

## Modificación genética del bacteriófago $\phi$ X174 para generar una replicación controlada en *Escherichia coli* para su uso como agente antimicrobiano

Balderas-Cisneros Francisco de Jesús & Morones-Ramírez José Rubén\*

Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biotecnología 3. Universidad Autónoma de Nuevo León., Pedro de Alba /SN, Ciudad Universitaria, 66450 San Nicolás de los Garza, N. L., México.

Correo: [fjbc92@gmail.com](mailto:fjbc92@gmail.com)

**Palabras clave:** Bacteriófagos, Biología Sintética,  $\Phi$ X174, Biotecnología, Antimicrobianos

### Introducción

La resistencia a antibióticos es un problema a nivel global que va en incremento. Los microorganismos patógenos a los que se enfrenta la sociedad moderna, generan resistencia a los antibióticos disponibles en el mercado más rápido de lo que se logran desarrollar antibióticos contra estos microorganismos<sup>1</sup>. Principalmente es debido a mutaciones espontáneas y por transferencia horizontal de genes<sup>2</sup>.

Los bacteriófagos son virus que tienen la habilidad de infectar células bacterianas y en muchos casos lisarlas. Se unen a receptores específicos de la célula para inyectar su material genético al citoplasma y posteriormente comenzar su replicación utilizando la maquinaria de la bacteria<sup>3</sup>. La fago-terapia se basa en aprovechar la naturaleza de estos agentes para tratar enfermedades causadas por bacterias patógenas cuyas ventajas son: aislamiento rápido, producción rentable, versatilidad en la formulación y aplicación, mínimo impacto contra la flora intestinal y baja toxicidad<sup>4</sup>.

$\phi$ X174 pertenece a la familia *Microviridae*. es un agente no patógeno para el ser humano, con forma de icosaedro, pequeño, sin cola y su genoma es DNA circular de cadena sencilla con una longitud de 5,386 nucleótidos<sup>5</sup>. Se ha utilizado la biología sintética para construir bacteriófagos modificados genéticamente, como, por ejemplo, que expresen la enzima DspB, la cual tiene actividad degradadora de biofilms<sup>6</sup>.

En este trabajo se busca modificar el genoma del bacteriófago  $\phi$ X174, mediante la técnica de recombinación homóloga para sustituir el gen F con el péptido antibacteriano Bac7(1-35) que al infectar a *Escherichia coli* C tenga efecto bactericida sin la producción de viriones.

### Parte experimental

Se extrajo el DNA plasmídico. Este plásmido se extrajo de *E. coli* Dh5 $\alpha$  mediante el método de lisis alcalina.

Se transformó *E. coli* C Calcio competente con el plásmido PKM208 mediante el procedimiento de choque térmico. PKM208 contiene los genes *Gam*, *Exo* y *Beta* que codifican para proteínas para llevar a cabo el proceso de recombinación homóloga.

Se realizaron cultivos sólidos (ensayo de doble capa) y líquidos de diferentes cepas de *E. coli* (C, BL21, DH5 $\alpha$ ) y se infectaron con  $\phi$ X174 para cuantificar los bacteriófagos por mL y para ensayos de sensibilidad de las cepas.

Se diseñaron primers para la caracterización de PKM208

### Resultados y discusión

El ensayo de doble capa se utilizó para la cuantificación de

bacteriófagos producidos en *E. coli* C. La única caja Petri en donde se observó el número de placas recomendados para realizar el conteo (30-300 Unidades formadoras de placas) fue la dilución  $10^{-7}$  de bacteriófago, en donde se apreciaron aproximadamente 35 placas, lo cual indica una concentración de  $3.5 \times 10^8$  pfu/mL<sup>7</sup>.

En los ensayos de fase líquida, se obtuvo una curva de crecimiento típica de una infección con  $\phi$ X174 en donde el cultivo de *E. coli* C presentó una disminución de OD<sub>600</sub> debido a la infección del bacteriófago a diferencia del cultivo de *E. coli* C sin infectar con el bacteriófago en donde no se presentó disminución alguna<sup>8</sup>.

El plásmido PKM208 contiene proteínas de recombinación pertenecientes al fago  $\lambda$ . Mediante la técnica Lambda-red se pueden realizar recombinación entre fragmentos de PCR y cromosoma bacteriano o elementos extracelulares<sup>9</sup>.

### Conclusiones

El bacteriófago  $\phi$ X174 infecta de manera específica a *E. coli* C y presentó una curva clásica de una infección de bacteriófago.

Se logró transformar a *E. coli* C con el plásmido PKM208 utilizando la técnica de choque térmico.

### Referencias

1. Morel, C. M., & Mossialos, E. (2010). Stoking the antibiotic pipeline. *BMJ*, (340), 1115-1118.
2. Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51.
3. Nallely Segundo, A., Hernández, E., López, O., & Torres, O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3), 17-26.
4. Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111-114.
5. Michel, A., Clermont, O., Denamur, E., & Tenaillon, O. (2010). Bacteriophage PhiX174's ecological niche and the flexibility of its *Escherichia coli* lipopolysaccharide receptor. *Applied and environmental microbiology*, 76(21), 7310-7313.
6. Lu, T. K., & Collins, J. J. (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11197-11202.
7. Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, 69-76.
8. Lubitz, W., Halfmann, G., & Plapp, R. (1984). Lysis of *Escherichia coli* after infection with  $\phi$ X174 depends on the regulation of the cellular autolytic system. *Microbiology*, 130(5), 1079-1087.
9. Marinelli, L. J., Hatfull, G. F., & Piuri, M. (2012). Recombineering: A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. *Bacteriophage*, 2(1), 5-14.