



EXPRESIÓN HETERÓLOGA DEL GEN QUE CODIFICA PARA UNA LIPASA SECRETADA POR UNA CEPA PSICRÓTROFA DE *Serratia marcescens* AISLADA DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO

Lucia Viridiana Aranda Collado, Fernando Martínez Morales y María del Refugio Trejo Hernández, Centro de Investigación en Biotecnología-Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001 CP. 62209, vagoporel mundo@hotmail.com.

Palabras clave: expresión heteróloga, lipasa, *Serratia marcescens*.

Introducción. Las lipasas (E.C.3.1.1.3) son enzimas capaces de hidrolizar triglicéridos. Las lipasas son producidas por diferentes organismos, siendo más estudiadas las provenientes de hongos y bacterias. Estas enzimas son ampliamente utilizadas en la industria, como en el área alimentaria, de detergencia, farmacéutica, entre otras. Entre las características interesantes de estas enzimas es que pueden ser funcionales a baja temperatura, siendo esta característica muy poco explorada (1). En la naturaleza estas enzimas no están disponibles en cantidades suficientes para el uso industrial, sin embargo hoy en día se está incrementando su producción mediante técnicas de ADN recombinante. Por lo que para estos propósitos se utilizan diferentes huéspedes de expresión (2).

En este proyecto se tiene como objetivo expresar heterológamente el gen de la lipasa *lipA* producida por la cepa psicrótrofa de *S. marcescens* SM3.

Metodología. Para la amplificación del gen de la lipasa de *S. marcescens*, se utilizó como templado el gen de *lipA* contenido en el plásmido pLVAC1 obtenido por Aranda en 2013; la PCR se realizó utilizando oligonucleótidos específicos, este producto se ligo en el vector de expresión pET22b(+), posteriormente se realizó una electroporación con las células de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron las clonas positivas mediante un análisis de restricción. Posteriormente se realizó la expresión heteróloga del gen usando el sistema de *E. coli* BL21(DE3). Se utilizó IPTG como inductor a una concentración de 0.5mM por 18 horas. Se realizó la extracción de proteínas periplasmáticas y se analizó en un gel SDS-PAGE al 12%.

Resultados. Se llevó a cabo la subclonación del gen de la lipasa, se transformaron las células de *E. coli* DH5 α , y se analizaron mediante extracción de ADN plasmídico y digiriéndolo con *Hind*III, resultando una clona positiva, ya que se observó una banda del tamaño esperado que es de aproximadamente 7336 pb, como se observa en el carril 3 en la fig. 1. Posteriormente se realizó la inducción y se realizaron las extracciones de proteínas periplasmáticas que se muestran en la fig. 2. En el carril 2, 4, 6 y 8 se observan las extracciones antes de la inducción de los cultivos de *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)+pET22b(+) y *E. coli* BL21(DE3)+pLVAC2; en el carril 3, 5, 7 y 9 se observan las extracciones después

de 18 horas de inducción de los cultivos de *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)+pET22b(+) y *E. coli* BL21(DE3)+pLVAC2, las cuales se analizaron mediante un gel SDS-PAGE, observando que en el carril 9 se observa una banda de aproximadamente 64 kDa con respecto al marcador de PM.

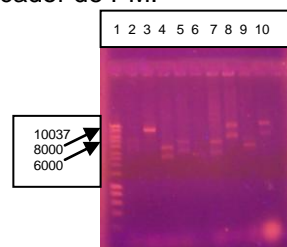


Fig. 1. Gel de agarosa 1%. Carril 1. Marcador de PM, carril 2 al 10. Análisis de restricción de los plásmidos.

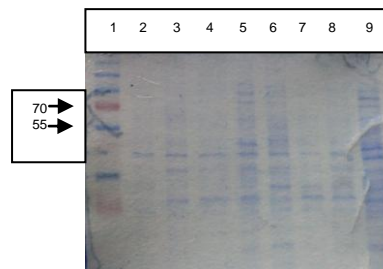


Fig. 2. Gel SDS-PAGE 12%. Carril 1. Marcador de PM, carril 2 al 9. Extracción periplasmática de los cultivos antes y después de la inducción.

Conclusiones. Se realizó la inducción de *lipA* en las células transformantes de *E. coli* BL21(DE3) con pLVAC2, habiendo una baja sobreexpresión de acuerdo a una banda observada de aproximadamente 64 kDa que puede corresponder a una lipasa.

Agradecimiento. A CONACyT por el financiamiento otorgado, No. De becario: 592484.

Bibliografía.

- Badu, J., Pramod, R. y George, T. 2008. *Biotechnology Advances* .26 : 457-470
- Yuan-Yuan, C., Yun-Kai, Q., Zhi-Feng, L., Zhi-Hong, W., Hong, L. y Yue-Zhong, L. 2011. *Int. J. Mol. Sci.* 12 : 6765-6780.