

Estudio de tres promotores de *Bacillus thuringiensis* para su posterior aplicación en la construcción de biosensores utilizados en la detección de patógenos en alimentos

F.M. Gutiérrez-Sánchez¹, G. Casique-Arroyo² J.E. Barboza-Corona^{1,2*}

1 Departamento de Alimentos División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. 2 Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. josebar@ugto.mx

RESUMEN:

La biología sintética es un área emergente que conjuga las bases de la biología molecular, la ingeniería genética, la programación y los modelos matemáticos para el diseño y construcción de sistemas biológicos controlables y predecibles lo que abre nuevas fronteras y faculta a la biotecnología aplicada a alimentos de nuevas herramientas para la mejora de procesos y productos. Los promotores son regiones dentro de un gen que permite la unión de la RNA polimerasa y tienen funciones reguladoras en la expresión de genes. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria anaerobia facultativa que posee en su secuencia genética los promotores *pchiA74*, *pBtl-BtII* y *pcytA*.

El enfoque de este trabajo radica en la obtención de las construcciones para cada uno de los tres promotores nativos de *B. thuringiensis*, siguiendo las reglas de estandarización del iGEM. Una vez que el gen reportero *gfp* esté bajo la regulación de cada promotor, podrá compararse la expresión de la proteína verde fluorescente entre ellos. Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado los principios de diseño, construcción, evaluación y prueba de la biología sintética, usando como chasis a *Escherichia coli*.

Palabras clave: Biología sintética, chasis, construcción, promotores, sistema biológico.

ABSTRACT:

Synthetic biology is an emerging area that combines the foundations of molecular biology, genetic engineering, programming and mathematical models for the design and construction of controllable and predictable biological systems, which opens new frontiers and empowers to food applied biotechnology of new tools for the improvement of processes and products. The promoters are regions within a gene that allows the binding of RNA polymerase and have regulatory functions in gene expression. *Bacillus thuringiensis* is a facultative anaerobic bacterium that possesses in its genetic sequence the promoters *pchiA74*, *pBtl-BtII* and *pcytA*.

The focus of this work is to obtain the constructs for each of the three native *B. thuringiensis* promoters, following the rules of standardization of the iGEM. Once the *gfp* reporter gene is under the regulation of each promoter, the expression of the green fluorescent protein between them, can be compared. During the development of this work the principles of design, construction, evaluation and testing of synthetic biology have been used, using as chassis *Escherichia coli*.

Keywords: Synthetic biology, construction, promoters, biological system, chassis.

INTRODUCCIÓN

La biología sintética es un área emergente de estudio que conjuga la biología molecular, la ingeniería genética y los conocimientos de sistemas eléctricos y computacionales empleando los principios de la ingeniería y tiene como objeto el diseño, construcción y aplicación de sistemas biológicos artificiales controlables y predecibles que con modelos matemáticos permiten evaluar su comportamiento (Aguilar y col, 2012). Así como los sistemas mecánicos, eléctricos y termodinámicos, los sistemas biológicos poseen propiedades que les permiten ser confeccionados modificando su estructura y agregando nuevos elementos (Bensussen y Meneses, 2013).

La biología sintética aplicada a la industria de alimentos tiene como objetivo simplificar y optimizar los procesos de transformación en diversas áreas de la producción tales como: seguridad alimentaria en la eliminación de biotoxinas y organismos patógenos; control de proceso, en fermentación y pasteurización principalmente; calidad alimentaria en vida útil y composición de alimentos y finalmente como organismos genéticamente modificados (Pineda, 2003).

B. thuringiensis es un bacilo gram positivo que durante el proceso de esporulación produce cristales proteicos que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (Sauka, 2008). Produce quitinasas, proteínas Cry, péptidos antimicrobianos y otras proteínas de interés biotecnológico. De manera particular la expresión de la quitinasa ChiA74 y de las proteínas insecticidas Cry1 y Cyt1A está controlada por los promotores *pchiA74*, *pBtI-BtII* y *pcytA*, respectivamente (Barboza y col, 2014).

Como parte de nuestro proyecto, el objetivo en este trabajo es obtener las construcciones de cada uno de nuestros promotores en el plásmido pSB1C3, posteriormente insertar río abajo del gen *gfp* y medir la fluorescencia emitida por las células en un lector de microplaca. De esta forma podrá determinarse cuál de los promotores expresa en mayor cantidad la proteína verde fluorescente. Una vez caracterizadas estas piezas biológicas podrán ser utilizadas para regular la expresión constitutiva de genes expresados en *E. coli*, de manera que puedan ser utilizados en la construcción de biosensores capaces de detectar bacterias patógenas de interés en alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los promotores fueron amplificados del genoma de *B. thuringiensis* y clonados posteriormente en el plásmido pHT3101. El gen *gfp* lo adquirimos del biobrick BBa_K1467204 del Kit de distribución IGEM 2015 (parts.igem.org/assembly/libraries.cgi?id=62). El plásmido pSB1C3 fue obtenido del mismo biobrick, el cual fue digerido con las enzimas EcoRI y PstI durante 2 horas a 37°C, para después purificarlo con un kit de purificación comercial (Jena Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos fueron diseñados con 3 sitios de corte al inicio (región de prefijo) y 3 sitios de corte al final de la secuencia (región sufijo), según las reglas de estandarización del iGEM. Las enzimas mencionadas fueron adquiridas de New England BioLabs, Inc.

La amplificación se llevó a cabo mediante la técnica de PCR con los oligonucleótidos diseñados, en un termociclador C1000 Touch BioRad, la amplificación obtenida fue cuantificada en el equipo Nanodrop Lite marca Thermo Scientific y purificada con un kit de purificación de PCR (Jena Bioscience). Ensamble en plásmido. Para comprobar la correcta

amplificación de los sitios de prefijo y sufijo, los promotores fueron ligados al plásmido pSB1C3, posteriormente se realizó una digestión de los sitios EcoRI y PstI en reacciones de 50µl que fueron incubadas a 37°C durante 2 horas, transcurrido éste tiempo 3µl de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 120 volts durante 15 minutos, el resto fue purificado con un kit de purificación comercial de PCR (Jena Bioscience).

Ensamble del promotor al gen GFP por el método estándar sobre el prefijo. El DNA plasmídico del biobrick BBa_K1467204 que contiene el gen GFP fué digerido con las enzimas EcoRI y XbaI en reacciones de 50µl e incubado a 37°C durante 2 horas, a continuación, el promotor *pBtI,II* clonado en el plásmido pSB1C3 fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y SpeI en reacciones de 50µl a 37°C durante 2 horas. Se realizó una ligación de ambos DNA's digeridos, en una reacción de 15µl a 16°C en un termociclador (C1000 Touch BioRad) durante 16 horas, en una concentración equimolar 5:1 inserto-vector.

Ensamble por el método estándar sobre el sufijo. En este caso, el DNA plasmídico del biobrick BBa_K1467204 que contiene el gen *gfp* fué digerido con las enzimas SpeI y PstI en reacciones de 50µl e incubado a 37°C durante 2 horas, así también, el promotor *pBtI,II* clonado fué digerido con XbaI y PstI en reacciones de 50µl a 37°C durante 2 horas. Las condiciones de ligación son las mismas que en el ensamble sobre el prefijo.

Las ligaciones fueron transformadas en células electrocompetentes de *E. coli* Top10 y crecidas en medio líquido LB a 37°C durante 1 hora, las células crecidas fueron centrifugadas y espatuladas en cajas Petri de LB con cloranfenicol en una concentración de 25mg/ml e incubadas la 37°C durante 16 horas.

Confirmación de clonas positivas. Las colonias crecidas fueron aisladas y sembradas durante 16 horas en medio líquido a 37°C, para posteriormente extraer DNA por CTAB. Se realizó una digestión del DNA obtenido con las enzimas EcoRI y PstI en reacciones de 10µl a 37°C durante 2 horas. La digestión obtenida se corrió en un gel de agarosa al 1% a 120V durante 15 minutos. De las clonas positivas se extrajo DNA plasmídico con un kit de minipreparaciones (Jena Bioscience) y se realizó una segunda digestión con las enzimas EcoRI y PstI en reacciones de 10µl a 37°C durante 2 horas, de nueva cuenta, las digestiones fueron corridas en gel de agarosa al 1% a 120 volts durante 15 minutos.

Cuantificación de proteína verde fluorescente. Posteriormente al ensamble transformaremos células electrocompetentes de *E. coli* Top 10 con las construcciones y las creceremos durante 16 horas a 37°C, éstas células se sonicaron y se midió fluorescencia por el método de microplaca en el Synergy HTX Biotek.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta el momento hemos amplificado correctamente los tres promotores con los oligonucleótidos diseñados con los sitios de corte de prefijo y sufijo, comprobamos la amplificación por medio de los geles de agarosa al 1% y obtuvimos bandas del peso esperado, para *pchiA74* se obtuvo un amplicón de 611 pb, para *pBtI,II* de 437 pb y para el promotor *cytA* un amplicón de 767 pb (Fig. 1-3)

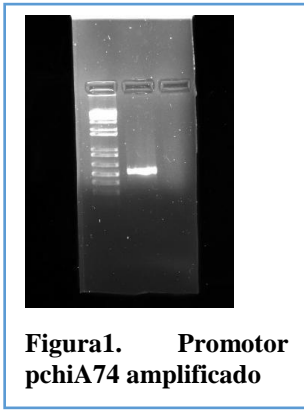


Figura 1. Promotor pchiA74 amplificado

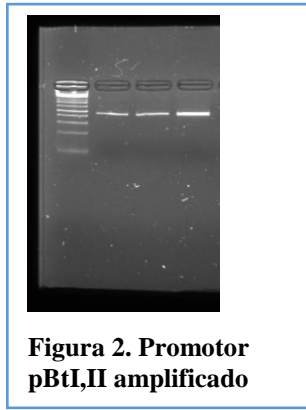


Figura 2. Promotor pBtI,II amplificado

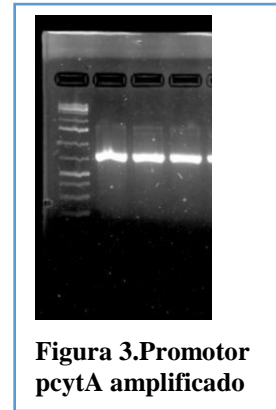


Figura 3. Promotor pcytA amplificado

El método de ensamblaje estándar es uno de los métodos recomendados por la organización IGEM, la versatilidad de éste método consiste en que posee dos estrategias de ensamblaje que permiten la construcción de circuitos biológicos y permite usar a las biobricks para lo que fueron creados, el ensamblaje que realizamos por el prefijo no arrojó resultados favorables, por otro lado, el ensamblaje por la región del sufijo nos dio excelentes resultados.

Para el ensamblaje por la región del sufijo es necesario que los promotores se encuentren clonados al plásmido pSB1C3, los promotores pcytA y pBtI,II han sido correctamente ligados a éste comprobando la correcta ligación por PCR y digestión, obteniendo en ambos casos resultados positivos. De igual manera, se logró la liberación de *gfp* (Fig. 4-6).



Figura 4. pBtI,II en pSB1C3 linearizado, digerido con SpeI y PstI

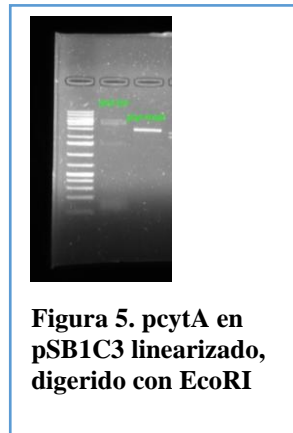


Figura 5. pcytA en pSB1C3 linearizado, digerido con EcoRI



Figura 6. Digestión de GFP con EcoRI y SpeI para obtención de pSB1C3

Posteriormente, logramos la primer construcción del promotor pBtI,II ligado al gen *gfp*, como ya mencionamos por el sufijo del promotor, GFP al ser digerido con PstI se une al sitio del mismo nombre previamente digerido en pSB1C3 y el extremo opuesto es digerido con XbaI quien se unirá al sitio SpeI digerido del plásmido que contiene al promotor, ya que la secuencia de XbaI se complementa con la secuencia de SpeI generando una cicatriz que ya no es posible digerir. Con esto concluimos que los subsecuentes ensamblajes utilizaremos la región del sufijo ya que en ésta obtuvimos mejores resultados. En la comprobación de ligación de la construcción de *E. coli*/pBtI,II+GFP en pSB1C3, la extracción de DNA por CTAB (Fig.7) mostró la presencia de 6 clonas positivas de las cuales se eligieron dos para extraer DNA plasmídico y corroborar mediante una nueva digestión, lo que confirmó como positiva a la clona 20 (Fig. 8).

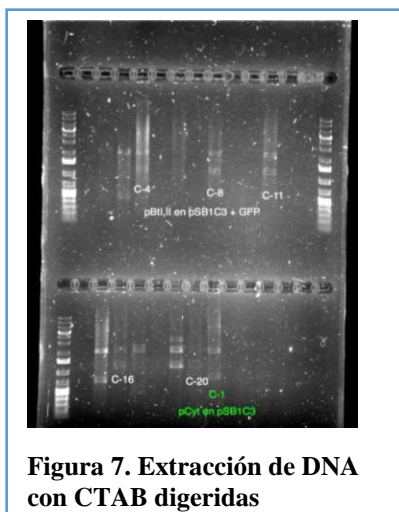


Figura 7. Extracción de DNA con CTAB digeridas

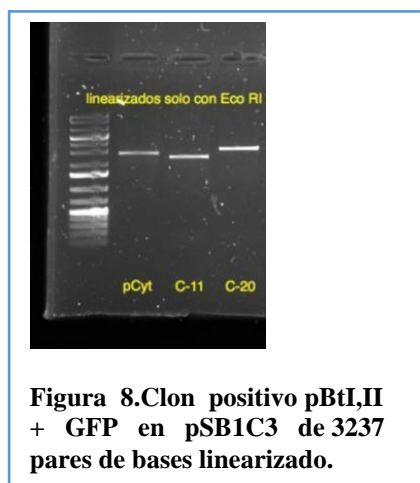


Figura 8. Clon positivo pBtII + GFP en pSB1C3 de 3237 pares de bases linealizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar S. D., Ángeles S.I., Trujillo R.M. A. (2012). Biología Sintética: Diseñando Sistemas Biológicos con Piezas Genéticas. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 11.
- Barboza-Corona. J.E., y col. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD1 as a factory to synthesize alkali-labile ChiA74sp chitinase inclusions, Cry crystals and spores for applied use. *Microbial cell factories*.
- Bensussen A., Meneses A.A. (2013). Biología Sintética: La Próxima Revolución Industrial. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 30-32.
- Pineda, D. (2003). Biosensores y su aplicación en la industria de alimentos. *Inventa, alimentos y bebidas*.
- Sauka H.D, B. G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plaga agrícola. *Revista Argentina de Microbiología*, 124-130.