

# SOBREEXPRESIÓN HOMÓLOGA DE UNA AZOREDUCTASA RECOMBINANTE DE *BACILLUS SUBTILIS*.

Hernández González Luis Ángel (1), Ramírez Ramírez Norma (2), Pedraza Reyes Mario (2)

<sup>1</sup> [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [luisgaraa@hotmail.com]

<sup>2</sup> [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [pedrama@ugto.mx]

## Resumen

Los colorantes tipo “AZO” que contaminan el medio ambiente generan productos potencialmente carcinogénicos. La reducción de dichos compuestos por azoreductasas microbianas puede ser una estrategia eficiente para el tratamiento de desechos contaminados con colorantes tipo AZO. Además de *yhdA*, una proteína con actividad de azoreductasa, un análisis bioinformático tipo BLAST reveló que *B. subtilis* cuenta con un un marco de lectura abierto que codifica para otra potencial azoreductasa denominada *ywqN*. En el presente trabajo se emplearon herramientas genéticas y moleculares para desarrollar una cepa recombinante de *B. subtilis* portando una construcción génica capaz de sobreproducir la proteína YwqN.

## Abstract

The type “AZO” dyes pollute the environment generating potential carcinogenic products. The reduction of these compounds by microbial azoreductases has been proposed as an efficient strategy for the treatment of wastes contaminated with AZO-type dyes. In addition to *YhdA*, a protein with azoreductase capacity, a BLAST analysis revealed that *B. subtilis* counts with another open reading frame encoding a potential azoreductase termed *YwqN*. In the present work genetic and molecular tools were applied to develop a recombinant strain of *B. subtilis* carrying a genetic construct capable of overproducing the protein YwqN.

## Palabras Clave

*B. subtilis*, Azoreductasa, Cromatoreductasa, YwqN, Colorantes azoicos, Cr(VI).

## INTRODUCCIÓN

La IUPAC define a los compuestos tipo AZO como derivados del diazeno, son compuestos con la estructura general R-N=N-R' en donde R y R' son dos radicales los cuales por estabilidad generalmente serán grupos arilos o alquilo [1].

Desde su descubrimiento en 1853 los compuestos AZO han sido ampliamente utilizados para teñir una gran variedad de insumos comerciales, incluyendo, los productos textiles, el calzado, la tapicería, los cosméticos y los tintes para tatuajes. La producción anual de estos colorantes sintéticos asciende a 7X10<sup>5</sup> toneladas de los cuales del 10 – 50% son eliminados como residuos al medio ambiente que al degradarse generan productos altamente carcinogénicos [2].

Las azoreductasas representan un grupo de enzimas conformadas por 180-200 aminoácidos con una masa molecular promedio de 19-23 kDa [3]. Estas enzimas, agrupadas en la familia de las NADPH:FMN oxidoreductasas se encuentran presentes en distintas bacterias que habitan en el suelo y el tracto gastrointestinal humano, tienen la capacidad de reducir el enlace "AZO" de los colorantes azoicos [2].

Se ha reportado que el gen *yhdA* de *B. subtilis* codifica para una proteína con capacidad azoreductasa; sin embargo, el genoma de esta bacteria posee información genética adicional que codifica para proteínas con potencial actividad de azoreductasas [3].

Un análisis bioinformático tipo BLAST mostró que el producto predicho del gen *ywqN* posee un alto porcentaje de identidad con *YhdA* y características de las oxidoreductasas dependientes de NADPH:FMN.

Por su capacidad de degradar los colorantes azoicos, las oxidoreductasas son excelentes candidatos para remediar ambientes acuosos contaminados con estos compuestos carcinogénicos [2].

En el presente estudio se implementó una estrategia molecular para clonar el gen *ywqN* en un vector de expresión con el propósito de generar una cepa de *B. subtilis* capaz de dirigir la sobreproducción homóloga de la proteína *ywqN*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Tanto las cepas bacterianas, oligonucleótidos iniciadores y los plásmidos que se utilizaron en este proyecto se enlistan en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Para el crecimiento y proliferación de las cepas tanto de *B. subtilis* como de *E. coli* se empleó el medio Luria-Bertani (LB). Las células competentes de *E. coli* y *Bacillus subtilis* y su transformación con ADN plasmídico se llevó a cabo mediante protocolos previamente descritos [4, 5].

El crecimiento de los cultivos se determinó mediante densidad óptica en un espectrofotómetro ajustado a 590 nm. Cuando se requirió los cultivos fueron suplementados con Ampicilina (Amp) 50 µg/mL o Kanamicina (Kn) 25 µg/mL.

Para la amplificación del gen *ywqN*, se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores específicos, directo, 5'-GCGTCGACCGTAAACAAAGGAGCAGATGC-3' y reverso 5'-GCGCATGCTTGACTTGCAGCGTGGTT', conteniendo sitios de corte *Sall* y *SphI*, respectivamente.

Tabla 1: Cepas empleadas en este estudio

CEPA	GENOTIPO O FENOTIPO	REFERENCIA
PERM 100	<i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ . F <sup>-</sup> $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR</i> <i>recA</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i>	Ceparío PERM Lab
PERM 118	<i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ + pDG148, Amp <sup>R</sup> , Kn <sup>R</sup> ( <i>B. subtilis</i> )	Ceparío PERMLab

PERM YB 130	<i>E. coli</i> XL10-Gold, Kn <sup>R</sup>	Cepario PERMLab
PERM 110	<i>B. subtilis</i> 1A751 eglS Δ102, bglIT/bglIS ΔEV npr apr his	Cepario PERMLab
PERM 1604	<i>E. coli</i> DH5-α conteniendo el plásmido pJET 1.2 más el ORF del gen <i>ywqN</i> (748 pb) Amp <sup>R</sup>	Este estudio
PERM 1618	<i>E. coli</i> XL10GOLD más el ORF del gen <i>ywqN</i> (740 pb) Kn <sup>R</sup>	Este estudio
PERM 1621	<i>B. subtilis</i> 1A751 conteniendo el plásmido pDG148 mas el ORF del gen <i>ywqN</i> (748 pb) Kn <sup>R</sup>	Este estudio

**Tabla 2: Plásmidos utilizados en este estudio**

Plásmido	Descripción	Referencia
pDG148	Vector de expresión con origen de replicación en <i>E. coli</i> Amp <sup>R</sup> y <i>B. subtilis</i> , Kn <sup>R</sup> .	Sun, Stragier, & Setlow, 1989
pJET 1.2	Vector de clonación; Amp <sup>R</sup>	Thermo Scientific, 2015
PERM 1604	pJET 1.2 + ORF del gen <i>ywqN</i> , Amp <sup>R</sup>	Este estudio
PERM 1618	pDG148 + ORF del gen <i>ywqN</i> , Kn <sup>R</sup>	Este estudio
PERM 1621	<i>B. subtilis</i> 1A751 conteniendo el plásmido pDG148 mas el ORF del gen <i>ywqN</i> (748 pb) Kn <sup>R</sup>	Este estudio

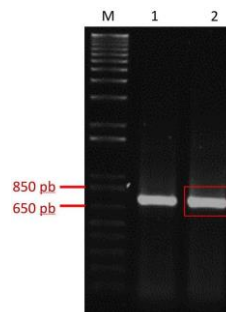
### Caracterización molecular de las cepas transformantes de *E. coli* y *B. subtilis*

La presencia de las construcciones de interés en las colonias transformantes se corroboró mediante análisis de restricción de minipreparaciones de ADN en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con bromuro de etidio [4].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Replicación *in vitro* y clonación del gen *ywqN* de *B. subtilis*

El gen *ywqN* se amplificó mediante PCR (*polymerase chain reaction*) usando como DNA molde el DNA genómico de la cepa silvestre *B. subtilis* 168. Para la amplificación del gen se utilizó una polimerasa de alta fidelidad (VENT polimerasa; New England Bio Labs) y los oligonucleótidos específicos descritos en Materiles y Métodos. Para la amplificación óptima del gen se utilizó un gradiente de temperatura en la etapa de alineamiento partiendo del promedio de las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores. Los productos de las reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1%. En la Figura 1 se observa que a una temperatura de alineamiento de 71 °C, se obtuvo una banda única de aproximadamente 740 pb que corresponde con el tamaño esperado del gen *ywqN*. El producto de PCR fue separado y purificado en un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

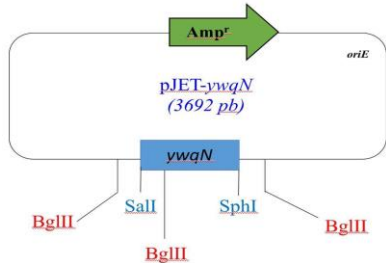


**Figura 1.** Análisis electroforético en un gel de agarosa al 1 % de los amplicones del gen *ywqN* de *B. subtilis*. M: marcadores de peso molecular de DNA, carriles 1 y 2, temperaturas de alineamiento de 72 y 71 °C respectivamente.

### Generación de una construcción para la sobreexpresión del gen *ywqN*.

El gen *ywqN* de *Bacillus subtilis* purificado se ligó en el vector de clonación pJET 1.2 mediante la enzima T4-DNA ligasa. El resultado de la reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α; se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina. La confirmación de la construcción se realizó mediante análisis de

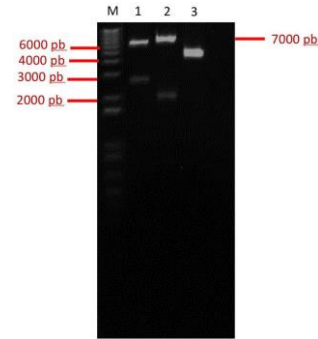
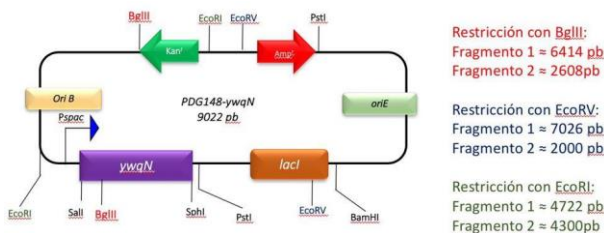
restricción de mini-preparaciones de DNA plasmídico. El patrón esperado en las bandas demostró la obtención de la construcción de interés a la cual se le denominó PERM1604 (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa del vector de clonación *pJET 1.2* más el gen *ywqN*. Construcción correspondiente a la cepa PERM 1604.

Para expresar el gen *ywqN* en *B. subtilis* se utilizó el vector de expresión *pDG148*. El gen *ywqN* se liberó de PERM 1604 y se ligó en los sitios *Sall* y *SphI* de *pDG148*; el producto de la ligación se introdujo por transformación a células competentes de la cepa *E. coli* XL10Gold.

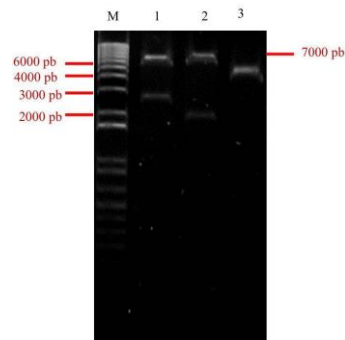
Se obtuvo el DNA plasmídico de las colonias transformantes y posteriormente se realizaron reacciones de restricción con las enzimas *BglIII*, *EcoRV* y *EcoRI* para corroborar que dichas colonias tengan la construcción *pDG148-ywqN*. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 3. Se obtuvieron las bandas de restricción esperadas; a la construcción generada se le denominó PERM 1618.



**Figura 3.** (Arriba) mapa del vector *pDG148-ywqN* indicando el sitio de corte y fragmentos esperados para las enzimas de restricción *BglIII*, *EcoRV* y *EcoRI*. (Abajo) Análisis de restricción para corroborar la identidad del plásmido *pPERM1618* (*pDG148-ywqN*) en un gel de agarosa al 1%. M: marcadores, Carril 1: plásmido cortado con *BglIII*, carril 2: plásmido cortado con *EcoRV*, carril 3: plásmido cortado con *EcoRI*.

### Obtención de una cepa recombinante de *B. subtilis* portando el plásmido de expresión PERM 1621.

La construcción PERM 1621 se utilizó para transformar células competentes de *B. subtilis*. Las colonias transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a Kanamicina. Para corroborar la presencia de la construcción se eligió al azar una clona para extraer DNA plasmídico y tratarlo con las enzimas de restricción *BglIII*, *EcoRV* y *EcoRI*. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 4; el patrón de bandas obtenido es idéntico al mostrado en la Figura 3, lo que corroboró la obtención de la cepa de *B. subtilis* portando la construcción para sobreexpresar al gen *ywqN*.



**Figura 4.** Análisis de restricción para corroborar la presencia del plásmido *pDG148-ywqN* en el fondo genético *B. subtilis* 1A751 (PERM 1621) en un gel de agarosa al 1%. M: marcadores, Carril 1 plásmido

cortado con *bgIII*, carril 2: plasmido cortado con *EcoRV*, carril 3: plasmido cortado con *EcoRI*. El tamaño de los fragmentos esparidos para cada enzima son los mismos que los mostrados en la figura 3.

## CONCLUSIONES

Con la aplicación de herramientas genéticas y moleculares se obtuvo una cepa de *B. subtilis* portando una construcción génica para sobreexpresar al gen *ywqN*.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Subsidios: 205744 y 221231) y de la Universidad de Guanajuato (Subsidios: DAIP-936-2016 y 1090-2016). LA. Hernández González agradece la beca otorgada por la DAIP durante la estancia de Verano 2017.

## REFERENCIAS

- [1] McMurry J. (2012). Reacciones de arilaminas. En J. McMurry (Ed.), Química Orgánica. (pp 966-972) México. 8ª. Edición.. Cengage Learning.
- [2] Sudha M, Saranya A, Selvakumar G, Sivakumar N. (2014). Microbial degradation of Azo Dyes: A review. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3: 670-690.
- [3] Deller S, Sollner S, Trenker-El-Toukhy R, Jelesarov I, Gübitz G, and Macheroux P. (2006) Characterization of a Thermostable NADPH:FMN Oxidoreductase from the Mesophilic Bacterium *Bacillus subtilis*. Biochemistry. 45:7083-7091.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- [5] Spizizen J. (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. Proc Natl Acad Sci USA. 44:1072-1078.