



## ELECCIÓN DEL GEN DE REFERENCIA IDÓNEO PARA CUANTIFICAR LA EXPRESIÓN DEL GEN *ATF1* EN *S. cerevisiae* DURANTE CULTIVO EN CONTINUO CON *Agave tequilana*.

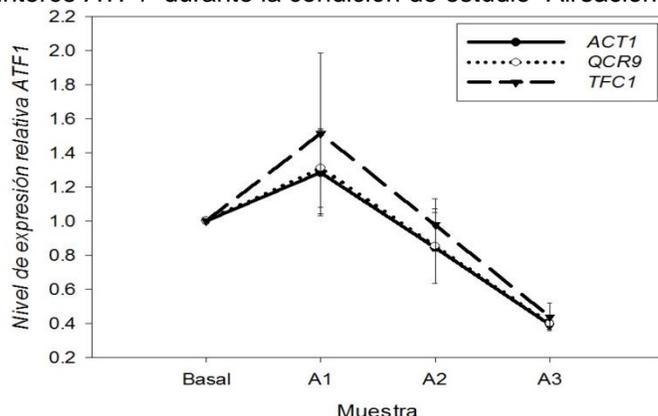
Laura-Elena Iñiguez-Muñoz, Luis-Eduardo Segura-García, Manuel-Reinhart Kirchmayr, Lorena Amaya-Delgado, Anne Gschaedler-Mathis, CIATEJ, Departamento de Biotecnología Industrial, Guadalajara, Jalisco 44270, laurainiguez09@hotmail.com

*Palabras clave:* GR, *ATF1*, *S. cerevisiae*.

**Introducción.** La reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) es la técnica más utilizada para medir la expresión génica. La normalización es esencial para un sistema fiable, ésta consiste en tener genes de referencia (GR) con expresión estable. La normalización contra un GR único es inaceptable a menos que se presente evidencia que confirme su expresión invariable bajo las condiciones experimentales (1). Durante la fermentación alcohólica del tequila, *S. cerevisiae* produce etanol, ésteres y otros compuestos a partir del jugo de *Agave tequilana*. Los ésteres son sintetizados por acción de las enzimas alcohol acetiltransferasas, codificadas por el gen *ATF1* entre otros. Los ésteres aportan caracteres frutales que confieren mayor calidad aromática al tequila. En este trabajo se buscó el GR idóneo para cuantificar la expresión del gen *ATF1* durante un cultivo en continuo con jugo de *Agave tequilana* como medio de cultivo y bajo diferentes condiciones experimentales.

**Metodología.** Se utilizó la cepa (AR5) de la colección de CIATEJ. Muestras tomadas durante la fermentación en continuo fueron sometidas a la extracción de ARNm y síntesis de ADNc. La amplificación de fragmentos por qPCR se realizó con iniciadores previamente publicados para los genes *ATF1*, *ACT1*, *QCR9* y *TFC1* (2-5). La eficiencia de iniciadores y cuantificación relativa se calculó de acuerdo a lo establecido por Pfaffl (6). El valor resultante fue normalizado en base al número de células, la cantidad de ARNm y ADNc.

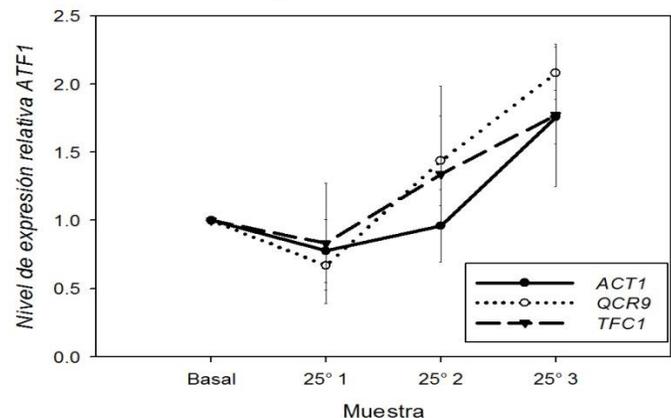
**Resultados.** La gráfica 1 muestra la estabilidad lograda por los GR *ACT1*, *QCR9* y *TFC1* en relación al gen de interés *ATF1* durante la condición de estudio "Aireación".



**Fig. 1.** Nivel de expresión relativa del gen de interés *ATF1* contra los genes de referencia *ACT1*, *QCR9* y *TFC1* en la condición "Aireación".

Se observa que el nivel de expresión más inestable o que presenta un mayor rango (valor mayor – valor menor) es del gen *TFC1*; la estabilidad del gen *ACT1* y *QCR9* durante esta condición de estudio es muy similar.

La gráfica 2 muestra la estabilidad lograda por los mismos genes al disminuir la temperatura de fermentación de 30° a 25°C.



**Fig. 2.** Nivel de expresión relativa del gen de interés *ATF1* contra los genes de referencia *ACT1*, *QCR9* y *TFC1* en la condición "25°C".

Durante la condición de estudio "25°C", el nivel de expresión más inestable fue del gen *QCR9* mientras los niveles de expresión de los genes *ACT1* y *TFC1* fueron similares (Fig. 2).

**Conclusiones.** El gen *ACT1* fue seleccionado como el gen de referencia idóneo para este trabajo por presentar el menor rango de variación durante las diferentes condiciones experimentales estudiadas en comparación con los genes *QCR9* y *TFC1* en *S. cerevisiae*.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue financiado por FOMIX JALISCO por medio del proyecto con clave 123157.

### Bibliografía.

1. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. (2009). *Clin Chem*. 55: 611-622.
2. Molina AM, Swiegers JH, Varela C, Pretorius IS, Agosin E. (2007). *Appl Microbiol Biotechnol*. 77: 675-687.
3. Babiskin AH, Smolke CD. (2011). *Mol Syst Biol*. 7: 471.
4. Vaudano E, Costantini A, Cersosimo M, Del Prete V, García-Moruno E. (2009). *Int J Food Microbiol*. 129: 30-36.
5. Teste M, Duquenne M, François J, Parrou J. (2009) *Mol Biol*. 10:1-15.
6. Pfaffl MW. (2001). *Nucleic Acids Res*. 29: e45.