



## PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO ESAT-6 DE *Mycobacterium tuberculosis* USANDO UN SISTEMA TERMOINDUCIBLE EN *Escherichia coli* RECOMBINANTE

Sara Restrepo-Pineda, Carlos G. Bando-Campos, Octavio T. Ramírez, Mauricio A. Trujillo-Roldán, Norma A. Valdez-Cruz.

Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México.

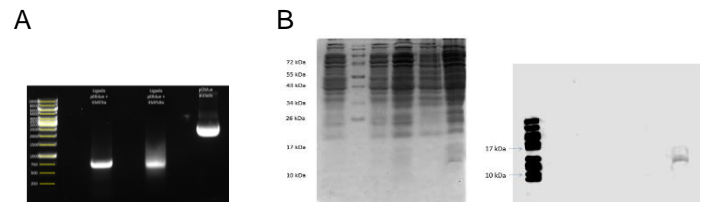
Email: adri@biomedicas.unam.mx

*Palabras clave:* ESAT-6, proteína recombinante, termoinducción, respuesta de choque térmico.

**Introducción.** El sistema de expresión termoinducible de *Escherichia coli* tiene un gran interés a nivel biotecnológico para la producción de proteínas recombinantes en la industria. Se basa en los promotores fuertes pL y/o pR regulados por el represor mutante termolábil cI857 del bacteriófago  $\lambda$ . Con este sistema de inducción se evita la adición de inductores químicos que pueden ser tóxicos y costosos y, además, se minimizan riesgos de contaminación<sup>(1,2)</sup>. Sin embargo, la termoinducción lleva a la activación de la respuesta de choque térmico que inicia con la expresión de chaperonas y proteasas involucradas en la degradación y correcto plegamiento de la proteína recombinante<sup>(3,4)</sup>. Por otro lado, el antígeno de secreción ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*, se ha considerado importante para el diseño de herramientas diagnósticas contra la tuberculosis, además de tener un papel importante en la respuesta celular inmune<sup>(5)</sup>. El objetivo principal es obtener y caracterizar una clona de *E. coli* recombinante productora de ESAT-6, usando un sistema de expresión inducido por temperatura.

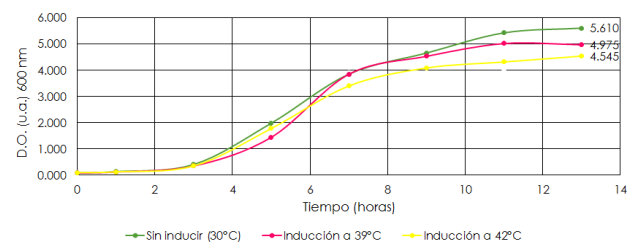
**Metodología.** Se realizó el diseño y construcción del plásmido con la secuencia codificante de ESAT-6. Después se realizó la transformación de la cepa de *E. coli* ATCC 53606 con el plásmido realizando la selección de clona transformada por PCR. Más adelante, se realizaron cinéticas de crecimiento de la clona transformada en matraces de 250 mL y en biorreactores de 1 L a 30°C. Para la expresión de la proteína recombinante ESAT-6, se indujo a 39°C y 42°C. El crecimiento se analizó a través de los cambios de densidad óptica (D.O.) (600 nm) en espectrofotómetro. Tras la recuperación y solubilización de los cuerpos de inclusión de *E. coli*, se comprobó la expresión de la ESAT-6 recombinante en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y Western blot.

**Resultados.** Construcción del plásmido p $\Delta$ blue+ESAT6, transformación de *E. coli* 53606 y expresión de la proteína ESAT-6. Una vez construido el plásmido, se realizó la transformación bacteriana y se comprobó por secuenciación y PCR (Figura 1A). Luego se realizaron cultivos termoinducidos de *E. coli* ATCC 53606 recombinante para comprobar la producción de proteína ESAT-6, observando su expresión en forma insoluble o en cuerpos de inclusión (Fig. 1B).



**Fig. 1.** Expresión de ESAT-6 en *E. coli* 53606 recombinante. 1A, amplificación por PCR de la secuencia del plásmido. 1B, izquierda: gel SDS-PAGE teñido con Coomassie, en el último carril se observa una banda aproximadamente a 13 kDa en cuerpos de inclusión; derecha: Western blot utilizando anticuerpo anti-ESAT6 (Thermo-Scientific).

**Caracterización de crecimiento de clona productora de ESAT-6.** Se realizaron cinéticas de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 recombinante con medio mínimo a diferentes temperaturas (30, 39 y 42°C), observando que bajo un sistema termoinducido, hay una disminución en la biomasa final y en la velocidad de crecimiento (Fig. 2).



**Fig. 2.** Cinética de crecimiento de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 en matraces a 200 rpm usando medio mínimo, bajo diferentes condiciones de inducción (6 hrs. de crecimiento).

**Conclusiones.** La construcción del plásmido p $\Delta$ blue con el gen de ESAT-6 fue realizada correctamente. Se observó expresión de ESAT-6 recombinante en cuerpos de inclusión cuando se elevó la temperatura a 39°C y 42°C. Se observó una disminución en la densidad celular y en la velocidad específica de crecimiento en los cultivos termoinducidos.

**Agradecimientos.** CONACYT 178528, 214404 y 220795; PAPIIT-UNAM IN-210013 y IN-209113.

### Bibliografía.

- (1) Valdez-Cruz N.A., Caspeta L., Pérez N.O., Ramírez O.T., Trujillo-Roldán M.A. (2010). *Microb Cell Fact*, 9:18.
- (2) Caspeta L., Lara A., Pérez N., Flores N., Bolívar F., Ramírez O. (2013). *J Biotechnol*, 167: 47–55.
- (3) Harcum S., Haddadin F. (2006). *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33: 801-814.
- (4) Valdez-Cruz N.A., Ramírez O.T., Trujillo-Roldán M.A. (2011). *Bioeng Bugs*, 2: 2.
- (5) Van Pinxteren L.A.H., Ravn P., Agger E.M., Pollock J., Andersen P. (2000). *Clin Diagn Lab Immunol*, 7: 155-160.