



## OBTENCIÓN DEL VECTOR pRGP-1 POR MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA, PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *Saccharomyces cerevisiae*

Francisco Javier Ríos-Fránquez<sup>1</sup>, Ana Ramos-Valdivia<sup>1</sup>, Héctor Mario Poggi-Varaldo<sup>1</sup>, Jaime García-Mena<sup>2</sup>, Alfredo Martínez-Jiménez<sup>3</sup>, Teresa Ponce-Noyola<sup>1\*</sup>.

1 Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, 2 Departamento de Biología Molecular, CINVESTAV-IPN, México, D.F. 3 Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca Morelos, México.  
javier\_rios07@hotmail.com, \*tponce@cinvestav.mx

*Palabras clave:* plásmido, mutación, levadura.

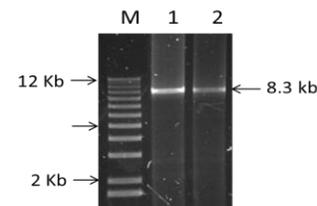
**Introducción.** Desde hace varias décadas *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizada para la expresión de proteínas recombinantes, presentando varias ventajas con respecto a otras levaduras. Uno de los vectores que han sido usados para este fin es pYEX-S1, un plásmido episomal con promotor constitutivo, el cual a pesar de contar con una secuencia de exportación de proteínas, ha mostrado problemas para expresarlas extracelularmente. Un análisis *in silico* mostró que en el sitio de multiclonación del vector, al final de la secuencia de exportación de proteínas, la secuencia Kex2 carece de un nucleótido, a lo que se atribuye la dificultad de las proteínas heterólogas para madurar y ser transportadas al exterior de las células.

Por lo anterior en el presente trabajo se insertó por mutagénesis sitio-dirigida el nucleótido faltante en la secuencia Kex2 de pYEX-S1 obteniendo el vector pRGP-1, aumentando con él los niveles de producción de proteína recombinante extracelulares en *S. cerevisiae*.

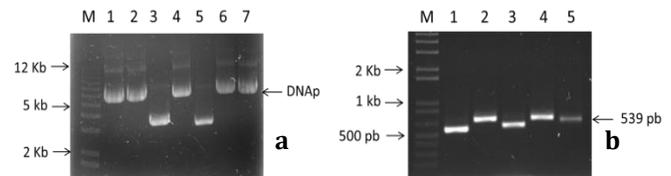
**Metodología.** El vector pYEX-S1 purificado se linealizó por PCR inversa, con un par de oligonucleótidos que hibridan en el sitio de multiclonación del plásmido. Estos oligonucleótidos contienen la secuencia Kex2 corregida. Durante la PCR se insertó el nucleótido faltante y se obtuvo un producto de amplificación con extremos restringibles para la enzima *SacI*. El producto de PCR purificado se restringió con dicha enzima y se religó con T4 DNA ligasa, obteniendo así el plásmido pRGP-1 circular. Con el producto de ligación se transformaron células calcio-competentes de *Escherichia coli* y se seleccionaron en placas de LB-Amp. Se extrajo el DNA plasmídico de las transformantes por lisis alcalina y se amplificó por PCR y secuenció el sitio de multiclonación de pRGP-1 para confirmar la mutación por inserción.

**Resultados.** El análisis electroforético del producto de la PCR inversa de pYEX-S1 mostró una banda única de 8352 pb correspondiente al vector pRGP-1 lineal (Fig. 1). Con el producto recircularizado de pRGP-1, se obtuvieron transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina, de las cuales a seis se les extrajo el DNA plasmídico (Fig. 2a) observando que a excepción de las transformantes 3 y 5, el resto presentan un DNA plasmídico del tamaño esperado con respecto al control. Se amplificó el sitio de multiclonación de 539 pb del

producto de miniprep de las transformantes 1, 2, 4, y 6 (Fig. 2b) y se secuenciaron con fundamento en la técnica de Sanger. Mediante un análisis por BLAST de los electroferogramas obtenidos en comparación con la secuencia de pYEX-S1, se confirmó que las transformantes 1 y 4 cuentan con la mutación puntual esperada, al final de la secuencia de exportación de proteínas.



**Fig. 1.** Obtención del vector pRGP-1 lineal de 8352pb (carriles 1 y 2) por PCR inversa del plásmido pYEX-S1 de 8351pb.



**Fig. 2. a)** Productos de miniprep de las transformantes 1-6 de pRGP-1 (carriles 1-6), control de tamaño de pYEX-S1 (carril 7). **b)** Productos de PCR del sitio de multiclonación de pRGP-1 recircularizado de las transformantes 1, 2, 4 y 6 (carriles 1-4), y control del amplión del sitio de multiclonación de pYEX-S1 (carril 5).

El plásmido pRGP-1 obtenido de la transformante 1 se utilizó para clonar y expresar genes sintéticos optimizados para *S. cerevisiae*, con un aumento en la cantidad de proteína recombinante extracelular.

**Conclusiones.** Se confirmó la mutación puntual en el vector pYEX-S1 dando origen al plásmido pRGP-1.

**Agradecimiento.** El desarrollo de este trabajo está apoyado por Conacyt, con la beca de Doctorado 355063 y el proyecto 236895.

### Bibliografía.

Mendoza Aguayo D, · Poggi Varaldo H, · García Mena J, · Ramos Valdivia A, · Salgado L M, · de la Torre Martínez M, · Ponce Noyola T (2014) Arch Microbiol. 196:25–33.