Estrategias de cultivo para el crecimiento de *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido pBSK

Beatriz Mosquera[1], Daniela Cossio[1], David Peña[1], Erika Arcila[1], Johan Pestaña[1], Michael Gonzalez[1], Yamid Orozco[1] y Víctor Manuel Osorio[2]

1. Estudiante de Biotecnología. Ingeniería de Bioprocesos. Facultad de Ciencias de la Salud. I.U. Colegio Mayor de Antioquia.
2. Docente Biotecnología. Facultad de Ciencias de la Salud. I.U. Colegio Mayor de Antioquia
Correspondencia: Victor.osorio@colmayor.edu.co

INTRODUCCIÓN

Para el desarrollo de muchos productos de origen biotecnológico son indispensables **los plásmidos**, una pequeña molécula de ADN circular que se encuentra principalmente en algunas bacterias y que se usan como vectores de clonación en diferentes organismos.

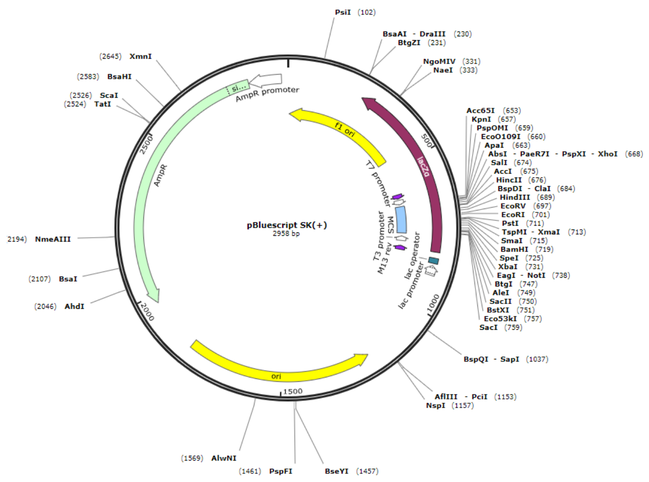

Figura 1. Plásmido pBluescript SK(+) Tomada de http://www.snapgene.com/resources/plasmid__files/basic_cloning_vectors/pBluescript_SK(+)/

El plásmido **pBSK** o pBluescript ll, es un vector diseñado con múltiples sitios de clonación, que se usa para el desarrollo de librerías genómicas y que genera una coloración azul en aquellas colonias que no logran incorporar de forma exitosa una secuencia de ADN.

La producción de plásmidos se da principalmente con cepas recombinantes de ***E. coli***. Una de las más usadas para la replicación de plásmidos es **DH5α,** que se cultiva en medios de cultivo como el LB y que puede aumentar su crecimiento celular al adicionar al medio de cultivo diferentes fuentes de carbono.

Figura 2. Placa de agar LB con colonias transfor-madas con pBSK. Tomada de https://en.wikipedia.org/wiki/Blue-white_screen

OBJETIVO

Evaluar el crecimiento celular de una cepa de *E. coli* DH5α transformada con el plásmido pBSK, en diferentes medios de cultivo y con concentraciones celulares iniciales a escala de erlenmeyer, y el efecto de diferentes condiciones de fermentación en reactor de tanque agitado.

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYOS A ESCALA DE ERLENMEYER

Inóculo:
Cultivo en caldo LB (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 10g/l) + ampicilina (100 µg/ml), por 24 horas a 37°C

Factores evaluados:

MEDIO DE CULTIVO
1. LB
2. LB + sacarosa (10g/l)
3. LB + glicerol (5 g/l)

DENSIDAD ÓPTICA A 600 nm DEL INÓCULO
1. Alta
2. Baja (inóculo inicial diluído 1:10)

Agitación: 180 rpm, Temperatura: 37°C, pH del medio: 7.0, tiempo de incubación: 24 h

Análisis estadístico: Anova multifactorial con interacción de primer grado y prueba de diferencia de medias de Tukey, con α = 0.05

ENSAYOS EXPLORATORIOS EN BIORREACTOR

	AGITACIÓN	AIREACIÓN
1	300 rpm	0 vvm
2	300 rpm	1 vvm
3	0 rpm	1 vvm

Volumen efectivo: 5 L
Medio de cultivo: LB+glicerol
Ampicilina: 100 µg/ml
Antiespumante: 0.1% v/v
Temperatura: 37°C

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

Densidad óptica a 600 nm

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

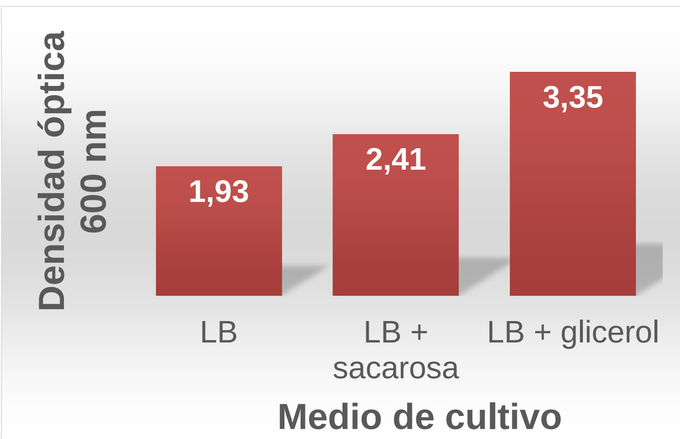

Figura 3. Densidad óptica promedio para los ensayos en Erlenmeyer según el medio de cultivo

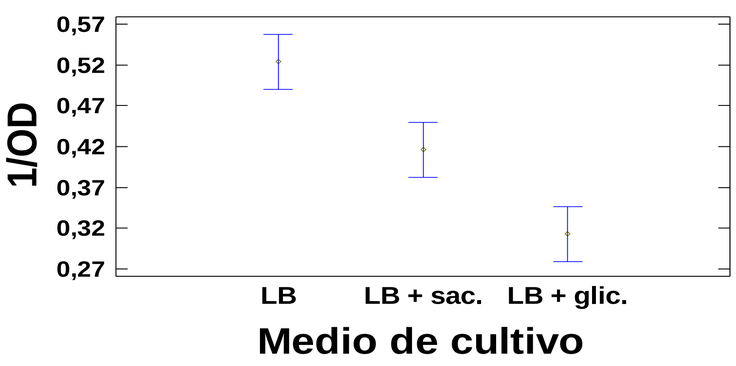

Figura 4. Medias para 1/OD según prueba de Tukey con α=0.05

Se realizó transformación de los valores de OD para garantizar normalidad de los datos e independencia de varianzas.

No hubo diferencias para las OD obtenidas según la cantidad de inóculo inicial. Sí hubo un efecto significativo del medio de cultivo sobre 1/OD. No se presentó interacción entre el medio de cultivo y el inóculo inicial.

Se encontraron diferencias signi-ficativas en las OD según la prueba de Tukey para cada uno de los tres medios evaluados.

El mayor crecimiento celular en biorreactor se obtuvo cuando el cultivo fue aireado o agitado y aireado simultáneamente.

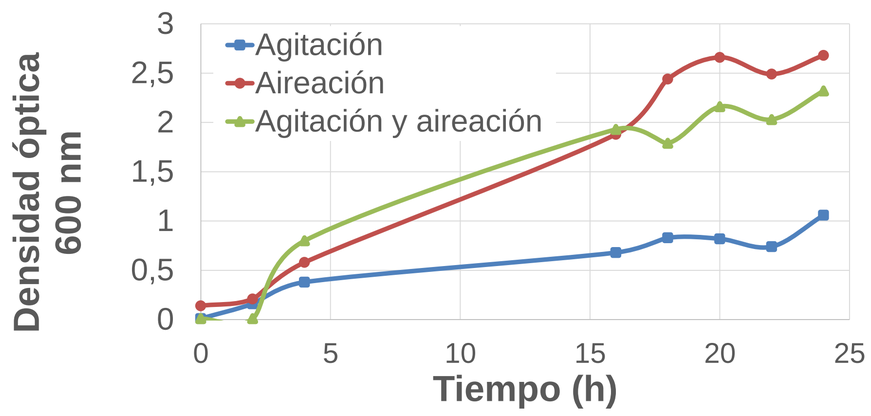

Figura 5. Crecimiento celular en biorreactor de tanque agitado bajo diferentes condiciones de aireación y agitación

CONCLUSIÓN

Algunas condiciones de cultivo mejoran el crecimiento de *E.coli* DH5α – pBSK(+) lo que puede representar una mayor recuperación del plásmido

REFERENCIAS

Borja, Z., Gheorghe, M., Ramirez, O. T., & Lara, A. R. (2014). Vacunas de ADN plasmídico: Una herramienta terapéutica emergente. *Bio Tecnologia*, *17*(3), 87–109.

Musa, H. H., Zhang, W., Tao, J., Guan, Y., Duan, X., Yang, Y., … Zhu, G. (2014). Cloning and expression of FimA-c3d recombinant protein. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *12*(1), 55–59.

Zheng, S., Friehs, K., He, N., Deng, X., Li, Q., He, Z., … Lu, Y. (2007). Optimization of medium components for plasmid production by recombinant *E. coli* DH5α pUK21CMVβ1.2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *12*(3), 213–221.

INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA
Alcaldía de Medellín Cuenta con vos
SIFACS
GIB Grupo de Investigación en Biociencias
mi U Colmayor Es calidad