

Técnica de transformación rápida de levaduras

J.A. AGUIAR, G. FERBEYRE, I. TORRENS, A. SILVA y J. MORALES

División de Proteínas y Hormonas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en diciembre de 1990

Aprobado en octubre de 1991

RESUMEN

Las especies de levadura *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron transformadas por el método de células competentes con plásmidos replicativos, usando un paso previo de congelación antes del golpe térmico, lo que redundó en un aumento de la frecuencia de transformación a niveles de 2 000 transformantes por microgramos de ADN, valor similar para las tres especies. Se comprobó que las células competentes preparadas por este método pueden ser almacenadas a -70°C por, al menos, un mes sin pérdida de viabilidad.

SUMMARY

The yeast species *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, and *Saccharomyces cerevisiae* were transformed with replicative plasmids using a modified competent cell method by freezing before the temperature shock; an increase of the frequency of transformation up to levels of 2 000 transformants per microgram of DNA were obtained for the three species. It was checked that competent cell prepared using this method can be stored at -70°C for at least one month without loss of viability.

INTRODUCCION

Desde el primer reporte de transformación de levaduras por protoplastos (Hinnen *et al.*, 1978) varios han sido los métodos

desarrollados con este propósito; entre ellos, tratamiento con sales de litio (Ito *et al.*, 1983), electroporación (Karube *et al.*, 1985) y otros. No obstante, ninguno de estos trabajos reporta haber logrado el almacenamiento y posterior uso de estas células para la transformación, evitando así el consumo de tiempo y reactivos.

Klebe *et al.* (1983) reportaron un método de preparación y transformación de células competentes de levaduras que incluyó diferentes especies y que permitió el almacenamiento a -70°C por, al menos, treinta días.

En este trabajo nosotros hemos seguido esencialmente lo reportado por Klebe *et al.*, 1983, pero hemos incluido un paso de congelación previo al golpe térmico, con lo cual hemos aumentado la frecuencia de transformación a niveles sustancialmente superiores a los reportados en la literatura.

MATERIALES Y METODOS

Cepas usadas

Para este trabajo se utilizaron mutantes de las levaduras *S. cerevisiae* SEY 2202 (α , *leu2-3-112*, *ura3-52*, *his4-519*) (donada por Jeremy Thorner),

K. lactis VD1 (α , arg, lis, uraA, pKD1) (Bianchi *et al.*, 1987) y *H. polymorpha* LR9 (odc1) (Roggenkamp *et al.*, 1986).

Vectores empleados

Los vectores replicativos utilizados fueron pBS-4 (Grillo, resultados no publicados) para la SEY 2202, pCXJ-kan 1 (Bianchi *et al.*, 1987) para la VD1 y pHARS (Roggenkamp *et al.*, 1986) para la LR9. Todos los plasmidios portan el gen *ura3* de *S. cerevisiae* o su equivalente y los orígenes de replicación característicos de cada especie.

Preparación de las células competentes

Las tres cepas fueron crecidas en medio de cultivo YPG (Sherman *et al.*, 1986). La temperatura fue de 30°C para la SEY 2202 y para la VD1, y de 37°C para la LR9. Se crecieron hasta alcanzar aproximadamente 0,6 DO₅₃₀ para la SEY 2202, y 0,2-0,4 DO₅₃₀ para la VD1 y LR9. Las células fueron centrifugadas durante 5 minutos a 3 000 rpm en centrífuga de mesa y resuspendidas suavemente en 50 ml de solución A (Bicine 10 mM, etilenglicol 3%, sorbitol 1 M, pH 8,35). Luego se centrifugaron y se resuspendieron suavemente en 2 ml de solución A, con las cuales se hicieron alícuotas de 200 μ l. Estas alícuotas fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido, almacenándose posteriormente a -70°C.

Transformación de las células competentes

Los plasmidios específicos para cada cepa fueron añadidos en la cantidad de 5 μ g a 200 μ l de células competentes aún congeladas, las cuales fueron posteriormente descongeladas a temperatura ambiente homogeneizándose suavemente esta mezcla. Seguidamente, se introdujo la modificación consistente en la recongelación de esta mezcla durante 15 minutos a -70°C, al cabo de este tiempo se aplicó el golpe térmico de 5 minutos con agitación lenta (100 rpm) en una zaranda termostataada, a 37°C en el caso de la SEY 2202 y de la VD1 y a 42°C para la LR9.

Posteriormente se añade 1 ml de solución B (Bicine 200 mM, PEG 1000 40%, pH 8,35) y se mezcla suavemente con las células y el ADN por inversión. Esta mezcla es incubada a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa (28°C para la SEY 2202 y la VD1 y de 37°C para la LR9) por un período de 30 minutos, después del cual son centrifugadas a 2 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El precipitado es lavado con 1 ml de solución C (Bicine 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,35), resuspendido en un volumen final de 300 μ l de solución C y plaqueado en medio GO (Galzi y Slonimski, 1957), suplementado con hidrolizado de caseína al 0,5% y glucosa al 2%.

Selección de los transformantes

La selección de los transformantes se realizó según el método descrito por Chevalier *et al.*, 1987 (Fig. 1).

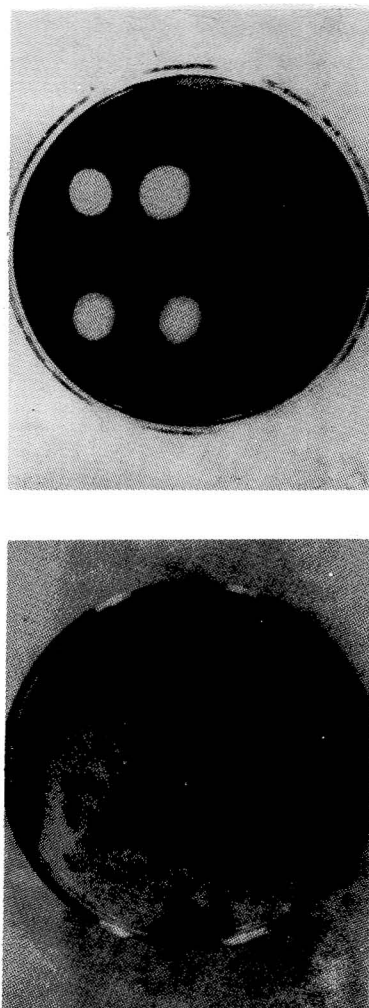


FIG. 1. Determinación de la presencia de plasmidios en los transformantes de *Hansenula polymorpha* LR9, por actividad Beta-lactamasa según reporta Chevalier *et al.*, 1987, usando el medio GO, Galzy *et al.*, 1957 y suplementado con hidrolizado de caseína 0,5%: (A) una hora de exposición con la mezcla yodo-yoduro de potasio; (B) tres horas de exposición con la mezcla yodo-yoduro de potasio.

Los controles negativos del experimento son las colonias de la cepa salvaje de *Hansenula polymorpha* sin transformar, parchadas junto a los transformantes y que no presentan halo blanco a su alrededor.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se compararon el tiempo de trabajo efectivo, el tiempo de incubación hasta aparición de las colonias y la frecuencia de transformación del método de Klebe *et al.* (1983) modificado por nosotros, con los métodos utilizados por otros autores (Ito *et al.*, 1983 y Klebe *et al.*, 1983).

Como se observa en la tabla 1, no existen diferencias en cuanto al tiempo de trabajo efectivo, ni al tiempo de aparición de las colonias, al comparar nuestros resultados con los del método de Klebe *et al.* (1983). En el caso descrito por Ito *et al.* (1983), los tiempos de aparición de los transformantes y de trabajo efectivo son superiores a los de los métodos de Klebe *et al.* (1983) y del aquí reportado por nosotros.

Al comparar las frecuencias de transformación de nuestra modificación, con las reportadas para los otros métodos de obtención de transformantes, observamos que con la modificación introducida la frecuencia aumenta desde 5×10^2 hasta 2×10^3 transformantes por microgramo de ADN. Estos datos obtenidos por nuestra modificación al protocolo de Klebe *et al.*, 1983, son un promedio de valores de

20 experimentos, todos con resultados similares, los cuales son superiores a los reportados en la literatura para las técnicas usadas en la comparación.

REFERENCIAS

- BIANCHI, M.M.; C. FALCONE; CH.X. JIE; M. WESLOWSKI-LOUVEL; L. FRONTALI y H. FUKUHARA (1987). Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 um circular plasmid pKD1. *Curr. Genet.* 12: 185-192.
- CHEVALIER, M.R. y M. ANGLI (1987). Qualitative detection of penicillinase produced by yeast strain carrying chimeric yeast- coli plasmids. *Febs Letters* 108(1): 179-180.
- GALZY, P y P.P. SLONIMSKI (1957). Variation physiologique de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *Comptes. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 245: 2423-2433.
- HINNEN, A.; J.B. HICK y G.R. FINK (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(4): 1929-1933.
- ITO, H.; Y. FUKUKA; K. MURATA y A. KIMURA (1983). Transformation of intact yeast cell treated with alkali cations. *J. Bacteriology* 153: 163-168.
- KARUBE, I.; E. TAMIYA y H. MATSUOKA (1985). Transformation *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. *Febs. letters* 182: 90-94.

Tabla 1
COMPARACION DE LOS METODOS DE TRANSFORMACION

Método ^a	TTE ^b (horas)	TI ^c (horas)	ET ^d (transformantes/ μ g de ADN)
1	1	48-72	5×10^2
2	1	48-72	2×10^3
3	3	72	5×10^2

^a El método 1 es el de Klebe *et al.*, 1983. El método 2 es el de Klebe *et al.*, 1983, modificado por nosotros. El método 3 es el de Ito *et al.*, 1983.

^b TTE: tiempo de trabajo efectivo.

^c TI: tiempo de incubación hasta la aparición de los transformantes.

^d ET: Eficiencia de la transformación.

KLEBE, R.J.; J.V. HARRISS; D. SHARP y M.G. DOUGLAS (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation bacteria and yeast. *Gene* 25: 333-341.

ROGGENKAMP, R.; H. HANSEN; M. ECKART; Z. JANOWICZ y C.P. HOLLENBERG (1986). Transformation of the methylotrophic yeast

Hansenula polymorpha by autonomous replication and integration vectors. *Molec. Gene. Genet.* 202: 302-308.

SHERMAN, F.; G.R. FINK y J.B. HICKS (1986). En: *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Lab., New York, USA.