



EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *vgb* DE LA HEMOGLOBINA DE *Vitreoscilla* BAJO EL PROMOTOR *trc* SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE ADN PLASMÍDICO EN *Escherichia coli*.

Karim Jaen¹, Juan Carlos Sigala¹, Luz M. Martínez², Guillermo Gosset², Alvaro R Lara¹.

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Departamento de Procesos y Tecnología. Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe, Delegación Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05348 México, D.F. jaenkarim@gmail.com.

²Instituto de Biotecnología, UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Cuernavaca, Morelos

Palabras clave: *trc*, hemoglobina, ADNp

Introducción. Desde su clonación en *E. coli* (1), la hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb), codificada en el gen *vgb*, es usualmente expresada a partir de su promotor nativo en respuesta a la limitación de O₂ disuelto. La modificación de la región promotora de ArcA en dicho sistema permite la expresión de *vgb* en condiciones aerobias con el plásmido pNKD1 (2,3), por lo que las reconocidas bondades de su capacidad amortiguadora de O₂ no son exclusivas en microaerobiosis, ya que en cultivos completamente aerobios de *E. coli* W3110 *arcA*⁻ y *E. coli* MG1655 *sdh*⁺, la expresión de *vgb* a través de pNKD1 incrementó la tasa de crecimiento específico (μ) en un 30 y 40%, respectivamente (4). Con la expectativa de magnificar los efectos benéficos de VHb en cultivos aerobios de *E. coli* y evaluar su potencial aplicación como fábrica celular para ADN plasmídico (ADNp), decidimos expresar *vgb* mediante el promotor fuerte *trc* e investigar su impacto sobre el crecimiento y la producción ADNp.

Metodología. El gen *vgb* fue clonado en el vector de expresión pLoxGentrc (pLox) (5). El vector y la construcción resultante (pLox-*vgb*), fueron transformadas en *E. coli* BL21 (B0). Las cepas transformadas fueron cultivadas a 37 °C en 50 mL de medio LB2X con 5 g/L de glucosa y 1 mM de IPTG a 125 (microaerobio) y 250 (aerobio) rpm. Adicionalmente se cultivó B0 pLox-*vgb* bajo las mismas condiciones sin IPTG como control. La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm. El ADNp se aisló y purificó con el kit QIAprep (Qiagen) y se cuantificó en Nanodrop 2000 mediante espectrofotometría UV.

Resultados. En la Figura 1 se presentan las gráficas de DO, μ y rendimiento específico de ADNp ($Y_{ADNp/X}$) en función del tiempo de los cultivos aerobios y microaerobios de B0 pLox y B0 pLox-*vgb* (control e inducido), respectivamente. Tanto en condiciones aerobias como microaerobias en el periodo comprendido entre las 0 y 5 h, B0 pLox creció más rápido las primeras 2 h, y aunque mantuvo mayor DO que B0 pLox-*vgb*, su μ comenzó a reducirse. En contraste, la μ de B0 pLox-*vgb* se incrementó y se mantuvo por encima de B0 pLox al menos en un 35%, pese a la mayor carga metabólica por la expresión de *vgb* y al mantenimiento de un plásmido con 6% mayor peso molecular que B0 pLox. En lo que toca a la producción de ADNp, $Y_{ADNp/X}$ de B0 pLox fue hasta un 50% superior que B0 pLox-*vgb*. Es interesante notar que la DO y μ del cultivo control de B0 pLox-*vgb*,

fueron idénticas a la del cultivo inducido con IPTG, y que $Y_{ADNp/X}$ del cultivo control fue mayor, sobre todo en condiciones microaerobias, en comparación a la del cultivo inducido.

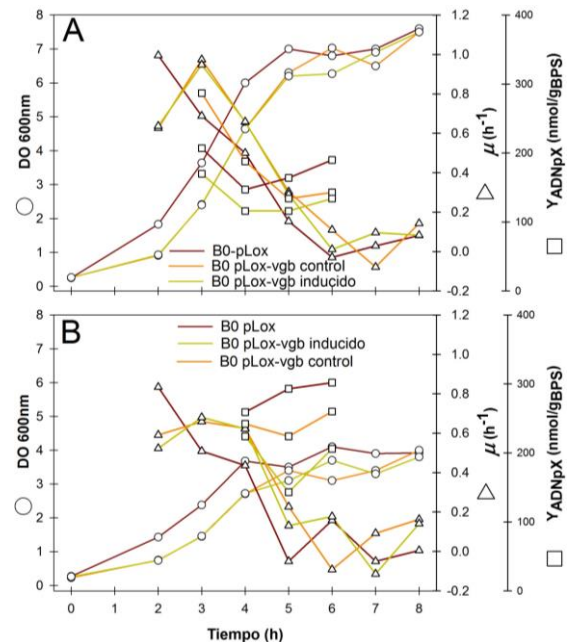


Figura 1. Cinéticas de crecimiento y producción de ADNp aerobio (A) y microaerobio (B) de B0 pLox y B0 pLox-*vgb*.

Conclusiones. La expresión de *vgb* bajo el promotor *trc* incrementó μ a un nivel ligeramente menor al del promotor nativo modificado, incluso prescindiendo de IPTG. Es posible que el incremento esperado en μ no se diera al limitarse la disponibilidad del grupo hemo. Aparentemente la producción de ADNp responde más a μ que a un efecto directo de VHb.

Agradecimiento. A la M. en B. Tania Pablos y la M. en C. Andrea Sabido por facilitar los plásmidos requeridos. A CONACYT por la beca proporcionada (No. 372887).

Bibliografía.

1. Dikshit KL, Webster DA. (1988). Gen.70(2):377-386.
2. Yang J, Webster DA, Stark B. (2005). Microbiol Res.160(4):405-415.
3. Dikshit KL, Orii Y, Navani N, Patel S, Huang H, Stark BC, Webster DA. (1998) Arch Biochem Biophys.349(1):161-166.
4. Pablos TE, Sigala JC, Le Borgne S, Lara A. (2014). Biotechnol J.9(6):791-799.
5. Sabido A, Martínez LM, de Anda R, Martínez A, Bolívar F, Gosset G. (2013). Plasmid.69(1):16-23.