

EL USO DE *E. coli* EN EL PERFECCIONAMIENTO DE UN MÉTODO PARA OBTENER GENES DE BACTERIAS NO CULTIVABLES

Alix Carmona, Jennifer Hegewisch, Alicia Hernández, David Montante, Thalía Fierro
Colegio Marymount
Estrella del Norte #6, Col. Rancho Tetela, Fax: 3 11-42-77, E-mail: colegio@marymount.edu.mx

Palabras clave: *E. coli*, electroporación, plásmidos

Introducción. Actualmente no se sabe cómo reproducir en el laboratorio al 99 % de las bacterias que existen en el mundo, es decir las no cultivables (1). Una vez que se conoce cómo cultivar una bacteria se puede saber el orden de los nucleótidos del ADN de las bacterias, lo cual nos da mucha información acerca de ellas. (2) Con el propósito de lograr obtener un mejor conocimiento de estas bacterias, montamos un método con el cual pudimos introducir genes de bacterias no cultivables en una bacteria fácilmente cultivable en el laboratorio, es decir *Escherichia coli* (debido a que ya se sabe cómo nutrirla) y reproducirla. Este proyecto busca ampliar el conocimiento que se tiene sobre el mundo de las bacterias.

Nuestro objetivo fue lograr perfeccionar un método para insertar genes de bacterias no cultivables (modelo) en bacterias *Escherichia coli* para reproducirlas y poder analizar así este material genético.

Metodología. Con la enzima *Sau3a* cortamos el ADN purificado (proveniente de *E. coli* modelo) en segmentos específicos de plásmido llamados "A." Sus secuencias genéticas en los extremos van a ser compatibles con "B." Por separado, cortamos (digerimos parcialmente) con la enzima *BamHI*, los plásmidos de las bacterias de *E. coli* que serán los segmentos "B." Fusionamos A+B con la enzima ligasa y se crearon plásmidos mutantes "C," de los cuales sólo los completos sobreviven en un medio con Kanamicina. Fusionamos los plásmidos "C" con las bacterias *E. coli* en el electroporador. Para la obtención de genes particulares, las pusimos en un medio sin triptofano, y sólo las que adquirieron la propiedad de sintetizarlo sobrevivieron. Reproducimos las bacterias en una caja de Petri, y contamos el número de colonias obtenidas.

Resultados y Discusión En el primer experimento obtuvimos 9000 colonias empleando la enzima *BamHI* durante 30 min, lo cual es muy poco ya que necesitábamos obtener 100,000 (un número suficiente para garantizar que sí se llevó a cabo la fusión en gran proporción). El vector no estaba suficientemente digerido por lo que rehicimos el experimento utilizando un mayor tiempo de digestión. En el segundo experimento se empleó la enzima *BamHI* durante 1 hora y la enzima de ligasa durante 30 min. Obtuvimos 4 colonias bacterianas. Debido a que el tiempo de la enzima *BamHI* ya se había modificado, ahora se tuvo que modificar el tiempo de

acción de la enzima ligasa. En el tercer experimento, al utilizar la enzima *BamHI* durante 30 min y la enzima ligasa durante 1 hora, obtuvimos 35000 colonias [Ver Fig. 1] Este fue un resultado óptimo que tendría que repetirse sólo 3 veces para obtener 100000 colonias. Cambiando el tiempo de uso de las enzimas, se aumentó el número de colonias fusionadas. Estos tiempos y cantidades específicas finales determinan las condiciones necesarias para poder construir bancos de genes.

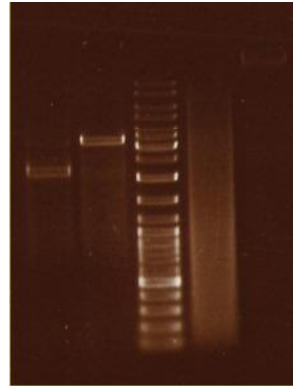


Fig. 1. Electroforesis en la que se muestra del tamaño final de los segmentos digeridos para la obtención de las 35000 colonias bacterianas.

Conclusiones. Se creó un banco de genes modelos. Se logró optimizar la metodología hasta que quedara un proceso definido y eficiente de tiempos y cantidades de uso de enzima. La cantidad de colonias obtenidas de los experimentos fueron las necesarias para poder tener bancos representativos de genes de bacterias no cultivables. Los resultados del proyecto pueden ser utilizados como un avance en los métodos de reproducción para bacterias no cultivables.

Agradecimientos. Al Dr. Lorenzo Segovia, nuestro asesor. (Laboratorio del Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis del IBT-UNAM)

Bibliografía.

1. Kowalsky, H., (2004) IBEA Announces Sorcerer II Expedition, Global Expedition To Sample World's Oceans And Land To Characterize And Understand Microbial Populations Using Environmental DNA Sequencing, Gordon and Betty Moore Foundation, <http://www.moore.org/pa-newsitem.aspx?id=498&pa=36> La página fue consultada el 11 de febrero del 2007.
2. Russell, P., *iGenetics & Mendelian approach*, Benjamin – Cummings Publishing Company, April 4, 2005. pp. 123-