

---

# **TRANSFORMACIÓN GENÉTICA: INSERCIÓN DEL GEN *gfp* DE LA MEDUSA *Aequorea victoria* EN EL GENOMA DE LA BACTERIA *E. coli* HB101**

Hernández J.<sup>1\*</sup>, Aparicio A.<sup>2</sup>, Bernal J.<sup>3</sup>

1\*. Coordinador CEBM; 2. Estudiante Microbiología U. Andes; 3. Director CEBM.

\*autor para correspondencia: [centrobiomol@campestre.edu.co](mailto:centrobiomol@campestre.edu.co)

## **RESUMEN**

Utilizando el sistema pGLO (BIO-RAD) se transformaron bacterias *E. coli* cepa HB101 con el gen *gfp*, que codifica para una proteína de fluorescencia verde (Green Fluorescent Protein). Esta proteína, que pertenece al genoma de la medusa *Aequorea victoria*, permite que este celentéreo brille en la oscuridad por la emisión de fluorescencia. La transformación se realizó utilizando células competentes y el plasmido pGLO que contiene un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. El gen *gfp* se expresó en las células bacterianas cuando estas crecieron en un medio de cultivo al que se adicionó arabinosa y ampicilina. Las células transformadas presentaron una coloración verde fluorescente cuando se observaron en una lámpara de rayos UV. El método utilizado permite estudiar los mecanismos de la regulación y la selección genética de una manera fácil, rápida y contundente.

**Palabras Claves:** GFP, proteína fluorescente verde, pGLO, medusa, resistencia a ampicilina.

## **ABSTRACT**

Utilizing the pGLO System (BIO-RAD) of transformed *E. coli* bacterial strain HB101 with the *gfp* gene that codes for a Green Fluorescent Protein (GFP). This protein which is present in the genome of jellyfish which causes fluorescence. Transformation occurred using competent cells and the pGLO plasmid that contains the gene for beta-lactamase which provides resistance to the antibiotic ampicillin. The *gfp* gene were found in the bacterial cells when arabinose and ampicillin were added to the growth media. The changed cells glowed with a brilliant green color under ultraviolet light. This method used allows the study of mechanisms in an easy and rapid regulation of genetic selection.

**Key Words:** GFP, Green Fluorescent Protein, pGLO, Jellyfish, ampicillin resistance.

---

## **INTRODUCCIÓN**

Todo organismo, aun el más simple, contiene una enorme cantidad de información. Esa información se repite en cada una de sus células organizadas en unidades llamadas genes, los cuales están formados por ADN. Los genes controlan todos los aspectos de la vida de cada organismo, incluyendo metabolismo, forma, desarrollo y reproducción. De ellos depende la continuidad de la vida, porque constituyen el enlace esencial entre generaciones. Esta transmisión de información genética se denomina herencia. Desde principios del siglo XX, la ciencia de la Ingeniería Genética ha experimentado notables avances. La

capacidad para introducir genes de una especie a otra, ha abierto espectaculares posibilidades al mejoramiento de especies animales, vegetales y humanas: el aumento de la resistencia de los cultivos a enfermedades, la producción de compuestos farmacéuticos en la leche de los animales, la elaboración de vacunas, y la alteración de las características del ganado son algunos ejemplos.

La transformación genética se convierte en el sistema técnico que posibilita la ingeniería genética. El sistema de transformación pGLO es un proceso sencillo para transformar genéticamente bacterias. La proteína fluorescente verde, GFP, es una proteína aislada de las

medusas del pacífico, *Aequoria victoria*<sup>1</sup> (Figura 1). Su papel está en traducir por transferencia de energía la quimioluminescencia azul de otra proteína, aequorin, en la luz fluorescente verde<sup>2</sup>. La clonación molecular de GFP y la demostración de Chalfie de que GFP se puede expresar como transgene funcional<sup>4</sup> han abierto inmensas posibilidades a la investigación en biología celular, biología del desarrollo y biología molecular. GFP se ha expresado en bacterias<sup>4</sup>, levaduras<sup>5</sup>, plantas<sup>7,8</sup>, la mosca de la fruta, *Drosophila*<sup>9</sup>, pez cebra<sup>10</sup> y en células de mamíferos<sup>11, 12</sup>.

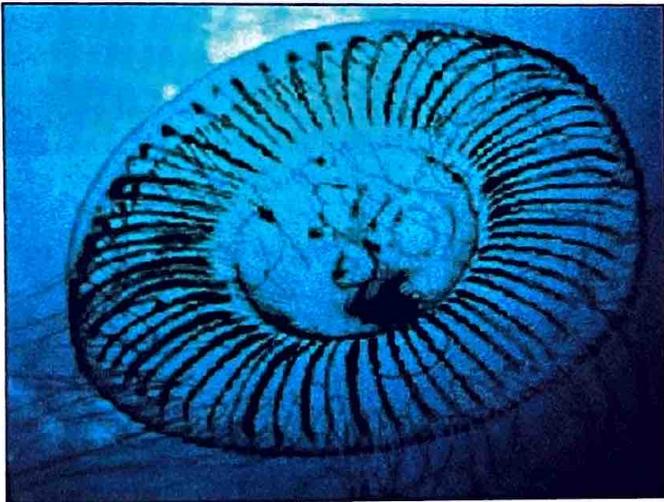


Figura 1. Medusa (*Aequorea Victoria*).  
Fotografía: David Wrobel

GFP puede funcionar como una etiqueta de la proteína, pues tolera la fusión del N y del C-terminal de una amplia variedad de proteínas muchas de las cuales se ha demostrado que conservan la función nativa.<sup>6, 13, 14</sup> La expresión de GFP en células mamíferas del tipo salvaje se distribuye típicamente a través del citoplasma y el núcleo, pero no en el nucleolo y los organelos vesiculares<sup>13</sup>. Sin embargo, la localización intracelular es altamente específica en el núcleo, las mitocondrias<sup>15</sup>, la vía secretora<sup>16</sup>, la membrana plasmática<sup>17</sup> y el citoesqueleto<sup>5</sup>. La flexibilidad enorme como marcador no invasor en células vivas permite utilizar GFP para múltiples usos, tales como un trazalíneas del linaje de la célula, reportero de la expresión del gene y como medida potencial de las interacciones proteína-proteína<sup>18</sup>.

Un ejemplo de la utilización de GFP lo representa “el proyecto del conejito de GFP” que fue terminado en febrero de 2000 con el nacimiento de “Alba” en Jouy-jouy-en-Josas-Josas, Francia. Este trabajo fue realizado por Louis zoosystemician Bec y los científicos Louis-Marie Houdebine y Patrick Prunet. “Alba”, la conejita fluorescente verde, es un conejo albino (Figura 2). Esto

significa que, puesto que ella no tiene ningún pigmento en la piel, bajo condiciones ambientales ordinarias ella es totalmente blanca con los ojos rosados. La coneja brilla intensamente solamente cuando es iluminada con luz azul (excitación máxima en 488 nm), y brilla intensamente con una luz verde (emisión máxima en 509 nm). La crearon con EGFP, una versión realzada (es decir, una mutación sintética) del gene fluorescente verde original del tipo salvaje encontrado en las medusas *Aequorea Victoria*. EGFP da cerca de dos órdenes de mayor fluorescencia de la magnitud en células mamíferas (incluidas células humanas) que el gen original de las medusas<sup>19</sup>.

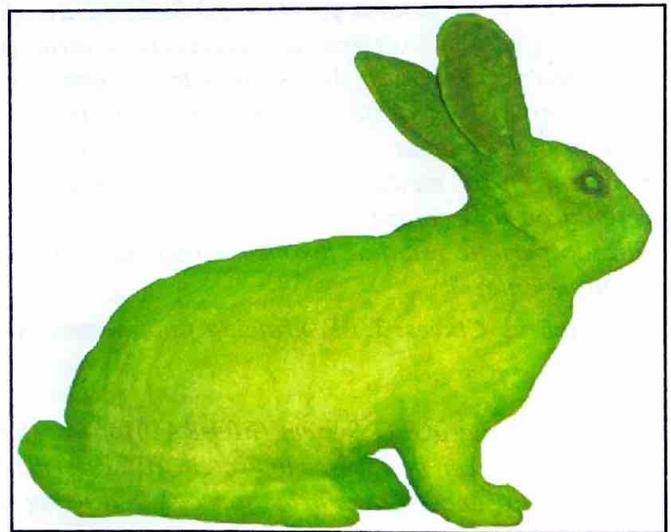


Figura 2. La coneja “Alba” que expresa activamente la proteína GFP de la medusa *Aequorea victoria*.

Este trabajo tuvo como objetivo realizar la transformación genética de la bacteria *E. coli*, cepa HB101 con el gen *gfp* y estudiar los mecanismos genéticos que permiten la expresión de la proteína *in vivo*.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

La transformación genética de las bacterias *Escherichia coli* cepa HB101 se realizó utilizando el kit Bacterial Transformation The pGLO™ System (Cat. 166-0003-EDU) BIO-RAD, USA.

El kit consta de: la cepa *E. coli* HB101 liofilizada, 7,5 mg del plasmado pGLO (Figura 3), arabinosa liofilizada, 15 ml de buffer de transformación estéril, 10 ml de medio LB-Broth, medio LB en polvo para preparar 500 ml, 50 pipetas pasteur estériles, 80 asas de plástico estériles, 40 cajas de petri pequeñas (60 mm) y 8 soportes para microtubos.

**Preparación para la transformación.** La transformación se inició preparando las cajas de petri con el medio de cultivo. Al medio LB en polvo se le adicionaron 500 ml de agua destilada y se calentó hasta el punto de ebullición. Después, esta mezcla se dejó enfriar y se sirvieron 16 cajas de medio LB (200 ml). Al restante medio de cultivo se le adicionó 1 ml de ampicilina y se sirvieron otras 16 cajas de medio LB/amp (otros 200 ml). A los últimos 100 ml de medio se le adicionó 3 ml de arabinosa y se sirvieron 8 cajas de medio LB/amp/ara. Las 40 cajas de medio se guardaron a 4°C hasta su utilización.

Usando una pipeta estéril se rehidrataron las células de *E. coli* HB101 adicionando 250 µl de solución de transformación. Luego, estas células se plataron en 8 cajas con medio LB y se incubaron a 37°C durante 24-36 horas.

Al plásmido pGLO liofilizado se le adicionó 250 µl de solución de transformación.

**Transformación.** Se marcaron dos microtubos de 1,5 ml como +DNA y -DNA. A estos tubos se transfirieron 250 µl de solución de transformación y se colocaron en hielo. Luego, utilizando una asa bacteriológica estéril se recogió una colonia de *E. coli* de las cajas previamente sembradas y se introdujo en el tubo marcado como +DNA. Igualmente se procedió con el tubo -DNA. Después, con otra asa bacteriológica se tomó una muestra del plásmido pGLO y se inoculó el tubo marcado como +DNA. Al tubo -DNA no se le adicionó plásmido (control negativo), y ambos tubos se colocaron nuevamente en hielo por 10 minutos.

Separadamente se marcaron 4 cajas de petri como: 1) +DNA, LB/amp; 2) +DNA, LB/amp/ara; 3) -DNA, LB/amp y 4) -DNA, LB.

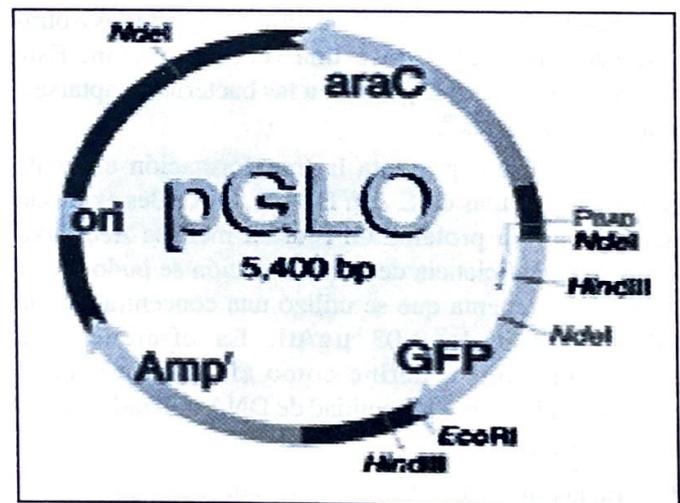
**Choque térmico.** Utilizando un soporte para microtubos se colocaron las dos muestras +DNA y -DNA en un baño maria a 42°C por 50 segundos exactos. Luego se colocaron en hielo por 2 minutos al cabo de los cuales se adicionaron 250 µl de LB-Broth a ambas muestras.

Usando una nueva pipeta estéril en cada caso, se sembraron 100 µl del tubo +DNA en las cajas numeradas como 1 y 2 y 100 µl del tubo -DNA en las cajas numeradas como 3 y 4. Esta solución de 100 µl se dispersó en la caja de petri utilizando asas bacteriológicas estériles. Por último, las cajas sembradas se incubaron a 37°C por 24 horas, después de las cuales se realizó la evaluación de la transformación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El sistema de transformación pGLO es un proceso sencillo para transformar genéticamente bacterias, con un gen aislado de la medusa *Aequorea victoria* que produce bioluminiscencia. Este gen codifica para una proteína de fluorescencia verde (Green Fluorescent Protein GFP). Esta proteína permite que la medusa brille en la oscuridad y emita fluorescencia. Las bacterias transformadas con el plásmido pGLO expresan el gen de la medusa y producen la proteína fluorescente. Al revelar estas bacterias con una fuente de rayos Ultra Violeta UV se observan las colonias de color verde fluorescente<sup>19</sup>.

El plásmido pGLO (Figura 3) posee un gen para resistencia a ampicilina que codifica para la beta-lactamasa e incorpora un sistema de regulación genética especial que puede ser usado para controlar la expresión de la proteína verde de fluorescencia en las células transformadas mediante la incorporación de arabinosa en el medio de cultivo y seleccionado mediante el crecimiento de las células en un medio de cultivo con ampicilina. Las células transformadas se verán verde fluorescente al colocarlas en la cámara de rayos UV<sup>19</sup>.



**Figura 3.** Plásmido pGLO que contiene el gen *gfp* entre el operon Ara. Adicionalmente contiene el gen resistencia a ampicilina y el origen de replicación.

El protocolo utiliza el llamado “choque térmico” para permitir que las células incorporen el plásmido deseado. En este proceso es muy importante el cambio de temperatura y la duración del choque térmico, ya que este incrementa la permeabilidad de la membrana celular al DNA foráneo, mecanismo que no ha sido explicado hasta el momento<sup>19</sup>.

La regulación genética es bastante compleja y permite adaptar a los organismos a condiciones específicas, así como evitar el desperdicio de proteínas no necesarias. La arabinosa, por ejemplo, es una buena fuente de energía y carbón para la bacteria, pero si no hay arabinosa presente en el ambiente sería un desperdicio producir la maquinaria enzimática para asimilarla. Por consiguiente cuando hay arabinosa, los genes se activan, y cuando se agota este recurso, los genes se inactivan<sup>19</sup>.

El operón arabinosa está limitado por un promotor, una enzima *araC* está ligada al DNA plasmídico y permanece inactiva. En cuanto la bacteria incorpora en su interior la arabinosa, ésta activa la enzima *araC* ligada al ADN permitiendo que la RNA polimerasa lea el ADN. En la asimilación de la arabinosa están involucradas 3 genes específicos (*araB*, *araA* y *araD*)<sup>19</sup>.

Durante el desarrollo de la transformación y después de lograr insertar el gen *gfp* dentro de *E. coli* HB101, se pueden estudiar los procesos de movimiento de genes de un organismo a otro con la utilización de plásmidos. Las bacterias naturalmente contienen una o más pequeñas piezas de DNA circular llamados plásmidos. Los plásmidos usualmente contienen genes que codifican para varias características que pueden beneficiar la supervivencia de la bacteria.

Las bacterias pueden transferir sus plásmidos a otras bacterias produciéndose una recombinación. Este mecanismo natural le permite a las bacterias adaptarse a nuevos ambientes<sup>19</sup>.

La Figura 4 presenta la transformación eficiente realizada a células de *E. coli* HB101, las cuales expresan activamente la proteína GFP de la medusa *Aequorea victoria*. La eficiencia de transformación se pudo medir teniendo en cuenta que se utilizó una concentración de DNA, pGLO de 0,03 µg/µl. La eficiencia de transformación se define como el total de células transformadas sobre la cantidad de DNA utilizado para la transformación.

En la transformación se utilizaron:

250 µl de buffer de transformación

10 µl de plásmido

250 µl de medio LB broth

100 µl de muestra de células

Se observaron únicamente 3 colonias transformadas que se obtuvieron con 0,3 mg de DNA. Este resultado nos indica una eficiencia de transformación muy baja de apenas unos  $3 \times 10^3$  bacterias/µg.

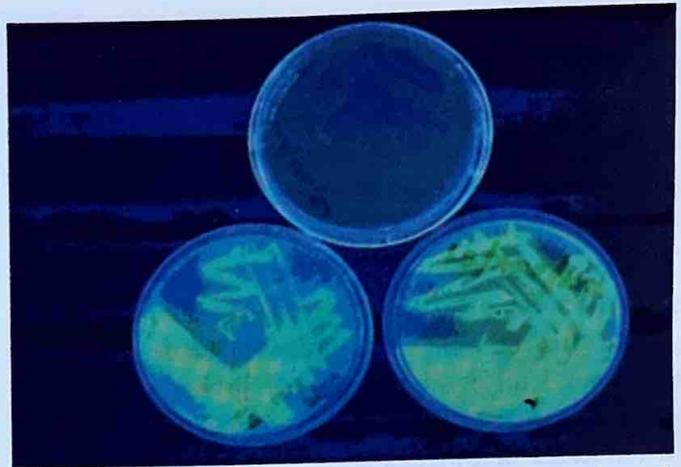


Figura 4. Transformación eficiente de células de *E. coli* con el gen *gfp* de la medusa *Aequorea victoria*. La caja de petri de arriba, muestra las células sin transformar.

Los resultados muestran que es posible la transformación de células procariotas con el gen *gfp* utilizando el sistema pGLO de Bio-Rad. Y que además es un sistema sencillo, barato, rápido y eficaz para desarrollar esta técnica.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a A.M. Asesoría y Mantenimiento LTDA., por cedernos gentilmente el kit Biotechnology Explorer™ Bacterial Transformation The pGLO™ System BIO-RAD, USA.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Morin, J. and Hastings, J., 1971. Energy transfer in a bioluminescent system. *J. Cell Physiol.* 77: 313-8.
2. Ward, W., in Photochemical and Photobiological Reviews, K. Smith, Editor. 1979, Plenum: NY. p. 1-57.
3. Prasher, D., Eckenrode, V., Ward, W., Prendergast, F. and Cormier, M., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111: 199-33.
4. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. and Prasher, D., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263: 802-5.
5. Kahana, J., Schapp, B. and Silver, P., 1995. Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 92: 9707-9711.
6. Moores, S., Sabry, J. and Spudich, J., 1996. Myosin dynamics in live *Dictyostelium* cells. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 93: 443-446.
7. Casper, S. and Holt, C., 1996. Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. *Gene.* 173: 69-73.
8. Epel, B., Padgett, H., Heinlein, M. and Beachy, R., 1996. Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. *Gene.* 173: 75-9.
9. Wang, S. and Hazelrigg, T., 1994. Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature.* 369: 400-03.

10. Amsterdam, A., Lin, S., Moss, L. and Hopkins, N., 1996. Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos. *Gene*. 173: 99-103.
11. Luđin, B., Doll, T., Meill, R., Kaech, S. and Matus, A., 1996. Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins. *Gene*. 173: 107-11.
12. DeGiorgi, F., Brini, M., Bastianutto, C., Marsault, R., Montero, M., Pizzo, P., Rossi, R. and Rizzuto, R., 1996. Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles. *Gene*. 173: 113-7.
13. Cubitt, A., Heim, R., Adams, S., Boyd, A., Gross, L. and Tsien, R., 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS*. 20: 448-55.
14. Olsen, K., McIntosh, J. and Olmstead, J., 1995. Analysis of MAP4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J. Cell Biol.* 130: 639-650.
15. Rizzuto, R., Brini, M., De Giorgi, F., Rossi, R., Heim, R., Tsien, R. and Pozzan, T., 1996. Double labeling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo. *Curr. Biol.* 6: 183-188.
16. Kaether, C. and Gerdes, H., 1995. Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 369: 267-271.
17. Marshall, J., Molloy, R., Moss, G., Howe, J. and Hughes, T., 1995. The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron*. 14: 211-215.
18. Mitra, R., Silva, C. and Youvan, D., 1996. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene*. 173: 13-7.
19. Biotechnology Explorer™ Bacterial Transformation The pGLO™ System Catalog Number 166-0003-EDU, BIO-RAD, USA.