

Construcción de un vector de expresión con genes heterólogos de Polihidroxi butirato (PHB)

FRANCISCO-MORALES, José Yonatan[†], MARTÍNEZ-AYALA, Itzel Guadalupe, SIERRA-MARTÍNEZ, Pavel, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo^{*}

^{*} Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas – UAGro. Avenida Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Guerrero. México.

Recibido Julio 16, 2014; Aceptado Enero 15, 2015

Resumen

Durante mucho tiempo ha existido una gran demanda hacia los productos plásticos derivados del petróleo, lo cual ha generado una gran contaminación debido a que no son biodegradables y es por ello que tienen una alta persistencia en el ambiente. A nivel mundial la producción de plásticos sintéticos se ha incrementado dramáticamente de 1.5 millones de toneladas en 1950 a 245 millones de toneladas en 2008 con un incremento anual del 9% (Chanprateep, 2010). Por estas razones ha surgido la necesidad de obtener nuevas fuentes de plásticos, una de ellas es el Polihidroxi butirato (PHB) el cual es un polímero lineal de 3-hidroxiácidos sintetizado de forma natural por algunas bacterias que lo utilizan como reservas de carbono y energía ante condiciones adversas de nutrición. Estos bioplásticos pueden degradarse en 5 a 6 semanas en el medio ambiente por lo cual se considera que son amigables con el mismo.

En México la investigación sobre el PHB aún es escasa, al igual lo es su distribución en el mercado, debido a su alto costo de producción. Pero actualmente existen alternativas para reducir su costo y mejorar la producción de PHB. Una de ellas es la obtención de cepas recombinantes, esto para lograr una alta tasa de conversión del sustrato y tener con esto mayor cantidad de este biopolímero.

En este trabajo se construyó una fusión transcripcional, que contiene los genes para la síntesis de PHB provenientes de *A. vinelandii* fusionados al promotor del gen *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*. Este plásmido posteriormente será introducido en una cepa de *Bacillus thuringiensis* acristalífera.

Vector, Genes, Heterólogos, Polihidroxi butirato (PHB).

Abstract

For a long time there has been a great demand towards plastic products derived from petroleum, which has generated a great pollution because they are not biodegradable and that is why we have a high persistence in the environment. Worldwide production of synthetic plastics has increased dramatically from 1.5 million tons in 1950 to 245 million tons in 2008 with an annual increase of 9% (Chanprateep, 2010). For these reasons there has been a need for new sources of plastic, one of which is the Polyhydroxybutyrate (PHB) which is a linear polymer synthesized 3-hydroxy acids naturally by some bacteria that use it as a carbon and energy to adverse nutritional conditions. These bioplastics may degrade in 5 to 6 weeks in the environment for which it is considered that are friendly to the same.

In Mexico research on PHB is still limited, as is its distribution in the market due to its high production cost. But currently there are alternatives to reduce cost and improve the production of PHB. One is the production of recombinant strains, that to achieve a high rate of conversion of substrate and with this to have more of this biopolymer.

In this paper a transcriptional fusion, which contains the genes for the synthesis of PHB from *A. vinelandii* fused to the promoter of *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene was constructed. This plasmid will then be introduced into a strain of *Bacillus thuringiensis* acristalífera.

Vector, Genes, heterologous, Polyhydroxybutyrate (PHB).

Citación FRANCISCO-MORALES, José Yonatan, MARTÍNEZ-AYALA, Itzel Guadalupe, SIERRA-MARTÍNEZ, Pavel, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo. Construcción de un vector de expresión con genes heterólogos de Polihidroxi butirato (PHB). Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2014 – Abril 2015, 1-2:127-131

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: hbgerardo@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Durante mucho tiempo ha existido una gran demanda hacia los productos plásticos derivados del petróleo, lo cual ha generado una gran contaminación debido a que no son biodegradables y es por ello que tienen una alta persistencia en el ambiente. A nivel mundial la producción de plásticos sintéticos se ha incrementado dramáticamente de 1.5 millones de toneladas en 1950 a 245 millones de toneladas en 2008 con un incremento anual del 9% (Chanprateep, 2010). Por estas razones ha surgido la necesidad de obtener nuevas fuentes de plásticos, una de ellas es el Polihidroxibutirato (PHB) el cual es un polímero lineal de 3-hidroxiácidos sintetizado de forma natural por algunas bacterias que lo utilizan como reservas de carbono y energía ante condiciones adversas de nutrición. Estos bioplásticos pueden degradarse en 5 a 6 semanas en el medio ambiente por lo cual se considera que son amigables con el mismo.

En México la investigación sobre el PHB aún es escasa, al igual lo es su distribución en el mercado, debido a su alto costo de producción. Pero actualmente existen alternativas para reducir su costo y mejorar la producción de PHB. Una de ellas es la obtención de cepas recombinantes, esto para lograr una alta tasa de conversión del sustrato y tener con esto mayor cantidad de este biopolímero.

En este trabajo se construyó una fusión transcripcional, que contiene los genes para la síntesis de PHB provenientes de *A. vinelandii* fusionados al promotor del gen *cryIAc* de *Bacillus thuringiensis*. Este plásmido posteriormente será introducido en una cepa de *Bacillus thuringiensis* acristalífera.

Objetivos

Realizar la caracterización por patrón de restricción los plásmidos pPHB_{AV} a partir de *Escherichia coli* y pHT1kAc a partir de *B. thuringiensis*, Así mismo realizar la clonación de los genes del operón de síntesis de PHB (*phbB*, *phbA* y *phbC*), de *Azotobacter vinelandii* en el plásmido pHT1kAc para obtener el plásmido pHTPHB_{AV}.

Metodología

La cepa de *E. coli* XL1Blue se usó como cepa de almacenamiento y manipulación de los plásmidos. Los plásmidos utilizados fueron pPHB_{AV} de 8089 pb y pHT1kAc de 10700 pb. Los medios de cultivo empleados fueron el medio Luria Bertani (LB) líquido o adicionado con agar, los cuales según la necesidad fueron suplementados con ampicilina (Amp) 150 µg/ml para seleccionar a las construcciones recombinantes, se incubaron a 37 °C. Se utilizó eritromicina (Erm) 2 µg/ml para cultivar a *B. thuringiensis* recombinante y se incubó a 28°C.

La preparación de células competentes y las transformaciones bacterianas se realizaron por la técnica de CaCl₂ (Mandel e Higa., 1970). El análisis de clonas portadoras del plásmido recombinante se seleccionó en medios con Amp y para la purificación del ADN plasmídico se siguió la técnica *Mini-prep* por lisis alcalina (Birnboim y Doly 1979). Se diseñó un juego de *primers* del operón *phbBAC* utilizando el software libre de la empresa INVITROGEN (www.lifetechnologies.com/oligoperfect/) el *primer*: directo
5'GCGAGATCTATGAGCAATCAACG-3'
y el *primer* reverso:
5'CGCGAATTCTCAGCCTTTCACG-3'
cabe mencionar que al *primer* directo se le incluyó el sitio de restricción para la enzima *BglII* y para el *primer* reverso se le adicionó el sitio *EcoRI*.

La amplificación de las mezclas se llevó a cabo en un termociclador marca eppendorf con gradiente de temperatura (Desnaturalización: 95°C-5min., Alineamiento: 55°C-30 seg., Extensión: 72°C-5min). Para obtener los fragmentos de interés se realizaron digestiones con enzimas de restricción. Al plásmido pHT1kAc se le realizó una doble digestión parcial con enzimas *Bam*HI y *Eco*RI para liberar gen *lacZ*, en lo cual fue subclonado el operón *phbBAC*. Para la digestión del producto de PCR del operón *phbBAC* se utilizaron las enzimas *Eco*RI y *Bgl*II. Ambas reacciones se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Se recuperaron los fragmentos de interés a partir de geles de agarosa (TBE 1X) al 0.8% utilizando un kit comercial GeneJET Gel Extraction. En la ligación de los productos purificados se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo SCIENTIFIC) en una proporción inserto:vector (5:1). La reacción se incubó a 22°C por 4 horas. Posteriormente se realizó la transformación de las células competentes de *Escherichia coli* X1 Blue por choque térmico tomado 5 µl de la reacción de ligación en 50 µl de células y se seleccionó a las candidatas sobre LB agar con Amp a 150 µg/ml.

Resultados

Después de comprobar la autenticidad de los plásmidos así como su integridad, se purificaron a partir de las cepas hospedadoras, y posteriormente se transfirió a *E. coli* XL1Blue con el fin de mantener y propagar los plásmidos de ensayo.

Obtención de ADN plasmídico a partir de las cepas hospedadoras. Se realizó la extracción de ADN plasmídico a partir de *B. thuringiensis*/pHT1kAc. Existió la difícil visualización de estos plásmidos en geles de agarosa, lo cual pudo ser debido a que se encuentran en bajo número de copias 4±1 copias/cromosoma. Así mismo se obtuvo el plásmido PHB_{AV} a partir de *E. coli*.

Transformación con ADN plasmídico. Las transformaciones fueron realizadas por separado. Las colonias se seleccionaron en medio LB más Amp 150 µg/mL, las bacterias que adquirieron el plásmido crecieron en el medio.

Comprobación y caracterización por patrón de restricción de los plásmidos PHB_{AV} y pHT1kAc en *E. coli* XL1Blue transformada. Para evaluar la presencia de los plásmidos en las bacterias transformadas se le realizó extracción de ADN plasmídico esto con el fin de comprobar que el plásmido fuera el correcto de acuerdo al peso molecular *figura 1*.

Para corroborar que ambos plásmidos portaran los sitios de restricción como se indican en el mapa de corte, se digirió con enzimas de restricción *figura 3*.

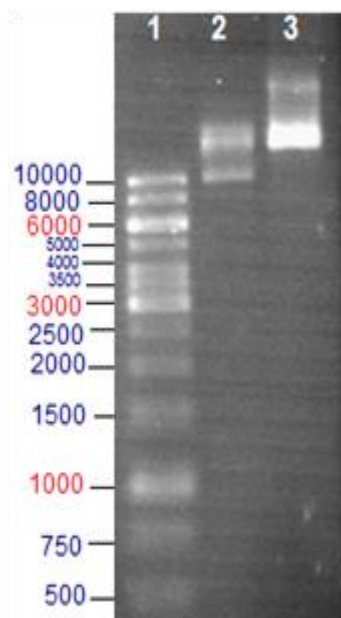


Figura 1 Comprobación de los plásmidos a partir de *E. coli* XL1Blue transformada. Electroforesis en gel de agarosa (TAE 1X) al 0.8%, teñida con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular de 1kb (Thermo SCIENTIFIC), Carril 2; plásmido PHB_{AV} 8089 pb, Carril 3; plásmido pHT1kAc 10700 pb.

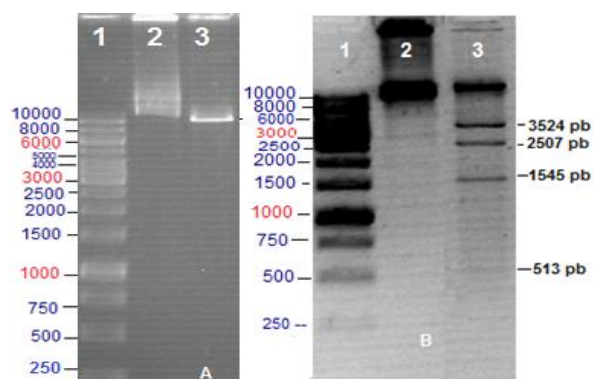


Figura 2 Comprobación de plásmidos por patrón de restricción. Gel de agarosa al 0.8%. Imagen A) plásmido pHT1kAc 10700pb. Carril 1: Marcador de peso molecular 1kb. Carril 2; plásmido sin digerir. Carril 3: plásmido digerido con la enzima *Bam*HI. Imagen B) Carril 3; Plásmido PHB_{AV} 8089 pb, plásmido digerido con la enzima *Ssp*I generando cuatro fragmentos; 3524 pb, 2507 pb, 1545 pb y 513 pb.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del operón PHB. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa, tomando como molde las regiones genómicas del operón *phbBAC*. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa **figura 3**.

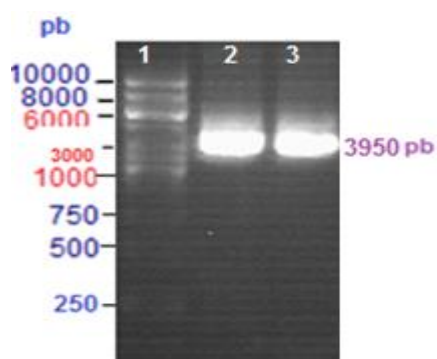


Figura 3 Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1; Marcador molecular 1kb. Carril 2 y 3; Productos de PCR del operón *phbBAC* 3950 pb.

Digestión, purificación del plásmido y productos de PCR. Para realizar la ligación de los productos de PCR del operón *phbBAC* (inserto) en el plásmido pHT1kAc (vector) se realizaron dobles digestiones, **figura 4**.

Posteriormente se purificaron las bandas de interés y se realizó la ligación de ambos productos, para obtener el plásmido pHTPHB_{AV}.

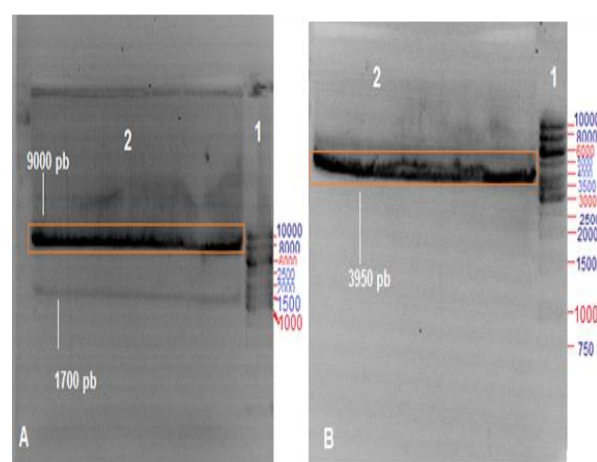


Figura 4 Gel de agarosa al 0.8%. A) Carril 1; Marcador molecular 1kb. Carril 2; Plásmido con doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, se liberan dos fragmentos uno de 9000 pb (vector) y otro de 1700 pb en *LacZ*. B) Carril 1; Marcador molecular 1kb. Carril 2) Digestión de productos de PCR del operón *phbBAC* (inserto) con las enzimas *Bgl*II y *Eco*RI. Los fragmentos remarcados se purificaron.

Verificación del plásmido heterólogo pHTPHB_{AV}.

Se purificó el ADN plasmídico de las células que crecieron en medio con antibiótico para comprobar la presencia del plásmido, en lo cual se obtiene una construcción de 12950 pb **figura 5**.

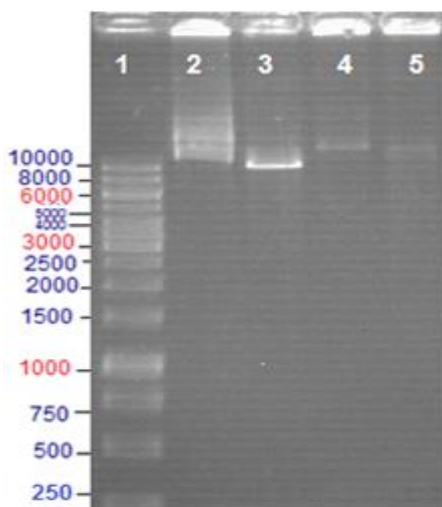


Figura 5 Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1; Marcador molecular 1kb. Carril 2; Plásmido control pHT1kAc 107000 pb, sin digerir. Carril 3; pHT1kAc digerido con la enzima *Bam*HI (linearizado). Carril 4; plásmido pHTPHB_{AV} 12950 pb sin digerir. Carril 5) pHTPHB_{AV} digerido con *Eco*RI (linearizado).

Discusión

En el presente trabajo de investigación se construyó un plásmido que contiene los genes de síntesis de PHB para posteriormente ser expresado en una cepa de *Bacillus thuringiensis* acristalifera (4D 22). La difícil visualización del plásmido pHT1kAc en geles de agarosa, pudo ser debido a que se encuentran en bajo número de copias 4 ± 1 copias/cromosoma, como reporta en Arantes y Lereclus en 1991, ya que el derivado de este plásmido presenta un bajo número de copias en *B. thuringiensis*, por lo cual se procedió a transformar a *E. coli* XL1Blue para obtener una mayor cantidad de plásmido, debido a que pHT1kAc tiene dos orígenes de replicación, uno para *Bacillus* y otro para *E. coli*. Se realizó la PCR del operón *phbBAC* en el cual al primer reverso se le añadieron sitios de restricción para la enzima *Eco*RI y el primer directo con el sitio *Bgl*III con la finalidad de que los extremos fueran compatibles al momento de la ligación dirigida de ambos extremos.

La ligación de los fragmentos se realizó con la enzima T4 DNA ligasa, ya que se pudo comprobar la veracidad del plásmido por el peso molecular esperado.

Conclusión

Al realizar la digestión del plásmido pPHB_{AV} con la enzima *Ssp*I y de pHT1kAc con *Bam*HI y *Eco*RI se pudieron comprobar las características de estos por su patrón de restricción, esto permitió obtener las cepas transformantes de *E. coli* XL1-Blue con dichos, las cuales se utilizaron posteriormente para la generación del vector de expresión y del operón de PHB (inserto) de *Azotobacter vinelandii* respectivamente. Por PCR se obtuvo el fragmento de ADN que contiene el operón *phbBAC* con los sitios de restricción *Bgl*III y *Eco*RI, para clonarse en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI en el plásmido pHT1kAc y así obtener la construcción final pPHTPHB_{AV}.

Referencias

- Arantes, O., Lereclus, D. (1991). Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108.Pp. 115-119.
- Birnboim, H., Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Chanprateep, S. (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Biosc Bioeng.* Aug. 14; Vol 110. N° 6. pp: 621-632.
- Mandel, M., Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.* Oct. 14; 53 (1). pp: 159-62.