



### CLONACION DEL cDNA DEL GEN DE LA INSULINA HUMANA EN UN VECTOR BINARIO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE BROCOLI

Berenice García-Reyes<sup>1</sup>; Ma. Del Carmen Montes-Horcasitas<sup>1</sup>; Emma G Ramos-Ramírez<sup>1</sup>; Armando Ariza-Castolo<sup>2</sup>; Josefina Pérez-Vargas<sup>3</sup>; Octavio Gómez-Guzmán<sup>1</sup>; Graciano Calva-Calva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. IPN 2508 Col. San Pedro Zacatenco. México, D.F., México 07360. Apartado postal 14-740, 07000. Teléfono: 57473800 Ext. 4348. [bgribqdf@gmail.com](mailto:bgribqdf@gmail.com), [gcalva@cinvestav.mx](mailto:gcalva@cinvestav.mx). <sup>2</sup>Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. <sup>3</sup>Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.

Palabras clave: *Brassica oleracea*, *Proteínas heterólogas*, *pCAMBIA1105.1*.

**Introducción.** La insulina es una proteína cuya actividad hormonal es regular los niveles de glucosa en la sangre [1]. La deficiencia en su modo de acción produce el padecimiento conocido como diabetes. La insulina humana recombinante se ha expresado en diversos organismos, incluyendo bacterias, levadura, hongos, células y órganos de animales y plantas transgénicas [2]. Aunque su producción comercial se ha limitado a microorganismos (*Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*) los sistemas basados en plantas ofrecen grandes ventajas tanto en producción, como en bioseguridad y economía [3]. De igual forma, se ha propuesto como alternativa de producción el uso de cultivos de células, tejidos y órganos vegetales (como raíces transformadas), tecnologías que pueden establecerse a nivel de biorreactores o usarse para regenerar plantas transgénicas productoras de este tipo de proteínas que generalmente tienen aplicaciones biotecnológicas e industriales. En este trabajo se presentan los resultados preliminares para la clonación del gen *Ins* en *Brassica oleracea* var. *italica*, la cual ha sido considerada como un modelo vegetal de expresión para otras proteínas heterólogas [4].

**Metodología.** Se usó la clona 3950204 (Open Biosystems, USA) de *E. coli* llevando el cDNA del gen de la insulina (*Ins*) insertado en el plásmido pDNR-Lib entre los sitios de restricción EcoR I, y Xho I, los cuales fueron usados para la liberación del cDNA respectivo. EL cDNA liberado se amplificó por PCR para luego ser incorporado al vector pCAMBIA1105.1. Con el constructo resultante (pCAMINSB) se realizará posteriormente la transfección del cDNA a plántulas de Brócoli vía agroinfección usando *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402.

**Resultados y discusión.** Por un lado, el vector pDNR-Lib-*Ins* que contiene el cDNA del gen *Ins* y el de resistencia a cloranfenicol; fue extraído y sometido a restricción con las enzimas EcoR I y Xho I, lo cual reveló la presencia de un fragmento con el tamaño esperado (531 pb). Por otro lado, el vector binario pCAMBIA 1105.1 se caracterizó con enzimas de restricción que liberaran fragmentos conocidos, entre ellas Nco I y Bgl II. El

producto de reacción de estas enzimas combinadas se usó para la ligación con el producto de PCR del vector pDNR-Lib-*Ins* amplificado con los oligos de pre y proinsulina. Los resultados del análisis por electroforesis en gel de estos productos de ligación amplificados en *E. coli* DH5 $\alpha$  están siendo analizados para la selección de transformantes adecuadas para la posterior transfección a Brócoli vía *Agrobacterium*. Las clonas de *E. coli* están siendo propagadas en medio LB con estreptomina. Concomitantemente, se germinaron semillas de Brócoli en medio mineral semisólido B5 y las plántulas resultantes que mostraron mayor cantidad de raíces fueron utilizadas para establecer líneas de cultivos de raíces no transformadas y transformadas; estas últimas por infección de los hipocotilos con la cepa silvestre de *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 y transformada con el vector pCAMBIA vacío. Los cultivos de raíces transformadas se establecieron a partir de explantes extraídos del punto de punción y propagados secuencialmente en medio SH semisólido y líquido.

**Conclusiones.** Se estableció la metodología para el establecimiento de cultivos de raíces transformadas de Brócoli. Se aisló el cDNA de *Ins* para ser transfectado a plántulas de Brócoli vía *Agrobacterium rhizogenes* transformada con el vector pCAMBIA1105.1, y a partir de las cuales se establecerán posteriormente cultivos de raíces que expresen el gen *Ins*.

**Agradecimiento.** A CONACyT por la beca otorgada al primer autor.

#### Bibliografía.

1. Cahill, G., (1971). Diabetes. 20: 785-799
2. Nykiforuk C. L., Murray E. W., Keon R. G., Goren H. J., Markley N. A. and Moloney M. M., (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnology Journal*. 4: 77-85.
3. Deckers, H., Moloney, M.M. and Baum, A., (1999). The case for recombinant production of pharmaceutical proteins in plants. *Annu. Rep. Med. Chem.* 34: 237-245.
4. Cardoza V., C.N.S., JR., (2004). Invited review: *brassica* biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*. 40: 542-551.