

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS PARA EL DISEÑO DE UN BIOSENSOR BACTERIANO DE *L. lactis*

America Selene Gaona Mendoza; Julio Armando Massange Sánchez; Luz Edith Casados Vázquez, Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida. Irapuato, C.P. 36500, as.gaonamendoza@ugto.mx.

Palabras clave: Optimización de genes, transcripción, traducción.

Introducción. Los biosensores bacterianos son herramientas genéticas que permiten detectar un analito objetivo, por ejemplo, moléculas producidas por microorganismos patógenos. Esto se logra gracias al diseño de circuitos con piezas genéticas que conforman al elemento sensible el cual reconoce al analito, y al elemento transductor que genera una señal de salida, por ejemplo óptica⁽¹⁾. Para generar un biosensor funcional, es necesario que la célula huésped tenga la capacidad de transcribir y traducir las proteínas de ambos elementos correctamente.

Es por ello que el objetivo del presente trabajo es evaluar la expresión de las proteínas AgrC, AgrA y mCherry que conforman al elemento sensible y transductor de un biosensor de *Lactococcus lactis* para la detección del péptido AIP proveniente de *Listeria monocytogenes* (Lm).

Metodología. *L. lactis* NZ3900 subsp. *cremoris* fue utilizado para la producción de las proteínas AgrC, AgrA y mCherry (esta última con y sin secuencia optimizada); se utilizó el Sistema de Expresión Controlado por Nisina (NICE) para la expresión de éstas. Una vez generadas las construcciones *pNisA-agrCA*, *pNisA-mCherry* y *pNisA-mCherry_optimizado* se corroboró la síntesis de los transcritos de cada gen, se evaluó el perfil proteico mediante geles SDS-PAGE al 17% teñidos con Coomassie y con la construcción *pNisA-mCherry_optimizada* se estandarizaron condiciones adecuadas de concentración de inductor (Nisina), pH y tiempo de incubación posterior a la inducción⁽²⁾.

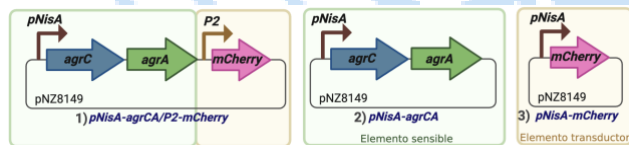


Fig.1. Piezas genéticas del biosensor de *L. lactis*. Biosensor completo (1) y construcciones para evaluar la expresión de las proteínas AgrC, AgrA y mCherry (2 y 3).

Resultados. Se comprobó que los genes *agrC*, *agrA* y *mCherry* con y sin optimización son reconocidos por la maquinaria de *L. lactis* ya que a partir del mRNA y mediante RT-PCR se obtuvieron ampliaciones de cada gen (Fig. 2 A). *L. lactis* tiene la capacidad de reconocer secuencias genéticas provenientes de bacterias como *Lm* y llevar a cabo el proceso de transcripción. Al evaluar el perfil proteico mediante geles SDS-PAGE de las proteínas AgrC, AgrA y mCherry no se logra percibir la

sobreexpresión de ninguna de estas proteínas al inducir con nisina a comparación con la expresión de mCherry optimizada la cual se expresa en todas las concentraciones del inductor evaluado (Fig. 2B).

La proteína mCherry optimizada permitió estandarizar parámetros óptimos de expresión de proteínas heterólogas en *L. lactis*, siendo éstos un rango de pH de 6-6.5, 16 h de incubación posteriores a la inducción, y 80 ng/ mL de nisina como inductor (Fig. 2C).

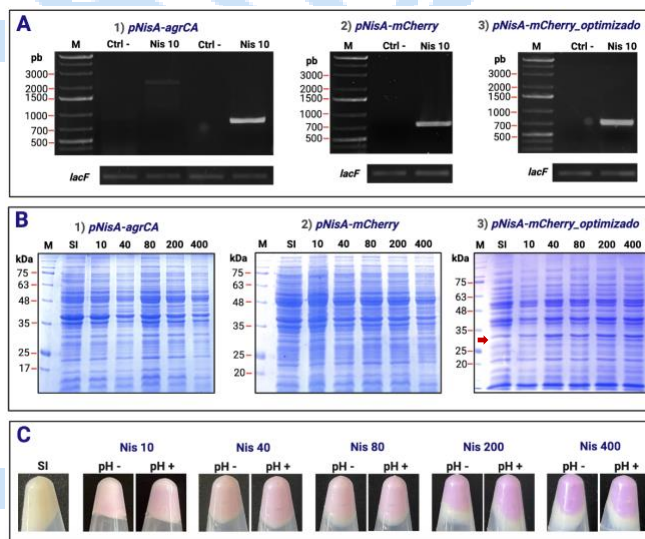


Fig. 2. A. PCR a partir de cDNA. **B.** Perfil proteico de proteínas expresadas en *L. lactis*. **C.** Parámetros óptimos para expresar mCherry. Ctrl-: *L. lactis* silvestre. Nis 10, 40, 80, 200, 400: inducción con 10, 40, 80, 200 ó 400 ng/μL de nisina. *lacF*: gen endógeno control. M: marcador de peso molecular. SI: Sin inductor. pb: pares de bases. kDa: kiloDalton. pH-: pH sin ajustar. pH+: pH ajustado. →: proteína mCherry (26.7 kDa).

Conclusiones. En nuestro estudio es necesario realizar análisis más finos para descartar una baja producción de proteínas con secuencia no optimizada. La optimización de codones resulta una opción viable para producir proteínas de manera exitosa pero no asegura la ausencia de problemas de plegamiento y solubilidad.

Agradecimientos. A la Universidad de Guanajuato y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Bibliografía.

1. Singh, A., & Kumar, V. (2021). *Ana Bioanal Chem.* 413: 73-82.
2. MoBiTec. NICE® expression system for *Lactococcus lactis* handbook. 2015.