



## DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA LA EXPRESIÓN DE Ag85B EN CLOROPLASTO DE *Chlamydomonas reinhardtii*.

Daniel Guzmán-Zapata; Noé Valentín Duran Figueroa, Jesús Agustín Badillo Corona; José Luis Castrejón Flores  
Instituto Politécnico Nacional -Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. México DF CP: 07340,  
danielguza@gmail.com

*Palabras clave: Ag85B, Chlamydomonas, Cloroplasto.*

**Introducción.** La proteína Ag85B es una de las proteínas más abundantes producidas por *Mycobacterium*. Esta participa en la síntesis de la pared celular. Adicionalmente, la proteína posee una actividad inmunogénica e inmunoprotectora, características que la hacen un candidato promisorio para la generación de vacunas de subunidad en tuberculosis (1,2). En nuestro grupo de trabajo previamente se ha expresado esta proteína en el cloroplasto del alga de *Chlamydomonas reinhardtii*, bajo la regulación del promotor Prn1, obteniéndose niveles detectables de proteína (3). Sin embargo, con la finalidad de facilitar la detección y su purificación, el objetivo de este trabajo fue la construcción de vectores, usando el promotor psbA y 4 diferentes etiquetas (Myc, Ha, 3X-Flag y X-Flag) acoplados a la proteína Ag85B los cuales serán utilizados para modificación de cloroplasto de *C. Reinhardtii*.

### Metodología.

Se amplificó por PCR el promotor psbA a partir del vector pSK-KmR (3). Los oligonucleótidos fueron diseñados para incluir un sitio de corte *PacI* en el extremo 5' del promotor y un sitio *NcoI* en el extremo 3' de cada etiqueta. Los productos amplificados que contienen el promotor y la etiqueta fueron clonados en el vector comercial pJET2.1 (Life Technologies) y posteriormente digeridos con las enzimas *NcoI* y *PacI* (New England Biolabs) para ser clonados en el vector p320-Ag85B. Este vector contiene el gen Ag85B y el terminador rbcl, además de regiones homologas al cloroplasto de *C. reinhardtii* lo que permitirá la incorporación de la construcción al genoma del cloroplasto por recombinación. El cloroplasto de la cepa *C.reinhardtii* CC-125 será transformada por biobalística (5) con los vectores p320-Tag-Ag85B y p228 el cual confiere resistencia a espectomicina.

### Resultados.

Se obtuvieron por PCR los promotores psbA con las etiquetas Myc, Ha, 3X-Flag y X-Flag, los productos obtenidos de aproximadamente 300 pb fueron clonados en el vector pJET 2.1 y secuenciados, para después ser clonados en el vector p320-Ag85B (Fig.1), generando los vectores p320-Tag-Ag85B. Se verificó la construcción por restricción con las enzimas *NcoI* y *PacI* y por secuenciación (Fig.2).

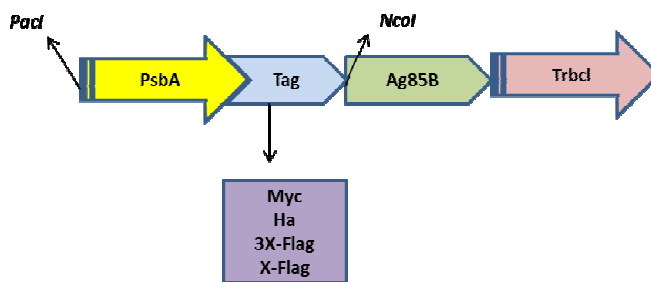


Fig. 1. Representación esquemática de los cassetes de expresión construidos con cada etiqueta.

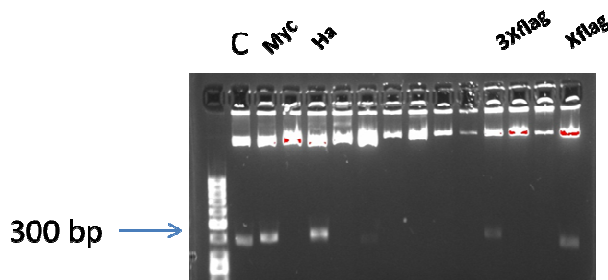


Fig. 2. Analisis de restricción con las enzimas *NcoI* y *PacI* de los vectores p320-Tag-Ag85B

**Conclusiones.** Se construyeron los vectores p320-Tag-Ag85B, que contiene el promotor psbA, la etiqueta, el gen Ag85B y el terminador rbcl. Estos vectores serán utilizados para la transformación de *C. reinhardtii*

**Agradecimiento.** Esta investigación es financiada por la Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación del DF (SECITI) mediante el proyecto PICSA 12-112. JABC y NVDF reciben apoyo para el laboratorio de SIP-IPN 20144606 y 20144617, respectivamente. Además, apoyos de EDI y COFAA. DGZ es estudiante de doctorado becario de CONACYT-México.

### Bibliografía.

- (1) Sheikh, J. A., Khuller, G. K., & Verma, I. (2011). *J Immune Based Ther Vaccines*, 9(1), 4.
- (2) Kruh-Garcia, N. A., Murray, M., Prucha, J. G., & Dobos, K. M. (2014). *J Proteomics*, 97, 141-150.
- (3) Almaraz-Delgado, A. L., Flores-Urbe, J., Pérez-España, V. H., Salgado-Manjarrez, E., & Badillo-Corona, J. A. (2014). *AMB Express*, 4(1), 57.
- (4) Bateman, J. M., & Purton, S. (2000). *MGG*, 263(3), 404-410.
- (5) Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., ... & Shark, K. B. (1988). *Science*, 240(4858), 1534-1538.