



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EXPRESIÓN DEL GEN *invB* DE *Zymomonas mobilis* EN *Pichia pastoris*. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES MEDIANTE BIOENSAYO EN PLACAS INDICADORAS.

Ara Itzel Pérez de los Santos Mondragón, María de los Ángeles Calixto Romo, Alejandro Santiago Hernández, María Eugenia Hidalgo-Lara. Depto. De Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. México, D.F. C.P. 07360. Tel. 5747-3800 ext. 4360. e-mail:ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: *Pichia pastoris*, bioensayo, promotor AOX1.

Introducción. La selección de transformantes funcionales implica una serie de etapas si no se cuenta con un método para su identificación. En el laboratorio de ingeniería de proteínas, se ha trabajado ampliamente con las invertasas provenientes de *Zymomonas mobilis*, debido a su importancia potencial a nivel industrial; además de que, su estudio sirve como modelo para futuros trabajos. *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica muy utilizada para la obtención de enzimas recombinantes, debido a las ventajas que posee. Entre algunos de sus promotores más utilizados se encuentran el promotor AOX1 (promotor inducible), considerado como promotor fuerte, regulado en presencia de metanol en el medio de cultivo. Ofrecer nuevas alternativas para la producción de proteínas de uso industrial, así como el mejoramiento de éstas, permite optimizar y disminuir costos en su utilización.

Objetivo: Seleccionar transformantes de *P. pastoris*/pPICZαA-*invB*, con actividad invertasa, por bioensayo con TTC.

Metodología. Subclonación del gen *invB* de *Z. mobilis* en vector pPICZαA y transformación en *Pichia pastoris*. Cultivo de transformantes en placas con medio mínimo y TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium). Comprobación de inserto por PCR. Expresión de invertasa recombinante por inducción con metanol.

Resultados.

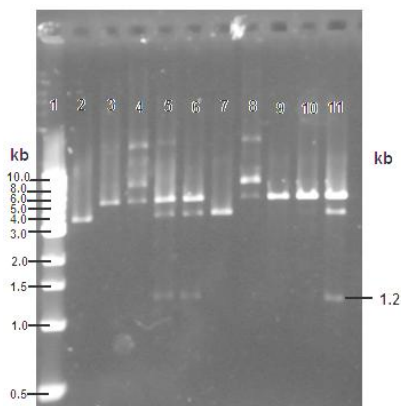


Figura 1. Análisis electroforético de digestiones del DNA plasmídico de clonas con construcción pPICZαA/*invB* digerido con *Eco RI* y *Sac II*

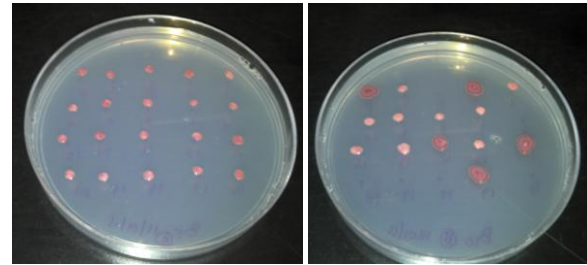


Figura 2. Análisis de 40 cepas de *P. pastoris* con la construcción pPICZαA/*invB* en placas con medio mínimo con TTC y 0.5% de metanol.

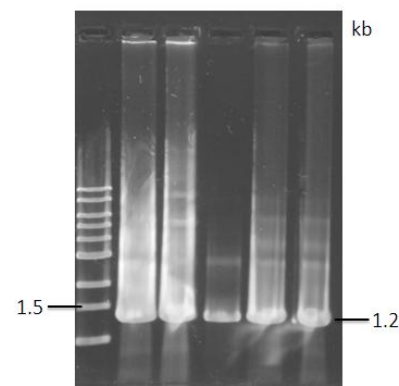


Figura 3. Análisis por PCR de las transformantes 2, 5, 11, 13, 17 resultantes de estudio con TTC.

Conclusiones. El método colorimétrico con el TTC es efectivo para discriminar entre transformantes con presencia y ausencia del gen *invB*.

Agradecimiento. Al CINVESTAV por el financiamiento de esta investigación y a la beca otorgada a AIPSM por el CONACYT para realizar estudios de doctorado.

Bibliografía.

1. Bochner B y Savageu M. (1977). *App. Envirom. Microbiol.* 33 (2): pág. 434-444.
2. Yanase H, Fukushi H, Ueda N, Maeda Y, Toyoda A y Tonomura K. (1998). *Agric. Biol. Chem.* 55 (5): pág. 1383-1390.
3. Ryan J, Farr H, Visnovsky S, Vyssotski M y Visnovsky G. (2010). *J. Microbiol Methods.* 82: pág. 49-53.