

# Aislamiento y Caracterización del cDNA del Gen de la Insulina para el Establecimiento de Cultivos de Raíces Transformadas

Berenice García Reyes\*

María del Carmen Montes Horcasitas\*

Emma Gloria Ramos Ramírez\*

Armando Ariza Castolo\*\*

Josefina Pérez Vargas\*\*\*

Octavio Gómez-Guzmán\*

Graciano Calva Calva\*

## Resumen

**E**n este trabajo se propone establecer cultivos de raíces transgénicas para la producción de insulina humana con el objetivo de coadyuvar a la creciente demanda, debida al aumento de la población que presenta problemas de diabetes. Como modelo vegetal, se ha considerado *Brassica oleracea var italica*, debido a la disponibilidad de la metodología para su transformación y su alta capacidad natural de acumulación de proteína.



### Acerca de los autores...

\* Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

\*\* Departamento de química, CINVESTAV-IPN.

\*\*\* Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.



## Introducción

La insulina humana es una proteína cuya actividad hormonal consiste en regular los niveles de glucosa en la sangre, aunque también participa en la regulación de otros procesos fisiológicos, como la utilización de algunos nutrientes, estimulación de la síntesis de glucógeno, aminoácidos, proteínas y consumo de lípidos (Cahill 1971). Las deficiencias en su modo de acción, ocurren cuando su biosíntesis es insuficiente y deficiente, provocando una alteración en sus funciones fisiológicas así directamente la concentración de glucosa en la sangre, produciendo así el padecimiento conocido como diabetes.

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por alteraciones en el metabolismo de la glucosa, grasas y proteínas, derivadas de las deficiencias en la secreción o la acción de la insulina. La insulina humana recombinante se ha expresado en diversos organismos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos, células y órganos de animales y plantas transgénicas (C. L. Nykiforuk 2006). No obstante que su producción comercial se ha limitado a microorganismos como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, los sistemas basados en plantas ofrecen grandes ventajas tanto en producción, como en bioseguridad y economía (Deckers 1999). Debido a ello, actualmente se ha propuesto como alternativa de producción el uso de cultivos de células, tejidos y órganos vegetales, biotecnologías que desde hace tiempo representan una opción real y económicamente viable. Estas tecnologías, tanto usando líneas de células en suspensión como cultivos de órganos, por ejemplo raíces transformadas, pueden establecerse a nivel de biorreactores o usarse para regenerar plantas transgénicas productoras de proteínas terapéuticas con aplicaciones biotecnológicas.

Por lo anterior, en este trabajo se propone establecer cultivos de raíces transgénicas para la producción de insulina humana, con el objetivo de coadyuvar a la creciente demanda generada por el aumento de la población que presenta problemas de diabetes. Como modelo vegetal se ha considerado a la *Brassica oleracea* var. *italica* debido a la disponibilidad de la metodología para su transformación y su alta capacidad natural de acumulación de proteína (V. Cardoza 2004).

## Materiales y métodos

Se usó la clona 3950204 (Open Biosystems, USA) de *E. coli* llevando el cDNA del gen de la insulina humana (*Ins*) insertado en el plásmido pDNR-Lib. El cDNA se liberó con las enzimas de restricción EcoR I, y Xho I. Para la amplificación por PCR se usaron oligos directo y reverso, diseñados en este trabajo.

Las enzimas de restricción Nco I, Bgl II y Eco3I I fueron empleadas para generar extremos cohesivos entre el cDNA y el vector binario pCAMBIA1105.1 y generar el constructo para la transfección a Brócoli. Para la amplificación de los constructos se usó la cepa de *E.coli* DH5 $\alpha$  transformada por electroporación.

Para la transfección a las plántulas de Brócoli se usó la cepa de *Agrobacterium* rhizogenes LBA9402 para inducir líneas de raíces transformadas.

El material vegetal consistió en plántulas de Brócoli obtenidas mediante la germinación de semillas en medio mineral B5. Las plántulas jóvenes (de 3-4 semanas de

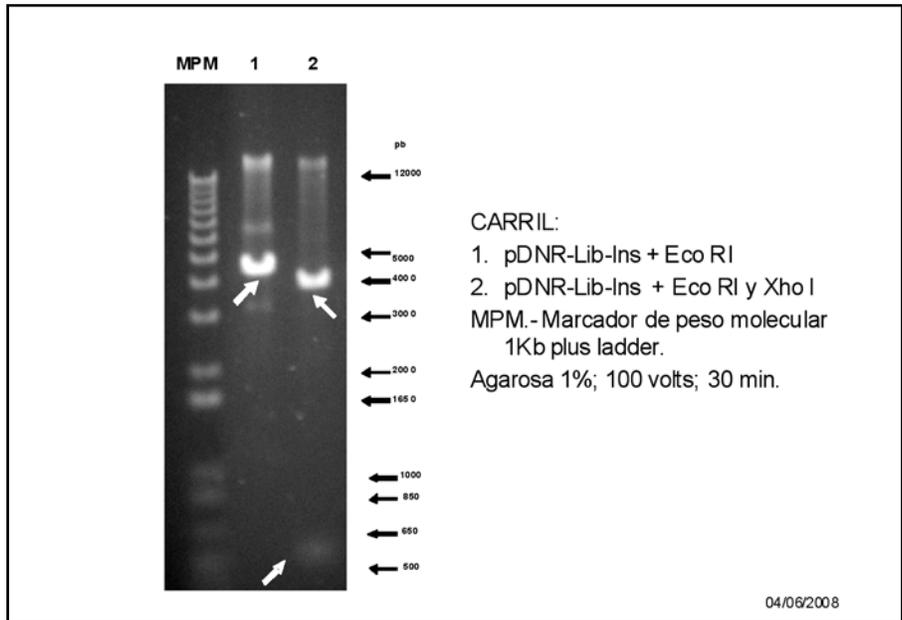
germinación y sin hojas verdaderas) se usaron para la transfección por punción, mientras que las adultas (mayores a un mes y con hojas verdaderas) se usaron para la obtención de explantes de raíces normales para el establecimiento de cultivos de raíces sin transformar en cultivo sumergido en medio mineral Schenck y Hildebrandt (SH).

### Resultados y Discusión

Caracterización del cDNA del gen *Ins* contenido en el en el plásmido pDNR-Lib.

El vector pDNR-Lib-*Ins* contenido en la clona 3950204 de *E. coli*, el cual

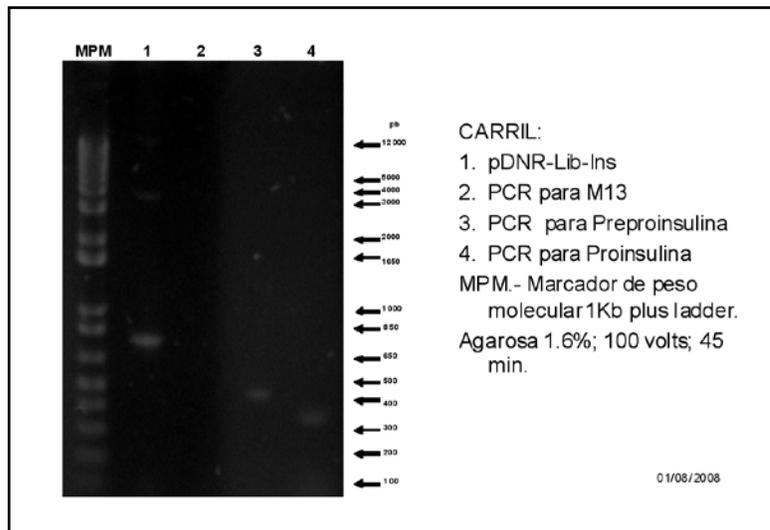
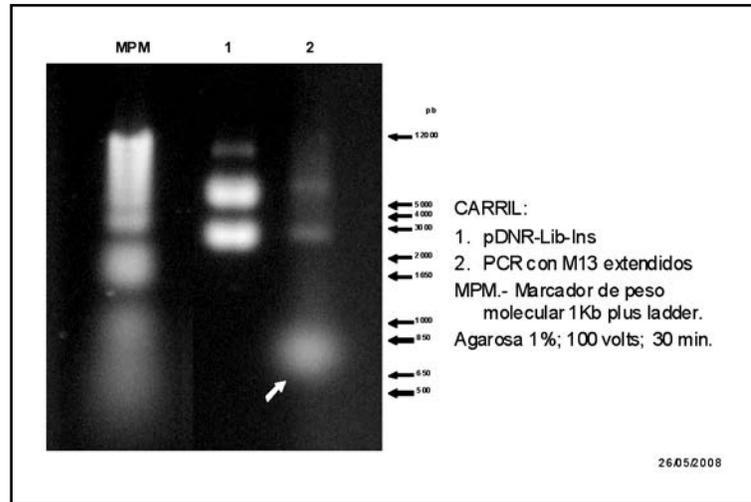
lleva el cDNA del gen de la insulina humana (*Ins*) y el gen de resistencia a cloranfenicol, fue extraído y sometido a reacciones de restricción con las enzimas EcoR I y Xho I, que flanquean dicho cDNA. El análisis por electroforesis del producto de las reacciones de restricción reveló la presencia de un fragmento con el tamaño esperado de 531 pb sólo cuando se llevó a cabo la doble digestión (Figura 1).



**Figura 1.** Liberación del cDNA del gen de la insulina humana *Ins* a partir del vector pDNR-Lib-*Ins* por reacciones de restricción con las enzimas EcoR I y Xho I



Continuando con la caracterización del gen *Ins* contenido en el vector pDNR-Lib-*Ins*, se amplificaron varias regiones del mismo, usando los oligos universales M13 extendidos (Figura 2) y los dos juegos denominados preproinsulina y proinsulina (Figura 3), diseñados específicamente para añadir la secuencia de las enzimas *Nco* I, *Bgl* II y *Eco* 31 I al cDNA del gen *Ins*. Como se esperaba, el análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel reveló que con los oligos M13 se obtuvo un fragmento de 796 pb (Figura 2), mientras que con los oligos preproinsulina y proinsulina los fragmentos amplificados fueron de 495 y 364, respectivamente (Figura 3).



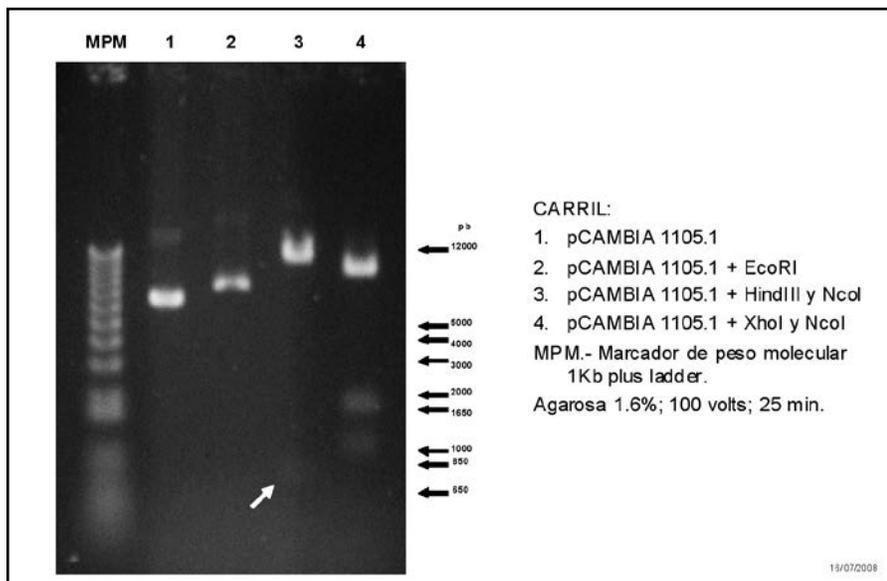
La formación de estos fragmentos en las reacciones de PCR, tanto del cDNA del gen *Ins* completo (preproinsulina) como los amplificados con los oligos M13 que contienen nucleótidos extra que no pertenecen a la región codificante, y el fragmento que no contiene la región correspondiente al péptido señal de la proteína correspondiente (proinsulina), confirma la presencia del cDNA del gen *Ins* en el vector. Para completar caracterización, se está realizando la secuenciación completa del mismo.

### Caracterización del vector pCAMBIA 1105.1

Por otro lado, se recuperó el vector binario pCAMBIA 1105.1 de una cepa de *E. coli* por lisis alcalina y se caracterizó con varias enzimas de restricción que liberaran fragmentos conocidos (Figura 4). Como puede verse, el análisis por electroforesis en gel mostró que la

enzima *EcoRI* sólo lineariza el vector, mientras que dobles restricciones con *HindIII* y *NcoI* o con *XhoI* y *NcoI* produjeron los fragmentos esperados.

Posteriormente se realizó la restricción con las enzimas *Nco I* y *Bgl II* que se usaron para insertar el cDNA del gen *Ins* y el producto de reacción se utilizó para la ligación con el producto de la PCR del vector pDNR-Lib-*Ins* amplificado con los oligos de la pre y proinsulina, sin embargo, hasta el momento no se ha tenido éxito en la ligación. El producto de ligación esperado será empleado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  por electroporación, las cuales serán propagadas en placas con medio LB con estreptomycin y luego utilizadas para la obtención del constructor, que será clonado en *Agrobacterium rhizogenes* para la inducción de raíces transformadas con el cDNA del gen *Ins*.



**Figura 4.** Caracterización del vector pCAMBIA 1105.1 por reacciones de restricción simples y dobles. En el carril 3 la flecha muestra la posición del fragmento menor esperado por la doble restricción, en el carril cuatro las bandas son evidentes.

Establecimiento de cultivos de raíces no transformadas e inducción de raíces transformadas.

Por otro lado, se germinaron semillas de Brócoli en medio mineral semisólido B5 adicionado con las vitaminas correspondientes, pero sin reguladores del crecimiento. Se colocaron cinco semillas por cámara de cultivo y se obtuvo una frecuencia de germinación de una plántula por sistema a las dos semanas de incubación (Figura 5). Las plántulas que alcanzaron mayor cantidad de raíces fueron utilizadas para establecer las líneas de raíces normales no transformadas en cultivo líquido (Figura 6), las cuales serán utilizadas como referencia de comparación del perfil de producción de proteínas con respecto a las líneas de raíces transformadas.



Figura 5. Establecimiento de material vegetal.

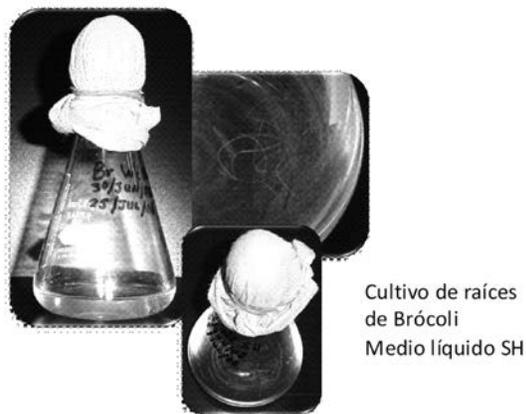
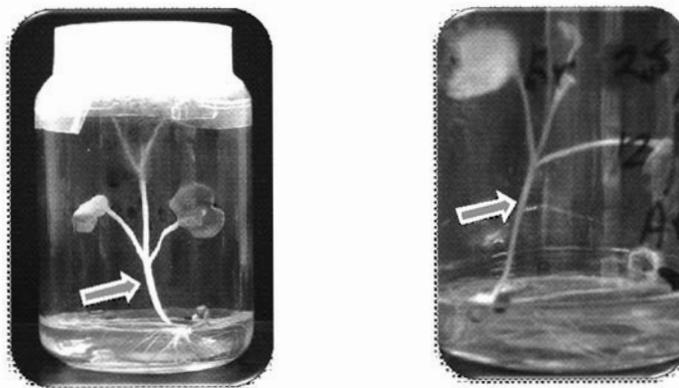


Figura 6. Cultivo de raíces normales de Brócoli recién transferidas a medio de cultivo líquido para su propagación.

Para la inducción de raíces transformadas, varias plántulas vigorosas y de 3-4 semanas de edad fueron utilizadas para infectarlas mediante la técnica de punción con la cepa silvestre de *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 (Figura 7). Como control de referencia para no confundir las raíces transformadas con posibles raíces adventicias sin transformar, varias plántulas fueron punzadas con agua destilada estéril. Como se observa en la Figura 7, sólo las plántulas punzadas con *Agrobacterium* mostraron la formación de tejido radical con las características ageotrópicas y morfología típica de las raíces transformadas.



Plántulas de Brócoli, Medio B5, 3-4 semanas de edad  
Presentan cotiledones y primeras hojas verdaderas  
Punzadas con *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402  
Control negativo: agua

**Figura 7.** Plántulas de Brócoli mostrando el punto de punción con agua estéril (izquierda) y con *Agrobacterium* (derecha). Nótese la presencia de raíces ageotrópicas en la plántula infectada con *Agrobacterium*

De acuerdo con los resultados descritos, se tiene el material genético, los vectores y protocolos adecuados para establecer en breve los cultivos de raíces transformadas con el gen *Ins*.

#### Bibliografía...

C. L. Nykiforuk, J. G. B., E.W. Murray, R. G. Keon, H. J. Goren, N.A. Markley and M. M. Moloney (2006). "Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds." *Plant Biotechnology Journal* 4: 77-85.

Cahill, G. (1971). *Diabetes* 20: 785-799-

Deckers, H., Moloney, M.M. and Baum, A. (1999). "The case for recombinant production of pharmaceutical proteins in plants." *Annu. Rep. Med. Chem.* 34: 237-245.

V. Cardoza, C. N. S., JR. (2004). "Invited review: brassica bitechonology." *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 40: 542–551.