

### CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA EXPRESIÓN CROMOSOMAL DE GENES EN *ESCHERICHIA COLI*

Andrea Sabido, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C. P. 62210, Cuernavaca, México; fax: (+52) 777 329 1648; e-mail: gosset@ibt.unam.mx

Palabras clave: *plásmidos, integración cromosomal, promotor trc,*

**Introducción.** La bacteria *Escherichia coli* ha sido utilizada en procesos biotecnológicos como cepa hospedero, para la expresión de genes homólogos y heterólogos, con el objetivo de producir proteínas y metabolitos específicos. Generalmente, es necesario un nivel de expresión alto de los genes de interés, presentes en plásmidos multicopia, para producir grandes cantidades de la proteína requerida. Sin embargo, algunas de las limitantes presentes en dichos procesos son: la inestabilidad segregacional, la carga metabólica y la adición de antibióticos, todas impuestas por la presencia del plásmido (1).

El objetivo de este trabajo, es la generación de un sistema que combine características tanto de plásmidos como de mecanismos de integración cromosomal. Siendo viable en desarrollo de procesos, por eliminar la dependencia al uso de antibióticos e inductores principalmente.

**Metodología.** Se generó el plásmido pLoxGen4trc, el cual presenta una región proveniente del plásmido pTrc99A, que incluye a *lacI*, *P<sub>trc</sub>* y *rrnB*. Posteriormente, se clonó el gen *melA* de *Rhizobium etli*; y utilizando una metodología similar a la de Datsenko y Wanner (2), el plásmido obtenido (pLoxGentrcmelA) se utilizó como templado para la generación de dos productos de PCR, con los cuales se inactivaron los genes cromosomales *lacZ* y *lacI* de la cepa W3110 de *E. coli* respectivamente.

**Resultados y discusión.** Se generó el plásmido pLoxGen4trc, el cual permite la clonación y expresión de cualquier gen de interés. Se decidió clonar el gen *melA*, quedando bajo control del promotor *trc* y siendo inducible por IPTG. Una vez generado el plásmido pLoxGentrcmelA, el sistema para inactivar y expresar genes en el cromosoma de *E. coli* requiere de 4 pasos (Fig.1). Las mutantes con las integraciones deseadas se verificaron fácilmente, ya que el sistema permite seleccionar por la resistencia a gentamicina y el fenotipo *melA*<sup>+</sup>. Por su parte, el análisis del PCR resultó como se esperaba en fragmentos de 2 y 3.5 Kbs para el caso de la interrupción del gen cromosomal *lacZ* (cuadro 1) y de 1.7 y 2.4 Kbs para *lacI* (datos no mostrados). La inactivación de *lacZ*, permite que la expresión de *melA* sea regulada por IPTG, mientras que al inactivar el represor del operón *lac*, se obtiene un sistema constitutivo en el cual se elimina la adición del inductor.

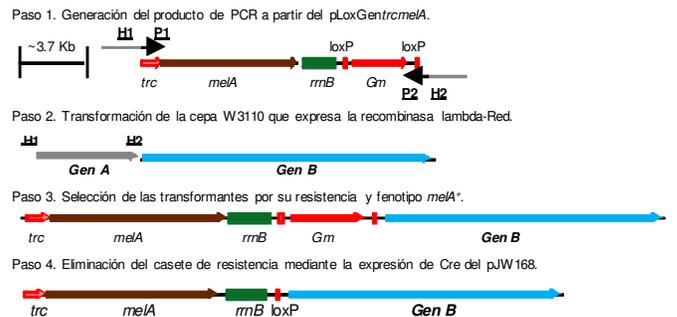
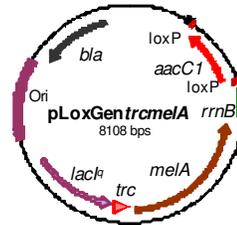


Fig. 1. Estrategia para la inactivación y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*. H1 y H2: región de homología con gen blanco (A); P1 y P2: región de homología con pLoxGentrcmelA.

Cuadro 1. Cuantificación de las transformantes con la integración deseada en el gen cromosomal *lacZ*.

No. de colonias	Fenotipo			
	Anb <sup>R</sup>	<i>lacZ</i>	<i>melA</i>	PCR
14	Cb <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup>	+	+	Wild type
2	Cb <sup>S</sup> Gm <sup>R</sup>	-	+	2 y 3.5 Kbs

**Conclusiones.** La generación del plásmido pLoxGentrc, permite la expresión de cualquier gene de interés bajo el control del promotor fuerte *trc*. Por su parte, el sistema desarrollado, permite de manera sencilla la inactivación y expresión de genes en el cromosoma de *E. coli*, eliminando el uso de inductores así como de antibióticos.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue financiado gracias al apoyo de CONACYT.

#### Bibliografía.

- Glick B. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv.* 13: 247-261.
- Datsenko K y Warner B. (2000). One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS.* 97(12): 6640-6645.