

ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE GENES ESPECÍFICAMENTE INDUCIDOS POR PETRÓLEO EN *Bjerkandera adusta*.

Laura Inés Cuervo Soto, Cynthia Romero Guido y Jorge Luis Folch Mallol

Centro de Investigación en Biotecnología- Universidad Autónoma del estado de Morelos. Av. Universidad
No. 1001 colonia chamilpa CP 62209 Cuernavaca Morelos México. Fax: 329705 maito19@hotmail.com

Palabras clave: estudio transcriptómico, microarreglos, genes.

Introducción. La extracción del crudo y su manejo inadecuado produce contaminación en los ecosistemas. Entre los métodos biológicos, los hongos ligninolíticos, a través de sus enzimas extracelulares pueden transformar una gran variedad de compuestos orgánicos incluyendo hidrocarburos, los cuales pueden ser mineralizados. Entre los hongos de la podredumbre blanca, *Bjerkandera adusta* ha mostrado la capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos, lo que sugiere un potencial como organismo eficiente en biorremediación. La expresión de genes puede ser analizada por microarreglos utilizando muestras sencillas o permite comparar dos diferentes tipos celulares. Esta tecnología consiste en un gran número de moléculas de ADN (sondas: como oligonucleótidos, cDNA o fragmentos pequeños de productos de PCR) ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que formen una matriz de secuencias en dos dimensiones, las cuales son hibridadas con los cDNA de *B. adusta* de las condiciones en estudio.

Objetivo General. Estudiar la regulación de un conjunto de genes inducidos por petróleo en *B. adusta* mediante el uso de microarreglos.

Metodología. Oligonucleótidos: Se diseñaron 41 oligos con un tamaño de 40 bp utilizando un algoritmo construido en el laboratorio. 40 de ellos fueron seleccionados de una base de secuencias pertenecientes a una librería de cDNA de *B. adusta* crecida en medio SD + 1% de petróleo crudo maya y que presentaban función conocida mediante alineamientos realizados con el programa blastx de NCBI. Como control positivo se utilizó la peroxidasa versátil de *B. adusta*.

Construcción del Chip: El chip contiene 12 copias de cada gen impresos en dos retículas de 4 cuadrantes cada una. Está diseñado en placas de vidrio de 75 mm de largo por 25 mm de alto.
Extracción de DNA genómico: Se obtuvo DNA genómico de *B. adusta* crecida en medio mineral líquido (sin NH₄NO₃) adicionado de peptona + glucosa 2% incubado a 28°C por 12 días.
Extracción de RNA total: Se probaron las siguientes condiciones: fuente de carbono: YNB+Glucosa a 28°C, YNB+Paja a 28°C. Fuente de nitrógeno: Medio mineral (con NH₄NO₃)+Glucosa 2% a 28°C, Medio mineral (sin NH₄NO₃)+peptona+Glucosa 2% a 28°C. Condición de T°:

YNB+Glucosa a 28°C, YNB+Glucosa a 34°C. Todos los cultivos fueron crecidos por 8 días y adicionados de 1.5% de agar. El RNA total fue convertido a cDNA mediante transcripción reversa, estos cDNA junto con DNA genómico fueron marcados con Cy3 y Cy5 para su posterior hibridación en el microarreglo.

Resultados. Como control de impresión y de lectura se realizó una primera hibridación con DNA genómico marcado con Cy3 y Cy5, en la cual se observó que hubo hibridación DNA - DNA en cada uno de los puntos correspondientes a los genes seleccionados (fig.1). La hibridación con cada una de las condiciones a probar para observar que genes se expresaron en petróleo, en una condición dada o en ambos se mostrarán parcialmente ya que está pendiente su hibridación.

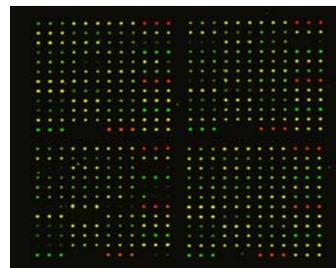


Fig. 1

Agradecimientos. Este trabajo se realizó con apoyo de CONACYT al otorgar la beca de Maestría No. 217379 y está financiado por el proyecto Ciencia Básica. N° 48256.

Bibliografía.

1. J Iqbal, F Hanel, A Ruryk, GV Limmon, A Tretiakov, M Durst, HP Saluz. 2008. Fabrication and evaluation of a sequence-specific oligonucleotide miniarray for molecular genotyping. Indian journal of medical Microbiology (26) 13-20.
2. Patrice Francois a, Christian Garzoni a, Manuela Bento a, Jacques Schrenzel. 2007. Comparison of amplification methods for transcriptomic analyses of low abundance prokaryotic RNA sources. Journal of Microbiological Methods (68) 385-391.
3. Erwin E. J. Kaal, ED de Jong, and Jim A. Field. 1993. Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera sp.* Strain BOS55. Applied and Environmental Microbiology (59)4031-4036.