

CARACTERIZACIÓN DE PIEZAS BIOLÓGICAS PARA EL DESARROLLO DE BIOSENSORES PARA DETECTAR BACTERIAS PATÓGENAS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS

Arrieta-Rangel, Leonardo José (1); Casique Arroyo, Gabriela (2); Barboza Corona, José Eleazar (2)

1 [Pregrado en Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad Simón Bolívar, Sede Barranquilla] | Dirección de correo electrónico: larrieta17@unisimon.edu.co]

2 [Posgrado en Bociencias, Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Direcciones de correos electrónicos: gcasiquea@gmail.com, josebar@ugto.mx*]

Resumen

Los promotores son secuencias ADN con notable importancia en biología sintética pues contribuyen a maximizar la efectividad de un proceso biotecnológico por su papel en la regulación de expresión genética. En el presente estudio, se buscó generar biobricks funcionales en *Escherichia coli* a partir de promotores aislados de *Bacillus thuringiensis* para desarrollar un biosensor que permita detectar bacterias patógenas en alimentos. Se generaron las partes necesarias para obtener construcciones en *E.coli* con los promotores aislados. En etapas posteriores, se espera adicionar una proteína reportera y estimar la actividad de los promotores frente a otros existentes.

Abstract

Promoters are DNA sequences with remarkable importance in synthetic biology because they contribute to maximize the effectiveness of a biotechnological process by its role in the regulation of genetic expression. In this study, it was intended to generate functional biobricks in *E.coli* from promoters isolated from *B. thuringiensis* to develop a biosensor that allows the detection of pathogenic bacteria in food. The parts required to obtain *E. coli* constructions with the isolated promoters were obtained. In later stages, it is expected to add a reporter-protein and estimate the activity of the promoters against other existing ones.

Palabras Clave

Promotores, biología sintética, biobricks,

INTRODUCCION

La biología sintética es, a grosso modo, la aplicación de principios de ingeniería en la biología; permitiendo así un enfoque racional para el diseño y construcción de partes y sistemas biológicos artificiales. Para ello, se recurre al diseño asistido con softwares y técnicas avanzadas en áreas de biotecnología, microbiología, biología evolutiva, biología molecular, biología de sistemas y biofísica, y ha sido aclamado como alternativa para los campos de la energía y la biotecnología industrial [1].

Una pieza biológica es una secuencia de ADN que codifica para alguna función biológica: como los promotores o las secuencias codificantes de proteínas. Los promotores, por ejemplo, son secuencias de ADN que inducen la maquinaria transcripcional y conducen a la transcripción de una secuencia ADN codificante, que se encuentra "downstream", en una molécula de ARN que sirve de molde para la síntesis de una proteína [2]. En este sentido, la transcripción eficiente y controlable es un elemento crítico que contribuye a maximizar rendimientos de producción y reproducibilidad. En consecuencia, los promotores sintéticos, además de una gama de elementos de control transcripcional complementarios para procariontes y eucariotes, se han desarrollado e implementado en una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas [1].

En la industria alimentaria puede significar la generación de organismos con capacidad de detectar y prevenir el aumento de bacterias patógenas dentro de la matriz alimentaria. Para esto, el biosensor usa como estrategia la sobreexpresión de moléculas con actividad antimicrobiana al percibir la presencia del patógeno (estímulo) y, por consiguiente, reprime su crecimiento. En este trabajo, se buscó generar BioBricks funcionales en *Escherichia coli* que pudieran usarse como pieza genética en el desarrollo de un biosensor para detectar alguna bacteria patógena de importancia en alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de promotores de interés.

Se cultivaron cepas modificadas de *E. coli* TOP10, que contenían los promotores *Btl-BtII* y *cytA*, en caldo Luria Bertani (LB) (DIBICO, MX) a 37°C/ 200 rpm por 16-18h. Tras la incubación, se concentró 3.0 mL de caldo a 12000rpm durante 2 minutos y se extrajo ADN plasmídico utilizando Fast-n-Easy Plasmid Mini-Preps Kit (Jena Biosciences, GE) acorde las instrucciones del fabricante. Los plásmidos purificados fueron cuantificados usando Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, UK) y usados como ADN molde para reacciones de PCR posteriores.

Tabla 1. Secuencias de cebadores utilizados para las amplificaciones.

Primer		Secuencia
BT I,II	F	5'- ccggaattcgcgccgcttagagttacaattcaagatgaattgcagg -3'
	R	5'- aaaactgcagcggccgctactagtagtacatcttttattaagataccaatttc -3'
Cyt	F	5'- ccggaattcgcgccgcttagagtatcttcgattcaaatcttc -3'
	R1	5'- aaaactgcagcggccgctactagtagtactttatcataatacataatttc -3'
	R2	5'- aaaactgcagcggccgctactagtaaagattatccccgggtaccgagctc -3'

Las mezclas de reacción PCR se optimizaron para los fragmentos *pBtl-BtlI* y *pcytA-R1* y *pcytA-R2* (Tabla 2), en función de los primers (Tabla 1). Así mismo, las condiciones de trabajo fueron optimizadas, para volumen de 25µL, como sigue: 95°C/2 min de desnaturalización; seguido de 30 ciclos a 95°C/30s, 57°C/45s y 59°C/45s para *pcytA* y *pBtl-BtlI*, respectivamente, 72°C/45s; 72°C/2min de elongación final. Los amplicones obtenidos fueron purificados usando PCR Purification Kit (Jena Biosciences, GE) y, posteriormente, cuantificados usando Nanodrop 2000 y los tamaños fueron verificados a través de un corrido electroforético en gel de agarosa 1% (NaraBiotec) a 120V por 15 minutos.

Tabla 2. Mezclas optimizadas para 25µL de reacción PCR de cada promotor.

Componente	<i>pBtl-BtlI</i>	<i>pcytA R1</i>	Componente	<i>pcytA R2</i>
Taq Buf. + KCl 10X	2.5µL	2.5µL	Taq Buf. + (NH ₄) ₂ SO ₄ 10X	2.5µL
MgCl ₂ 25mM	1.25mM	1.25mM	MgCl ₂ 25mM	1.25mM
dNTPs 10mM	200µM	100µM	dNTPs 10mM	200µM
Pr. Forward 10mM	0.4µM	0.2µM	Pr. Forward 10mM	0.4µM
Pr. Reverse 10mM	0.4µM	0.2µM	Pr. Reverse 10mM	0.4µM
Taq DNA Pol 5U	0.06U/µL	0.06U/µL	Taq DNA Pol 5U	0.06U/µL
ADN Molde	100ng	100ng	DNA Molde	100ng
dd H ₂ O	5.0µL	5.0µL	dd H ₂ O	5.0µL

Para la ligación, los amplicones de cada promotor fueron digeridos usando las enzimas EcoRI (Invitrogen, UK) y PstI (NE Biolabs, UK) para generar extremos cohesivos. Para un volumen de 50µL, la mezcla de trabajo se constituyó como sigue: 5µL NEBuffer 3.1 10X (1M NaCl; 500mM Tris-HCl; 100mM MgCl₂; 1mg/ml BSA); 0.2U/µL PstI; 0.15U/µL EcoRI; 650-1000ng DNA y agua destilada estéril hasta completar el volumen final. Las mezclas fueron incubadas a 37°C, sin agitación, por 4 horas. Las digestiones obtenidas fueron purificadas usando PCR Purification Kit y, posteriormente, cuantificadas. Se corrió 50ng de ADN en gel de agarosa 1% para constatar el tamaño del fragmento (120V/ 15 minutos).

Preparación del plásmido vector.

Se cultivó una transformante de *E.coli*, que contenía el plásmido pSB1C3, en caldo LB a 37°C/ 200 rpm por 16-18h. Tras la incubación, se concentró 3.0mL de caldo a 12000 g durante 2 minutos y se extrajo DNA plasmídico utilizando Fast-n-Easy Plasmid Mini-Preps Kit acorde las instrucciones del fabricante. El plásmido vector fue linealizado por digestión usando las enzimas EcoRI (Invitrogen, UK) y PstI (NE Biolabs, UK) para obtener un fragmento de ~2000bp. Para esto, la mezcla de trabajo se constituyó como sigue: 5µL NEBuffer 3.1 10X; 20U/µL PstI; 15U/ EcoRI; ~2000ng ADN plasmídico y agua destilada estéril hasta completar 50µL. Las mezclas fueron incubadas a 37°C por 4 horas. Las digestiones obtenidas fueron corridas en gel de agarosa 1% (120V/ 15 minutos) y se seleccionó la banda correspondiente al fragmento de ~2000bp. La banda fue cortada y purificada utilizando Agarose Gel Extraction Kit (Jena Biosciences, GE) siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector fue concentrado en Speed Vac 120 (Thermo Scientific, UK) para optimizar el rendimiento de la ligación.

Ligación

Se ajustó las reacciones de ligación como sigue: Buffer T4 Ligasa 10X 1.5µL; ATP 1.0mM; T4 Ligasa 13.3U, plásmido vector 24ng, inserto (*pBtl-BtlII* 23.5ng; *pcytA-R1* 38.8ng; *pcytA-R2* 42.1ng) y agua destilada estéril hasta completar volumen final de 15µL. La mezcla fue incubada a 18°C en un termociclador (Thermal Cycle C1000 Touch, BioRad US) durante 4h.

Transformación y análisis de transformantes.

Para ello, se procedió como sigue: Se adicionó 3µL del producto de ligación a 200µL de *E. coli* TOP10 Calcio Competentes (ECT10CC) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Luego, se incubó a 42°C por 1 minuto y se mantuvo en hielo por 5 minutos. Tras lo anterior, se adicionó 1.0mL de caldo LB y se incubó a 37°C/ 200 rpm por 1h. Finalmente, se concentró el material celular a 12000rpm por 2 minutos, se sembró 100µL en placas de LB w/ Cloranfenicol (25mg/mL) y se incubó a 37°C durante 16-18h. Las colonias halladas fueron resembradas en placas de agar LB y caldo LB, ambos suplementados con cloranfenicol. Esto fue incubado a 37°C durante 16-18h. Tras la incubación, se concentró 1.5mL de caldo a 12000 g durante 2 minutos y se extrajo DNA plasmídico acorde al método de Del Sal [3]. El ADN plasmidial obtenido de cada colonia, fue digerido con la enzima NotI (NE Biolabs). Para esto, la mezcla de trabajo se constituyó como sigue: 1uL NEBuffer 3.1 10X; 1U/µL NotI; ~200ng DNA plasmídico y agua destilada estéril hasta completar 10µL. Las mezclas fueron incubadas a 37°C por 1.5h. Luego de la incubación, se corrió la mezcla en gel de agarosa 1% para corroborar el tamaño del fragmento (120V/ 15 minutos). Las clonas positivas fueron resembradas y preservadas en caldo LB (20%v/v glicerol) a -20°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de fragmentos de interés: insertos y vector

Tras las reacciones PCR, se obtuvo 3 amplicones con tamaños de: *pBtl-BtlII* (~400bp), *pcytA-R1* (~750bp) y *pcytA-R2* (~600bp). Luego de las digestiones con enzimas de restricción, los fragmentos purificados preservaron los tamaños mencionados con las siguientes concentraciones y razones de pureza (A260/A280): *pBtl-BtlII* (23.5ng/1.67), *pcytA-R1* (35.3ng/1.90), *pcytA-R2* (70.2ng/1.86) (Figura 1).

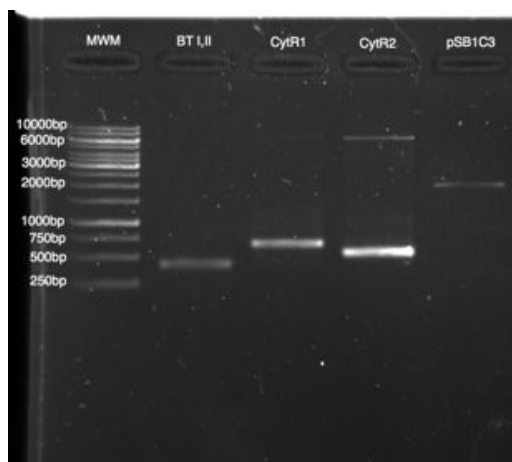


Figura 1. Corrido electroforético de los fragmentos digeridos y purificados.

Obtención de clonas positivas

Los recuentos transformantes hallados fueron significativamente altos: *pBtl-BtlII* 1.6×10^3 UFC; *pcytA-R1* 1.2×10^3 UFC y *pcytA-R2* 1.7×10^3 UFC (Figura 2). Pese al elevado número de colonias halladas en las placas, no se obtuvo clonas positivas por análisis de restricción y este evento pudo estar condicionado por el deterioro de las células competentes utilizadas.

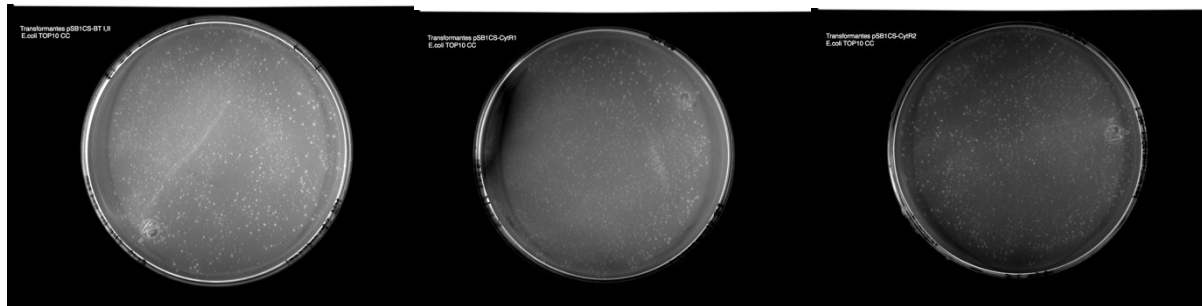


Figura 2. Placas de LB Agar / Cloranfenicol con transformantes tras 18h de incubación. En 3A, las transformantes de BtlI,II; en 3B, las transformantes de CytR1 y en 3C, las transformantes de CytR2.

CONCLUSIONES

Se generaron las partes necesarias para obtener construcciones en *E.coli* con los promotores aislados. En etapas posteriores, se espera adicionar una proteína reportera y estimar la actividad de los promotores frente a otros existentes. Partiendo de la actividad obtenida experimentalmente, pueden diseñarse construcciones que permitan detectar bacterias patógenas en alimentos y sean capaces de sobreexpresar moléculas con actividad antimicrobiana al percibir la presencia de dicho patógeno y, por consiguiente, reprimir su crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato y la Universidad Simón Bolívar por el apoyo logístico para la realización de este proyecto durante la estancia en el Verano de Investigación. A Celia Luna y todos los compañeros investigadores del laboratorio de Biotecnología y Microbiología Molecular del UG-DICIVA. Con especial mención de la Dra. Gabriela Casique, quien con paciencia me guió para alcanzar las metas, y al Dr. J. Eleazar por abrirme espacio en su laboratorio para el desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Ljubcic, S., Berger, I., Fitzgerald, D. J. et al. (2015). Synthetic Biology in Biopharmaceutical Production. *European Biopharmaceutical Review*. 12. pp. 3995-3997.
- [2] The International Genetically Engineered Machine Competition iGEM (2017). Registry of Standard Biological Parts - Parts. Recuperado de <http://parts.igem.org/Help:Parts>. Fecha de acceso: [21-07-2018 12:46PM]
- [3] G. Del Sal, G. Manfioletti and C. Schneider (1989). The CTAB-DNAPrecipitation Method: A Common Mini-Scale Precipitation of Template DNA From Phagemids, Phages or Plasmids Suitable for Sequencing. *Biotechniques* 7:514-519.