

DISEÑO DE UN PLÁSMIDO SINTÉTICO miniR1 Y SU PRODUCCIÓN POR *Escherichia coli* MODIFICADA GENÉTICAMENTE.

Fabiola Islas Lugo, Inés Penella, Daniela Velázquez, Juan Carlos Sigala, Alvaro R. Lara
Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Departamento de Procesos y Tecnología, Ciudad de México 05348,
fabi_il@hotmail.com.

Palabras clave: plásmidos sintéticos, miniR1, microaerobio.

Introducción. La producción de plásmidos de uso terapéutico se centra casi exclusivamente en el uso de vectores que contienen el replicón pUC de alto número de copias, por lo que existe un amplio campo de innovación. Un ejemplo son los plásmidos con origen de replicación R1. Se ha demostrado que este tipo de plásmidos pueden producir altos rendimientos de ADNp (1). El plásmido R1 fue descubierto en 1963 en *Salmonella* y fue secuenciado completamente en 2017 (2), con una longitud de 97566 nucleótidos. El origen de replicación del plásmido R1 (oriR1) tiene una estructura de origen theta. La replicación ocurre de manera unidireccional y es iniciada por la proteína RepA, cuya expresión está controlada transcripcionalmente por el promotor P2 y parcialmente por el promotor P1 y acoplada de manera translacional a un pequeño péptido líder, el gen *tapA*. Dos moléculas ejercen un control de replicación negativo: la proteína CopB, expresada desde el promotor P1, reprime la transcripción de *repA* del promotor P2, mientras que el ARN antisentido codificado por *copA* bloquea la traducción de *tapA* (3).

En el presente trabajo se diseñó un plásmido sintético, el cual contiene los elementos mínimos del plásmido R1, llamado miniR1. Posteriormente se evaluó su producción utilizando una cepa de *Escherichia coli* diseñada para expresar la hemoglobina de *Vitreoscilla*, para la producción de ADNp en condiciones microaerobias (4).

Metodología. Cepa y plásmido: La cepa utilizada fue *Escherichia coli* W3110 *recA⁻ vgb⁺*. La cepa fue transformada con el plásmido mini R1. El pminiR1 (2808 pb) contiene los elementos mínimos del plásmido R1, con marcador de resistencia a kanamicina. **Medios y cultivo:** Medio LB (Sigma, MO, USA), Medio mineral (5) suplementado con 2.5 g/L de glucosa y 1 g/L de extracto de levadura. Los cultivos aerobios, se llevaron a cabo en matraces bafleados de 250 ml con 30 ml de medio a 250 rpm y 37°C, el cultivo se inició a 0.2 DO_{600nm}; los cultivos microaerobios se llevaron a cabo en matraces de 250 ml con 65 ml de medio a 100 rpm a 37°C, el cultivo se inició a 0.6 DO_{600nm}. Los cultivos se realizaron por triplicado. **Métodos analíticos:** El plásmido se obtuvo con el kit QIAgen Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Germany) y se midió espectrofotométricamente utilizando el NanoDrop One (Thermo Scientific, MA, USA).

Resultados. La biomasa (g/L), la concentración de plásmido (mg/L) y el rendimiento específico (mg/g) obtenidos con el plásmido pminiR1 se muestran en la Fig. 1, podemos observar que en los cultivos aerobios no se observa diferencia significativa, entre los dos medios de cultivo, en el cultivo microaerobio con medio mineral se observa una disminución de biomasa y producción de plásmido. Sin embargo, en el cultivo

microaerobio con medio LB se observa el menor crecimiento, la mayor producción de plásmido (11.2 mg/L) y por lo tanto el mayor rendimiento (17.07 mg/g). Al igual se realizaron cultivos, empleando el plásmido pUC 57 Kan, los cuales se muestran en la Tabla 1, con el fin de comparar la producción de ADN plasmídico. La producción de pminiR1 fue 17% menor en el cultivo aerobio, sin embargo fue 14% mayor en el cultivo microaerobio con respecto al plásmido pUC57 Kan.

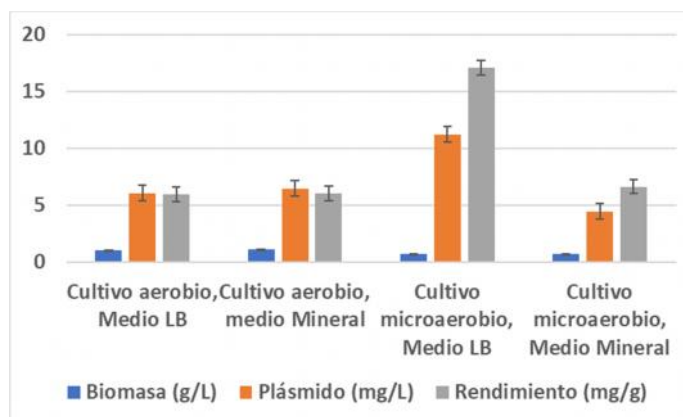


Fig. 1. Crecimiento, producción de plásmido y rendimiento del plásmido pminiR1, en cultivos aerobios y microaerobios

Tabla 1. Biomasa, plásmido y rendimiento del plásmido pUC57Kan en cultivo aerobio y microaerobio empleando medio LB.

pUC57Kan	Cultivo aerobio	Cultivo microaerobio
Biomasa (g/L)	1.03±0.04	0.57±0.01
Plásmido (mg/L)	7.25±0.35	9.64±1.15
Rendimiento (mg/g)	6.90±0.64	16.95±1.61

Conclusiones. El plásmido sintético pminiR1 presenta producciones y rendimientos similares a los del pUC57Kan, el cual es un plásmido de alto número de copias. El empleo de la cepa *Escherichia coli* W3110 *recA⁻ vgb⁺* bajo condiciones de microaerobiosis incrementa la producción de plásmido.

Agradecimientos. A la UAM por la beca posdoctoral otorgada.

Bibliografía.

1. Bower D, Prather K (2012) *Microbial Cell Factories*. 11: 1-10
2. Cox K, Schildbach J (2017) *Plasmid*. 91: 53-60
3. Nordström K (2006) *Plasmid* 55: 1-26
4. Jaén K (2018) Desarrollo de una plataforma eficiente para la producción de ADN plasmídico en condiciones microaerobias por *Escherichia coli*. Tesis doctoral, UAM-C.
5. Jaén K et al. (2017) *BMC Biotechnology*. 17(60): 1-12.

