

Póster

Modificación de cepas de E. coli B para su uso como herramienta en experimentos de RNA interferente



Daniel Díaz, Manuel J Muñoz, Andrés Garzón

Área de Genética. Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), Carretera de Utrera Km 1 41013 Sevilla

Palabras clave: OP50, BL21(DE3), HT115(DE3), C. elegans, dsRNA

RESUMEN

Motivación: Los experimentos de RNA interferente (RNAi) suponen una herramienta muy potente para analizar la función de los genes en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se basa en el silenciamiento de genes de manera selectiva al incorporar *C. elegans* RNA de doble cadena (dsRNA) producido por la bacteria de la que se alimenta. Mientras que para los experimentos de RNAi la bacteria empleada es la cepa de *Escherichia coli* K HT115(DE3), para el resto de técnicas en *C. elegans* la bacteria empleada como fuente de alimento es la cepa de *E. coli* B OP50. Las cepas de *E. coli* K y B presentan diferencias significativas en su genoma que repercuten tanto a nivel proteómico (Yoon et al., 2012) como en la composición de metabolitos (Reinke et al., 2012). Estas diferencias pueden verse reflejadas en el fenotipo de *C. elegans* (Pang y Curran, 2014), lo que supone un problema a la hora de comparar los datos obtenidos de experimentos en los que se hayan empleado cepas de *E. coli* distintas como fuente de alimento. El diseño de una cepa de *E. coli* B con capacidad de producir dsRNA se postula como una alternativa al uso de HT115(DE3).

Métodos: Las cepas de *E. coli* B empleadas como base para la construcción de la cepa productora de dsRNA son BL21(DE3) y OP50. Se incorporará una mutación de la RNasa III (degrada dsRNA) tanto en BL21(DE3) como en OP50, y se inactivará el sistema de restricción EcoB en OP50 mediante transducción por fago P1 (Thomason et al., 2007), y la técnica de recombinación mediada por la recombinasa de lambda red (Datsenko y Wanner, 2000). Todos los experimentos se realizarán paralelamente sobre la cepa de *E. coli* K12wt como control.

Resultados: Se ha construido una cepa derivada de BL21(DE3) con los mismos componentes que le permiten a HT115 (DE3) sintetizar dsRNA. La construcción de la cepa derivada de OP50 se encuentra en su fase final.

Conclusiones: La cepa construida a partir de BL21(DE3) consta, en teoría, de la capacidad de producir dsRNA, por lo que futuros ensayos incluirán experimentos de RNAi en *C. elegans* comparando su uso con el de HT115(DE3). Estos ensayos también se realizarán con la cepa derivada de OP50 una vez que finalice su construcción. Los experimentos realizados sobre OP50 tienen una menor eficiencia que cuando se realizan sobre K12wt, y las cepas obtenidas presentan diferencias significativas en la velocidad de crecimiento, lo cual sustenta el hecho de que las cepas son distintas (Yoon et al., 2012).

BIBLIOGRAFIA

- Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products (2000) PNAS 97(12):6640-6645
- Pang S, Curran SP. Adaptive capacity to bacterial diet modulates aging in *C. Elegans* (2014) Cell Metab. 19(2):221-31
- Reinke SN, Hu X, Sykes BD, Lemire BD. *Caenorhabditis elegans* diet significantly affects metabolic profile, mitochondrial DNA levels, lifespan and brood size (2010) Mol Genet Metab. 100(3):274-82
- Thomason LC, Constantino N, Court DL. *E.coli* genome manipulation by P1 transduction (2007) Curr Protoc Mol Biol. 1:1.17
- Yoon SH, Shim JH, Han MJ, Jeong H, Lee SY, Kwang T, Kim JF, Lee HC, Xia XX, Lee DH. Comparative multi-omics systems analysis of *Escherichia coli* strains B and K-12 (2012) Genome Biol, 13:R37