

Comparación de la eficiencia de transformación entre diferentes cepas de *E. coli*

Comparison of transformation efficiency in different *E. coli* strains

SAMANTHA YOLOTZIN GARCÍA-CÁRDENAS^{1,2}, DANIELA GRISSEL RUVALCABA-HIDROGO^{1,2}, CARMEN CAROLINA ALVARADO-GONZÁLEZ^{1,2}, MARÍA GEORGINA GÓMEZ-FIERRO^{1,2}, ÓSCAR ENRIQUE JUÁREZ-ACOSTA^{1,2}, MAYELA ROSARIO ESPINOZA-DUARTE^{1,2}, GERARDO PÁVEL ESPINO-SOLÍS^{1,2,3}

Recibido: Diciembre 18, 2018

Aceptado: Mayo 23, 2019

Resumen

La transformación es la introducción y expresión de ADN exógeno por células bacterianas. La eficiencia de la transformación puede medirse en unidades formadoras de colonia/ml (UFC/ml) y es susceptible al método utilizado, a la cepa bacteriana utilizada para la expresión y al propio vector. En este trabajo se busca evaluar las diferencias en la eficiencia de transformación de dos plásmidos de expresión (pExp-Lib y pSF-CMV-Ub-puro-SV40 Ori SbfI), en cuatro cepas diferentes de *E. coli* (DH5 α , BL21, XL1-Blue y TG1) utilizando un método de preparación de células competentes basado en el uso de MgCl₂/CaCl₂. En todas las cepas utilizadas, el crecimiento bacteriano y la eficiencia de transformación fueron mayores para las cepas con el vector pExp, a excepción de BL21, donde la eficiencia fue más elevada para el vector pSF.

Palabras clave: *E. coli*, transformación, choque térmico, método MgCl₂/CaCl₂.

Abstract

The transformation is the introduction and expression of exogenous DNA into bacterial cells. Transformation efficiency is susceptible to the method used, the bacterial strain used for the expression and the vector itself, and it can be measured in colony forming units/ml (CFU/ml). It was evaluated by the MgCl₂/CaCl₂ method with thermal shock in four strains of *Escherichia coli* (DH5 α , BL21, TG1 and XL1-Blue) with two plasmids (pExp-Lib and pSF-CMV-Ub-puro SV40 Ori SbfI). Strains evaluated bacterial growth and transformation efficiency were higher in strains added with pExp, with exception of BL21, where vector pSF, displayed higher transformation efficiency.

Keywords: *E. coli*, transformation, thermal shock, MgCl₂/CaCl₂ method

¹ UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA. FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS. LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL. CIRCUITO UNIVERSITARIO 31109, CAMPUS II UACH, CHIHUAHUA, CHIH. TEL. (614) 461-8314.

² UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA. FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS. LABORATORIO NACIONAL DE CITOMETRÍA DE FLUJO, SEDE CHIHUAHUA. CIRCUITO UNIVERSITARIO 31109, CAMPUS II UACH, CHIHUAHUA, CHIH. TEL. (614) 461-8314.

³ DIRECCIÓN ELECTRÓNICA DEL AUTOR DE CORRESPONDENCIA: GESPINOS@UACH.MX

Introducción

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) fue descrita y aislada por primera vez en 1884 por el microbiólogo y pediatra alemán Theodor Escherich, él la llamó como *Bacterium coli commune* debido a los estudios que realizaba con microorganismos en el intestino de niños y su papel en la digestión (Blount, 2015).

En el siglo XX, en los inicios de los años 40, esta bacteria comienza a ser empleada como modelo experimental (Judson, 1996). En el presente, es posible encontrar entre 10,000-18,000 cepas de *E. coli* de acuerdo al The *Escherichia Coli* Genetic Stock Center (<http://cgsc2.biology.yale.edu>) y *American Type Culture Collection* (www.atcc.org).

La facilidad y económico que resulta trabajar con esta bacteria, además de su versatilidad, han hecho de ella un modelo experimental ampliamente usado alrededor del mundo por diferentes empresas biotecnológicas y grupos de investigación. Se estima que en el año 2011 este modelo bacteriano aportó a la economía global \$ 500 mil millones de dólares (Bruschi *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012; Baeshen *et al.*, 2015).

En genética, la transformación se define como la introducción y expresión de ADN exógeno, natural o diseñado genéticamente, por células bacterianas (Chen y Dubnau, 2004; Roychoudhury *et al.*, 2009). Las células bacterianas que tienen la capacidad de introducir y expresar ADN exógeno se conocen como células competentes (Roychoudhury *et al.*, 2009; Blount, 2015; Kostylev *et al.*, 2015). La transformación puede llevarse a cabo de manera natural o por medios artificiales en bacterias. La transformación natural se da gracias a la presencia de proteínas en la superficie exterior de las bacterias que pueden unirse al ADN y transportarlo al interior de la célula. Este fenómeno se da en diversos géneros de bacterias, como *Micrococcus*, *Haemophilus*, *Bacillus* y *Streptococcus* (Roychoudhury *et al.*, 2009; Blount, 2015; Kostylev *et al.*, 2015). Sin embargo, ese tipo de transformación raramente ocurre en la mayoría de las bacterias, requiriendo de su inducción por métodos artificiales (Chen y Dubnau, 2004; Yoshida y Sato, 2009; Chan *et al.*, 2013).

Uno de los métodos más utilizado y económico de preparación de células competentes de *E. coli* es con cloruro de calcio (CaCl_2) y transformación por choque térmico, reportado por Mendel y Higa en 1970 (Mandel y Higa, 1970). El proceso de transformación genética consta de cuatro etapas: desarrollo de un estado de competencia en la célula, unión de la molécula de ADN a la superficie celular, su entrada y procesamiento y, finalmente, la expresión fenotípica del nuevo genotipo resultante (Hanahan, 1983; Blount, 2015). El mecanismo exacto por el cual el cloruro de calcio media el proceso de transformación artificial sigue siendo una incógnita. Resultados previos sugieren que el calcio facilita la adsorción del ADN sobre la superficie celular y el choque térmico permite la entrada del ADN adsorbido al citoplasma de la célula (Sinha y Redfield, 2012; Choi *et al.*, 2013; Rahimzadeh *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

La bacteria *E. coli* tiene características muy atractivas, como un crecimiento acelerado, la transformación rápida de ADN exógeno y la fácil obtención de cultivos de alta densidad celular (Rosano y Ceccarelli, 2014). Gracias a esta versatilidad, diversos trabajos de investigación con *E. coli* han llevado a muchos avances en una variedad de campos como la biología molecular, fisiología y genética; se puede mencionar la descripción del código genético (Crick *et al.*, 1961), replicación del ADN (Lehman *et al.*, 1958), transcripción (Blount, 2015), y el descubrimiento de las enzimas de restricción (Linn y Arber, 1968; Meselson y Yuan, 1968). En el campo farmacéutico ha permitido la síntesis *in vivo* de proteínas recombinantes terapéuticas como la insulina (tratamiento de diabetes), interleucina 2 (melanoma metastásico), interferón beta humano (esclerosis múltiple), taxol (cáncer), etc. (Kamionka, 2011; Huang *et al.*, 2012; Baeshen *et al.*, 2015). En

aplicaciones de ingeniería genética y biotecnología, en este modelo bacteriano se han desarrollado técnicas y tecnologías de ingeniería genética incluidas la clonación molecular y ADN recombinante (Cohen *et al.*, 1972; Cohen *et al.*, 1973). Esta bacteria ha sido también utilizada para la producción de biocombustibles (Liu y Khosla, 2010; Janssen y Steinbuchel, 2014), y químicos industriales como el fenol (Kim *et al.*, 2014) y etanol (Hildebrand *et al.*, 2013).

La eficiencia de transformación se expresa matemáticamente como el cociente del número total de células bacterianas que expresan el marcador de resistencia a antibiótico, y la cantidad de ADN que fue utilizado en el experimento (Roychoudhury *et al.*, 2009). Esta eficiencia de transformación depende directamente de la cepa bacteriana y plásmido empleados. La cantidad de plásmidos se estima en 78,028 de acuerdo al repositorio de plásmidos Addgene (<https://www.addgene.org>) y las secuencias disponibles depositadas en la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), es de 10,892 (Brooks *et al.*, 2019), cada uno de ellos con características diferentes como: replicones, promotores, marcadores, sitios de clonación múltiple, entre otras (Rosano y Ceccarelli, 2014). La transformación de *E. coli* con plásmidos por requisito incluye uno o varios genes que proveen resistencia a antibióticos, se dice que un procedimiento de transformación es exitoso cuando aparecen/crecen colonias aisladas en placas con medio selectivo. Uno de los criterios utilizados para evaluar este evento es la eficiencia de transformación (Hanahan, 1983).

La introducción del ADN a la célula bacteriana no es un proceso sencillo, en algunos casos utilizando células competentes comerciales la eficiencia de transformación alcanza entre 10^9 - 10^{10} UFC/ μ g (unidades formadoras de colonias/ μ g de plásmido empleado). Por esta razón, la transformación puede ser considerada como el paso limitante en algunas aplicaciones, como la construcción de librerías de ADN y de expresión de genes (Aachmann y Aune, 2009).

Las cepas de *E. coli* DH5a y XL1-blue, permiten hacer procedimientos de clonación y la selección con el sistema azul/blanco con una interrupción en el gen *lacZ* Δ M15, tienen alta estabilidad en los insertos debido a una mutación en el gen *recA1* y permiten una alta producción y calidad de ADN por la mutación en *endA*.

Las células competentes XL-1 blue se utilizan para el rescate de fagemido de una sola hebra de ADN y la transformación del ADN metilado (Han *et al.*, 2001; Kostylev *et al.*, 2015). La cepa BL21 (DE3) pLysS permite la expresión de proteínas de alta eficiencia de cualquier gen que esté bajo el control de un promotor T7. La cepa transporta tanto el lisógeno DE3 como el plásmido pLysS, que se expresa de forma constitutiva niveles bajos de lisozima T7, que reduce la expresión basal de genes recombinantes mediante la inhibición de los niveles basales de ARN polimerasa T7. La alta expresión de proteínas se logra mediante la adición de IPTG (Isopropyl β -D -1-thiogalactopyranoside) (Jeong *et al.*, 2015). Las células competentes TG1 son el estándar de oro para el despliegue en fagos de anticuerpos o la creación de bibliotecas de despliegue de fagos de péptidos. Esta cepa se utiliza ampliamente para crear bibliotecas más grandes y hacer métodos de «*screening*» rápidos (Carmen y Jermutus, 2002; Fryszczyn *et al.*, 2011).

En este trabajo se está evaluando la compatibilidad de dos plásmidos con cuatro diferentes cepas de *E. coli*: el interés en pEXP-Lib (pEXP) reside en la versatilidad que presenta para ser empleado en la construcción de librerías de cADN, por otra parte, permite hacer librerías de expresión en células de mamífero; debido a que contiene un cassette de resistencia puromicina, es posible seleccionar células resistentes a este antibiótico, lo cual se traduce en la obtención líneas celulares estables productoras de la proteína de interés. El plásmido pSF-CMV-Ub-puro-SV40 Ori Sbfl (pSF), contiene el origen de replicación del virus de simio 40 (SV40), lo cual le permite aumentar los niveles de expresión del gen de interés. Este vector también se puede usar para forzar la recombinación en el genoma de células de mamíferos que no expresan el antígeno T grande de SV40 después de la transfección y la selección de puromicina.

El enfoque de nuestro laboratorio es de aplicaciones biotecnológicas y de investigación traslacional, por lo que es de importancia optimizar el procedimiento de transformación y hacerlo más eficiente para impactar en la reducción de costos y tiempo invertido. En este trabajo se analiza la compatibilidad y eficiencia de transformación de dos plásmidos (pExp-Lib y pSF-CMV-Ub-puro-SV40 Ori Sbfl), en cuatro cepas diferentes de *E. coli* (DH5 α ,

BL21, XL1-Blue y TG1) utilizando un método de preparación de células competentes modificado, basado en el uso de $MgCl_2/CaCl_2$, con el racional de aumentar la carga electrostática en la superficie las bacterias al aumentar la cantidad de iones y de esta manera aumentar la adsorción de ADN exógeno.

Materiales y métodos

Lugar y año del estudio. El presente trabajo se llevó a cabo en el periodo comprendido entre febrero y agosto del año 2018 en el Laboratorio de Investigación Traslacional y Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, ubicados en la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH).

Preparación de células quimiocompetentes. Se estruaron las cuatro diferentes cepas bacterianas de *E. coli* (DH5 α , BL21, TG1 y XL1-Blue) en placas Petri con medio LB-agar (BD Ref. 244520) sin antibiótico y se incubaron a 37 °C toda la noche. Se tomó una colonia aislada para inocular 3 ml de medio LB líquido (BD Ref. 244620) sin antibiótico y se incubó a 37 °C durante toda la noche a 100 rpm. Se transfirieron 500 μ l de cada precultivo a matraces con 50 ml de medio LB sin antibiótico y se incubaron con agitación (100 rpm) por 2-3 horas hasta alcanzar una OD₆₀₀ (densidad óptica) de 4.5 - 5.5. Se centrifugaron a 4000 rpm y 4 °C por 15 min y se descartó el sobrenadante. Se disolvió la biomasa bacteriana en 20 ml de disolución con $MgCl_2/CaCl_2$ (80 mM y 50 mM respectivamente) previamente enfriada, y se incubó por 90 min en hielo. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones (a 4000 rpm y 4 °C por 15 min) y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron los pellets en 2 ml de la disolución $MgCl_2/CaCl_2$ (80 mM y 50 mM respectivamente) fría, se adicionaron 2 ml de glicerol, se homogenizaron las células y se prepararon alícuotas de 100 μ l. Finalmente, se almacenaron a - 80 °C.

Una vez que se tuvieron las células quimiocompetentes de todas las cepas, se sometieron a un proceso de transformación con dos diferentes vectores cada una, pExp-Lib (Clontech, #Cat. 635003) y pSF-CMV-Ub-puro-SV40 Ori Sbfl (Oxford Genetics, Código OG136).

Transformación. Se añadieron 1.2613×10^{11} copias de cada vector a 100 μ l de cada cepa de quimiocompetentes y se colocaron en hielo por 30

min, después, en baño maría a 42 °C por 1 min, y nuevamente en hielo por 2 min. Se añadieron 250 μ l de medio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), en zona estéril, y se incubó con agitación (100 rpm, 37 °C) por una hora. Se sembraron 100 μ l en medio agar LB selectivo. Las cuatro cepas transformadas con pExp-Lib fueron plaqueadas en medio selectivo con ampicilina [50 μ g/ml] (Sigma, #Cat. A9528) y las cepas con pSF-CMV-Ub-puro-SV40 Ori Sbfl en medio selectivo con kanamicina [40 μ g/ml] (Sigma, #Cat. K1876). Se incubaron a 37 °C por toda la noche.

Método estadístico. Se calculó la eficiencia de transformación para cada cultivo, y las eficiencias de cada cepa con cada plásmido se compararon con respecto a la eficiencia de DH5 α , con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, este método estadístico se engloba bajo la denominación de contrastes para comparaciones múltiples, ya que su objetivo fundamental es comparar entre sí medias de tratamientos o grupos de ellas, y permite superar las dificultades que surgen al aumentar el número de grupos a comparar. En donde los parámetros de comparación se expresan en términos del *p value* = < 0.0001 (***) significativo; (**) = medianamente significativo; ns = no significativo. El orden y análisis de los datos se llevó a cabo con los programas Microsoft Excel y Graph Pad Prism v5.0.

Resultados

Se evaluó la compatibilidad de los plásmidos pSF-CMV-Ub-puro-SV40 (pSF) y pExp-Lib (pExp) con dos cepas multicopia (DH5 α y XL1-blue), y dos cepas de interés biotecnológico utilizadas para la expresión de proteínas (BL21 y TG1). Las cepas utilizadas se adecuaron para hacerlas competentes con un protocolo modificado con $MgCl_2$ y $CaCl_2$ a concentraciones de 80 mM y 50 mM, respectivamente, con el racional de aumentar la capacidad de las bacterias para internalizar ADN exógeno. El protocolo de transformación empleado se describe en materiales y métodos, las bacterias se incubaron a 37 °C durante toda la noche, para después hacer el conteo de colonias y determinar el proceso de transformación más efectivo. Los cultivos con las combinaciones bacteria-plásmido más efectivos, es decir, los que presentaron mayor número de colonias por placa fueron aquellos

donde se utilizó la cepa XL1-Blue, sin importar el plásmido con que fue transformada (Figura 1A-E). Se observó que las colonias obtenidas en la cepa BL21 mostraron mayor tamaño (Figura 1B-F), en comparación con las colonias de las cepas XL1-Blue (Figura 1A-E) y DH5 α (Figura 1D-H). En este trabajo, la eficiencia de transformación se representa en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Las cepas transformadas con el plásmido pSF no mostraron diferencias significativas entre ellas, sin embargo, las bacterias DH5 α mostraron diferencia significativa de transformación con respecto a las cepas XL1-Blue, y medianamente significativa con

BL21 y TG1, como se muestra en la Figura 2A. Al calcular la eficiencia de transformación en las cepas tratadas con el plásmido pExp, se observó que la variabilidad entre estas fue muy marcada. Se encontró una diferencia significativa entre las cepas DH5 α y XL1-Blue, medianamente significativa entre DH5 α y TG1 (Figura 2B). En contraste, las cepas DH5 α y BL21 no mostraron una diferencia significativa en su eficiencia de transformación (Figura 2B). En el caso del plásmido pExp, la cepa que mostró mayor eficiencia de transformación fue con la XL1-Blue, medianamente con las bacterias TG1 y la cepa con menor eficiencia DH5 α (Figura 2B).

Figura 1. Evaluación de la eficiencia de transformación con los vectores de expresión pSF-CMV-Ub-puro-SV40 Ori Sbf1 (Kan^r) y pExp-Lib (Amp^r) en cuatro cepas de *E. coli*: XL1-Blue (A, E), BL21 (B, F), TG1 (C, G) y DH5 α (D, H).

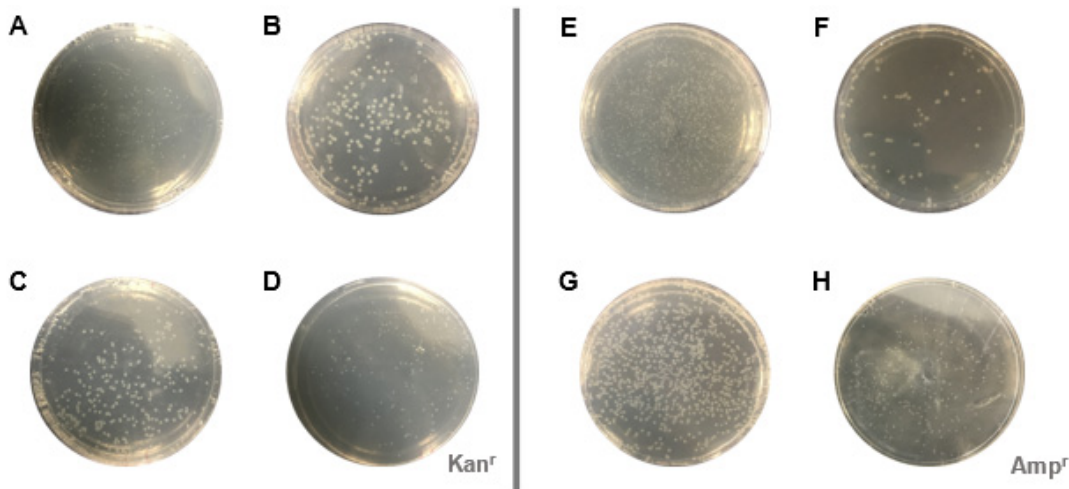
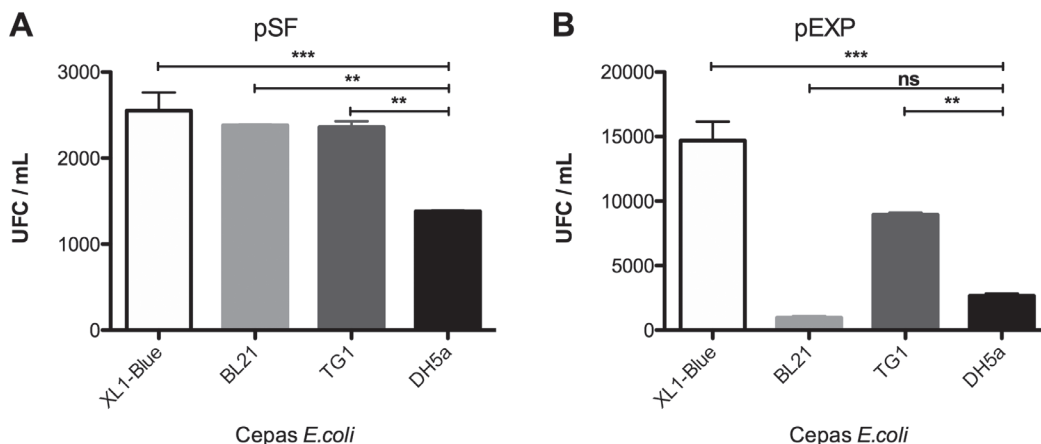
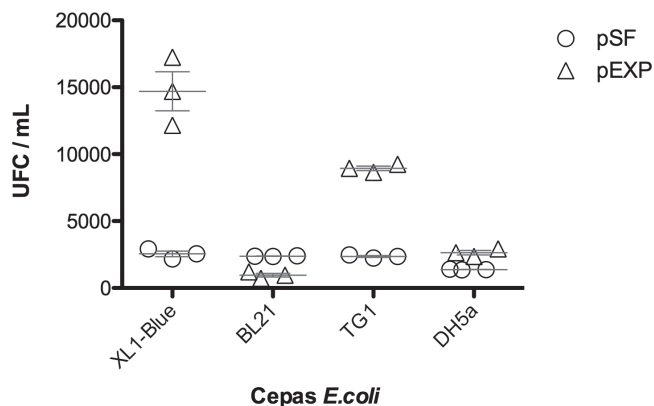


Figura 2. Eficiencia de transformación de diferentes cepas de *E. coli* y su comparación con DH5 α . A) Eficiencia de transformación con pSF-CMV-Ub-puro-SV40 Ori Sbf1 en diferentes cepas de *E. coli*. Comparación múltiple de Bonferroni. P value = 0.0003. B) Eficiencia de transformación con pExp-Lib en diferentes cepas de *E. coli*. Comparación múltiple de Bonferroni. P value = <0.0001. *** = significativo, ** = medianamente significativo, ns = no significativo.



En la Figura 3 se muestra un resumen de los resultados obtenidos al comparar la eficiencia de transformación entre las distintas cepas bacterianas. Se observó que el proceso de transformación más eficiente fue en los tratamientos donde las bacterias XL1-Blue y TG1 se transformaron con el plásmido pExp. La eficiencia de transformación en las cepas BL21 y DH5a no muestra diferencias notables al ser transformadas con ambos plásmidos. Los resultados obtenidos con el plásmido pExp muestran que la eficiencia de transformación incrementa tres veces el número de unidades formadoras de colonias al combinar la cepa XL1-Blue, y se duplica en la cepa TG1 en comparación con vector pSF. Los resultados en términos de la compatibilidad que presentan los plásmidos pExp y pSF con las cepas de *E. coli* en donde fueron evaluadas, sugieren que la cepa XL1-Blue y el vector pExp son los que presentan el mejor rendimiento de transformación.

Figura 3. Análisis de eficiencia de transformación (en UFC/ml) de cepas de *E. coli*, comparando los dos vectores de expresión utilizados (pSF-CMV-Ub-puro-SV40 Ori SbfI y pExp-Lib) con cada cepa bacteriana.



Discusión

La clonación de productos de PCR en plásmidos es una práctica común y necesaria en pasos subsecuentes para llevar a cabo experimentos que involucran ingeniería genética. La eficiencia de transformación es muy importante, puede afectar directamente el éxito de todos los ensayos posteriores y puede verse alterada por factores como la calidad

de las células competentes; por lo tanto, el establecimiento de un método químico de transformación eficiente y rápido es deseable en cualquier laboratorio de investigación que requiera de la biología molecular. Los protocolos para preparar las células competentes son diversos, y en aquellos donde se emplea el choque térmico para hacer la transformación, las bacterias son tratadas con CaCl_2 a una concentración que oscila entre 30-100 mM (Mandel y Higa, 1970; Chan *et al.*, 2013; Serrano-Rivero, 2013; Liu *et al.*, 2018), el papel del Ca_2 es destruir la matriz de lípidos en la membrana celular para formar un complejo con poli-hidroxi-butrato y poli-fosfato inorgánico en la membrana celular, para facilitar la infiltración de ADN exógeno (Cohen *et al.*, 1992; Pope y Kent, 1996). Existen casos en que la preparación de las células competentes con CaCl_2 no es lo suficientemente efectivo, y tienen que modificarse los protocolos agregando MgCl_2 o MnCl_2 con la finalidad de hacer más eficiente la transformación de las bacterias (Chan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018). Se ha reportado que la baja eficiencia de transformación puede ser causada por la propiedad antibacteriana de LFCin-B (Brogden, 2005) y puede ser incrementada al agregar una concentración moderada/alta de MnCl_2 (50 mM) y CaCl_2 (30 mM), debido a que las propiedades antibacterianas de LFCin-B pueden ser inhibidas por concentraciones de Ca_2 y Mn_2 sin perder la permeabilidad de la membrana celular (da Silva *et al.*, 2012).

En este trabajo se evaluaron cuatro cepas de *E. coli* con diferentes características y aplicaciones. Fueron modificadas para hacerlas competentes y aumentar su capacidad de internalizar DNA exógeno, con un protocolo que incluye MgCl_2 y CaCl_2 a concentraciones de 80 mM y 50 mM, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron expresados en términos del número de colonias para determinar el proceso de transformación más efectivo. Se formuló una matriz de variantes experimentales donde a dos plásmidos (pExp y pSF) se les determinó su compatibilidad con las cepas seleccionadas. Al valorar las eficiencias de transformación entre los plásmidos seleccionados, los resultados obtenidos con pExp sugieren que existe una mayor compatibilidad con las cepas bacterianas XL1-Blue y TG1, no así, con las cepas BL21 y DH5a (Figura 3).

No existe un consenso sobre la metodología más adecuada para obtener una mejor eficiencia de transformación. Dentro de los métodos de transformación química, existen diferentes variables que influyen en el proceso, como la cepa y plásmido utilizados (y la cantidad de ambos), el método para hacer competentes las células, con particular énfasis en las soluciones utilizadas, el medio de recuperación utilizado, y el gen de resistencia en cada plásmido. No existe un estándar para determinar la eficiencia de transformación, ya sea en función de la cantidad de ADN o en UFC (Unidades Formadoras de Colonia).

Conclusiones


En el presente estudio, fue modificado un método químico clásico para la obtención de células competentes; las bacterias fueron preparadas con una solución $MgCl_2$ (80 mM) y $CaCl_2$ (50 mM) con la finalidad de hacerlas más eficientes en la internalización de los plásmidos seleccionados. Por la importancia y aplicaciones en el área biotecnológica, los plásmidos pSF-CMV-Ub-puro-SV40 (pSF) y pExp-Lib (pExp) fueron evaluados en cepas de *E. coli* con características y aplicaciones especializadas en diversas técnicas de biología molecular. Dos de estas cepas son reconocidas por ser buenas productoras-duplicadoras de ADN (DH5 α y XL1-blue), y las otras dos son utilizadas para la expresión de proteína recombinante (BL21 y TG1). En conclusión, al comparar la eficiencia de transformación entre las distintas cepas bacterianas y su afinidad por los plásmidos empleados, pExp mostró el mejor desempeño al ser ensayado en las bacterias XL1-Blue y TG1. Para el caso de las cepas BL21 y DH5 α , y el plásmido pSF, tendrán que diseñarse y ser optimizados nuevos protocolos para aumentar la eficiencia de transformación. Cabe resaltar que la eficiencia de transformación por métodos químicos es mucho menor que la de la electroporación, sin embargo, requiere de menor infraestructura y es más económica. Algunos investigadores la consideran inadecuada para experimentos de clonación molecular, como la construcción de bibliotecas de ADNc de alta complejidad, donde se cuenta con una cantidad mínima de ARNm. De ahí la importancia de contar con un protocolo en el laboratorio de un método químico de transformación eficiente y rápido.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte con el proyecto CONACYT: Apoyos Complementarios para la Consolidación de Laboratorios Nacionales, Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo No. 293569.

Referencias

- AACHMANN, F.L., Aune, T.E., 2009. Use of cyclodextrin and its derivatives for increased transformation efficiency of competent bacterial cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:589-596.
- BAESHEN, M.N., Al-Hejin, A.M., Bora, R.S., Ahmed, M.M., Ramadan, H.A., Saini, K.S., Baeshen, N.A., Redwan, E.M., 2015. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol* 25:953-962.
- BLOUNT, Z.D., 2015. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife* 4.
- BROGDEN, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238-250.
- BROOKS, L., Kaze, M., Siström, M., 2019. A Curated, Comprehensive Database of Plasmid Sequences. *Microbiol Resour Announc* 8.
- BRUSCHI, F., Dundar, M., Gahan, P.B., Gartland, K., Szenté, M., Viola-Magni, M.P., Akbarova, Y., 2011. Biotechnology worldwide and the 'European Biotechnology Thematic Network' Association (EBTNA). *Curr Opin Biotechnol* 22 Suppl 1:S7-14.
- CARMEN, S., Jermutus, L., 2002. Concepts in antibody phage display. *Brief Funct Genomic Proteomic* 1:189-203.
- CHAN, W.T., Verma, C.S., Lane, D.P., Gan, S.K., 2013. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Biosci Rep* 33.
- CHEN, I., Dubnau, D., 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* 2:241-249.
- CHOI, H.A., Lee, Y.C., Lee, J.Y., Shin, H.J., Han, H.K., Kim, G.J., 2013. A simple bacterial transformation method using magnesium- and calcium-aminoclay. *J Microbiol Methods* 95:97-101.
- COHEN, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., Helling, R.B., 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:3240-3244.
- COHEN, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., Helling, R.B., 1992. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. 1973. *Biotechnology* 24:188-192.
- COHEN, S.N., Chang, A.C., Hsu, L., 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2110-2114.
- CRICK, F.H., Barnett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R.J., 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192:1227-1232.
- DA SILVA, B.R., de Freitas, V.A., Nascimento-Neto, L.G., Carneiro, V.A., Arruda, F.V., de Aguiar, A.S., Cavada, B.S., Teixeira, E.H., 2012. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: a review of the literature. *Peptides* 36:315-321.
- FRYSZCZYN, B.G., Brown, N.G., Huang, W., Balderas, M.A., Palzkill, T., 2011. Use of periplasmic target protein capture for phage display engineering of tight-binding protein-protein interactions. *Protein Eng Des Sel* 24:819-828.

- HAN, M.J., Yoon, S.S., Lee, S.Y., 2001. Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing Poly(3-hydroxybutyrate). *J Bacteriol* 183:301-308.
- HANAHAN, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- HILDEBRAND, A., Schlacta, T., Warmack, R., Kasuga, T., Fan, Z., 2013. Engineering *Escherichia coli* for improved ethanol production from gluconate. *J Biotechnol* 168:101-106.
- HUANG, C.J., Lin, H., Yang, X., 2012. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:383-399.
- JANSSEN, H.J., Steinbuchel, A., 2014. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol Biofuels* 7:7.
- JEONG, H., Kim, H.J., Lee, S.J., 2015. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain BL21. *Genome Announc* 3.
- JUDSON, H.F., 1996. *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- KAMIONKA, M., 2011. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Curr Pharm Biotechnol* 12:268-274.
- KIM, B., Park, H., Na, D., Lee, S.Y., 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of phenol from glucose. *Biotechnol J* 9:621-629.
- KOSTYLEV, M., Otwell, A.E., Richardson, R.E., Suzuki, Y., 2015. Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5alpha-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PLoS One* 10:e0137466.
- LEHMAN, I.R., Zimmerman, S.B., Adler, J., Bessman, M.J., Simms, E.S., Kornberg, A., 1958. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. V. Chemical Composition of Enzymatically Synthesized Deoxyribonucleic Acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44:1191-1196.
- LINN, S., Arber, W., 1968. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59:1300-1306.
- LIU, J., Chang, W., Pan, L., Liu, X., Su, L., Zhang, W., Li, Q., Zheng, Y., 2018. An Improved Method of Preparing High Efficiency Transformation *Escherichia coli* with Both Plasmids and Larger DNA Fragments. *Indian J Microbiol* 58:448-456.
- LIU, T., Khosla, C., 2010. Genetic engineering of *Escherichia coli* for biofuel production. *Annu Rev Genet* 44:53-69.
- MANDEL, M., Higa, A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-162.
- MESELSON, M., Yuan, R., 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110-1114.
- POPE, B., Kent, H.M., 1996. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 24:536-537.
- RAHIMZADEH, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., Mobasheri, H., 2016. Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Mol Biol Res Commun* 5:257-261.
- ROSANO, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:172.
- ROYCHOUDHURY, A., Basu, S., Sengupta, D.N., 2009. Analysis of comparative efficiencies of different transformation methods of *E. coli* using two common plasmid vectors. *Indian J Biochem Biophys* 46:395-400.
- SERRANO-RIVERO, Y., & Fando-Calzada, R., 2013. Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 44.
- SINHA, S., Redfield, R.J., 2012. Natural DNA uptake by *Escherichia coli*. *PLoS One* 7:e35620.
- YOSHIDA, N., Sato, M., 2009. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:791-798. 

Este artículo es citado así:

García-Cárdenas, S. T., D. G. Ruvalcaba-Hidrogo, C. C. Alvarado-González, M. G. Gómez-Fierro, O. E. Juárez-Acosta, M. R. Espinoza-Duarte, G. P. Espino-Solís. 2019. Comparación de la eficiencia de transformación entre diferentes cepas de *E. coli*. *TECNOCIENCIA Chihuahua* 13(2):112-120.

Resumen curricular del autor y coautores

SAMANTHA YOLOTZIN GARCÍA CÁRDENAS. Estudió la carrera de Ingeniería Biomédica en la Universidad Autónoma de Chihuahua, realizó su servicio social en el Laboratorio de Investigación Traslacional, en la sede del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo sede Chihuahua. Ha participado como organizadora y asistente a diversos cursos como la XIII Escuela de proteínas, Fisiología en la plasticidad neuronal y Citometría de flujo. Tiene expertise en biología molecular, cultivo celular y diversas técnicas de citometría de flujo para monitorear viabilidad celular y expresión de citocinas. Actualmente realiza su trabajo de tesis en la búsqueda de compuestos con actividad antineoplásica en venenos de distintas especies.

DANIELA GRISEL RUVALCABA HIDROGO. Actualmente es pasante de la carrera de Ingeniería Biomédica de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realizó su servicio social en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la misma y prácticas profesionales en el Laboratorio de Investigación Traslacional - Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo Sede Chihuahua, lugar en donde se desempeña como tesista. Ha participado en un congreso nacional de ingeniería biomédica organizado por la Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica (SOMIB) presentando un proyecto estudiantil y ha formado parte del equipo organizador del "Taller de Fundamentos en Citometría de Flujo". Durante su formación acudió a cursos extracurriculares de inmunología, modelamiento de proteínas, citometría de flujo y de PCR en tiempo real. En el 2019 realizó una estancia de verano por la Academia Mexicana de Ciencias en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Resumen curricular del autor y coautores (cont.)

CARMEN CAROLINA ALVARADO GONZÁLEZ. Estudiante de la carrera de Ingeniería Biomédica en la Universidad Autónoma de Chihuahua. Realizó su servicio social en el Laboratorio de Investigación Traslacional, ahora también Laboratorio Nacional de Citometría sede Chihuahua. Actualmente realiza su tesis de licenciatura acerca de alacranes endémicos del estado de Chihuahua, llevando a cabo su clasificación morfológica y caracterización bioquímica del veneno. Ha participado en cursos impartidos en su facultad, asistió al "2° Curso de Animales Venenosos en México" en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Participó como ponente en el Simposio de Investigación en Biomédica de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH.

MARÍA GEORGINA GÓMEZ FIERRO. Es egresada de la carrera de Ingeniería Biomédica de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, con el mejor promedio de su generación. Ha sido becada por la Academia Mexicana de Ciencias para realizar estancias de investigación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados, sede Zacatenco. Ha participado como organizadora en talleres y cursos de inmunología y citometría de flujo. Realizó su servicio social en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo sede Chihuahua y actualmente trabaja en su tesis de licenciatura en el mismo, en colaboración con el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

OSCAR ENRIQUE JUÁREZ ACOSTA. Terminó su licenciatura en Ingeniería Biomédica en el 2018, por la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH). Actualmente se encuentra realizando su tesis sobre la clasificación morfológica y caracterización bioquímica del veneno de alacranes endémicos del estado de Chihuahua en el Laboratorio de Investigación Traslacional, ahora Laboratorio Nacional de Citometría sede Chihuahua. En 2016 realizó su servicio social como Ingeniero Biomédico en el Hospital Central Universitario del Estado de Chihuahua.

MAYELA ROSARIO ESPINOZA DUARTE. Es egresada de la segunda generación de Ingeniería Biomédica por la Universidad Autónoma de Chihuahua, obtuvo una beca completa para participar en la primer escuela de verano en biotecnología "Una ventana al IBT y a la investigación" por el Instituto de Biotecnología de la UNAM, realizó una estancia académica en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo de la UNAM. Ha presentado proyectos de investigación en cursos y congresos organizados por la IUIS-ALAI y la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Ha participado como organizadora y asistente a diversos cursos como la XIII Escuela de proteínas, Actualización en Inmunología y Citometría de flujo. Actualmente es coordinadora de la sede en Chihuahua del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo. Trabaja en líneas de investigación enfocadas a la citometría dentro del Laboratorio de Investigación Traslacional.

GERARDO PÁVEL ESPINO-SOLÍS. Es Ingeniero Bioquímico por el Instituto Tecnológico de Durango; en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) obtuvo los grados de Maestro y Doctor en Ciencias Bioquímicas, realizó estudios postdoctorales en Baylor Institute for Immunology Research (BIIR), en Dallas Tx. Es Profesor - Investigador de Tiempo Completo, titular C, en la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH. Ha publicado artículos de investigación original, en revistas de circulación internacional, así como algunos trabajos de divulgación científica y dos patentes. Ha sido profesor y tutor en los programas de maestría y doctorado en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y en Baylor University. Es miembro de la Sociedad Mexicana de Inmunología y Sociedad de Glicobiología en Estados Unidos. Entre las distinciones que ha recibido destaca el reconocimiento como miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel 1 y perfil PRODEP. Actualmente dirige el Laboratorio de Investigación Traslacional y es Director de la Sede en Chihuahua del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo.