

EVALUACIÓN DE CIRCUITOS SINTÉTICOS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Daniela Velazquez, Juan Carlos Sigala, Alvaro R. Lara
Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Departamento de Procesos y Tecnología.
Ciudad de México, 05348.
daniela369.velaz@hotmail.com

Palabras clave: ADNp, microaerobiosis, rnal

Introducción. El ADN plasmídico (ADNp) cobra cada vez mayor importancia debido al incremento de sus aplicaciones en terapia génica y en el desarrollo de vacunas, por lo tanto, es de esperarse que en un futuro no muy lejano la demanda del ADNp se incremente (1). Dentro del origen de replicación de los plásmidos pUC, están contenidos los genes *rnal* y *rnall*, los cuales controlan la replicación del plásmido. La abundancia de RNAlI determina la cantidad de moléculas de plásmido en la célula (2). En el presente trabajo se planteó desarrollar un esquema de autoinducción de la replicación del ADNp en condiciones microaerobias mediante la modificación del plásmido directamente en la replicación del vector utilizando promotores inducibles por microaerobiosis.

Metodología. Se insertó una copia extra del gen *rnall* bajo el control los promotores microaerobios P_{vgb} , P_{yfid} y, una variación de este último, P_{yfidm} en pUC57mini. Estos promotores están regulados por la molécula de control positivo fumarato y nitrato reductasa (3). Se evaluaron las construcciones en las cepas de *E. coli* W3110 *recA*⁻ y W3110 *recA*⁻ *vgb*⁺ transformadas con los circuitos en medio mineral con glucosa y en LB 2X bajo dos condiciones:

- Aerobiosis: Matraces de 250mL bafleados con 50mL de medio y 300 rpm.
- Microaerobiosis: Matraces de 250mL con 80mL de medio y 150/100 rpm.

El crecimiento celular se midió por absorbancia a 600 nm y se tomó muestra para la cuantificación de ADNp en la fase exponencial. La extracción y cuantificación de este se realizó con un kit comercial y su concentración se midió espectrofotométricamente. El análisis de los plásmidos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Resultados. En las siguientes figuras se muestran los rendimientos obtenidos con las cepas W3110 *recA*⁻ y W3110 *recA*⁻ *vgb*⁺ transformadas con las diferentes construcciones bajo condiciones aerobias y microaerobias en medio mineral y en LB 2X (Fig. 1). Los promotores P_{yfid} y P_{yfidm} presentaron rendimientos bajo condiciones microaerobias mayores al de pUC57mini con ambas cepas. El máximo rendimiento alcanzado fue de 16.63 mg/g con la cepa W3110 *recA*⁻ *vgb*⁺, 12 veces mayor al de pUC57mini.

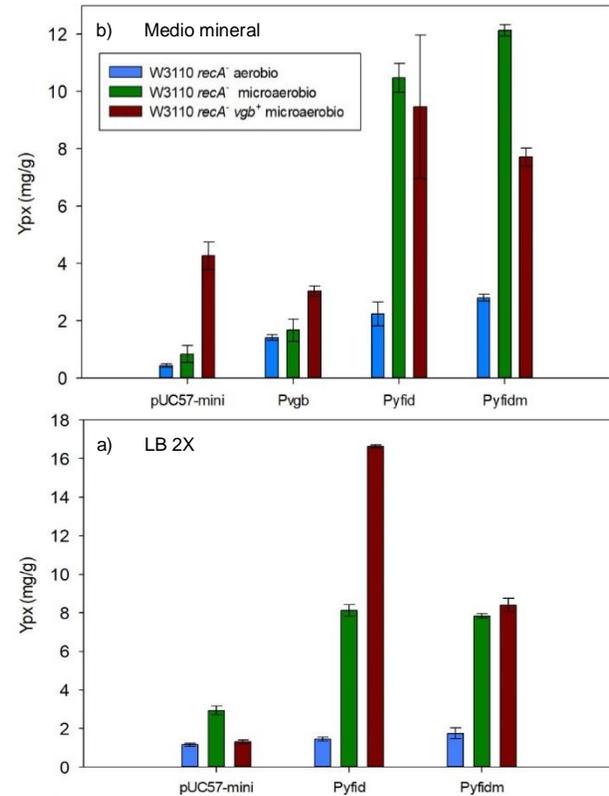


Fig. 1. Comparación de los rendimientos obtenidos en fase exponencial de las diferentes cepas con ambas condiciones en medio mineral (a) y LB 2X (b). Las barras verticales muestran la desviación estándar.

Conclusiones. Los circuitos sintéticos con una copia extra de *rnall* bajo el control de los promotores P_{yfid} y P_{yfidm} en condiciones microaerobias incrementaron el rendimiento de ADNp. El uso de promotores inducibles por condiciones microaerobias resulta una estrategia innovadora para la producción de ADNp si se cuenta con una fábrica celular capaz de contener los efectos negativos de la limitación de oxígeno.

Agradecimientos. Este trabajo contó con financiamiento de CONACyT y CONACyT-CIBIOGEM mediante los proyectos 256617 y 264460, respectivamente.

Bibliografía.

1. Borja GM, Ramírez OT, Lara AR. (2013). *Bio Tecnología*. 17(3):87-109.
2. Saramago M, et al. (2015). *Plasmid*. 78:26-36.
3. Green J, et al. (1996). *Biochem. J.* 316(3):887-892.