



EXPRESIÓN BICISTRÓNICA DE GENES HETERÓLOGOS EN EL CLOROPLASTO DE *Chlamydomonas reinhardtii*.

Karla Soledad Macedo-Osorio, Víctor Hugo Pérez-España, Noé Valentín Durán-Figueroa, Jesús Agustín Badillo-Corona, Departamento de Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-IPN, México D. F., C. P.07340. jbadilloc@ipn.mx

Palabras clave: Policistron, Operón, Proteínas heterólogas.

Introducción. La producción de proteínas recombinantes ha tomado gran importancia en los últimos años, las microalgas han sido propuestas como una plataforma de expresión viable, debido a su bajo costo de mantenimiento, pocos requerimientos nutricionales y facilidad de expresar proteínas en el núcleo, cloroplasto o mitocondria (1). El cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*, el alga más estudiada, ha sido secuenciado y en él se han encontrado genes que se transcriben en policistrones (2,3), tal como ocurre en bacterias, estos genes se encuentran separados por regiones intercistónicas (RI) que contienen elementos reguladores de la traducción (4), y que permiten la expresión individual de los genes policistrónicos.

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del uso de regiones intercistónicas del cloroplasto de *C. reinhardtii* para la expresión bicistrónica de genes heterólogos, el gen *aphA-6* que confiere resistencia a kanamicina y el gen *gfp* que codifica para una proteína verde fluorescente.

Metodología. Las RIs de todos los genes policistrónicos del cloroplasto de *C. reinhardtii* (Tabla 1), fueron amplificadas por PCR y clonadas entre los genes *aphA-6* y *gfp*. Esta construcción está regulada por el promotor y terminador *rbcL*. Los casetes de expresión construidos fueron clonados en el vector p320, vector derivado de p322 (*Chlamydomonas* Resource Center, USA), que contiene las regiones homólogas al genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii*. La transformación se realizó por biobalística co-transformando con el vector p228, que confiere resistencia a espectinomocina. Las líneas transformadas fueron seleccionadas por su resistencia a espectinomocina y posteriormente a kanamicina. La presencia de los genes *aphA-6* y *gfp*, fue confirmada por PCR. La expresión del gen *gfp* fue verificada por microscopía de fluorescencia con un microscopio de barrido láser multifotónico (Carl Zeiss).

Resultados. Se transformaron 4 de los 10 vectores construidos que contienen las RI del cloroplasto de *C. reinhardtii* acopladas a los genes *aphA-6* y *gfp* (Fig.1). Las líneas obtenidas fueron resistentes a kanamicina, así mismo se comprobó la presencia de los genes *aphA-6* y *gfp*. La fluorescencia de *gfp* fue visualizada en las líneas transformadas (Fig. 2).

Tabla 1. Genes policistrónicos del cloroplasto de *C. reinhardtii*

RI	Genes policistrónicos	
Op1	<i>petA</i>	<i>petD</i>
Op2	<i>psbB</i>	<i>psbT</i>
Op3	<i>psbN</i>	<i>psbH</i>
Op4	<i>psbD</i>	<i>psaA2</i>
Op5	<i>rps7</i>	<i>atpE</i>
Op6	<i>psaC</i>	<i>petL</i>
Op7	<i>petL</i>	<i>trnN</i>
Op8	<i>tscA</i>	<i>ch1N</i>
Op9	<i>T7g10</i>	
Op10	<i>T7 g10</i>	

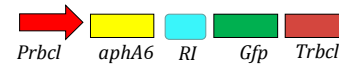


Fig. 1. Representación de los vectores bicistrónicos construidos.

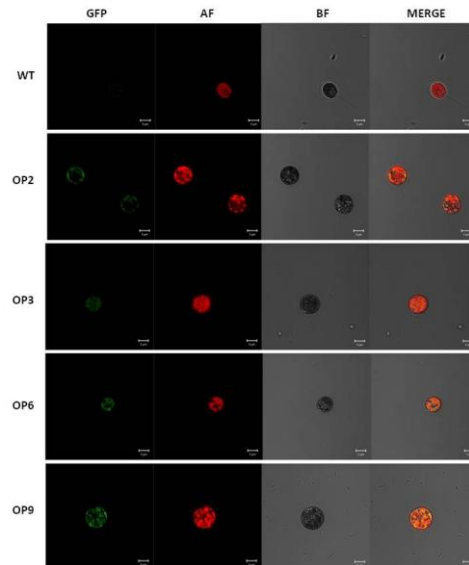


Fig. 2. Microscopía de fluorescencia de células vivas expresando *gfp* (OP2, OP3, OP6, OP9) y la cepa silvestre (WT).

Conclusiones. Cuatro de las RI evaluadas resultaron ser funcionales para la expresión bicistrónica de genes heterólogos en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.

Agradecimiento. KMO es beneficiario de una beca de doctorado de CONACyT. JAB y NDF son beneficiarios de la beca COFAA y EDI-IPN.

Bibliografía.

- Almaraz-Delgado (2014). *AMB Express* 4(1): 57
- Maul J. et al. (2002). *Plant Cell* .14:2659-2679.
- Klein U. (2009) Chloroplast transcription. En: *Chlamydomonas Sourcebook: Vol.2*. Stern D. editor, Academic Press, USA. 893-909
- Lu Y. et al. (2013) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110 (8):E623-32.