



TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CLOROPLASTO DE *Nicotiana tabacum* CON UN FRAGMENTO DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA TOXINA A DE *Staphylococcus aureus*.

Carmen Daniela González-Barriga., Tania Siqueiros-Cendón., Sigifredo Arévalo-Gallegos., Antonio García-Triana., Gilberto Erosa-De La Vega., Quintín Rascón-Cruz.

Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Circuito N.1 Nuevo Campus Universitario Chihuahua, Chih. México 31125. Tel. 614 2366000 qrascon@uach.mx

Palabras clave: Toxina A, *Nicotiana tabacum*, Recombinación homologa.

INTRODUCCIÓN. En los últimos años la transformación genética de plantas ha logrado introducir genes al genoma de cloroplasto, ya que presenta un mayor nivel de expresión que el núcleo debido al alto número de copias de su genoma, como también evitar la transferencia horizontal de genes⁽¹⁾. *Staphylococcus aureus* es un patógeno muy importante para el ser humano y algunos animales, generando enfermedades por la diversidad de factores de virulencia que tiene, de los cuales destaca con mayor relevancia la toxina A, la cual causa intoxicación almenaría y mastitis en animales⁽²⁾.

En trabajos recientes se ha observado que los epítopes de una proteína pueden ser usados como antígenos, para generar en un huésped inmunogenicidad, por tanto se pretende transformar cloroplastos de tabaco con el gen tox A.

METODOLOGÍA. Se clono en el vector de recombinación homologa pCPTn, el gen que codifica para la toxina A en los sitios NheI y XbaI dentro de las regiones *mn16* y *rps 12/7*, posteriormente se bombardearon hojas de tabaco con la construcción pCPTnToxA. Los explantes de tabaco se colocaron en medio de choque osmótico 24 h. antes del bombardeo, se probaron distintos parámetros para estandarizar la técnica de bombardeo, en la cual se utilizó el plásmido pCAMBIA 1302 que contiene el gen marcador para la proteína verde fluorescente⁽⁴⁾ en el dispositivo PIG (Particle Inflow Gun), las condiciones fueron las siguientes: 60, 80 y 100 Lb y 5, 10 y 50 µg, conteniendo la mezcla, tungsteno (1 µg), H₂O estéril, CaCl₂ 2.5M y espermidina 100 mM.

RESULTADOS. Se realizó la construcción del vector pCPTnToxA, que contiene el gen tox A (Figura 1).

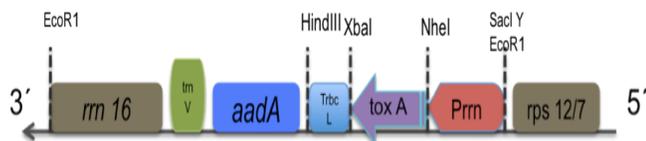


Figura 1: Mapa del vector pCPTnToxA con la inserción del gen tox A entre las regiones de recombinación homologa del genoma plásmido de tabaco. El gen toxA es expresado por el promotor Prm. Sitio de selección de Espectinomicina (*aadA*), *TrbcL* estabiliza el mRNA.

utilizando distintos tratamientos, se encontraron las condiciones más efectivas para el bombardeo, 50 µg de DNA, 6 µL de mezcla de reacción, 15 cm de distancia, 80 lb de presión, obteniendo 36 foci por campo, con el cual se obtuvo la mayor expresión del gen de la proteína verde fluorescente (Tabla 1).

Tabla 1. Promedio de focio por campo utilizando diferentes tratamientos.

tratamiento	Promedio de foci por campo
A	5
B	6
C	8
D	8
E	28
F	36

Los materiales bombardeados con el vector pCPTnToxA se mantienen en medio de selección con Espectinomicina para lograr la generación de brotes transplasmómicos que contienen el gen de la toxina A en cloroplasto (figura 2).



Figura 2. (A) Explantes de tabaco en medio osmótico (B) Explantes bombardeados en medio RMOP.

CONCLUSIÓN: Se logró la subclonación del gen tox A, obteniéndose la construcción genética pCPTnToxA, la cual se ha utilizado para el bombardeo de explantes de *N. tabacum*. Se encontraron las mejores condiciones para llevar a cabo los ensayos de biobalística, utilizando el gen de la proteína verde fluorescente como marcador.

AGRADECIMIENTO: A CONACYT por brindar la beca para realizar la tesis de Maestría Ciencias en Biotecnología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Svab, Z., Hajdukiewicz, P., Maliga, P. (1990). *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8526–8530.
2. Betley, M., Mekalanos, J. (1988). *J. Bacteriology*. 170 34-41.
3. Sidorov, V., Kasten D., Pang, S., Hajdukiewicz, P., Staub, J., Nehra, N. (1999). *Plant J* 19: 209–216.

