



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Diseño de un sistema de expresión de
proteínas heterólogas en *Bacillus subtilis*”**

Tesis que presenta

IBt. Ana Karen Gutiérrez García

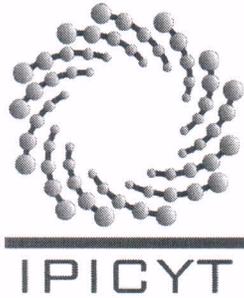
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2015



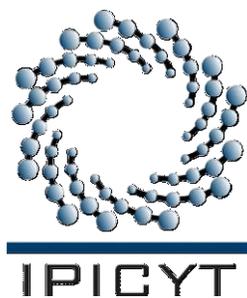
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Diseño de un sistema de expresión de proteínas heterólogas en *Bacillus subtilis****" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Ana Karen Gutiérrez García y aprobada el **nueve de julio del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
Director de la tesis

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Miembro del Comité Tutorial

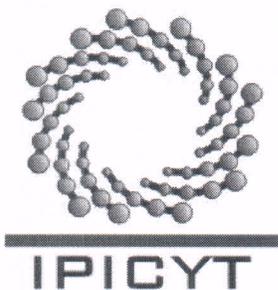
Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No 297341 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 130 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ana Karen Gutiérrez García

sobre la Tesis intitulada:

Diseño de un sistema de expresión de proteínas heterólogas en Bacillus subtilis

que se desarrolló bajo la dirección de

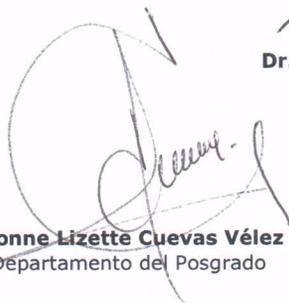
Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de julio de 2015.



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dr. Marcial Bouilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

*Dedico este trabajo y el esfuerzo puesto en el, a las persona
que me han apoyado en todo momento a lo largo de mi carrera
profesional, mi familia.*

Mis padres Silvia Garcia y José Manuel Gutiérrez

Mis hermanos Shantal, Andrea y Pepe

Mis sobrinos Renata y Chistopher

LOS AMO

Agradecimientos

Agradezco al Doctor Antonio de León Rodríguez por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio, por su asesoría y sus enseñanzas.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por las facilidades prestadas en su laboratorio para la realización de este trabajo de tesis.

Al M. en B. Leandro Gabriel Ordóñez por su apoyo para la realización de esta tesis.

A los doctores Ana Paulina Barba de la Rosa y Samuel Lara González por sus comentarios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca No. 297341 para realizar mis estudios de maestría en el IPICyT.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por haber brindado los recursos necesarios para mi formación profesional.

A mis amigos del laboratorio 4: Gil, Rodrigo (Rigo), Sergio, Tomás, Ángel, Cecy, Zazil, Pris por sus consejos y sugerencias y por hacer los ratos más agradables.

A mis estudiantes Alejandro y David por su ayuda prestada para realizar esta tesis.

Y por último y no menos importante a mi familia por su apoyo, comprensión y cariño a lo largo de mi carrera profesional y personal.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	¡Error! Marcador no definido.
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	8
2.1 Cepas bacterianas y plásmidos	8
2.2 Extracción de ADN y procedimientos de transformación bacteriana	8
2.3 Diseño de un vector replicativo para <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.4 Transformación con un vector integrativo en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.5 Construcción de los plásmidos de expresión	10
2.5.1 Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	10
2.5.2 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vs_Vi en las <i>Bacillus subtilis</i>	11
2.5.3 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vasoinhibina en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	12
2.5.4 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vasostatina en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	12
3. Resultados y discusión	15
3.1 Transformación con un vector integrativo en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	15
3.2 Diseño del vector replicativo	17
3.3 Validación del vector replicativo y expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	17

3.4 Validación de un vector replicativo para la producción de Vs_Vi en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	20
3.5 Validación de un vector replicativo para la producción de Vasoinhibina en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	24
3.6 Validación de un vector replicativo para la producción de Vasostatina en las cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	24
3.7 Evaluación de la expresión constitutiva de la RNA polimerasa T7 sobre el crecimiento de <i>B. subtilis</i>	27
4. Conclusiones	30
5. Perspectivas.....	31
6. Referencias	32
7. Anexos	36

Lista de tablas

Tabla 1 Características genotípicas de las cepas y plásmidos utilizados en este estudio.	14
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de figuras

Fig. 1. Representación esquemática del sistema de secreción dependiente de Sec en <i>B. subtilis</i> ...	7
Fig. 2. Vector integrativo en <i>Bacillus subtilis</i>	16
Fig. 3. Diseño del vector replicativo	18
Fig. 4. Comprobación de la construcción de GFP	19
Fig. 5. Fluorescencia con GFP en <i>B. subtilis</i> IPI/pAKG-GFP	21
Fig. 6. Fluorescencia con GFP en <i>B. subtilis</i> LBMB/pAKG-GFP	21
Fig. 7. Fluorescencia con GFP en la cepa BL21-SI/pAKG-GFP.....	22
Fig. 8. Comprobación de la construcción Vs_Vi	23
Fig. 9. Comprobación de la construcción de Vi por digestión y PCR	25
Fig. 10. Comprobación de la construcción de Vs30 con <i>cassette</i> de tetraciclina	26
Fig. 11. Cinéticas de crecimiento de las diferentes cepas	28

Anexos

7.1	Protocolos.....	36
7.1.1	Células rubidio competentes.....	36
7.1.2	Transformación de células rubidio competentes.....	36
7.1.3	Extracción de ADN plasmídico en Gram negativas.....	37
7.1.4	Transformación en <i>Bacillus subtilis</i>	39
7.2	Medios de cultivo.....	39
7.2.1	Medio LB.....	39
7.2.2	Medios para transformación de <i>Bacillus subtilis</i>	40
7.2.2.1	Medio A base 10X.....	40
7.2.2.2	Bacillus sales 10X.....	40
7.2.2.3	Medio A.....	40
7.2.2.4	Medio B.....	40
7.3	Soluciones para células rubidio competentes.....	41
7.3.1	Solución RF1.....	41
7.3.2	Solución RF2.....	41
7.4	Electroforesis en gel de agarosa.....	41
7.4.1	TAE 10X.....	41
7.4.2	Gel de agarosa al 1%.....	42
7.5	Soluciones para purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina.....	42
7.5.1	Solución I.....	42
7.5.2	Solución II.....	42
7.5.3	Solución III.....	42
7.6	Soluciones para purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina en Gram positivas.....	42
7.6.1	Solución I.....	42
7.6.2	Solución II.....	43
7.6.3	Solución III.....	43

Resumen

“Diseño de un sistema de expresión de proteínas heterólogas en *Bacillus subtilis*”

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva, no patógena, aerobia que secreta gran cantidad de proteínas al medio de cultivo por lo tanto existe un gran interés comercial para la producción de proteínas heterólogas. Debido a que se disponen de pocos vectores de expresión para *B. subtilis*, se propone diseñar un nuevo sistema de expresión mediante dos vectores con base en el sistema del promotor del fago T7. El sistema, consiste en un vector integrativo que contiene al gen de la polimerasa T7 bajo el control del promotor constitutivo p43 y un vector replicativo que contiene el gen de interés regulado por el promotor de la polimerasa T7. El vector cuenta con un péptido señal perteneciente a la vía de secreción Sec y un marco de lectura abierto. La funcionalidad del sistema de expresión se evaluó utilizando el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) y posteriormente se utilizarán para la producción de la Vasostatina (Vs30), Vasoinhibina (Vi II-14.1) y una proteína quimérica Vs_Vi.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, péptidos señal, expresión de proteínas, sistemas de expresión.

Abstract

“Design of a heterologous protein expression system in *Bacillus subtilis*”

Bacillus subtilis is a non-pathogenic, Gram positive aerobic bacterium that secretes large amounts of proteins into the culture medium, so there is high commercial interest for heterologous protein production. There are few expression vectors for *B. subtilis*, we have designed a new expression system using two vectors based on the phage T7 promoter. The system consists of an integrative vector containing the T7 polymerase gene under the constitutive promoter p43, and a replicative vector containing the gene of interest regulated by the T7 polymerase promoter. The vector has a signal peptide belonging to the Sec secretion pathway and open reading frame. The functionality of the expression system was assessed using the reporter gene green fluorescent protein (GFP), and subsequently it will be used for the production of Vasostatin (Vs30), Vasoinhibin (Vi II-14.1) and a chimeric protein Vs_Vi.

Keywords: *Bacillus subtilis*, signal peptides, protein expression, expression system

1. Introducción

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva bacilar, no patógena, aerobia, móvil, formadora de endosporas, en forma de vara comúnmente encontrada en el suelo, fuentes de agua y en asociación con plantas (Fahnestock & Fisher, 1986). Es un hospedero atractivo para la producción de proteínas heterólogas por varias razones: es capaz de secretar proteínas extracelulares funcionales directamente al medio de cultivo, no tiene un sesgo significativo en el uso de codones. Se cuenta con información sobre sus mecanismos de transcripción y traducción, manipulación genética y fermentación a gran escala (Wong, 1995). También es un microorganismo importante en aplicaciones biotecnológicas, ya que se utiliza como hospedero para la producción de enzimas a nivel industrial., tales como amilasas y proteasas (Toymentseva et al., 2012). El uso de *B. subtilis* para la producción de productos alimenticios y farmacéuticos se ve altamente favorecido sobre el uso de *Escherichia coli* ya que *B. subtilis* es considerado como un organismo GRAS (por sus siglas en inglés, generalmente conocido como seguro), no produce exotoxinas, las cuales son pirogénicas en humanos y otros mamíferos por lo que tienen que ser eliminadas y complican el proceso de purificación en otros sistemas de expresión como *E. coli* (Petsch & Anspach, 2000).

Se han reportado plásmidos como vectores de clonación para *B. subtilis*, sin embargo, tienen la desventaja de que se replican a través de un ADN monocatenario intermedio. Un problema frecuentemente observado es el alto nivel de inestabilidad plasmídica (Bron et al., 1991). Pueden distinguirse dos tipos de inestabilidad: estructural y segregacional. La inestabilidad estructural se refiere a

los re-arreglos en el ADN, es decir, después de varias etapas de replicación, estos plásmidos son altamente susceptibles a reordenamientos estructurales. (Jannière et al., 1990). La inestabilidad segregacional se refiere a la pérdida del plásmido completo de la población celular bajo condiciones no selectivas (Bron & Luxen, 1985). Una alternativa para evitar el problema de la inestabilidad plasmídica en *B. subtilis* es utilizar plásmidos integrativos.

Hidenori & Henner (1986) desarrollaron un plásmido integrativo denominado ptrpBGI para *B. subtilis*, que contiene en su forma más simple, un gen marcador de resistencia a antibióticos (el cual se utiliza para llevar a cabo la selección en *B. subtilis*), secuencias de ADN homólogas al cromosoma de *B. subtilis* y un sitio de clonación múltiple intercalada entre los dos brazos de la secuencia homóloga. El locus *amyE*, que codifica para una α -amilasa no esencial, se utiliza en la mayoría de los casos para la integración. Tras la transformación de células de *B. subtilis*, las secuencias *amyE* se recombinan en sus sitios homólogos, de ese modo se insertan las secuencias de ADN de manera estable en medio de *amyE*-front y *amyE*-back en el cromosoma de *B. subtilis* a través de un evento de doble recombinación.

La integración de genes en el cromosoma tiene varias ventajas sobre el mantenimiento de los genes en plásmidos. En primer lugar, la integración asegura que una sola copia del transgén está presente, lo que puede ser importante para la regulación de genes (Hidenori & Henner, 1986). En segundo lugar, genes integrados en el cromosoma son muy estables, y se mantienen en el mismo número de copias, incluso en ausencia de selección (Vazquez-Cruz et al., 1996).

Otra ventaja de la integración en el cromosoma es que el transgén está presente en la misma ubicación física como otro ADN cromosómico.

B. subtilis posee sistemas de secreción eficientes que permiten que las proteínas se liberen en el medio de cultivo, facilitando su aislamiento y purificación. El destino final de una proteína está definida por la presencia o ausencia de péptidos señal.

Los péptidos señal consisten en pequeñas secuencias de amino ácidos que tienen señales de reconocimiento para dirigirlos a diferentes compartimentos intra o extra celulares, después de liberar la proteína al compartimiento subcelular correcto, son removidos frecuentemente por peptidasas señal especializadas (Brockmeier et al., 2006).

Los péptidos señal procedentes de especies de *Bacillus* varían en longitud entre 18 y 35 residuos de aminoácidos y son, en promedio, 5-7 residuos más largos que los de las bacterias Gram-negativas y eucariotas, comparten algunas características comunes conservadas en diferentes organismos. La mayoría de los péptidos señal se componen de tres regiones distintas: 1) el dominio N amino-terminal de carga positiva de 2 a 8 aminoácidos (contiene al menos un residuo cargado positivamente) que interactúa con la maquinaria de translocación y fosfolípidos cargados negativamente, 2) el centro hidrofóbico; también llamado dominio H, formado por residuos hidrofóbicos que adoptan una conformación α -hélice en la membrana, con un promedio de 17 residuos, 3) la peptidasa señal

(SPasa) la cual es un sitio de reconocimiento hidrofílico, denominada como el dominio C-terminal polar de 8 residuos (Brockmeier et al., 2006; Baltz et al., 2010).

El proceso de secreción de proteínas en *B. subtilis* puede dividirse en 3 etapas: etapa temprana, involucrando el blanco de proteínas secretoras a la membrana plasmática, etapa intermedia, involucrando la translocación de estas proteínas a través de la membrana; y etapa tardía, involucrando el procesamiento del péptido señal, la liberación de las proteínas secretoras en el lado *trans* de la membrana, su plegado en una conformación nativa, su paso a través de la pared celular, y liberación en el medio de cultivo.

La mayoría de las proteínas secretoras de *Bacillus* se sintetizan como precursores con péptidos señal N-terminal. En base al sitio de corte para la SPasa y la ruta de secreción por la cual este precursor será exportado, los péptidos señal pueden estar divididos en cinco clases diferentes: 1) péptidos señal secretorios (tipo Sec), 2) péptidos señal lipo-protéicos, 3) péptidos señal doble-arginina, 4) péptidos señal tipo pseudopilina y 5) péptidos señal de bacteriocinas y feromonas.

Dependiendo de la naturaleza del péptido señal, y la presencia o ausencia de señales de retención, estas proteínas son retenidas en la membrana, o liberadas de la membrana debido al procesamiento por peptidasas señal especializadas (SPasas), de las cuales existen dos tipos, tipo I y tipo II (Dalbey et al., 1997). La región C-terminal contiene una secuencia de reconocimiento para la peptidasa señal tipo I con el consenso A-X-B, donde A es Ala, Gly, Leu, Ser, Thr o Val; B es generalmente Ala, Gly, Ser, Thr, y X puede ser casi cualquier residuo,

aunque Met y Pro son muy raros. La escisión por la peptidasa señal tipo I se produce en la parte C-terminal del residuo B (Baltz et al., 2010). La peptidasa señal tipo II reconoce específicamente a lipoproteínas, las cuales quedan unidas a la parte *trans* de la membrana y tienen diferentes regiones C-terminal con diferentes estructuras para facilitar el reconocimiento por la peptidasa señal específica de lipoproteínas tipo II. El sitio consenso de la señal de escisión de la peptidasa señal tipo II consta de cuatro residuos: el residuo N-terminal es Leu, Val o Ile, la segunda es Ala, Gly, Ser o Thr, la tercera es Gly o Ala, y el cuarto es invariablemente Cys. La escisión por la peptidasa señal tipo II se lleva a cabo en el lado N-terminal del residuo Cys (Sankaran & Wu, 1994).

Las estrategias generales para la secreción de proteínas heterólogas por *Bacillus* se basan en la fusión en el marco de lectura de la proteína respectiva con un péptido señal amino-terminal que dirige esta proteína en la vía de secreción dependiente de Sec (van Dijl et al., 2002).

Se han identificado dos obstáculos principales para la secreción de proteínas heterólogas a través de la ruta dependiente de Sec. El primero es el proceso de translocación por la maquinaria Sec, que se compone de un canal proteico en la membrana que consiste en SecY, SecE, SecG y SecDF-YrbF y un motor de translocación SecA. La maquinaria Sec es conocida como “hilo” sus sustratos pasan a través de la membrana en un estado desplegado. Esta maquinaria es inherentemente incapaz de translocación de proteínas que se pliegan en el citosol (van Dijl et al., 2002; Bolhuis et al., 1998). Las exoproteínas que se secretan a través de la ruta Sec se sintetizan como precursores de

proteínas con secuencias líder N-terminal. Estos péptidos señal facilitan la translocación de las pre-proteínas desplegadas a través del canal SecYEG en la membrana citoplasmática. Después del paso a través de la membrana, los péptidos señal se cortan por péptidasas señal ancladas a la membrana y la proteína madura se liberan en el espacio extracelular. Las proteínas maduras son finalmente plegadas y difunden a través de la pared celular al medio extracelular (Bron et al., 1998) (Fig. 1).

El objetivo de este trabajo es diseñar un sistema de expresión de proteínas heterólogas en *Bacillus subtilis* basado en el promotor T7. Transformando las cepas *B. subtilis* WB600 y *B. subtilis* 168 con un vector integrativo (pInT7) el cual contiene un *cassette* de expresión para la T7 RNA polimerasa, diseñar un vector replicativo basado en el promotor del fago T7 para la expresión de proteínas heterólogas y verificar la funcionalidad del sistema de expresión con la proteína GFP.

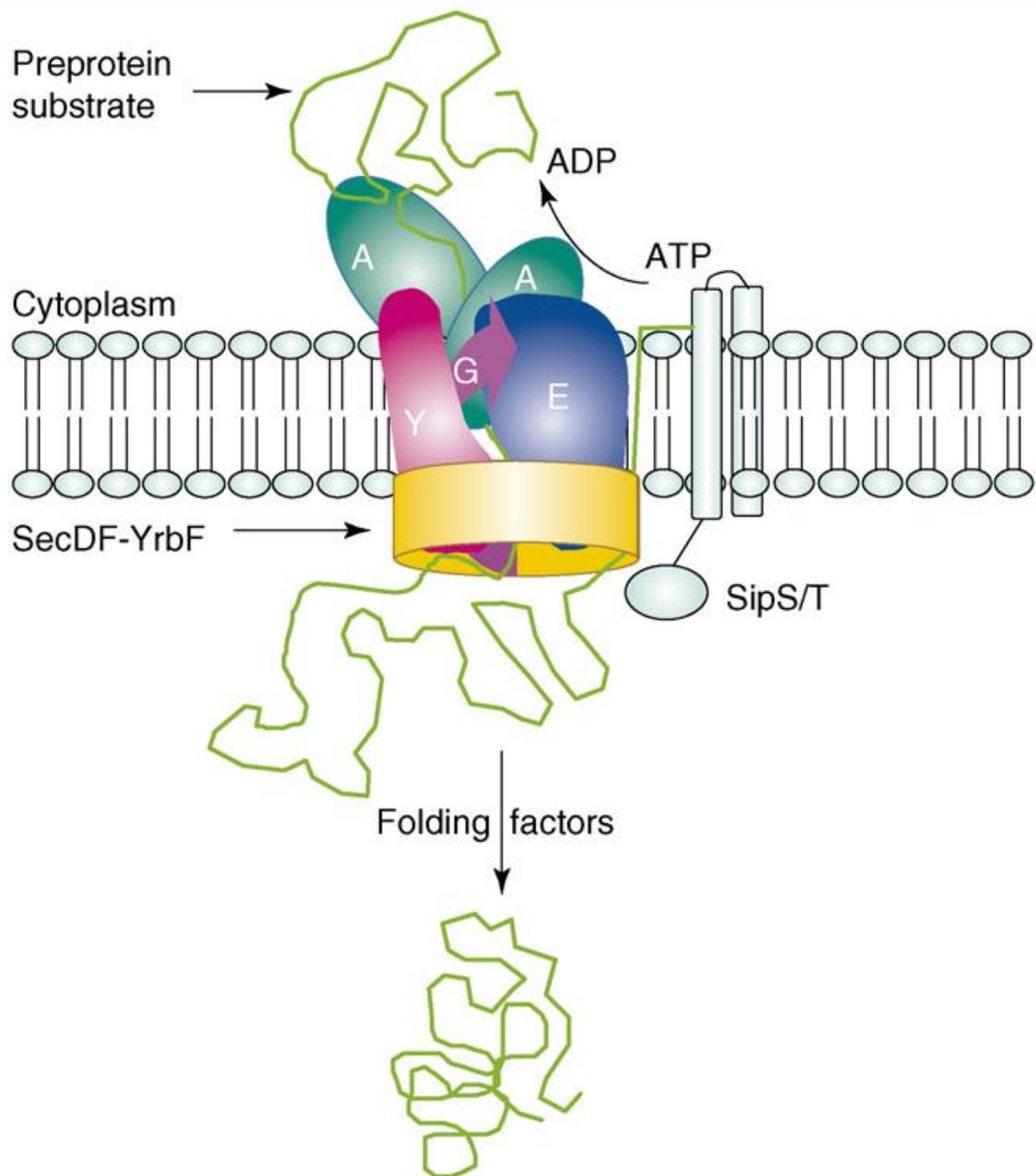


Fig. 1. Representación esquemática del sistema de secreción dependiente de Sec en *B. subtilis*.

La pre proteína es transportada a través de la translocasa, la cual consiste en el dímero SecA, un poro heterotrimérico (SecYEG), el complejo heterotrimérico SecDF-YrbF y las principales peptidasas señal tipo 1 (SipS y SipT). Después de la translocación, la pre proteína se pliega en su conformación correcta por pro péptidos, isomerasas y cationes divalentes. Tomada de Harwood & Cranenburgh, 2008.

2. Materiales y métodos

2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* DH5 α (Invitrogen), *E. coli* BL21-SI (Gibco), *B. subtilis* 168 y *B. subtilis* WB600 (proporcionada por el Dr Wrong de la Universidad de Calgary) fueron cultivadas de manera rutinaria en medio de cultivo Luria Bertani (Invitrogen). Las características genotípicas de las cepas se muestran en la tabla 1. Cuando fue necesario a los medios de cultivo se les agregaron los siguientes antibióticos a las concentraciones finales que se indican a continuación: ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; kanamicina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; tetraciclina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2 Extracción de ADN y procedimientos de transformación bacteriana

Los ensayos para la purificación de ADN, PCR, digestión enzimática, ligación y electroforesis en geles de agarosa y transformación de células competentes de *E. coli* se realizaron usando técnicas estandarizadas (Ver anexos).

La transformación en *B. subtilis* se realizó llevando a la bacteria al estado de competencia natural por el método descrito por Anagnostopoulos & Spizizen (1961).

2.3 Diseño de un vector replicativo para *Bacillus subtilis*

Se diseñó un *cassette* de expresión, el cual contiene los elementos esenciales optimizados para *B. subtilis* y un péptido señal perteneciente a la vía de secreción Sec. El vector está formado por el promotor T7 de la RNA polimerasa, un sitio de unión a ribosoma optimizado para *B. subtilis*, un péptido señal perteneciente a la vía de secreción Sec denominado Yoch (MKKTMITFSLVLMFLGVASGASA'A

MKKTMITFSLVLMFLFGVASGASA'A) con el sitio de corte para la peptidasa ('A), un marco abierto de lectura, una cola de histidinas para facilitar la purificación de los péptidos y el terminador de la RNA polimerasa T7.

Se realizó el diseño del *cassette* de expresión en el programa v 10.6 (MacVector Inc.) utilizando secuencias optimizadas para *B. subtilis* y el péptido señal Yoch, cuidando que todos los elementos se encontraran en fase. El *cassette* de expresión se insertó dentro de un vector pBSK modificado.

2.4 Transformación con un vector integrativo en las cepas de *Bacillus subtilis*

Se llevó a cabo la integración del vector integrativo denominado pInT7 dentro del genoma de las diferentes cepas de *B. subtilis* (168 y WB600), dicho vector contiene el gen que codifica a la T7 RNA polimerasa bajo el promotor constitutivo p43 de *B. subtilis*.

Las cepas de *B. subtilis* se llevaron al estado de competencia, posteriormente se realizó la transformación con el ADN plasmídico de pInT7, la integración ocurre por medio de un evento de doble recombinación homóloga en el locus *lacA* del genoma de *B. subtilis*. Debido a que el vector lleva un marcador de resistencia a kanamicina, las colonias se crecieron con dicho antibiótico y las clonas que crecieron se analizaron por PCR. A las clonas de la cepa 168 se les denominó como *B. subtilis* IPI y a las cepas WB600 como *B. subtilis* LBMB.

2.5 Construcción de los plásmidos de expresión

2.5.1 Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las cepas de *Bacillus subtilis*

El gen de la proteína verde fluorescente se amplificó mediante PCR utilizando como templado de la reacción el plásmido pUC19-GFP/JM101 (Ramírez- Romano, 2007) y los oligonucleótidos sentido 5'-GTCGACATGTCTAAAGGTGAAGAA-3'(GFPfor) y antisentido 5'-GAGATCTTTATTTGTACAATTCATCCATACC-3'(GFPrev). El oligonucleótido sentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Sall* (subrayado), el oligonucleótido antisentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *BgIII* (subrayado) y un codón de paro (negritas). El producto amplificado fue subclonado en el plásmido pGEMT-easy vector (Promega) y digerido con las enzimas *Sall* y *BgIII*. El producto de restricción *Sall*-GFP-*BgIII* fue clonado en el plásmido pKa, obteniendo la construcción denominada pKa-GFP.

El gen que confiere la resistencia a tetraciclina se amplificó mediante PCR utilizando como templado de la reacción el plásmido pACYC y los oligonucleótidos sentido 5'-GTCTAGAGTTTGACAGCTTATCATC-3' (TETfor) y antisentido 5'-GCTCGAGATATGTTCTGCCA -3' (TETrev). El oligonucleótido sentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *XbaI* (subrayado), el oligonucleótido antisentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *XhoI* (subrayado). El producto amplificado fue subclonado en el plásmido pGEMT-easy vector (Promega) y digerido con las enzimas *XbaI* y *XhoI*.

El producto de restricción *Xba*I-Tet-*Xho*I fue clonado en el plásmido pKa-GFP, obteniendo el vector replicativo denominado pAKG-GFP.

Para comprobar la funcionalidad del sistema, la construcción se transformó en las cepas de *B. subtilis* 168 IPI y WB600 LBMB, posteriormente se crecieron a 37°C en medio LB durante 16 h, posteriormente se tomó una muestra y se expuso en microscopio de fluorescencia (Microscopio óptico Zeiss acoplado a ApoTome) utilizando los filtros para la visualización de la GFP.

2.5.2 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vs_Vi en las *Bacillus subtilis*

El gen de la proteína quimérica Vs_Vi se obtuvo a partir del plásmido pET12a-Vs_Vi (Vázquez-Rodríguez, 2009), el cual fue digerido con las enzimas de restricción *Sal*I y *Bam*HI. El producto de restricción *Sal*I-Vs_Vi-*Bam*HI fue clonado en el plásmido pKa, generando la construcción denominada pKa-Vs_Vi.

El gen que confiere la resistencia a tetraciclina se amplificó mediante PCR utilizando como templado de la reacción el plásmido pACYC y los oligonucleótidos sentido 5'-GTCTAGAGTTTGACAGCTTATCATC-3' (TETfor) y antisentido 5'-GCTCGAGATATGTTCTGCCA -3' (TETrev). El oligonucleótido sentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Xba*I (subrayado), el oligonucleótido antisentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho*I (subrayado). El producto amplificado fue subclonado en el plásmido pGEMT-easy vector (Promega) y digerido con las enzimas *Xba*I y *Xho*I.

El producto de restricción *Xba*I-Tet-*Xho*I fue clonado en el plásmido pKa-Vs_Vi, obteniendo el vector replicativo denominado pAKG-Vs-Vi.

2.5.3 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vasoinhibina en las cepas de *Bacillus subtilis*

El gen de la proteína Vasoinhibina se obtuvo a partir del plásmido pET12a-Vi (Vázquez-Rodríguez, 2009), el cual fue digerido con las enzimas de restricción *Sal*I y *Bam*HI. El producto de restricción *Sal*I-Vi-*Bam*HI fue clonado en el plásmido pKa, generando la construcción denominada pKa-Vi.

El gen que confiere la resistencia a tetraciclina se amplificó mediante PCR utilizando como templado de la reacción el plásmido pACYC y los oligonucleótidos sentido 5'-GTCTAGAGTTTTGACAGCTTATCATC-3' (TETfor) y antisentido 5'-GCTCGAGATATGTTCTGCCA -3' (TETrev). El oligonucleótido sentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Xba*I (subrayado), el oligonucleótido antisentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Xho*I (subrayado). El producto amplificado fue subclonado en el plásmido pGEMT-easy vector (Promega) y digerido con las enzimas *Xba*I y *Xho*I. El producto de restricción *Xba*I-Tet-*Xho*I fue clonado en el plásmido pKa-Vi, obteniendo el vector replicativo denominado pAKG-Vi.

2.5.4 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vasostatina en las cepas de *Bacillus subtilis*

El gen de la proteína Vasostatina se obtuvo a partir del plásmido pET12a-Vs (Vázquez-Rodríguez, 2009), el cual fue digerido con las enzimas de restricción

Sall y *BamHI*. El producto de restricción *Sall*-Vs-*BamHI* fue clonado en el plásmido pKa, generando la construcción denominada pKa-Vs. El gen que confiere la resistencia a tetraciclina se amplificó mediante PCR utilizando como templado de la reacción el plásmido pACYC y los oligonucleótidos sentido 5'-GTCTAGAGTTTGACAGCTTATCATC-3' (TETfor) y antisentido 5'-GCTCGAGATATGTTCTGCCA -3' (TETrev). El oligonucleótido sentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *XbaI* (subrayado), el oligonucleótido antisentido contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *XhoI* (subrayado). El producto amplificado fue subclonado en el plásmido pGEMT-easy vector (Promega) y digerido con las enzimas *XbaI* y *XhoI*. El producto de restricción *XbaI*-Tet-*XhoI* fue clonado en el plásmido pKa, obteniendo el vector replicativo denominado pAKG-Vs.

Todas las construcciones fueron verificadas por análisis de restricción y por amplificación mediante PCR. Las características de los plásmidos utilizados en este estudio se muestran en la tabla 1.

2.6 Evaluación de la expresión constitutiva de la RNA polimerasa T7 sobre el crecimiento de *B. subtilis*

Para llevar a cabo el ensayo, se prepararon pre-inóculos de las cepas parentales de *B. subtilis* 168, WB600 y sus transformantes denominadas *B. subtilis* IPI y LBMB, respectivamente, incubados toda la noche a 37°C y en agitación. Con ellos se iniciaron los cultivos con una densidad óptica inicial a 600nm de 0.1 y se siguió la cinética de crecimiento mediante mediciones a la misma longitud de onda cada

hora. Así como también se evaluó el crecimiento de las transformantes IPI/pAKG-GFP y LBMB/pAKG-GFP.

Tabla 1 Características genotípicas de las cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas y Plásmidos	Genotipo/propiedades relevantes	Fuente/referencia
Cepas		
<i>E. coli</i> BL21-SI	Cepa derivada de GJ1158, contiene el gen integrado de la RNA polimerasa T7, bajo el control del promotor inducible por sal <i>proU</i>	Invitrogen Life Technologies (USA)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁻) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Invitrogen Life Technologies (USA)
<i>B. subtilis</i> 168	ind ⁻ tyr ⁺ trpC2	(Kunst et al, 1997)
<i>B. subtilis</i> WB600	<i>trpC2 nprE aprE epr bpr mpr nprB</i> ;Em ^r	(Wu et al, 1991)
Plásmidos		
pKa	Plásmido que contiene el <i>cassette</i> de expresión, bajo el control del promotor T7. Amp ^r	Este estudio
pAKG	Plásmido que contiene el <i>cassette</i> de expresión. Tet ^r	Este estudio
pInT7	Plásmido que contiene entre los dos brazos del gen <i>lacA</i> , el marcador de resistencia a kanamicina de pBEST501 y el marco de lectura abierto de la RNA Polimerasa T7 bajo el promotor p43.	Este estudio

3. Resultados y discusión

3.1 Transformación con un vector integrativo en las cepas de *Bacillus subtilis*

La integración dentro del genoma de *B. subtilis* del gen que codifica a la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor fuerte constitutivo p43 se llevó a cabo con el vector pInT7 (Fig. 2A). La integración ocurrió por medio de un evento de doble recombinación homóloga en el locus *lacA* del genoma de *B. subtilis*. Para corroborar el resultado se amplificó mediante PCR el gen que codifica a la polimerasa T7, utilizando como templado de la reacción ADN genómico obtenido de las cepas transformantes de *B. subtilis* resistentes a kanamicina y los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados para amplificar la T7 de 2652 pb (Fig. 2B, C, D).

Las cepas parentales de *B. subtilis* 168 y WB600, la cual (WB600) es carente de seis proteasas extracelulares (*nprE*, *aprE*, *epr*, *mpr*, *Fbpr* y *BnprB*) fueron transformadas con el vector integrativo pInT7. Con esto se pretende que en la cepa WB600 se obtenga una mayor producción de proteína recombinante, debido a que mejora la calidad y cantidad de proteína recombinante secretada, ya que se ha visto que utilizando esta cepa (WB600) en la producción de β -lactamasa, mejora la estabilidad de la proteína secretada, debido a que prolonga su actividad en un 80% aproximadamente, después de 50 h comparada contra las cepas DB428 y WB500, las cuales son deficientes en 4 y 5 proteasas respectivamente, en donde la actividad de la proteína se redujo a un nivel muy bajo después de 50 h

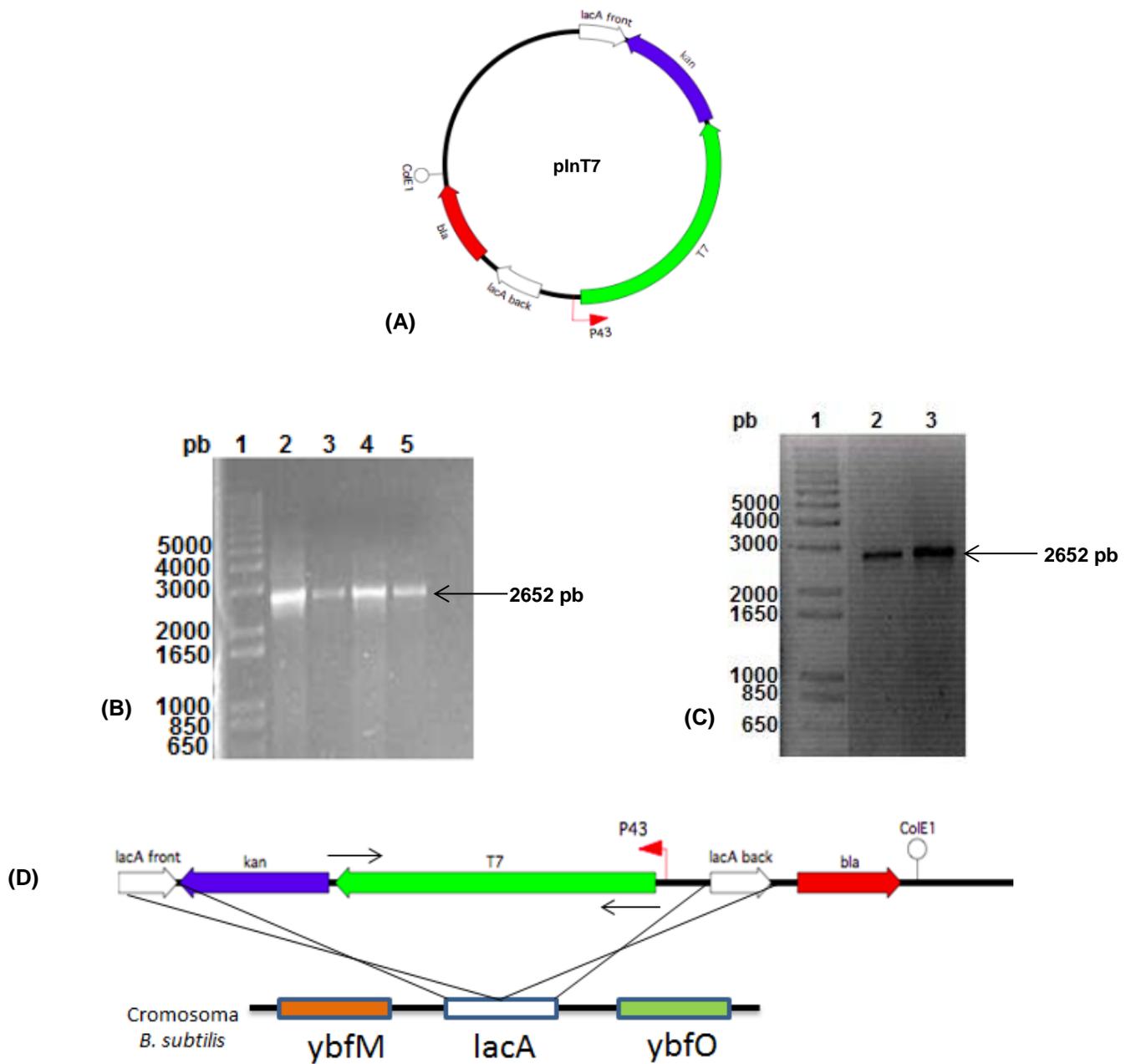


Fig. 2. Vector integrativo en *Bacillus subtilis*

(A) Representación esquemática de los componentes del vector integrativo. (B) Comprobación de la cepa *B. subtilis* LBMB. En el primer carril se observa el marcador de pares de bases (MPB), el segundo carril corresponde a un control positivo de la polimerasa T7, y en los 3 carriles posteriores se observa la amplificación de 3 clones obtenidas después de la transformación. (C) Comprobación de la cepa *B. subtilis* IPI. En el primer carril se observa el MPB, segundo y tercer carril corresponden a clones obtenidas después de la transformación. (D) Se muestra el locus dentro del cromosoma de *B. subtilis* donde ocurre el evento de doble recombinación homóloga.

de cultivo. Se ha reportado, que la cepa WB600 muestra solo el 0.32% de actividad de proteasa extracelular respecto a la cepa 168 (Wu et al., 1991).

3.2 Diseño del vector replicativo

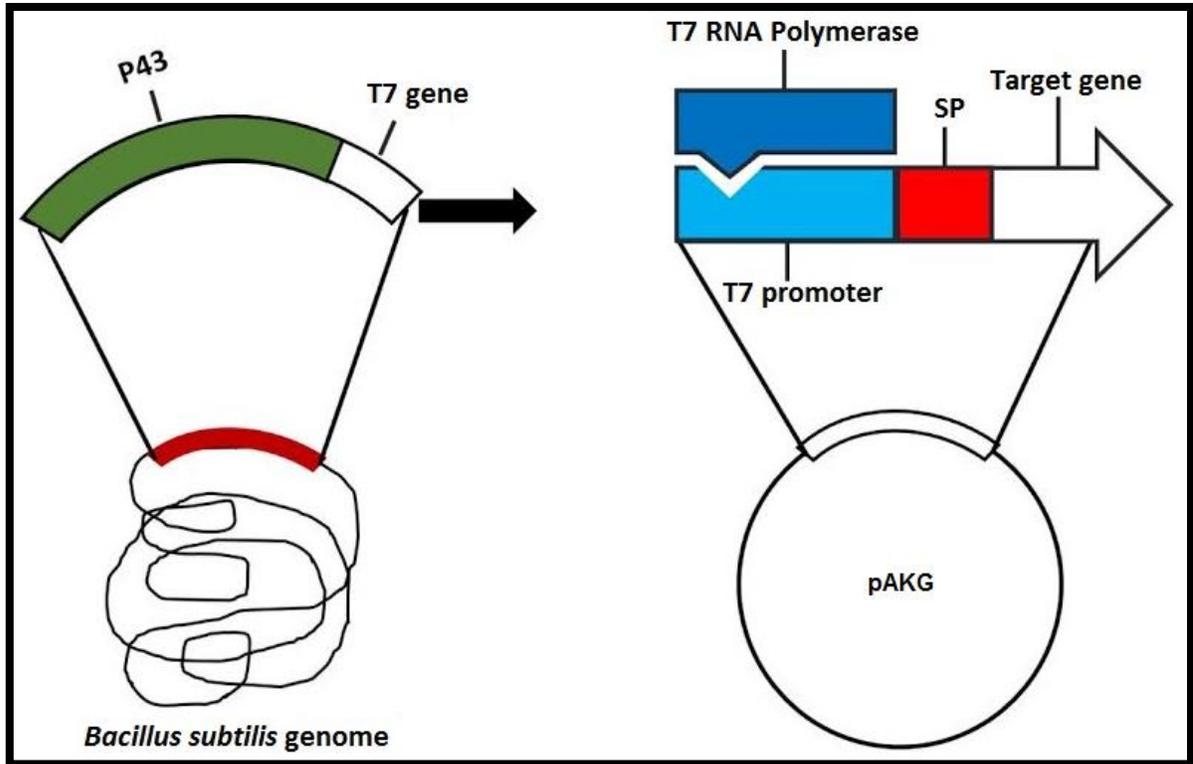
Un vector replicativo fue diseñado con todos los elementos esenciales optimizados para *B. subtilis* y el péptido señal YocH perteneciente a la vía Sec para lograr expresar y secretar al medio de cultivo las proteínas de interés (Fig. 3).

El uso de promotores constitutivos, en donde no es necesario agregar inductores, ofrece la ventaja respecto a los otros promotores inducibles reportados para *B. subtilis*, como los promotores *spac* y *xyl*, que utilizan IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y xilosa como inductores, respectivamente. La desventaja de estos sistemas es que estos compuestos elevan los costos para su aplicación industrial (Ming et al., 2010). El uso de promotores constitutivos tiene el inconveniente de que no son eficientes cuando las proteínas heterólogas son tóxicas para las células donde se producen.

3.3 Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las cepas de *Bacillus subtilis*

La construcción se transformó en las dos cepas de *B. subtilis* IPI y LBMB, se comprobó con amplificación por PCR con los oligos sentido GFPfor y antisentido GFPprev y por análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BgIII*. El tamaño correspondiente a la proteína GFP es de 729 pb (Fig. 4). La clonación del gen de la GFP se realizó para utilizarse como gen reportero y verificar de una forma rápida la funcionalidad del sistema de expresión. Las cepas transformantes fueron

(A)

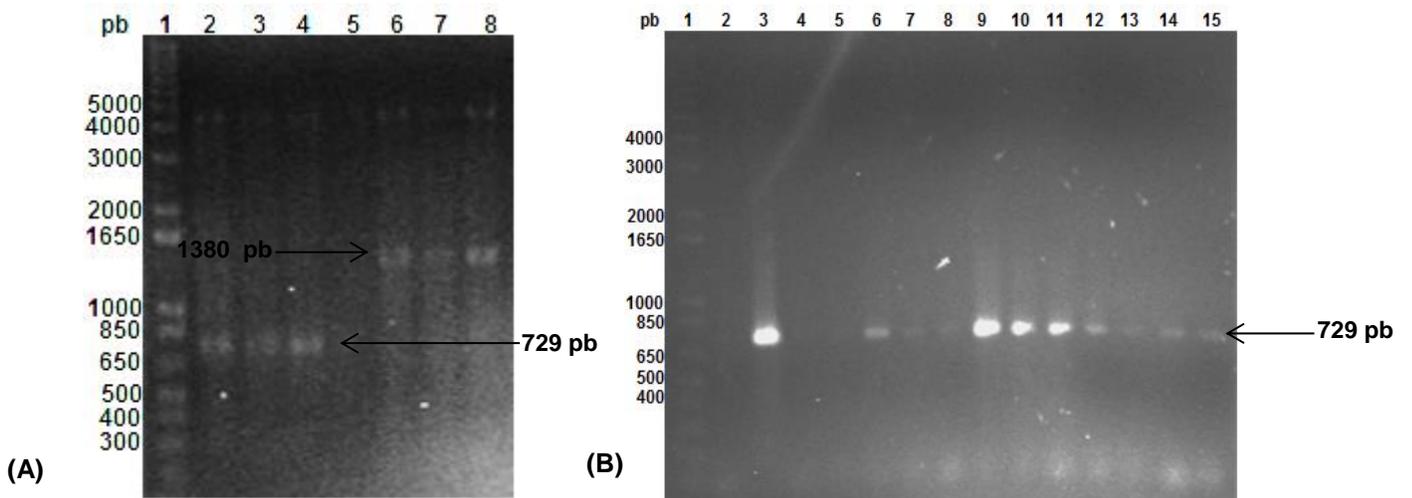


(B)



Fig. 3. Diseño del vector replicativo

En la figura (A) se muestra el diseño del sistema de expresión. Se observa al vector pInT7 integrado dentro del cromosoma de *B. subtilis*, el cual contiene el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor constitutivo p43. El vector replicativo se observa a la derecha se muestra el promotor T7 y el péptido señal. (B) En esta figura se esquematiza el orden de los elementos que conforman al vector replicativo.



(C)

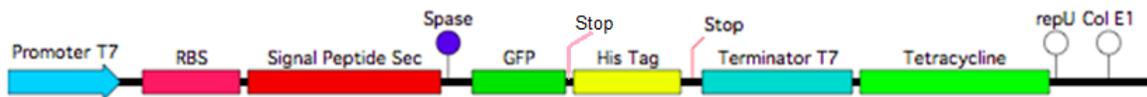


Fig. 4. Comprobación de la construcción de GFP

Comprobación de la construcción por digestión enzimática y amplificación por PCR. (A) Análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BglII* de 3 clonas que liberan el inserto de la GFP carriles 2,3,4 y las mismas clonas pero digerido con las enzimas *XbaI* y *XhoI* para liberar el fragmento de tetraciclina carriles 6,7,8. Carril 1 MPB (B) Amplificación de la GFP por PCR de varias clonas de *B. subtilis* 168 y WB600. (C) Representación esquemática de la construcción de GFP.

incididas con un haz de luz UV a una longitud de onda de 475nm. Con la emisión de fluorescencia verde de parte de las bacterias, comprobamos que el sistema es funcional. Por ello, las cepas de *B. subtilis* 168 IPI/pAKG-GFP y WB600 LBMB/pAKG-GFP se crecieron, posteriormente se tomó una muestra y se expuso en microscopio de fluorescencia (Fig. 5, 6 y 7).

Este vector fue transformado en las cepas de *B. subtilis*, así como también en la cepa BL21-SI para demostrar que el vector replicativo funciona también en la cepa de *E. coli* BL21-SI.

3.4 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vs_Vi en las cepas de *Bacillus subtilis*

Se realizó la construcción de la proteína quimérica Vs_Vi en el vector replicativo para expresar dicha proteína (Fig. 8). La construcción se transformó en las dos cepas de *B. subtilis* IPI y LBMB, se comprobó con amplificación por PCR con los oligos sentido PFWVS-vi y antisentido PRVS-vi (Vázquez-Rodríguez, 2009) y por análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BamHI*. El tamaño correspondiente a la proteína quimérica es de 496 pb.

Ya se ha demostrado que *B. subtilis* es capaz de producir ciertas proteínas humanas utilizadas en medicina como, la interleucina humana 1 (hIL-1) y un fragmento del anticuerpo anti-digoxina de cadena sencilla (SCA), las cuales son difíciles de producir en otros sistemas de expresión, la limitación que existe es que los sistemas utilizados tienen un bajo rendimiento de producción (Wong, 1995).



Fig. 5. Fluorescencia con GFP en *B. subtilis* IPI/pAKG-GFP

Diferentes muestras de cultivo de *B. subtilis* IPI/pAKG-GFP. En las imágenes de la izquierda (A) se observa la fluorescencia en el campo de la GFP, en las imágenes del centro (B) se observa el campo de la GFP sobrelapado sobre el campo claro, esto para confirmar que la fluorescencia corresponde a una célula bacteriana, en las imágenes de la derecha (C) se muestra el campo claro.

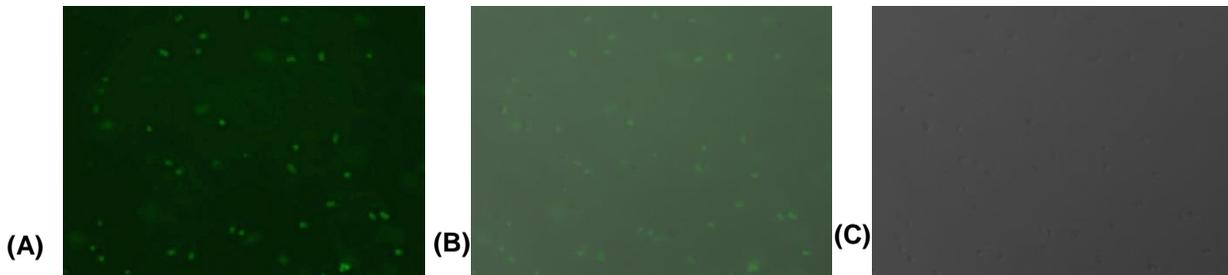


Fig. 6. Fluorescencia con GFP en *B. subtilis* LBMB/pAKG-GFP

Diferentes muestras de cultivo de *B. subtilis* LBMB/pAKG-GFP. En las imágenes de la izquierda (A) se observa la fluorescencia en el campo de la GFP, en las imágenes del centro (B) se observa el campo de la GFP sobrelapado sobre el campo claro, esto para confirmar que la fluorescencia corresponde a una célula bacteriana, en las imágenes de la derecha (C) se muestra el campo claro.

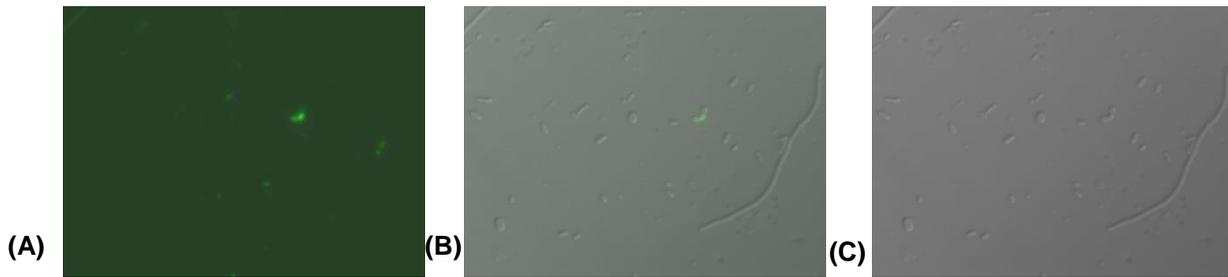


Fig. 7. Fluorescencia con GFP en la cepa BL21-SI/pAKG-GFP

En las imágenes de la izquierda (A) se observa la fluorescencia en el campo de la GFP, en las imágenes del centro (B) se observa el campo de la GFP sobrelapado sobre el campo claro, esto para confirmar que la fluorescencia corresponde a una célula bacteriana, en las imágenes de la derecha (C) se muestra el campo claro.

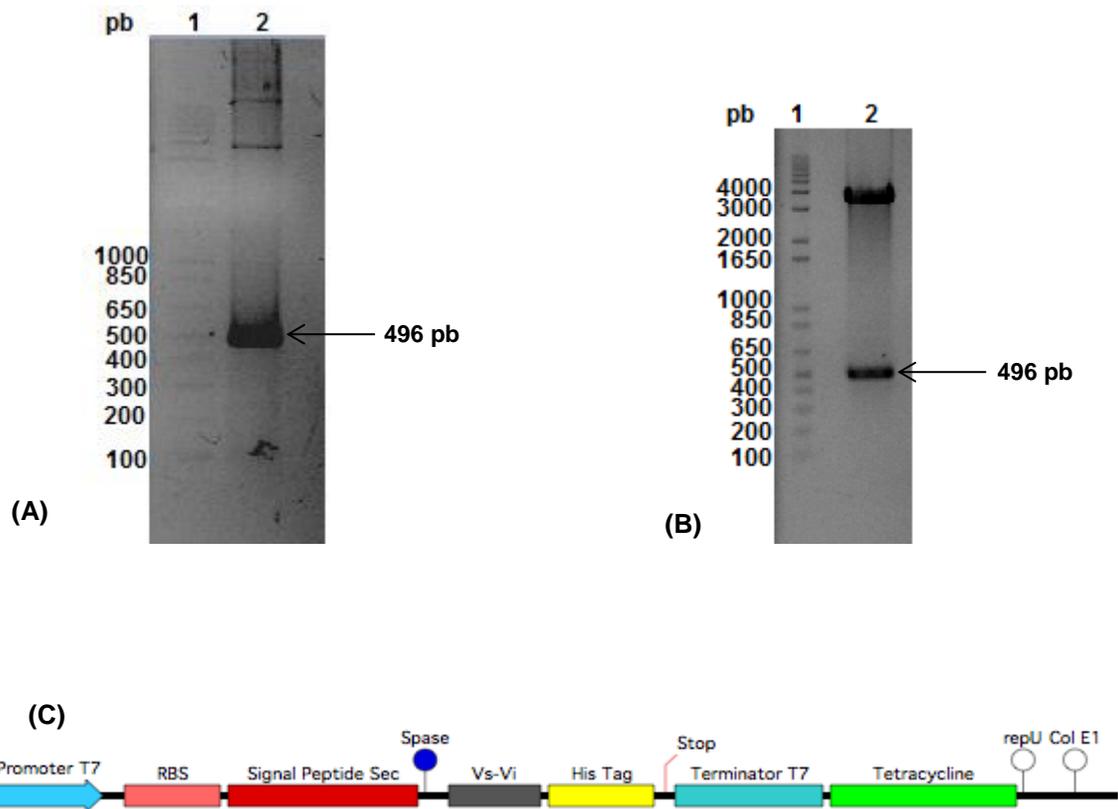


Fig. 8. Comprobación de la construcción Vs_Vi

Comprobación de la construcción por PCR y digestión enzimática. (A) Carril 1 MPB, carril 2 amplificación de la proteína quimérica Vs_Vi. (B) Análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BamHI*. Carril 1 MPB, carril 2 digestión enzimática liberando el fragmento que corresponde a la proteína quimérica Vs_Vi. (C) Representación esquemática de la construcción de la Vs_Vi.

Por tal motivo, creemos que es posible expresar nuestras proteínas de interés, utilizando un péptido señal que dirija la proteína eficientemente a la translocasa y que se escinda de manera eficiente por las peptidasas señal y así evitar los problemas que existen en los diferentes sistemas de expresión que se encuentran actualmente.

3.5 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vasoinhibina en las cepas de *Bacillus subtilis*

Las dos cepas de *B. subtilis* se transformaron con la construcción pAKG-Vi y las cepas transformantes resultantes IPI/ pAKG-Vi y LBMB/ pAKG-Vi se comprobaron con amplificación del gen de Vi por PCR empleando los oligos sentido P-FWVI y antisentido P-RVI (Vázquez-Rodríguez, 2009). La identidad del fragmento amplificado se corroboró por análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BamHI*, liberando el inserto correspondiente a la Vi (Fig. 9). El tamaño correspondiente al péptido de vasoinhibina es de 396 pb.

3.6 Construcción de un vector replicativo para la producción de Vasostatina en las cepas de *Bacillus subtilis*

El gen de la proteína Vasoinhibina se obtuvo a partir del plásmido pET12a-Vs (Vázquez-Rodríguez, 2009), el cual fue digerido con las enzimas de restricción *Sall* y *BamHI*, el inserto se clonó en el vector pka, junto con el inserto que corresponde al gen de tetraciclina. Para corroborar dicha construcción se optó por amplificar el gen de la tetraciclina, así como también se realizó un análisis de restricción con las enzimas *XbaI* y *XhoI*. El tamaño correspondiente al inserto de tetraciclina es de 1389 pb (Fig. 10).

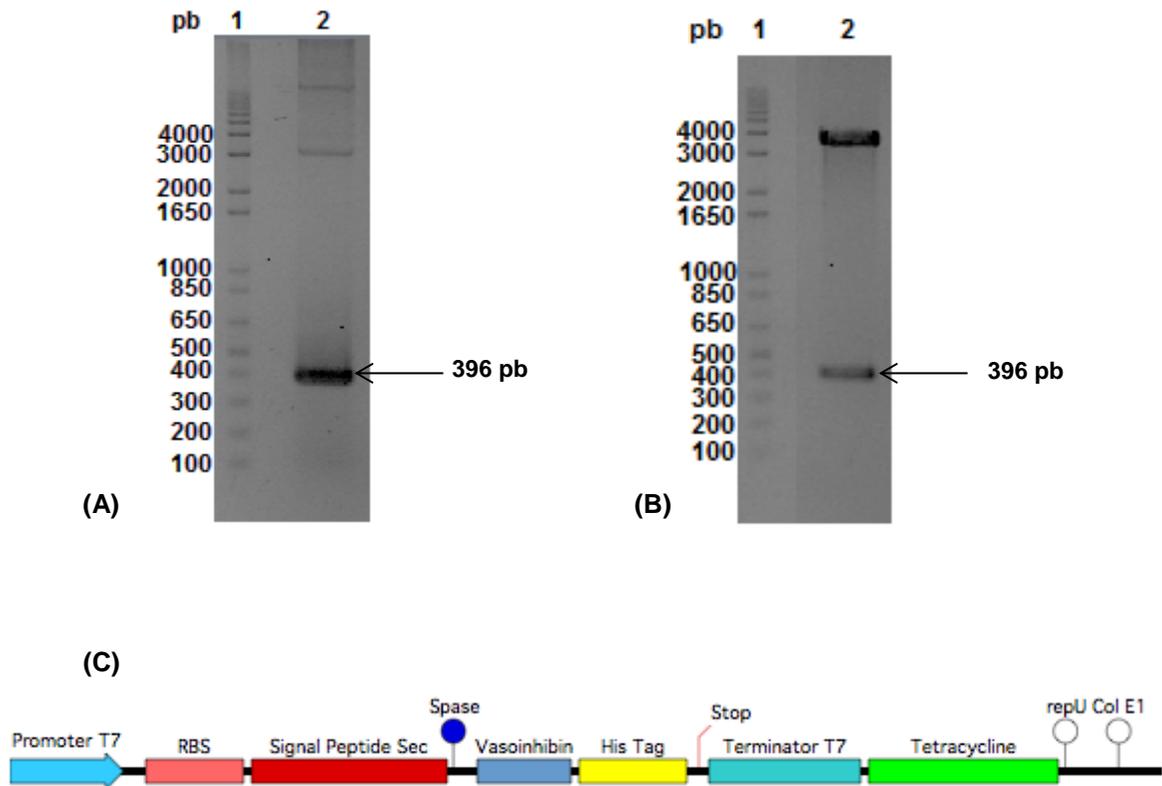


Fig. 9. Comprobación de la construcción de Vi por digestión y PCR

Comprobación por PCR y digestión enzimática de la construcción de Vasoinhibina. (A) En el carril 1 se observa el MPB, en el carril 2 se observa la banda que corresponde al amplificado de la Vasoinhibina. (B) Análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BamHI*. En el carril 1 se observa el MPB, carril 2 digestión enzimática que libera el fragmento que corresponde al péptido Vasoinhibina. (C) Representación esquemática de la construcción.

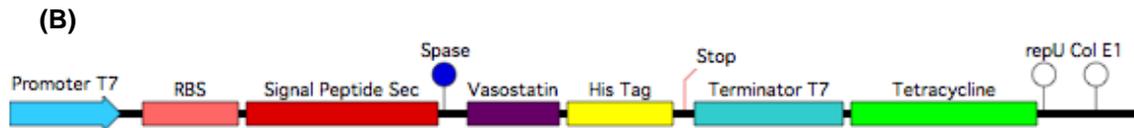
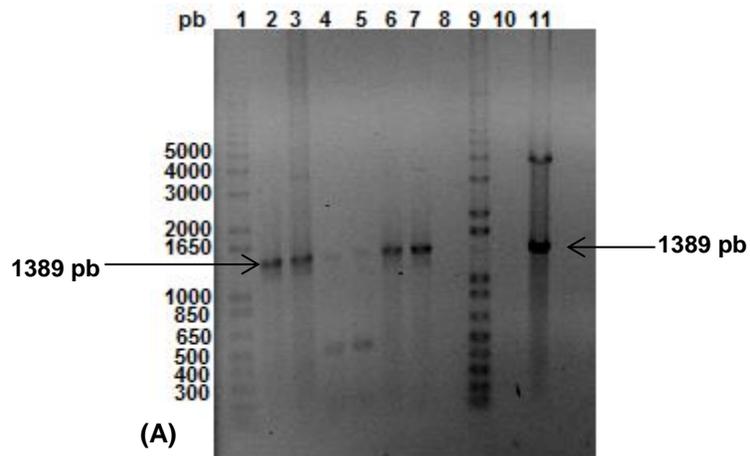


Fig. 10. Comprobación de la construcción de Vs30 con *cassette* de tetraciclina

Comprobación por PCR de la construcción Vs30 con el inserto del *cassette* de tetraciclina. El carril 1 al MPB, del carril 2 al 6 clonas obtenidas de la transformación, carril 7 corresponde al control positivo mientras que el carril 8 al control negativo, carril 9 MPM, carril 10 análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BamHI* de la clona utilizada en el carril 2, carril 11 digestión de la clona utilizada en el carril 3.

3.7 Evaluación de la expresión constitutiva de la RNA polimerasa T7 sobre el crecimiento de *B. subtilis*

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de evaluar si la expresión constitutiva de la RNA polimerasa T7 afecta o no el crecimiento de la bacteria. Para ello, las cepas parentales de *B. subtilis* 168, WB600 y sus transformantes denominadas *B. subtilis* IPI y LBMB, respectivamente, así como también las cepas IPI/pAKG-GFP y LBMB/pAKG-GFP se cultivaron, siguiendo su cinética de crecimiento, comenzando con una OD_{600nm} de 0.1. Observando que la expresión de la RNA polimerasa T7 integrada dentro del genoma de *B. subtilis* no afecta el crecimiento de la bacteria, la velocidad específica de crecimiento para las cepas 168, WB600, IPI y LBMB es de 0.742 h⁻¹, 0.8484 h⁻¹, 0.7725 h⁻¹ y 0.8475 h⁻¹ respectivamente, sin embargo al evaluar el crecimiento con el sistema de expresión completo, es decir, con ambos vectores observamos que el crecimiento de la bacteria se ve afectado, la velocidad específica de crecimiento para las cepas IPI- pAKG-GFP y LBMB/pAKG-GFP es de 0.583 h⁻¹ y 0.614 h⁻¹ respectivamente (Fig. 11).

El sistema de expresión basado en el fago T7 fue descrito por primera vez en *E. coli*, este sistema es conocido por su alta eficiencia y especificidad en la expresión de genes diana bajo el control del promotor T7. La iniciación de la transcripción génica a partir del promotor T7 requiere la función de la T7 RNA polimerasa, por lo tanto, se permite la expresión exclusiva de los genes que se encuentren bajo el promotor T7 sin necesidad de competir por la RNA polimerasa del huésped (Chen et al., 2010), por lo cual hace de esto un sistema altamente selectivo.

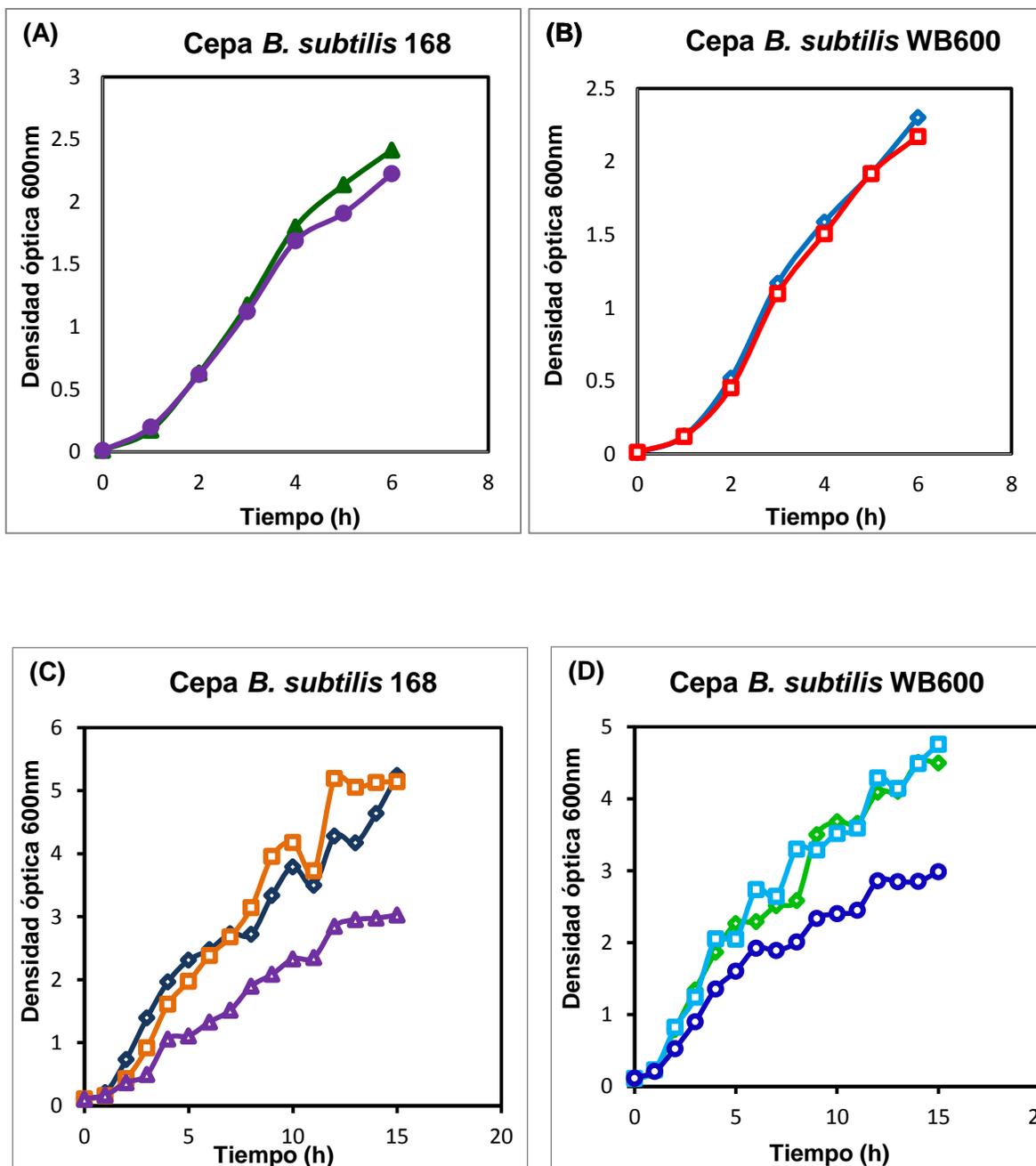


Fig. 11. Cinéticas de crecimiento de las diferentes cepas

En la figura (A) se muestra la cinética de crecimiento que corresponde a la cepa parental 168 y la cepa IPI. En la figura (B), se muestra la cinética de crecimiento para las cepas WB600 y LBMB. En ambas, no se observa diferencia en su crecimiento. En las figuras (C) y (D) se muestran las cinéticas para las cepas parental 168, IPI, IPI/pAKG-GFP, WB600, LBMB y LBMB/pAKG-GFP respectivamente.

El uso de *B. subtilis* para la sobreproducción de proteínas recombinantes se ve obstaculizada debido a que se ha realizado muy poca ingeniería genética en esta bacteria para obtener una alta producción de proteínas recombinantes, por lo cual decidimos diseñar un nuevo sistema de expresión con promotores constitutivos, un péptido señal eficiente y el sistema de la polimerasa T7, esperando que los rendimientos de expresión de proteína sean mayores que en los sistemas que existen actualmente.

4. Conclusiones

El sistema de expresión basado en el promotor T7 es funcional en las cepas de *B. subtilis* IPI, *B. subtilis* LBMB y *E. coli* BL21-SI. Esto se concluye por la fluorescencia de la GFP observada. El siguiente paso es utilizar el sistema de expresión de proteínas de interés biotecnológico.

El sistema de expresión si afecta a la tasa de crecimiento de las bacterias, por lo cual, el uso de un promotor inducible en el vector replicativo podría ser una buena alternativa para evitar dicho problema.

5. Perspectivas

- Llevar a cabo la expresión y purificación de las proteínas Vs_Vi, Vasoinhibina y Vasostatina.
- Evaluar la eficiencia de la secreción de las proteínas por el péptido señal.
- Modificar el sistema a promotores inducibles.
- Integrar el vector replicativo en el genoma de *B. subtilis*.

6. Referencias

- Anagnostopoulos, C., & Spizizen, J. (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 81(5), 741.
- Baltz, R. H., Demain, A. L., & Davies, J. E. (2010). Manual of industrial microbiology and biotechnology: *American Society for Microbiology Press*.
- Bolhuis, A., Broekhuizen, C. P., Sorokin, A., van Roosmalen, M. L., Venema, G., Bron, S. . . . van Dijk, J. M. (1998). SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular Siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), 21217-21224.
- Brockmeier, U., Caspers, M., Freudl, R., Jockwer, A., Noll, T., & Eggert, T. (2006). Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *Journal of molecular biology*, 362(3), 393-402.
- Bron, S., Bolhuis, A., Tjalsma, H., Holsappel, S., Venema, G., & van Dijk, J. M. (1998). Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in bacilli. *Journal of biotechnology*, 64(1), 3-13.
- Bron, S., Holsappel, S., Venema, G., & Peeters, B. P. (1991). Plasmid deletion formation between short direct repeats in *Bacillus subtilis* is stimulated by single-stranded rolling-circle replication intermediates. *Molecular and General Genetics MGG*, 226(1-2), 88-96.
- Bron, S., & Luxen, E. (1985). Segregational instability of pUB110-derived recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*, 14(3), 235-244.

- Chen, P. T., Shaw, J.-F., Chao, Y.-P., David Ho, T.-H., & Yu, S.-M. (2010). Construction of chromosomally located T7 expression system for production of heterologous secreted proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9), 5392-5399.
- Dalbey, R. E., Lively, M. O., Bron, S., & Diji, J. M. V. (1997). The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Science*, 6(6), 1129-1138.
- Fahnestock, S. R., & Fisher, K. E. (1986). Expression of the staphylococcal protein A gene in *Bacillus subtilis* by gene fusions utilizing the promoter from a *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase gene. *Journal of bacteriology*, 165(3), 796-804.
- Harwood, C. R., & Cranenburgh, R. (2008). *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends in microbiology*, 16(2), 73-79.
- Hidenori, S., & Henner, D. J. (1986). Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the trp operon of *Bacillus subtilis*. *Gene*, 43(1), 85-94.
- Janni re, L., Bruand, C., & Ehrlich, S. D. (1990). Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors. *Gene*, 87(1), 53-61.
- Janssen, G. (1993). Industrial microorganisms: Basic and applied molecular genetics. *American Society for Microbiology, Washington, DC*, 169-176.
- Ming, Y. M., Wei, Z. W., Lin, C. Y., & Sheng, G. Y. (2010). Development of a *Bacillus subtilis* expression system using the improved Pglv promoter. *Microbial cell factories*, 9(1), 55.

- Petsch, D., & Anspach, F. B. (2000). Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of biotechnology*, 76(2), 97-119.
- Ramírez-Romano, J (2007). Construcción de un sistema de expresión capaz de emplear galactosa como inductor de la transcripción del gen 1 del fago T7 para la producción de interleucina-10 humana en *Escherichia coli*. Tesis de Maestría.
- Sankaran, K., & Wu, H. C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19701-19706.
- Smith, H., Bron, S., Van Ee, J., & Venema, G. (1987). Construction and use of signal sequence selection vectors in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 169(7), 3321-3328.
- Toymentseva, A. A., Schrecke, K., Sharipova, M. R., & Mascher, T. (2012). The LIKE system, a novel protein expression toolbox for *Bacillus subtilis* based on the *lial* promoter. *Microb Cell Fact*, 11(1), 143.
- van Dijk, J. M., Braun, P. G., Robinson, C., Quax, W. J., Antelmann, H., Hecker, M., . . . Jongbloed, J. D. (2002). Functional genomic analysis of the *Bacillus subtilis* Tat pathway for protein secretion. *Journal of biotechnology*, 98(2), 243-254.
- Vazquez-Cruz, C., Ochoa-Sanchez, J., & Olmedo-Alvarez, G. (1996). Pulse-field gel-electrophoretic analysis of the amplification and copy-number stability of an integrational plasmid in *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 46(1), 55-60.

Vázquez-Rodríguez, G (2009). Producción de las proteínas antiangiogénicas: vasostatina, vasoinhibina y sus quimeras en *Escherichia coli* y su actividad biológica. Tesis de Maestría.

Wong, S.-L. (1995). Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current opinion in biotechnology*, 6(5), 517-522.

Wu, X.-C., Lee, W., Tran, L., & Wong, S. (1991). Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *Journal of bacteriology*, 173(16), 4952-4958.

7. Anexos

7.1 Protocolos

7.1.1 Células rubidio competentes

- Crecer un pre-inóculo de la cepa en 5 mL durante toda la noche a 37°C.
- Tomar una muestra del pre-inóculo (1 mL) e inocular en medio de cultivo fresco (100 mL), comenzar con una OD_{550nm} de 0.1.
- Incubar a 37°C hasta alcanzar una OD_{550nm} de 0.5.
- Transferir el cultivo a tubos de polipropileno previamente enfriados en hielo.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Decantar sobrenadante.
- Resuspender suavemente el pellet celular en 5 ml de la solución 1.
- Incubar en hielo por 15 min agitando de vez en cuando.
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C.
- Decantar sobrenadante.
- Resuspender suavemente el pellet celular en 2 mL de la solución 2.
- Alicuotar en tubos eppendorf previamente congelados volúmenes de 100µL.
- Almacenar a -80°C.

7.1.2 Transformación de células rubidio competentes

- Descongelar en hielo un tubo eppendorf de las células rubidio competentes.
- Añadir 1ng de ADN plasmídico o el total del ADN proveniente de una reacción de ligación, mezclar gentilmente.
- Reposar en hielo durante 30 min, agitando cada 10 min.

- Incubar el tubo a 42°C por 70 s e inmediatamente volver a reposar en hielo por 2 min.
- Añadir 1 mL de medio LB precalentado (37°C) y recuperar las células a 37°C durante 1 h, 20 min estable y 40 min en agitación vigorosa.
- Plaquear en cajas con medio LB con antibiótico.

7.1.3 Extracción de ADN plasmídico en Gram negativas

- Inocular 5 mL de medio de cultivo rico (LB o LBON) e incubar toda la noche a 37°C, 200 rpm.
- Alicuotar el cultivo en tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Centrifugar a máxima velocidad por 8 min a 4°C.
- Descartar sobrenadante y dejar el pellet tan seco como sea posible.
- Añadir en esterilidad y en hielo 100µL de la solución de lisis alcalina I, mezclar en vortex y dejar reposar en hielo.
- Añadir en hielo 200µL de la solución de lisis alcalina II recién preparada y mezclar (no usar vortex), almacenar el tubo en hielo.
- Adicionar 150µL de la solución de lisis alcalina III, mezclar y dejar reposar de 3-5 min en hielo.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 10 min a 4°C, transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio.
- Añadir un volumen igual al que se tiene en el tubo (aproximadamente 450µL) de fenol:cloroformo, mezclar en vortex y centrifugar a máxima velocidad por 2 min a 4°C.

- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
- Precipitar el ADN plasmídico con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C. Mezclar y dejar reposar 30 min.
- Centrifugar a máxima velocidad por 10 min a 4°C.
- Remover el sobrenadante por aspiración y colocar el tubo en posición invertida sobre un papel para remover el etanol.
- Dar 2 lavados con etanol 70% frío.
- Invertir el tubo y dejar secar por evaporación a temperatura ambiente.
- Resuspender el ADN plasmídico en 30µL de buffer TE o agua MQ estéril.
- Añadir 2µL de RNAsa 20µg/mL, incubar a 37°C durante 1 h.
- Analizar la integridad del ADN plasmídico en geles de agarosa 1%.

NOTA: para extraer ADN plasmídico de Gram positivas, tratar previamente con una solución de lisozima a una concentración de 30mg/mL.

- Resuspender en 500 µL de 50mM de EDTA y agregar 100 µL de solución de lisozima. Incubar 60 min a 37°C.
- Centrifugar a 13000 rpm por 10 min. Desechar sobrenadante.
- Resuspender en 500 µL de 50mM de EDTA y agregar proteinasa K a una concentración de 0.8mg/mL.
- Incubar 60 min a 37°C. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y continuar con protocolo de extracción de ADN plasmídico.

7.1.4 Transformación en *Bacillus subtilis*

- Inocular de 2 a 3 colinas frescas en un tubo con 20 mL de medio A. Incubar toda la noche a temperatura ambiente sin agitación.
- Transferir el cultivo a un matraz de 250 mL, incubar a 37°C y 250 rpm.
- Tomar alícuotas de 1 mL para seguir la cinética de crecimiento a una OD600, se registran los valores en papel semi-logarítmico hasta localizar el t₀, es el punto de intersección entre la línea de crecimiento exponencial (log) y el inicio de la fase estacionaria.
- Se continúa la incubación durante 90 min después de haber cesado la fase log de crecimiento (t₉₀). En este punto se diluyen 50 µL de cultivo en 450 µL de medio B en un tubo de vidrio estéril de 16x125mm.
- Los tubos se incuban con agitación vigorosa (250 rpm) durante 90 min más. En este punto las células son altamente competentes para su transformación.
- Para transformar agregar a los 500 µL de células competentes 1 µg de ADN transformante.
- Incubar los tubos durante 30 min a 37°C.
- La mezcla de transformación se siembra en alícuotas de 200 µL sobre placas con medio LB sólido con antibiótico.

7.2 Medios de cultivo

7.2.1 Medio LB

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 min. Para LB sólido, adicionar 15 g de agar bacteriológico.

7.2.2 Medios para transformación de *Bacillus subtilis*

7.2.2.1 Medio A base 10X

Reactivos	Cantidad
Extracto de levadura	10 g
Bactotriptona	2 g
Glucosa 50%	100 mL

Disolver el extracto de levadura y la bactotriptona en 900 mL de agua destilada, esterilizar 121°C durante 15 min. Posteriormente agregar la glucosa al 50% previamente esterilizada por filtración.

7.2.2.2 Bacillus sales 10X

Reactivos	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	183 g
KH ₂ PO ₄	60 g
Citrato de Na	10 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	2 g

Disolver las sales hasta un volumen de 1 L y esterilizar en autoclave.

7.2.2.3 Medio A

Reactivos	Cantidad
Agua estéril	81 mL
Medio A base 10X	10 mL
Sales Bacillus 10X	9 mL

7.2.2.4 Medio B

Reactivos	Cantidad
Medio A	4.98 mL
CaCl ₂ *2H ₂ O 50mM	0.05 mL
MgCl ₂ *6H ₂ O 250mM	0.05mL

7.3 Soluciones para células rubidio competentes

7.3.1 Solución RF1

Reactivos	Cantidad
100mM de RbCl	2.4 g
45mM de MnCl ₂ *4H ₂ O	1.98 g
10mM de CaCl ₂	0.30 g
15% de glicerol	30 mL

Ajustar a 200ml con agua destilada, esterilizar en autoclave y posteriormente agregar 6 ml de KAc 1M pH 7.5 estéril.

7.3.2 Solución RF2

Reactivos	Cantidad
10mM de RbCl	0.24 g
75mM de CaCl ₂	2.2 g
15% de glicerol	30 mL

Ajustar a 200ml con agua destilada, esterilizar en autoclave y posteriormente agregar 4 ml de MOPS 0.5M pH 6.8 estéril.

7.4 Electroforesis en gel de agarosa

7.4.1 TAE 10X

Reactivos	Cantidad
Tris (base)	48.5 g
Ácido acético glacial	11.4 mL
EDTA (0.5M, pH 8.0)	20 mL

Aforar a 1 L con agua Milli Q .

7.4.2 Gel de agarosa al 1%

Reactivos	Cantidad
Agarosa	1 g
TAE 1X	100 mL

Calentar la solución en horno de microondas a potencia 3 durante 3 min.

7. 5 Soluciones para purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina

7.5.1 Solución I

Reactivos	Cantidad
Glucosa	50mM
Tris-HCl	25mM
EDTA	10mM

7.5.2 Solución II

Reactivos	Cantidad
NaOH	0.2 N
SDS	1%

7.5.3 Solución III

Reactivos	Cantidad
Acetato de Potasio	5 M

Ajustar a pH 4.8 con ácido acético glacial.

7.6 Soluciones para purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina en

Gram positivas

7.6.1 Solución I

Reactivos	Cantidad
Tritón X-100	2.4%
Tris-HCl	25mM pH 8.0

EDTA	10mM pH 8.0
------	-------------

7.6.2 Solución II

Reactivos	Cantidad
NaOH	0.2 N
SDS	1%

7.6.3 Solución III

Reactivos	Cantidad
Acetato de Potasio	5 M

Ajustar a pH 4.8 con ácido acético glacial.