

SÍNTESIS *IN VITRO* POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y LA EXPRESIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA TERMOLÁBIL (LTB) DE *Escherichia coli* PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA COMESTIBLE.

José Luis Sánchez Vargas José Luis¹, Rubén López Revilla² y G. Calva Calva¹.

¹Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y ²Departamento de Biología Celular, Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508 Sn. Pedro Zacatenco, CP. 07360 México, D.F. Fax 57473800 ext.4305. gcalva@mail.cinvestav.mx.

Palabras claves: Vacunas comestibles, toxina termolábil, genes sintéticos.

Introducción. La vacunas tradicionales son elaboradas con microorganismos o virus completos ó parte de los mismos que previamente son atenuados o inactivados con diferentes procedimientos físicos, químicos ó biológicos. A pesar del enorme beneficio que representan para la salud de los humanos, existe el inconveniente con algunas vacunas de ser un gran riesgo potencial para la salud de los empleados en los centros de fabricación y para algunos de los vacunados. Las metodologías de Ingeniería Genética han propiciado la identificación y la manipulación *in vitro* de los genes y han determinado el desarrollo de vacunas recombinantes de subunidades específicas. El avance más reciente en la vacunología lo representa la expresión de antígenos relevantes, como el de la superficie del virus de la hepatitis B o de la subunidad B de la toxina del cólera y de la toxina termolábil de *E. coli*, en tejido comestible de plantas de papa (1, 2) desarrollandose así el concepto de vacunas comestibles. Nuestro grupo está interesado en el desarrollar de un modelo de vacuna comestible en plantas de zanahoria que pueda ser útil para combatir las diarreas provocadas por *E. coli* enterotoxigénica.

Metodología. Se diseñó un gen quimérico con uso de codones más apropiado para su expresión en *D. carota*. Se decidió incluir en el marco de lectura del gen, una secuencia de secreción para vegetales y una señal de retención microsomal que permita un tránsito lento y su probable almacenamiento en el retículo endoplasmático. Para lograr la síntesis *in vitro* del gen quimérico *pr1BeltB* se usaron 10 oligonucleótidos parcialmente sobrelapados con diferentes longitudes de 47-81 nts. Para la síntesis *in vitro* se usó la PCR con dos fases diferentes de amplificación; una inicial de 10 ciclos y mezclando los 10 oligonucleótidos sobrelapantes en 16 pb, y un segundo PCR para la extensión de productos del tamaño correcto de 475 pb por el uso de un par de oligonucleótidos de 21 pb que representaron los extremos 5' y 3' terminales del amplicon. El gen de 475 pb se clonó en el vector (pBSIIKS) para su secuenciación, al hacer uso de los sitios BamHI y XbaI que se insertaron en los extremos de los oligonucleótidos respectivos. La secuencia del producto de PCR se realizó por el método de Sanger en un secuenciador automático. Se realizaron varias subclonaciones desde el vector de secuenciación para

colocar el gen sintético en vehículos de expresión bacterianos y de plantas. Los plásmidos recombinante obtenidos se utilizaron para la transformación de *E coli* y protoplastos de zanahoria. Los protoplastos fueron obtenidos por digestión enzimática de la pared celular de un cultivo en suspensión de *D. carota* variedad Nanteys.

Resultados y Discusión. De 14 clonas enviadas a secuenciar sólo una mostró poseer la estructura primaria adecuada al diseño inicial, todas las demás durante el proceso de polimerización con la enzima termoresistente comercial elongasa (mezcla de Taq polimerasa y Pwo) introdujo deleciones o inserciones en el amplicon que determinaron un corrimiento del marco de lectura en el gen. Para la expresión en bacterias se usó el vector pQE30 y 31, los cuales permiten hacer fusiones traducionales en diferente fase de lectura de los genes de interés colocandolos bajo señales transcripcionales y traducionales fuertes que determinan una expresión abundante en *E coli*. Por ensayos de ELISA y Western se detectó un producto proteico de tamaño similar al de la subunidad B de la toxina del cólera comercial que se usó como control positivo. Para la expresión en plantas se investigó la expresión transitoria del gen puesto bajo el control de un promotor quimérico el denominado P4ocs35S del vector pBPFQ9 y el P2.35S del vector pUI235-5.1.

Conclusiones. Se logró sintetizar un nuevo gen quimérico que podremos usar para obtener zanahorias transgénicas que podrán utilizarse para inmunizar ratones y determinar en ellos los niveles de anticuerpos antiCTB circulantes y secretorios. Además podremos utilizar las plantas transgénicas como biorreactores para la obtención de la LTB y su uso como adyuvante con otros antígenos purificados.

Agradecimientos. Trabajo financiado por el donativo al proyecto MEXUS-CONACyT

Bibliografía. 1. Mason HS, DM-K Lam, CJ Arntzen. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci (USA) 89:11745-11749.
2. Mason HS, TA Haq, JD Clements, CJ Arntzen. 1998. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic lt-b gene. Vaccine 16:1336-1343