio, YNB, biotina y el glicerol.

### **4. Medio BMMY**

Preparación para 1 litro

1% Extracto de levadura  
2% Peptona  
100 mM Fosfato de potasio, pH 6.0  
1.34 % YNB  
0.5 % Metanol

Disolver el extracto de levadura y la peptona en agua destilada, esterilizar por 20 minutos a 121 °C, dejar enfriar y adicionar el fosfato de potasio, YNB, biotina y el metanol.

### **C. Protocolo de Químicocompetentes**

- Se crece un cultivo de células TOP10F en medio LB toda la noche a 35 °C.
- Se inoculan por cada 3 ml de medio LB con 100 µl de cultivo y deja crecer a 37 °C hasta llegar a una D.O de 0.8.
- Se centrifuga a 14000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
- Se resuspende las células r en  $CL_2Ca+2H_2O$  0.1 M con un décimo del volumen de cultivo.
- Se deja incubar en hielo durante 2 h.
- Se centrifuga a 14000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
- Se resuspende las células en  $CL_2Ca+2H_2O$  0.1 M nuevamente con un décimo del volumen de cultivo.
- Se agregan 88 µl de DMSO (estéril) por cada mililitro de células en  $CL_2Ca+2H_2O$  0.1 M.
- Se hacen alícuotas de 100 µl por vial.

#### Transformación de células:

- Añadir 5  $\mu$ l de plásmido a las alícuotas de 100 $\mu$ l
- Colocar en hielo por 30 minutos
- Se deposita en 42 °C baño maría por 40 segundos.
- Se coloca nuevamente en hielo durante 5 minutos
- Añadir 1 ml de LB o SOC
- Incubar 1 h a 37 °C
- Retirar el medio, dejando 200  $\mu$ l y se resuspenden las células.
- Sembrar en cajas con medio y antibiótico para seleccionar 10  $\mu$ l

#### **D. Protocolo de Electrocompetentes**

- Cultivar 5 ml de *Pichia pastoris* en YPD en un matraz de 50 ml a 30 °C durante toda la noche
- Inocular 500 ml de medio nuevo en un matraz de 2 litros con 0.1-0.5 ml del cultivo de toda la noche. Crecer nuevamente durante toda la noche hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 1.3-1.5
- Centrifugar las células a 3,360 rpm durante 5 minutos a 4°C. Suspender el sedimento en 500 ml de agua estéril fría.
- Centrifugar nuevamente a 3,360 rpm durante 5 minutos a 4°C, suspender el sedimento con 250 ml de agua estéril fría en hielo.
- Centrifugar las células a 3,360 rpm durante 5 minutos a 4°C y resuspender el sedimento en 20 ml de sorbitol frío 1 M.
- Centrifugar las células y resuspender el sedimento en 1 ml de sorbitol 1 M frío para obtener un volumen final de aproximadamente 1.5 ml.

#### Transformación

- Mezclar 80  $\mu$ l de las células obtenidas con 5-10  $\mu$ g de ADN linearizado y transferirlos a una cubeta de electroporación enfriada con hielo.
- Incubar la cubeta con las células sobre hielo durante 5 minutos.
- Dar un pulso a las células con el electroporador.
- Agregar 1 ml de sorbitol 1M enfriado con hielo a la cubeta
- Transferir el contenido a un tubo eppendor estéril e incubar a 30°C sin agitar durante 1-2 horas.
- Plaquear 10,25,50,100 y 200  $\mu$ l en placas separadas de YPDS con 100  $\mu$ g/ml de Zeocina.
- Incubar las placas de 3-10 días a 30°C hasta la formación de colonias.



## E. Extracción de ADN genómico de levaduras

### Breaking buffer

- 2% (v/v) Tritón X-100
- 1% (v/v) SDS
- 100 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl pH 8.0
- 1 mM EDTA pH 8.0

### Materiales adicionales

- Buffer TE
- 1 mg/ml RNAsa A
- 4 M solución acetato de amonio
- Etanol 100%

### Procedimiento

- 1) Inocular en 10 ml de YPD una colonia y dejar crecer toda la noche a fase estacionaria
- 2) Centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm, tirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 0.5 ml de agua, centrifugar 1 minuto y tirar el sobrenadante.
- 3) Resuspender las células en 200  $\mu$ l de Breaking buffer y 200  $\mu$ l fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y dar vortex a alta velocidad por 3 minutos.
- 4) Agregar 200  $\mu$ l de buffer TE y dar vortex, centrifugar 5 minutos.
- 5) Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio, agregar 1 ml de etanol al 100% y mezclar por inversión.
- 6) Centrifugar por 3 minutos, remover el sobrenadante y resuspender el pellet en 400  $\mu$ l de buffer TE.
- 7) Agregar 30  $\mu$ l de 1 mg/ml RNAsa A (3  $\mu$ l de RNAsa a 10 mg/ml) incubar 5 minutos a 37 °C.
- 8) Agregar 10  $\mu$ l de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol 100% mezclar por inversión.
- 9) Centrifugar 3 minutos a alta velocidad, descartar el sobrenadante, secar el pellet.
- 10) Resuspender el DNA en 100  $\mu$ l de buffer TE (resuspender en menos volumen para aumentar la concentración). Guardar a -20 °C correr en gel de agarosa para visualizar.

**Buffer TE:**

- 10 mM Tris-HCl pH 8.0
- 1 mM EDTA

**Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico:**

- 25 partes Fenol equilibrado
- 24 partes Cloroformo
- 1 parte Alcohol isoamílico

**F. Buffer PBS 1x**

- 8.06 gr NaCl
- 0.22 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.20 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Aforar a 1 litro con agua destilada y esterilizar 15 min a 121 °C.



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete (Co Tutor)  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Maura Téllez Téllez

Tesis: "EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F EN LAS  
CEPAS KM71 Y GS115 EN *Pichia pastoris* USANDO EL  
PLÁSMIDO pPICZA $\alpha$

Alumno que la presenta a revisión: **MONICA AMEZCUA CASTILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. GERARDO CORZO BURGUETE



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete (Co Tutor)  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Maura Téllez Téllez

Tesis: "EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F EN LAS  
CEPAS KM71 Y GS115 EN *Pichia pastoris* USANDO EL  
PLÁSMIDO pPICZA $\alpha$

Alumno que la presenta a revisión: **MONICA AMEZCUA CASTILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete (Co Tutor)  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Maura Téllez Téllez

Tesis: "EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F EN LAS  
CEPAS KM71 Y GS115 EN *Pichia pastoris* USANDO EL  
PLÁSMIDO pPICZA $\alpha$

Alumno que la presenta a revisión: **MONICA AMEZCUA CASTILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete (Co Tutor)  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Maura Téllez Téllez

Tesis: "EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F EN LAS  
CEPAS KM71 Y GS115 EN *Pichia pastoris* USANDO EL  
PLÁSMIDO pPICZA $\alpha$

Alumno que la presenta a revisión: **MONICA AMEZCUA CASTILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MAURA TELLEZ TELLEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal (Tutor)  
Dr. Gerardo Corzo Burguete (Co Tutor)  
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango  
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís  
Dra. Maura Téllez Téllez

Tesis: "EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO scFv 6009F EN LAS  
CEPAS KM71 Y GS115 EN *Pichia pastoris* USANDO EL  
PLÁSMIDO pPICZA $\alpha$

Alumno que la presenta a revisión: **MONICA AMEZCUA CASTILLO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS