

Comparación de dos métodos de extracción de ADN plasmídico en *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*.

Eiber Briones-Velazquez ^a, Luis Bermudez-Humaran ^b, Isaias Balderas-Renteria^{a*}

^a Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, Facultad de Ciencias Químicas, UANL, Monterrey, NL, México.

^b French National Institute for Agricultural Research (INRA), paris, francia.

* E-mail de autor responsable: ibalderas@hotmail.com

Palabras clave: Diabetes Mellitus, Bacterias ácido lácticas, Extracción de ADN plasmídico

Introducción

La diabetes mellitus se define como una enfermedad endocrino-metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas, y proteínas; puede deberse a una deficiencia en la secreción de insulina, resistencia a la acción de ésta, o una combinación de ambas¹.

Las cifras a nivel mundial en el número de casos están en aumento ya que el año 2015 se calculó que existían en el mundo 415 millones de personas afectadas por diabetes mellitus, y se calcula que esta cifra aumentará a 642 millones para el año 2040. México, en el año 2015 se colocó en el lugar número 6 a nivel mundial con una cifra de 11.5 millones de personas afectadas y se estima que ésta aumentará a 20.6 millones para el año 2040².

La investigación para tratamiento de esta enfermedad se enfoca en la búsqueda de nuevos fármacos de origen natural así como biológicos, además de buscar nuevas formas farmacéuticas para administración más sencilla y que sea aceptada por el paciente ya que esto ocasiona una falta de apego al tratamiento, el ejemplo más común se tiene en el uso de la insulina en el cual las inyecciones constantes provoquen un rechazo de este por el paciente y una consecuente alteración metabólica que pueda desencadenar complicaciones en un futuro. Lo anterior abre la oportunidad para el uso de las bacterias ácido lácticas para utilizarlas como un medio de transporte de fármacos, ya que anteriormente han sido utilizadas con este fin.

Parte experimental

Para la realización de los distintos protocolos de extracción se utilizó la cepa de *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* MG1363 la cual porta el plásmido pLB333, utilizando cloranfenicol como marcador de selección. El primer método que se utilizó fue proporcionado por la compañía MoBiTec (2015)³. Por último se empleó el protocolo establecido por Langella et al (1993) modificado. Se verificó la extracción de ADN plasmídico mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% usando buffer TAE 1x (Tris, acetato y EDTA), el colorante Blue gel, además del marcador de peso molecular con lo cual se espera observar una banda en aproximadamente 3330 pares de bases (pb). Se corrió a 120 V durante 30 minutos⁴, con se espera la visualización del plásmido

Resultados y discusión

Los resultados de la electroforesis de los 2 protocolos realizados mostraron que las muestras obtenidas por el método de MoBiTec presentaron una amplia degradación de las bandas, lo anterior probablemente debido a la ausencia de potentes agentes oxidantes puesto que se trata de una variante de los métodos de lisis alcalina. En contraparte con el método de Langella que lleva entre los componentes del protocolo RNasa A la cual ayuda a la remoción de los restos de RNA que a su vez dificultan la visualización de las bandas en los geles, además del empleo de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, el cual al precipitar las proteínas, lípidos y restos celulares y el empleo de 2 lavados con etanol al 70 % (para eliminar la mayor cantidad posible de sales), mostraron una mayor eficacia en la obtención del ADN plasmídico, al observar bandas nítidas y robustas sin rastros de degradación aparente⁵.

Conclusiones

Se logró la extracción de DNA plasmídico mediante el método Langella et al (1993) modificado, mostrando bandas totalmente nítidas sin presencia de degradación. Este método a pesar de que conlleva un mayor tiempo y manipulación del DNA en comparación con el sugerido por MoBiTec (2015) fue el que mostró un mejor resultado.

Referencias

1. Balderas I. *Diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Un abordaje multidisciplinario*. Vol 1.; Manual Moderno: Mexico, 2015; 110-132.
2. Instituto Nacional de Salud Publica. <http://www.insp.mx> (consultado el 07/03/2016)
3. MoBiTec. http://www.mobitec.com/cms/products/bio/04_vector_sys/Vs-ELV01100.pdf?pdf=VS-ELV01100.pdf (consultado el 06/07/16).
4. Bermudez, H. desarrollo de una Vacuna Probiótica para Combatir el Cáncer Cérvico-Uterino: Construcción de Cepas Recombinantes de *Lactococcus lactis* que expresan la E7 del VPH-16 y la IL-12 murina. Tesis de Doctorado, UANL. Monterrey Nuevo Leon, mayo 2002.
5. Sambrook, J. Russell, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ed*; Cold Spring: New York, 2012; pp 51-77.