

El poli- β -hidroxibutirato en las bacterias: El género *Azospirillum*

Sobreexpresión del gen *phbC* de *Azospirillum brasilense*

Ramiro Martínez Cámara¹, Lucía Soto Urzua², María de los Ángeles Martínez Martínez¹, Luis Javier Martínez Morales²

Posgrado en Microbiología¹, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas²

Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Puebla, Pue., México

luis.martinez@correo.buap.mx; jlmartin2859@gmail.com

Abstract— The goal is to analyze the expression of *phbC* gen in the strain *A. brasilense* Sp7, the primers from the sequence (access No. AF353205 GenBank), the amplicon of 1857 bp was cloned into pCR2.1TOPO and transformed in *E. coli* DH5 α . The sequence analysis showed a 98% identity with wild type strain. The *phbC* gen was subcloned into pMMB206 expression vector, and transformed in *E. coli* S17.1, for subsequently conjugating with *A. brasilense* Sp7. Induction was performed with 0.4 and 1 mM of IPTG, in the strain *A. brasilense* Sp7-p206c and compared with *A. brasilense* Sp7-pMMB6 and *A. brasilense* Sp7. Though, the strain *A. brasilense* Sp7-p206c showed an increase in PHB production, the performed of a SDS-PAGE did not show an expected proteic band.

Keyword— *Azospirillum brasilense*, Poly- β -hydroxybutyrate, *phbC* gen, Overexpression gene.

Resumen— El objetivo es analizar la sobreexpresión del gen *phbC* en la cepa *A. brasilense* Sp7, los iniciadores se diseñaron a partir de la secuencia (No. de acceso AF353205 del GenBank), el amplicon de 1857 pb se clonó en el vector pCR2.1TOPO, se transformó en células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes. La secuencia mostró el 98% de identidad con la cepa silvestre. El gen *phbC* fue subclonado en el vector de expresión pMMB206 y transformado en *E. coli* S17.1, conjugado con la cepa *A. brasilense* Sp7. La inducción de *A. brasilense* Sp7-p206c con 0.4 y 1 mM de IPTG y comparada con *A. brasilense* Sp7-pMMB206 y la cepa silvestre. Aunque *A. brasilense* Sp7-p206c mostró un incremento en la producción de PHB, en un SDS-PAGE no se observó ninguna banda proteica sobreexpresada correspondiente al tamaño esperado.

Palabras claves— *Azospirillum brasilense*, Poli- β -hidroxibutirato, gen *phbC*, Sobreexpresión génica.

I. INTRODUCCIÓN

Debido a la preocupación ambiental se está haciendo un esfuerzo por desarrollar materiales biodegradables. Algunos sustitutos de plásticos derivados del petróleo, son los polihidroxialcanoatos (PHA) [1]; [2]. Los PHAs son poliésteres sintetizados y acumulados intracelularmente por varios microorganismos [3].

Es un poliéster de origen bacteriano producido bajo condiciones de estrés nutricional en el medio de cultivo. Se acumula en el citoplasma dentro de gránulos y representa para el microorganismo una reserva de carbono y poder reductor [4].

La bacteria *A. brasilense* es Gram negativa, fija nitrógeno y produce fitohormonas, vive en asociación con las raíces de las plantas, lo que propicia un incremento en su crecimiento y por lo cual tiene importancia agronómica [5]; [6]. En condiciones de alta concentración de C y una baja concentración de N, *A. brasilense* sintetiza y acumula poli- β -hidroxialcanoatos hasta el 80% del peso seco de la célula. Se ha demostrado que, en contraste con otras especies de bacterias, *A. brasilense* no produce copolímeros de hidroxialcanoatos, produciendo solo homopolímeros de poli- β -hidroxibutirato [7]. Los productos de los genes de *phbA* (β -cetotiolasa), *phbB* (acetil CoA reductasa), y *phbC* (PHB sintetasa) son los responsables de la biosíntesis de PHB en *A. brasilense* Sp7 [8].

El conocimiento de las vías metabólicas en los diversos microorganismos, así como, la clonación y la caracterización de los genes involucrados en las vías sintéticas de los diferentes PHAs permitirán la obtención de microorganismos recombinantes, que pierdan o modifiquen los mecanismos regulatorios limitantes de la producción y/o utilización de los PHAs sintetizados. Este tipo de estrategias ha creado grandes expectativas en la agroindustria y en la industria de los plásticos, y de manera puntual los genes involucrados en la síntesis de PHB ya han sido clonados exitosamente en organismos procariotas [9]. Por lo que el objetivo de este trabajo es analizar la sobreexpresión del gen *phbC* de *Azospirillum brasilense* y analizar su importancia en la síntesis de PHB.

II. ANTECEDENTES

A. PHB en *Azospirillum brasilense*

En *Azospirillum brasilense*, el PHB es sintetizado y acumulado en más del 80% del peso seco de la célula, se sabe que la síntesis de PHB se ve favorecida bajo la limitación de Oxígeno y por una alta relación de C/N hacia el final de la fase exponencial de crecimiento en un cultivo discontinuo. [10].

Los genes para la biosíntesis de PHB fueron identificados en *A. brasilense* Sp7, los genes implicados son: *phbA* (β -cetotiolasa), *phbB* (acetoacetyl-CoA reductasa) y *phbC* (PHB sintasa), [8], y para la degradación *phbZ* (PHB depolimerasa) [11].

B. Función biológica del PHB

El papel que juega el PHB en la supervivencia, proliferación y en la colonización de raíces en *A. brasilense* no es completamente conocido, para conocer un poco de esto, se realizaron dos mutantes una en *phbC* y otra en *phbZ* [8]; [11].

La cepa mutante en *phbC* mostro un decrecimiento de la supervivencia en experimentos de limitación de nutrientes, lo que demostró el papel del PHB como fuente de carbono y energía, que puede aumentar la supervivencia cuando los recursos son limitados. Esta cepa también presentó incremento en la movilidad, producción de exopolisacaridos (EPS) y en la adhesión a raíces [8].

La cepa mutante en el gen *phbZ* manifestó una clara disminución en la habilidad de la cepa para sobrevivir a diferentes tipos de estrés (limitación de nutrientes, osmótico, calor, UV). La incapacidad de la cepa *A. brasilense* mutante en *phbZ* de degradar y usar el PHB como fuente de carbono y energía en condiciones de estrés demuestra la importancia del gen *phbZ* en la movilización (degradación) del PHB acumulado, para usar sus productos de degradación para el crecimiento y la supervivencia cuando los recursos son escasos, se observó una disminución en la capacidad de la cepa mutante para producir EPS y formar agregados [11].

La problemática que ha generado la producción de plásticos ha llevado a una búsqueda continua de materiales biodegradables con características similares a éstos, dentro de los cuales se encuentra el PHB un polímero producido por *A. brasilense*, es un poliéster con características como: la biodegradabilidad sin producir desechos tóxicos, su biocompatibilidad, la de regular cristalinidad y moderada resistencia mecánica, lo convierten en un material capaz de sustituir a los plásticos actuales. Sin embargo, la obtención de este producto de microorganismos como *A. brasilense* conlleva algunas desventajas, dentro de las que sobresalen su baja productividad y por lo tanto altos costos de obtención, por lo que es necesario generar nuevas estrategias que ayuden a aumentar su rendimiento. La sobreproducción de este compuesto haciendo uso de herramientas de ingeniería genética puede representar una opción viable para ayudar a resolver tal problemática.

El objetivo general de este trabajo es estudiar la regulación de la biosíntesis de PHB en *A. brasilense* por medio de la modificación de uno de los genes involucrados en su vía sintética, sobreexpresando el

gen *phbC*, el cual está encargado de la formación de este polímero, observando de esta manera como se ve afectada su producción.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas y plásmidos utilizados están en la tabla I y II respectivamente.

Tabla I. Cepas bacterianas

Cepa	Característica	Referencia
<i>A. brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre ATCC29145	[12]
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(<i>r_K⁻m_K⁺</i>), λ^-.</i>	[13]
<i>E. coli</i> S17.1	<i>pro, thi, hsdR, hsdM⁺, recA, Sm^r</i>	[14]
<i>E. coli</i> DH2.1TopoC	<i>E. coli</i> DH5 α Contiene el plásmido pCR2.1 <i>phbC</i> 1.8	
<i>E. coli</i> DH-pJET-55c	<i>E. coli</i> DH5 α Contiene el plásmido pJET-55c	
<i>E. coli</i> DH-pJET- <i>phbZ</i>	<i>E. coli</i> DH5 α Contiene el plásmido pJET- <i>phbZ</i>	
<i>E. coli</i> S17-p206c	Contiene el plásmido p206C	
<i>A. brasilense</i> Sp7-p206c	Contiene el plásmido p206C	
<i>A. brasilense</i> Sp7-pMMB6	Contiene el plásmido pMMB206	

Tabla II. Plásmidos

Plásmidos	Descripción	Referencia
pCR2.1TOPO	Vector de clonación Ampr, Kmr	Invitrogen
pJET1.2/Blunt	Vector de clonación, Ampr	Thermo Scientific
pMMB206	Vector de expresión de alto rango de hospedero y bajo número de copias, Cmr	[15]
pCR2.1 <i>phbC</i> 1.8	Derivado del pCR2.1TOPO que porta el fragmento del gen <i>phbC</i>	
p206C	Derivado del pMMB206 que contiene el gen <i>phbC</i>	
pJET-55C	Derivado del pJET1.2/Blunt que contiene el gen <i>phbC</i>	

La cepa de *A. brasilense* Sp7 fue recuperada a partir de gliceroles almacenados a -70 °C en medio Luria-Bertani (LB) con 100 μ g/ml de Ampicilina (Amp), incubadas 18 horas a 30 °C y 150 rpm. Se utilizaron distintos medios de cultivo como rojo Congo y Medio Mínimo (K-malato) como medios selectivos para verificar pureza y uniformidad de las colonias durante los distintos protocolos elaborados.

La cepa de *E. coli* DH5 α , fue crecida en caldo LB e incubada durante 18 horas a 37 °C y con agitación a 150 rpm, adicionado Acido Nalidíxico (Nx) 15 μ g/ml, mientras que la cepa de *E. coli* S17.1 se creció en las mismas condiciones pero utilizando Estreptomycin (Sm) 20 μ g/ml.

Se utilizó medio mínimo (MM) con Cloranfenicol (Cm) 20 μ g/ml y Amp 100 μ g/ml con y sin adición de IPTG, incubados 72 horas a 30 °C y 180 rpm, para los ensayos de cuantificación de PHB y proteínas totales.

J. Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA genómico se realizó por la técnica de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) de acuerdo a Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. [16]. La pureza del DNA se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y 75 V, se tiñó el gel con bromuro de etidio (BET) y se visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador.

K. Amplificación del gen *phbC*

Los iniciadores que se utilizaron fueron diseñados a partir de la secuencia reportada por Kadouri D., Jurkevitch E., Burdman S. y Okon Y. [8] para la PHB sintasa depositada en el Genebank (No. de acceso AF353205), utilizando el software Primer Select de DNASTar. En el diseño de los iniciadores se incorporó el sitio de restricción para la enzima *Pst* I en el gen *phbC*, los iniciadores utilizados en el trabajo se muestran en la Tabla 3. La amplificación del gen *phbC* se realizó a partir del DNA genómico de la cepa *A. brasilense* Sp7, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó de acuerdo al protocolo especificado por el fabricante (Taq recombinante Invitrogen), el tamaño del amplificado es de 1857 pb correspondiente al gen de la poli- β -hidroxibutirato sintasa.

Tabla III. Iniciadores diseñados para amplificar el gen *phbC*. sitio de restricción *Pst* I subrayado

Nombre	Secuencia	Gen
GCsp7D	5' ATGGTTCGGAGATCTGGGTGTGG 3'	<i>phbC</i>
GCsp7R	5' TCAGACGATGCGGACCTTGGC 3'	<i>phbC</i>
<i>phbC</i> -FPst	5' CTGCAGATGGTTCGGAGATCTGGGTGT 3'	<i>phbC</i>
<i>phbC</i> -RPst	5' CTGCAGTCAGACGATGCGCACCTTGG 3'	<i>phbC</i>

Para los análisis *in silico* se utilizaron los programas: pDRAW32, Softberry, DNASTar, DNAsis, Serial cloner, entre otros.

La mezcla de reacción para la PCR se realizó de la siguiente manera: DNA 5-10 ng, PCR buffer 1X, dNTPs 0.2 mM, MgCl₂ 2 mM, iniciadores: delantero 0.6 μ M, iniciador reverso 0.6 μ M, Taq Pol 1 U y DMSO 5%. Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C x 5 min (1 ciclo), 94 °C x 30 seg, T_m (dependiendo de cada par de iniciadores) x 45 seg, 72 °C x 2 min (30 ciclos), 72 °C x 5 min (1 ciclo), y enfriamiento a 4 °C x tiempo indefinido (Fig. 1).

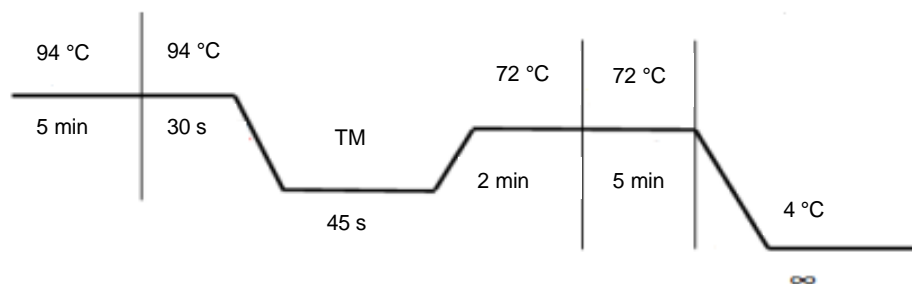


Fig. 1. Esquema de las condiciones de amplificación.

L. Clonación del fragmento de *phbC* en vector pCR2.1-TOPO

La ligación del fragmento con el vector de clonación pCR2.1-TOPO, se realizó de acuerdo a lo descrito en el manual de clonación TOPO TA cloning kit, la cual se incubó toda la noche a temperatura ambiente (22-23 °C). Ésta fue usada en la transformación de células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α y seleccionadas en placas de LB conteniendo Kanamicina (Km) 50 μ g/ml. Las clonas positivas fueron seleccionadas adicionando X-Gal e IPTG. Las transformantes presuntivas se crecieron en LB con el antibiótico de selección. Se llevó a cabo la extracción de DNA plasmídico y se realizó una PCR para observar la inserción del fragmento clonado, de la misma forma una prueba de restricción con *Eco* RI para observar la liberación de éste. El DNA plasmídico de la clona (*E. coli* DH2.1TopoC) que mostró las características esperadas se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Mex.

M. Clonación del fragmento de *phbC* en el vector pJET1.2/Blunt

El producto de amplificación de se ligó en el vector de clonación pJET1.2/Blunt de acuerdo al protocolo especificado por el proveedor CloneJET PCR cloning Kit (Thermo SCIENTIFIC). La reacción de ligación se realizó con la ligasa LigaFast Rapid DNA Ligation System incubando a temperatura ambiente (22-23 °C) por 2 horas, el producto de ligación se usó para transformar las células competentes de *E. coli* DH5 α y seleccionadas en placas de LB con Amp 100 μ g/ml. Las clonas candidatas fueron crecidas en 5 ml de LB con el antibiótico de selección, para extracción de DNA plasmídico. Confirmado por patrones de restricción con la enzima *Pst* I, corroborando la presencia del gen clonado

N. Subclonación en el vector de expresión pMMB206

A partir del DNA obtenido de la clona pJET-55C, el gen *phbC* se liberó por digestión con *Pst* I, este fue visualizado en un gel de agarosa, extraído de banda y purificado de acuerdo al protocolo del kit de purificación Zymoclean Gel DNA Recovery. De igual forma el vector de expresión pMMB206 fue digerido con *Pst* I. Ambos productos de digestión fueron usados para ligarlos y transformar la cepa de *E. coli* DH5 α químicamente competentes en placas de LB conteniendo Cm 10 μ g/ml y colocando 80 μ g/ml de X-gal e IPTG 1 mM para facilitar la selección de las clonas positivas al gen clonado. Posterior a esto se les realizó extracción de DNA plasmídico y la presencia del gen fue corroborado por PCR, patrones de restricción con la enzima *Pst* I; así como una digestión con la enzima *Eco* RI para comprobar la orientación 5'-3' de éste. El plásmido resultante p206C fue usado en la transformación de la cepa conjugativa de *E. coli* S17.1.

O. Conjugación de *E. coli* S17.1 p206C y *A. brasilense* Sp7

Para llevar a cabo la conjugación de las cepas *E. coli* S17.1 p206C (donadora) y *A. brasilense* Sp7 (receptora), fueron recuperadas en 5 ml de LB sin antibiótico y sin agitación a 37 °C y 30 °C

respectivamente. La cepa receptora y la donadora se inocularon en una placa de LB sin antibiótico a 30 °C durante 18 h. Se adicionó 1 ml de solución salina para recuperar las células y se realizaron diluciones seriadas, que fueron extendidas en placas de LB con Amp 100 µg/ml y Cm 10 µg/ml, seleccionando aquellas cajas que tuviesen colonias aisladas. Las colonias se usaron para seleccionar las transconjugantes de *A. brasilense* portadoras de la construcción p206C por medio de una prueba por crecimiento en medio diferencial rojo Congo y/o K-malato conteniendo 20 µg/ml de Cm. Una vez determinadas las transformantes, se seleccionó una candidata, a la cual se le realizaron pruebas confirmatorias para la detección del vector p206C en PCR en colonia, extracción del plásmido, patrones de restricción, y la cepa fue denominada *A. brasilense* Sp7-p206c.

P. Curva de crecimiento de las cepas A. brasilense Sp7, A. brasilense Sp7-p206c y A. brasilense-pMMB6.

Se realizó la curva de crecimiento, a partir de cultivo fresco de cada una de las cepas *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp7-p206c y *A. brasilense* Sp7-pMMB6, que nos permitirá inferir si la presencia del plásmido afecta el crecimiento de la cepa. Se preparó un pre-inoculo de 48 h para posteriormente inocular un matraz y ajustar la DO_{600nm} a 0.1, realizando un muestreo cada 2 h durante 24 h.

Q. Cuantificación de PHB en la cepa transformada de A. brasilense Sp7-p206c.

Con el objetivo de detectar cambios significativos en la expresión de PHB en la cepa *A. brasilense* Sp7-p206c, se procedió a su cuantificación, usando el protocolo de Law J. H. y Slepecky R. A. [17]. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado en cultivos con y sin adición del inductor (IPTG). Se usaron como controles negativos la cepa silvestre y una cepa transformada con vector sin el inserto, denominada *A. brasilense* Sp7-pMMB6.

R. Determinación de proteínas totales.

Para la determinación de proteínas totales se realizó una curva patrón por triplicado con albúmina sérica bovina (BSA), realizando diluciones a partir de un stock a 1 mg/ml. Posteriormente se utilizó el reactivo de Bradford (Biorad) y se midieron en el espectrofotómetro a 595 nm, se graficaron los datos y por medio de una regresión lineal se determinó la ecuación de la recta, así como la tendencia de la misma (R^2).

La determinación de proteínas totales se realizó a partir del cultivo utilizado para la cuantificación de PHB, se utilizó 1 ml del cultivo anterior el cual se centrifugó, la pastilla obtenida se resuspendió en buffer salino de fosfatos (PBS) y fue sometida a sonicación, se centrifugó y se recuperó el extracto proteico soluble, este se utilizó en la cuantificación de proteínas totales con el reactivo de Bradford, las muestras fueron leídas al espectrofotómetro a 595 nm, los datos obtenidos se interpolaron en la curva patrón para determinar la concentración. Posteriormente los datos de medición del PHB y las proteínas totales se correlacionaron para determinar si hubo diferencia significativa entre las muestras tratadas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Análisis in silico

Para iniciar el trabajo se analizó la secuencia reportada por Kadouri D., Jurkevitch E., Burdman S. y Okon Y. [8] del gen *phbC* (AF353205.1) con el fin de diseñar los oligonucleótidos adecuados para la amplificación por PCR de este gen. En nuestro grupo de trabajo, anteriormente no se había logrado obtener la secuencia completa del gen *phbC*, se realizó un Blastn en busca de secuencias homólogas al gen en las bases de datos del NCBI (Fig. 2), La homología observada fue con las cepas (2) *A. brasilense* Sp245 en un 98%, (3) *A. lipoferum* un 89%, (4) *A. sp.* B510 en un 88%, con (5) *Magnetospirillum*

magneticum AMB-1 80%, (6) *Rhodospirillum centenum* SW un 80% y con (7) *Thauera* sp. MZ1T un 78%.

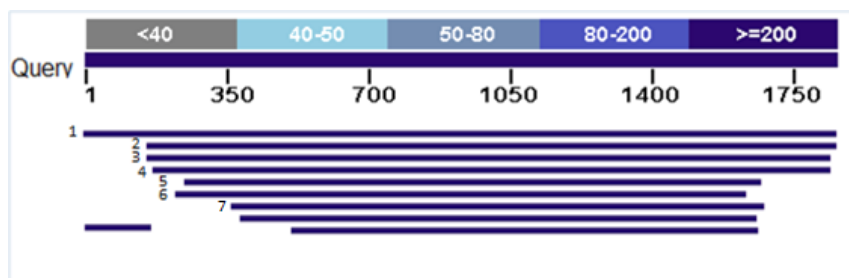


Fig. 2. Blastn para la secuencia del gen *phbC* (1) reportada por Kadouri [8], de la cepa *A. brasilense* Sp7.

Como resultado del análisis de secuencias de *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sp245, *A. lipoferum*, *A. sp. B510*, *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, *R. centenum* SW y *Thauera* sp. MZ1T mediante el Blastn se observó que existen variaciones significativas del gen *phbC* entre las regiones 5' y 3', y se obtuvo información sobre los genes putativos de las PHB sintasas (Fig.3), usando el programa CLC Main Workbench. (B510) *A. sp. B510*, (Lipoferum) *A. lipoferum*, (Sp7) *A. brasilense* Sp7, (SW) *Rhodospirillum centenum* SW, (AMB1) *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, (MZ1T) *Thauera* sp., (Sp245) *A. brasilense* Sp245.

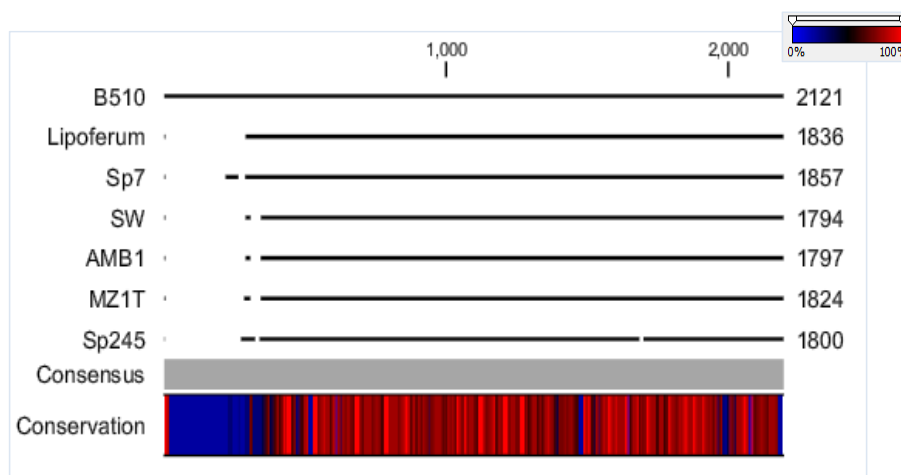


Fig. 3. Alineamiento de las secuencias de los genes y genes putativos de la PHB sintasa de las cepas con homología.

Debido a la variación presente en las secuencias de nucleótidos de este gen, se realizó un análisis de las secuencias de aminoácidos para observar si existen variaciones importantes de esta proteína entre cepas (Fig. 4) usando el programa CLC Main Workbench. (PSp7) *A. brasilense* Sp7, (PSp245) *A. brasilense* Sp245, (PB510) *A. sp. B510*, (PLipoferum) *A. lipoferum*, (PSW) *Rhodospirillum centenum* SW, (PAMB1) *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, (PMZ1T) *Thauera* sp.

Con el alineamiento de la Fig. 4, se pueden distinguir las regiones conservadas de esta proteína en todas las secuencias analizadas, así como también se observó con más claridad la variación que existe entre las secuencias en las regiones amino y carboxilo-terminal, reafirmando lo que mostraban los análisis anteriores, se concluyó que los oligonucleótidos deberían ser diseñados directamente de la secuencia reportada por Kadouri D., Jurkevitch E., Burdman S. y Okon Y. [8].

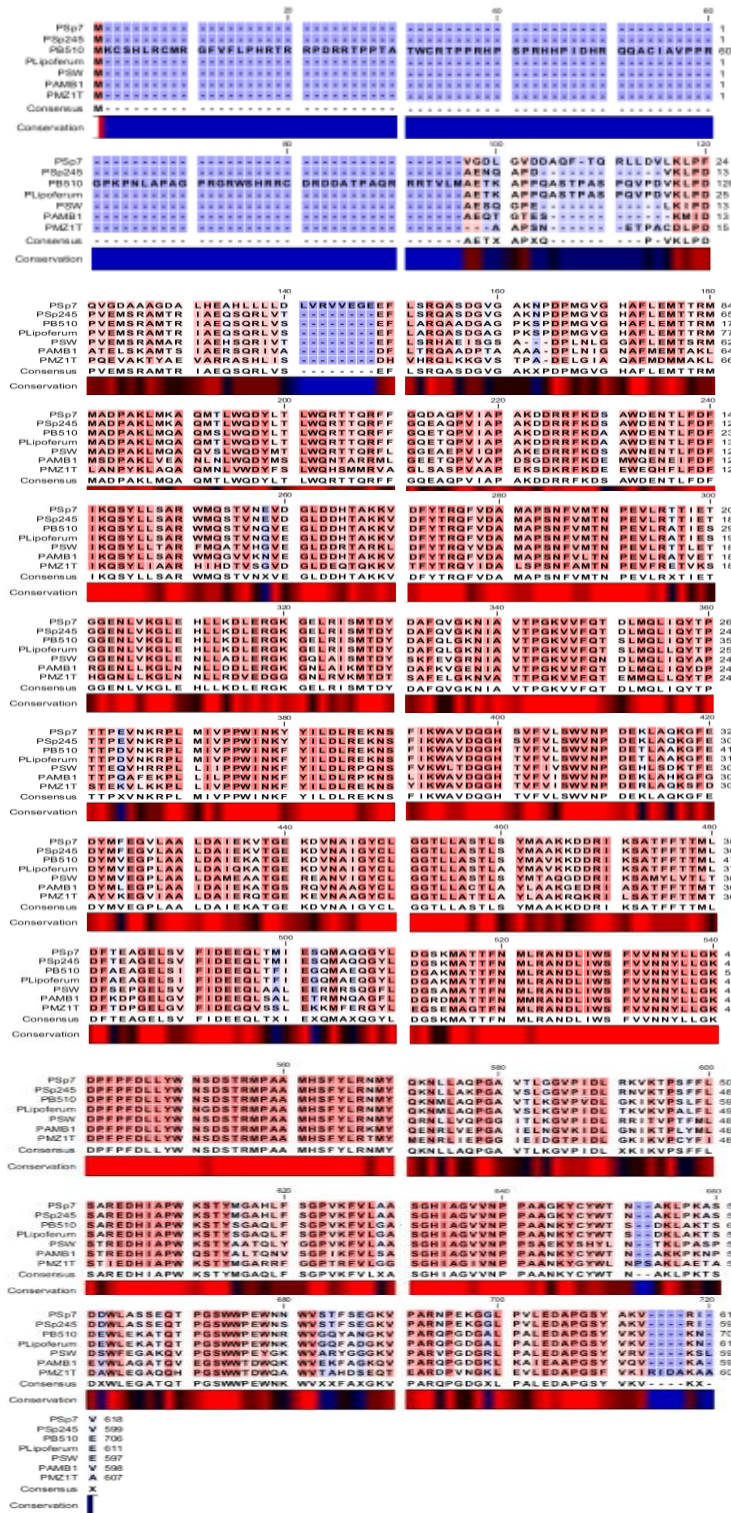


Fig. 4. Alineamiento de las proteínas homologas de la PHB sintasa.

Como se observó en los análisis anteriores existe una variación importante en la región N-terminal del gen *phbC* en todas las cepas, se pensó que no tienen una función importante en la síntesis de PHB, pero se ha estudiado por medio de mutaciones y deleciones de la región N-terminal, que puede tener

importancia en la interacción con otras proteínas involucradas en la síntesis del PHB, además de la importancia en su plegamiento [18]. Mientras que la región C-terminal se encuentra conservada, y se ha visto que en esta región se encuentran los aminoácidos conservados con un papel importante en el mecanismo catalítico [19].

B. Amplificación, clonación y secuenciación del gen *phbC*

Para la amplificación del gen de la PHB sintasa, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de *A. brasilense* Sp7. Con ellos se logró el amplicón esperado de 1857 pb como se observa en la Fig. 5, a partir del DNA total de *A. brasilense* Sp7. (M) 1 kb DNA Ladder Invitrogen, (C1, C2) amplicón del gen *phbC*.

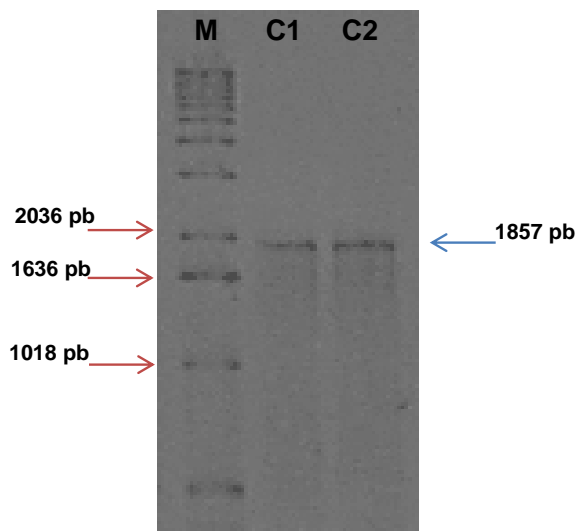


Fig. 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, amplificación del fragmento que contiene el gen *phbC*.

Este amplicón se clono en el vector pCR2.1TOPO y el producto obtenido se usó para la transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5a, posteriormente se les realizo extracción de DNA plasmídico, para ser sometidos a una prueba por patrones de restricción utilizando la enzima *Eco* RI que reconoce un sitio dentro del gen clonado y un sitio del plásmido permitiendo la liberación de un fragmento de 1720 pb y uno que no se aprecia de 168 pb, así como lo correspondiente al vector de 3913 pb (Fig. 6), analizadas por perfil de restricción. (M) 1 kb DNA Ladder Invitrogen, (C1, C2) digestión con *Eco* RI y liberación del fragmento esperado.

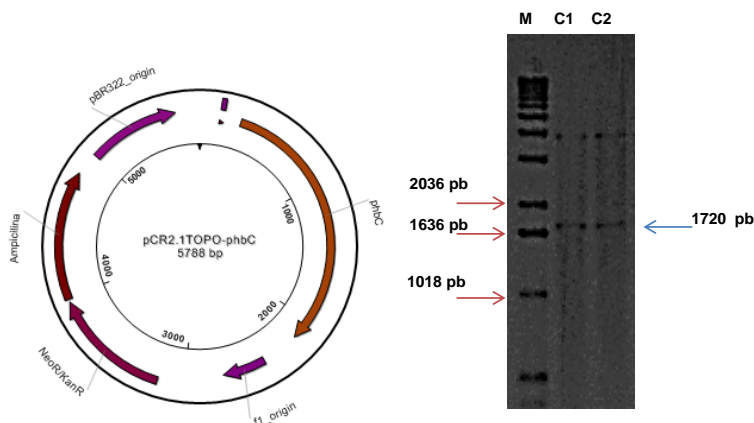


Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de clonas candidatas con el gen *phbC*.

De las clonas candidatas que presentaron el patrón de digestión esperado se seleccionó C1 (Fig. 5) y se envió a secuenciar, el resultado del análisis de la secuencia, permitió saber que el gen clonado posee un 98% de homología con lo reportado por Kadouri D., Jurkevitch E., Burdman S. y Okon Y. [8], correspondiente al gen *phbC* de *A. brasilense* Sp7 (Fig. 7) y obtener una plantilla la cual será utilizada para amplificar al agregarle un sitio de corte *Pst* I para la posterior clonación en el vector de expresión pMMB206. El alineamiento de la secuencia mostro un 98% de homología con el gen *phbC* reportado en el NCBI de la cepa *A. brasilense* Sp7.

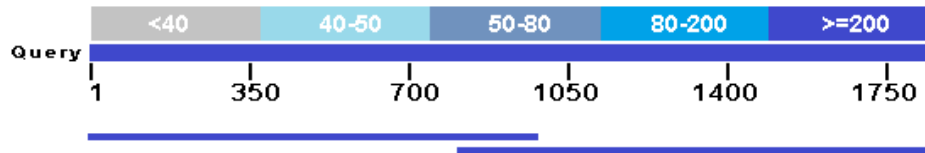


Fig. 7. Alineamiento de la secuencia del gen *phbC*.

C. Clonación del gen *phbC* en el vector pJET2.1/Blunt y subclonación en el vector de expresión pMMB206

Para la clonación del gen de la PHB sintasa (*phbC*) en el vector pJET2.1/Blunt se adicionó el sitio de corte *Pst* I. El gen se amplificó y se ligó en el vector pJET2.1/Blunt, para transformar la cepa *E. coli* DH5 α , realizando la extracción de plásmido y corroborando la presencia del sitio de corte agregado (Fig. 8). (M) 1 kb DNA Ladder Invitrogen, (C1) amplificación del gen *phbC*, (C2) digestión con *Pst* I para corroborar la presencia del gen y los sitios de corte en el vector pJET-55C.

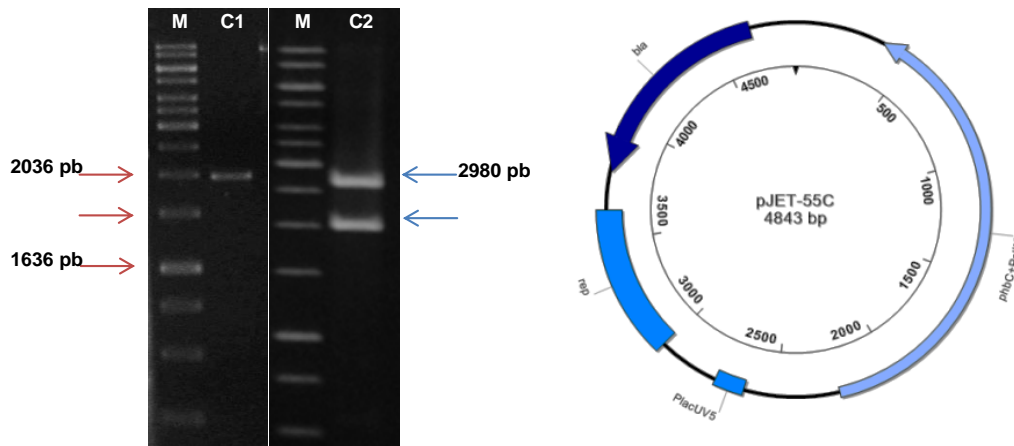


Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, amplificación y clonación del gen *phbC* en el vector pJET1.2/Blunt.

La subclonación se realizó a partir del plásmido pJET-55C (Fig. 8), para ello se efectuó una digestión con la enzima *Pst* I y se purificó la banda del fragmento del gen *phbC*, que fue utilizada para la ligación con el vector pMMB206 (Fig. 9), el cual previamente fue digerido con esta misma enzima, con esta ligación se transformó *E. coli* DH5 α . (M) GeneRuler 1 kb DNA Ladder, (C1) clona con el perfil de restricción esperado (un fragmento de 9311 pb y otro de 1863 pb), digerida con la enzima *Pst* I (p206C).

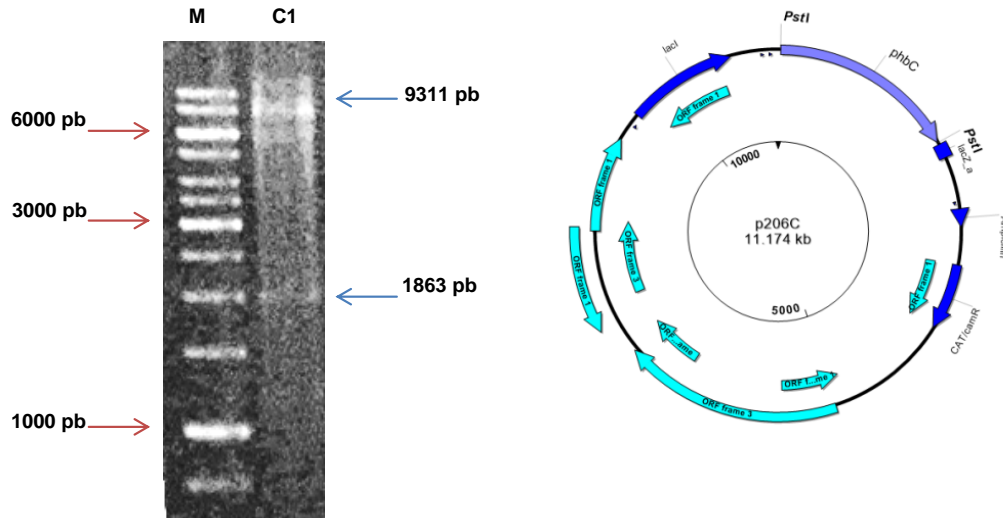


Fig. 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, subclonación del gen *phbC* en el vector pMMB206.

La clona candidata seleccionada se sometió a un análisis de restricción para corroborar la orientación de fragmento, se realizó con la enzima *Eco* RI, esperando dos fragmentos uno de 10955 pb y uno de 189 pb (no se aprecia) en caso de encontrarse en la orientación 5´- 3´, y dos fragmentos uno de 9456 pb y otro de 1728 pb si estuviera en orientación 3´- 5´ (datos no mostrados). La clona que dio el perfil deseado fue utilizada para transformar la cepa *E. coli* S17.1.

La subclonación y posterior transformación de la cepa de *E. coli* S17.1 con la construcción p206C es para la conjugación con la cepa de *A. brasilense* Sp7, el vector de expresión usado es de amplio rango de hospedero, bajo número de copias, inducible con IPTG y confiere resistencia a Cm.

Se realizó la transformación de la cepa S17.1 con el vector sin la inserción del fragmento como un testigo, y se observó que no existe afectación en el crecimiento de la cepa por la presencia del plásmido pMMB206.

D. Conjugación de la cepa *E. coli* S17.1 y *A. brasilense* Sp7

Las transconjugantes fueron crecidas en medios selectivos MM y rojo Congo, con Amp y Cm como antibióticos de selección, y posteriormente sometidas a amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos para el plásmido pMMB206 (Fig. 10). (M) GeneRuler 1 kb DNA Ladder, (C2) control negativo (*A. brasilense* Sp7), (C3) *A. brasilense* Sp7-p206c, (C1) control positivo (Vector p206C).

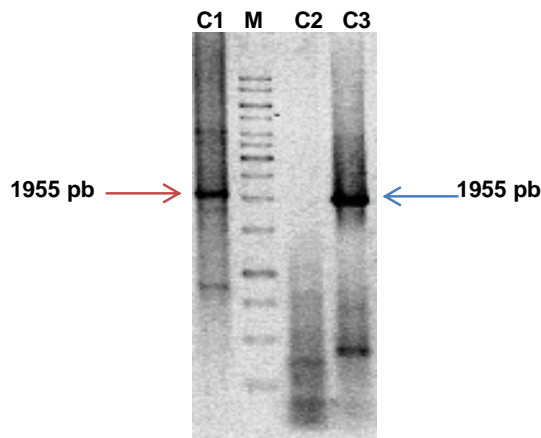


Fig. 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, análisis por PCR de la transconjugante de *A. brasilense* Sp7-p206c.

E. Curvas de crecimiento

Se realizaron las curvas de crecimiento de las cepas de *A. brasilense* Sp7, Sp7-pMMB6 y Sp7-p206c, no se observó una diferencia significativa en cuanto al crecimiento de las cepas (Fig. 11), descartando afectación. Se muestran las curvas de crecimiento iniciadas a D.O.₆₀₀ de 0.1 y seguidas con mediciones cada 2 horas hasta el inicio de la floculación. Datos ajustados al modelo de Monod.

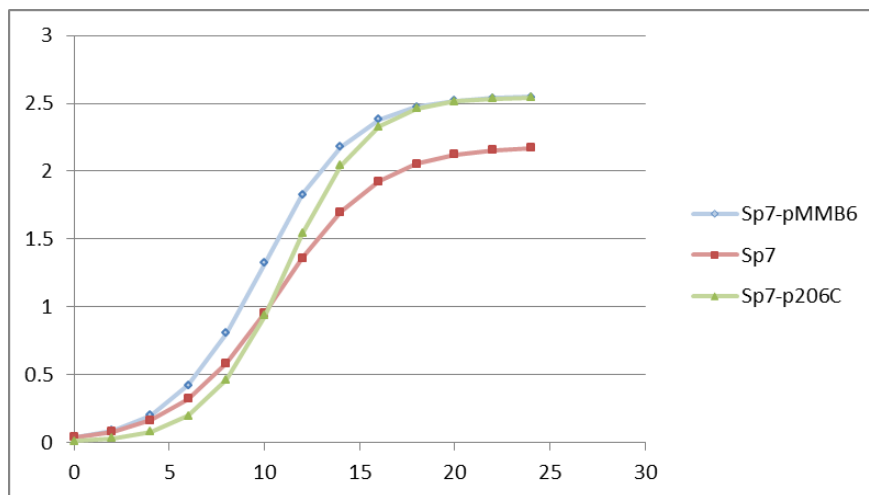


Fig. 11. Curva de crecimiento de las cepas *A. brasilense* Sp7, Sp7-pMMB6 y Sp7-p206c.

F. Relación PHB/Proteínas totales

La relación de PHB/Proteínas totales se obtuvo de cuantificar la cantidad de PHB en las cepas *A. brasilense* Sp7, Sp7-pMMB6 y Sp7-p206c, sometidas a estrés en un medio mínimo con alta concentración de fuente de carbono y limitada de nitrógeno y relacionarla con las proteínas totales obtenidas del cultivo en estos medios, estas fueron realizadas por triplicado con y sin adición del inductor IPTG a una concentración de 1 mM, colocando el inductor al inicio del cultivo. De ellas se puede observar que no hay una variación significativa en la producción de PHB (Fig. 12) (p206c l) Cepa *A. brasilense* Sp7-p206c con IPTG 1 mM, (p206c) Cepa *A. brasilense* Sp7-p206c sin IPTG, (pMMB6 l) Cepa *A. brasilense* Sp7-pMMB6 con IPTG 1 mM, (pMMB6) Cepa *A. brasilense* Sp7-pMMB6 sin IPTG, (Sp7 l) Cepa de *A. brasilense* Sp7 con 1 mM de IPTG, (Sp7) Cepa de *A. brasilense* Sp7 sin IPTG. Datos por triplicado en ensayos independientes.

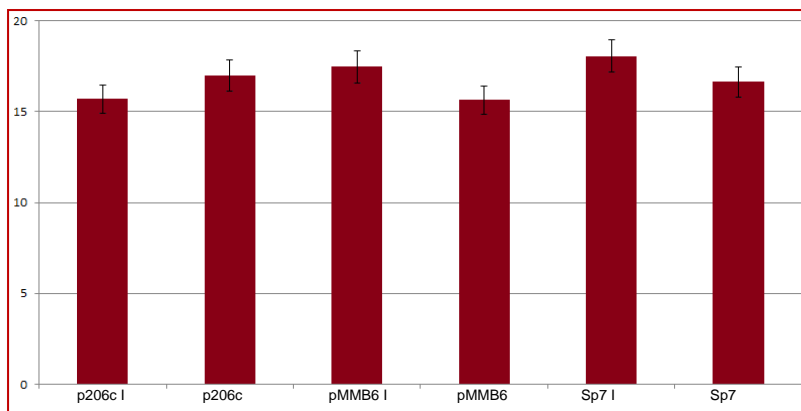


Fig. 12. Relación PHB/Proteínas totales.

Se realizó un ensayo modificado, se inició cuando el cultivo llega a una D.O._{600nm} de 0.6, sin inducir (Fig. 13) e inducido (Fig. 14) a una concentración de 0.4 mM de IPTG y posteriormente se tomaron muestras a las 3 y 6 horas, posteriormente se cuantifico la relación de PHB/Proteínas totales.

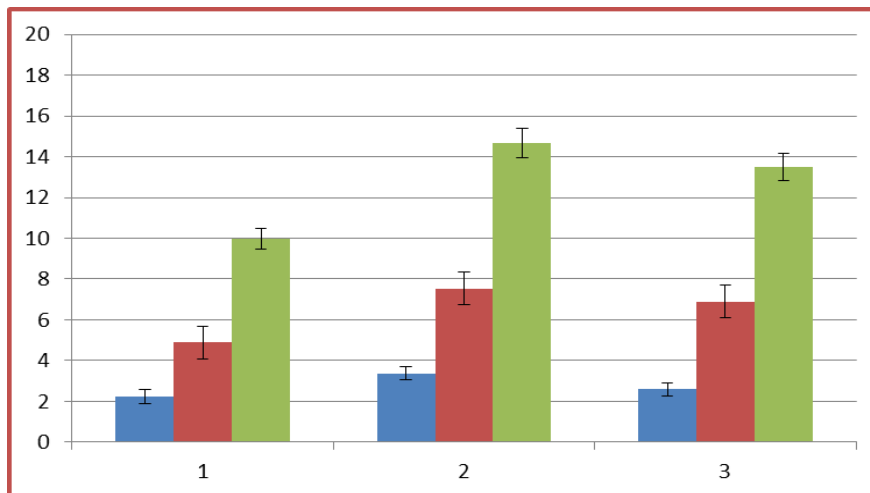


Fig. 13. Relación PHB/Proteínas totales. Sin inducción. 1:0, 2:3 y 3:6h. *A. brasilense* Sp7-pMMB6, Sp7 y Sp7-p206c.

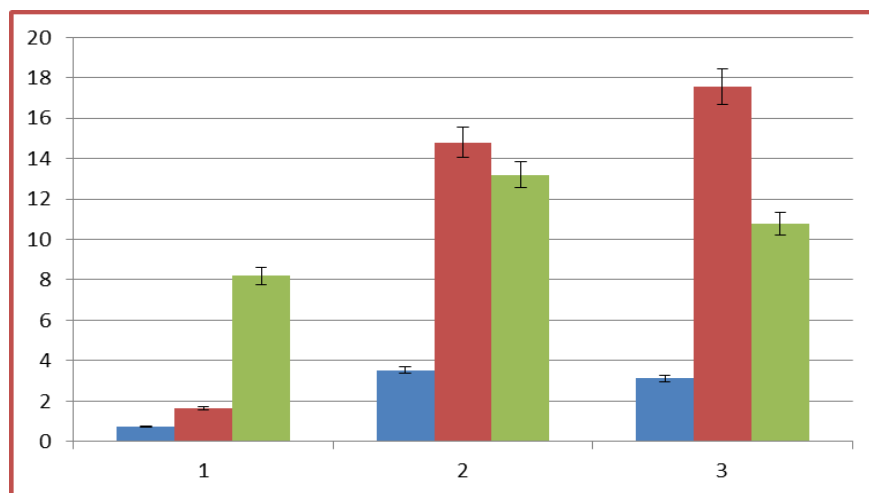


Fig. 14. Relación PHB/Proteínas totales. Con inducción. 1:0, 2:3 y 3:6h. *A. brasilense* Sp7-pMMB6, Sp7 y Sp7-p206c.

En la relación PHB/Proteínas totales no se observa un aumento significativo en la cuantificación del PHB al colocar el inductor al inicio del cultivo (Fig. 12) y dejarlo por 72 horas, pero esto no indica que se esté sobreexpresando el gen *phbC*, dado que puede estarse sintetizando proteína y no estar relacionada a la producción de PHB. Sin embargo, cuando se realiza la inducción al llegar a una D.O._{600nm} de 0.6 se observó una tendencia de aumento en la producción de PHB en la cepa *A. brasilense* Sp7-p206c (Fig. 14), así como un comportamiento errático con la cepa *A. brasilense* Sp7-pMMB6 como en el ensayo sin inducción (Fig. 13).

Cabe señalar que las concentraciones utilizadas del inductor IPTG fueron manejadas de acuerdo a lo reportado por Morales M. V., Assar B. y Michael B. [15] donde mostró que la inducción con el vector pMMB206 podía llevarse a cabo desde 0.05 a 2 mM, el vector posee el promotor *tac* un vector híbrido que es 10 veces más fuerte que el promotor *lac* UV5 y 3 veces más que el promotor *trp* de los cuales

proviene [20]. Este vector ha sido utilizado en *A. brasilense* para la expresión de genes [21], por lo cual se usó como la condición adecuada para inducir y expresar este gen.

RECONOCIMIENTOS

Damos las gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca a RMC, también a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) de la BUAP.

REFERENCIAS

- [1] Sudesh K, Abe H. and Doi Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* ;25:1503-55.
- [2] Steinbuechel A. and Luke-Eversloh T. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Eng. J.* 16 81-96.
- [3] Barnard G. N. and Sanders J. K. 1989. The poly-B-hydroxybutyrate granule *in vivo*. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. *Biol. Chem.*,264:3286-329L.
- [4] Povolo F., Élida B. Hermiday and Andrea Saad. 2001. Determinación de los módulos tensil y de almacenamiento de compuestos de PHB. Jornadas SAM – CONAMET – AAS 2001
- [5] Okon Y. and Labandera-Gonzales C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- [6] Okon Y. and Vanderleyden J. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *Features.* 63: 366-370.
- [7] Itzigsohn R., Yarden O. and Okon Y. 1995. Polyhydroxyalkanoate analysis in *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 41:73–76.
- [8] Kadouri D., Jurkevitch E., Burdman S. and Okon Y. 2002. Identification and isolation of genes involved in poly (β -Hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. *Applied and Environmental Microbiology.* 68.6.2943–2949.
- [9] Trotsenko Y. and Belova L. 1999. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and its regulation in bacteria. *Microbiol.* 69,753-763.
- [10] Tal S. and Okon Y. 1985. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 31: 608-613.
- [11] Kadouri D., Jurkevitch E. and Okon Y. 2003. Poly β -hydroxybutyrate depolymerase (*PhaZ*) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Arch. Microbiol.* 180: 309–318.
- [12] Tarrand J., Krieg J. N. R. and Dobereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with the description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species. *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*24:967-980.
- [13] Hanahan D. 1985. *In DNA Cloning: A practical approach.* Glover, D. M. (ed.), Vol. 1, p. 109.
- [14] Simon R., Priefer U. and Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-790.
- [15] Morales M. V., Assar B. and Michael B. 1991. A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene*, 97 (1991) 39-47.
- [16] Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [17] Law J. H. and Slepecky R. A. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* vol. 82 no. 1 33-36.
- [18] Zhong Zheng, Ming Li, Xiao-Jing Xue, Hong-Lei Tian, Zhi Li and Guo-Qiang Chen. 2006. Mutation on N-terminus of polyhydroxybutyrate synthase of *Ralstonia eutropha* enhanced PHB accumulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2006) 72: 896 – 905.

- [19] Qingsheng Qi and Bernd H. A. Rehm. 2001. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology*. 147, 3353–3358
- [20] Herman A. de Boer, Lisa J. C. and Mark V. (1982). The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 80 pp. 21-25.
- [21] Nagarajan T., Mukti N. M., Stijn S., Jos V., Carol A. G. and Anil K. T. (2008). An extra-cytoplasmic function sigma factor and anti-sigma factor control carotenoid biosynthesis in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 154, 2096-2105.