



TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTO DE *Chlamydomonas reinhardtii* PARA MODIFICAR LA ASIMILACIÓN DE FOSFORO.

José Manuel Sandoval Vargas, Agustín Badillo Corona. UPIBI-IPN, Laboratorio de Biotecnología Molecular, México, D.F., 07340, ibt_jose_sandoval@hotmail.com

Palabras clave: cloroplastos, fosfito, biobalística.

Introducción. El fósforo juega un papel fundamental en la bioquímica y fisiología de todas las células. En la naturaleza, se encuentra bien documentado que el compuesto ortofosfato, en cuya forma de Pi más oxidada (+5), es la única forma química que puede asimilarse por autótrofos (1) y ello se satisface consumiéndolo desde el ambiente a partir de dichos compuestos y sus ésteres de fosfato fácilmente hidrolizables (2). Aunque el fósforo Pi es la especie predominante y más estable dentro del ciclo del fósforo, se han encontrado compuestos de fósforo reducidos en ambientes naturales, tales como sedimentos marinos, geotermas y chimeneas volcánicas además de sitios altamente influenciados por actividades humanas debido al alto uso de compuestos de Pi en agricultura y procesos industriales (3-4). De estos compuestos de Pi, el fosfito (Phi; +3) ha generado gran interés debido a la posibilidad de que se presente como una fuente asimilable de fósforo. La habilidad de utilizar fuentes alternativas de Pi se presenta como una ventaja para muchos microorganismos siendo aproximadamente el 1% del total de especies bacterianas capaces de utilizar compuestos de Pi reducido (fosfito o hipofosfito) como únicas fuentes de fósforo (5).

En el presente estudio, se demuestra la modificación del cloroplasto del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* con la enzima fosfito deshidrogenasa para permitir metabolizar fosfito como única fuente de fósforo e integrarlo dentro de la biomasa y los procesos metabólicos del alga.

Metodología. Para la construcción de los vectores se utilizó la cepa de *E. coli*. Top 10 de acuerdo con los procedimientos de clonación descritos en (6). Para la expresión de proteína, se empleó la cepa de *E. coli* BL 21 Star. El alga *C. reinhardtii* cepa 125c fue cultivada en medio de cultivo TAP de acuerdo con (7). La transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* se realizó mediante el método de biobalística descrito por (8). Para la detección de líneas transgénicas, se realizaron PCR con los oligonucleótidos (JAB 489, 490, 491 y 492) específicos para la proteína. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo con seguido de un Western Blot (9).

Resultados. La tabla 1 muestra los vectores construidos. Los casetes de expresión finales fueron introducidos en el vector p320 que presenta sitios de recombinación homóloga al genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* y se transformaron las microalgas.

Tabla 1. Plásmidos construidos para la expresión de la proteína PTDH.

Vector	Promotor	Terminador
pKM1	atpA	psbA
pKM2	psbD	rbcL

Las células transformadas fueron seleccionadas tras 2-3 semanas después del evento de transformación hasta que formaran colonias bien diferenciadas. Para la evaluar la efectividad de la etiqueta 3X Flag y corroborar la detección de la proteína PTDH, se utilizó la cepa *E. coli* BL 21 Star nativa y transformada con el vector ptxD. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 2), seguido de un ensayo de Western blot.

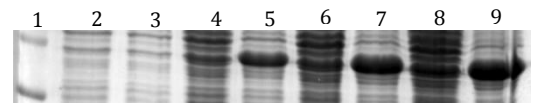


Fig. 1. Gel SDS-PAGE teñido con azul de coomasie para la separación de proteínas en *E. coli* cepa BL 21 Star. 1) Marcador de peso molecular (Western C); 2, 4, 6, 8) *E. coli* nativa; 3, 5, 7, 9) *E. coli* transformada con vector ptxD.

Conclusiones.

- Se construyeron los casetes de expresión pKM1 y pKM2 y se introdujeron al vector p320.
- Se transformó el cloroplasto de *C. reinhardtii* mediante el método de biobalística con los vectores construidos.
- Se realizó la detección de la proteína PTDH mediante la técnica de Western blot.

Agradecimiento. JMSV agradece a CONACyT por la beca.

Bibliografía.

1. Healy, F. (1982). Phosphate. En: *The Biology of Cyanobacteria*. Carr, N. W. Blackwell Scientific Publishers Berkeley and Los Angeles, USA (pp. 105-124).
2. Kononova, S. N. (2002). *Biochemistry*. Vol. 67 (2): 184-195.
3. Hanrahan, H., Salmassi, T.M., Khachikian, C.S, Foster, K.L. (2005) *Talanta*. Vol. 66: 435-444.
4. Morton, S.C., Glindermann, D., Edwards, M.A. (2003). *Environ. Sci. Technol.* Vol 37:1169-1174.
5. Pasek, M. (2008) *PNAS*. Vol 105 (3): 853-858.
6. Sambrook, J. M. (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. New York, EE.UU: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
7. Gorman, D. L. (1965). *PNAS*. , 1665-1669.
8. Boynton, J. Gillham, N.W. Harris, E.H. Hosler, J.P. Johnson, A.M. Jones, A.R. Randolph-Anderson, B.L. Robertson, D. Klein, T.M. Shark, K.B. (1988). *Science*. Vol. 240 (4858): 1534-1538.
9. Laemmli U.K. (1970). *Nature*. Vol. 227 (5259): 680-685.