

Expresión de Taq polimerasa recombinante en *E. coli* TOP10 para su producción a bajo costo

Cristian Alberto Pedrín^a, Hassian León-Montoya^b, Reyna de Jesús Romero-Geraldo^a, Carlos Angulo^b.

^aTecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de La Paz. La Paz, B.C.S. ^bCentro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Grupo de Inmunología y Vacunología, La Paz, B.C.S. eangulo@cibnor.mx

Biotechnología y Ciencias Agropecuarias

Abstract

The main function of the polymerase enzyme is to generate new copies of a DNA strand. An example of this enzyme is Taq polymerase, known for its thermal stability. However, Taq polymerase is commercially expensive; therefore, alternatives are sought for simple, functional, and low-cost production. This work aims to express functional Taq polymerase for application in the polymerase chain reaction. From a transformed and cultured colony of *Escherichia coli* TOP10 strain, the expression of the enzyme was induced with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), followed by an incubation at 37 °C for 72 hours. Later, the enzyme was extracted by using buffer A and buffer B and stored at 4 °C in a storage buffer. Then, the enzyme protein integrity was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis. Thereafter, an endpoint PCR was performed using 1 and 2 μ L of the protein extract. Finally, the concentration of Taq polymerase in the protein extract was determined using the ImageJ software. The presence of Taq polymerase was identified at 94 kDa with a concentration between 135-196 ng/ μ L. The best PCR amplification was with 1 μ L of extract compared to 2 μ L of the extract. In conclusion, *E. coli* produced the enzyme Taq polymerase functionally for application in PCR.

Keywords: bioproduction, protein, molecular biology, genetic engineering.

Resumen

La enzima polimerasa tiene como función principal generar nuevas copias de una cadena de ADN; ejemplo de esta enzima es la Taq polimerasa, la cual destaca por su estabilidad térmica. Sin embargo, la Taq polimerasa tiene un alto costo comercial; por lo tanto, se buscan alternativas para una producción sencilla y a bajo costo. Este trabajo tiene como objetivo expresar Taq polimerasa funcional para su aplicación dentro de PCR. La expresión de la enzima Taq polimerasa se indujo con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en cepas *Escherichia coli* TOP10 a 37 °C por 72 horas. Después, la extracción de la enzima se realizó mediante los buffers A y B, un baño María y se guardó con buffer de almacenamiento a 4 °C. La integridad de la enzima se evaluó mediante electroforesis SDS PAGE y una PCR de punto final con 1 y 2 μ L del extracto proteico; finalmente, la concentración de la Taq polimerasa en el extracto proteico se determinó mediante densitometría con el software ImageJ. La presencia de Taq polimerasa se identificó como una banda de 94 kDa, y una concentración entre 135-196 ng/ μ L del extracto. La mejor amplificación por PCR fue con 1 μ L de extracto en comparación con 2 μ L. En conclusión, *E. coli* produjo la enzima Taq polimerasa de forma funcional para su aplicación en la PCR.

Palabras clave: bioproducción, proteína, biología molecular, ingeniería genética.

Problemática

La ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* presenta dificultades asociadas a sus condiciones de crecimiento, su cultivo en laboratorio y la compleja extracción de la enzima. Además, la Taq polimerasa tiene un alto costo comercial para su uso en laboratorio dentro de estudios genéticos y en biología celular con aplicaciones benéficas para la humanidad.

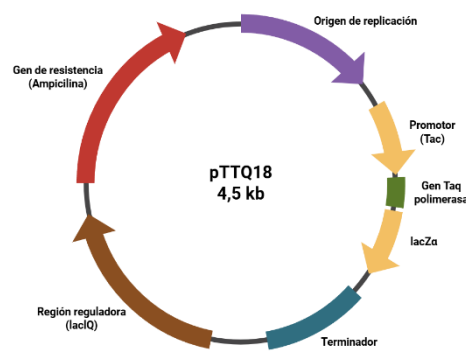


Figura 1. Vector pTTQ18, utilizado en *E. coli* TOP10 para expresar Taq polimerasa.

Usuarios

El sector ciencia y tecnología, el sistema educativo, empresas biotecnológicas y la sociedad en general.

Introducción

En las células existen las enzimas llamadas ADN polimerasas, las cuales tienen la función de generar nuevas copias de las cadenas de material genético (Tortora et al., 2019). Esta cualidad es aprovechada en los laboratorios para aplicarse en la identificación parental, enfermedades genéticas, patógenos; entre otras, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las bacterias también cuentan con ADN polimerasas, pero específicamente la bacteria *Thermus aquaticus* produce una ADN polimerasa llamada "Taq polimerasa" descubierta en los años 70's (Chien et al., 1976). La enzima Taq polimerasa destaca por su estabilidad térmica a temperaturas de 80-95 °C, y por ello es utilizada en técnicas de biología molecular como la PCR (Ishino & Ishino, 2014). Sin embargo, las condiciones de crecimiento de *T. aquaticus* dificultan la producción de Taq polimerasa y elevan el precio de venta (Chien et al., 1976). Por esta razón se buscan alternativas para la producción de esta enzima. Las alternativas que se han llevado a cabo para reducir costos son su producción en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) o bacterias como *Vibrio natriegens* y *Escherichia coli* (Hriňová et al., 2024; Zhra et al., 2024). Particularmente, en *E. coli* se ha realizado la producción en sistemas de expresión pET y métodos de purificación basados en la afinidad a metales, lo que añade costos de procesamiento (Abeldenov & Khassenov, 2014). Una alternativa más barata es el uso directo de extractos de *E. coli* productora de Taq polimerasa en PCR (Lee et al., 2023). Las cepas de *E. coli* JM109, DH5 α y BL21 son ampliamente utilizadas para la producción de Taq. Mientras que cepas como *E. coli* TOP10, comúnmente utilizada para clonación de vectores, ha sido poco explorada como producción enzimática (Gómez et al., 2002; Ferralli et al., 2007; Abeldenov et al., 2014; Hriňová et al., 2024). Para la producción de esta enzima en *E. coli* se utiliza un vehículo genético llamado pTTQ18 (Figura 1), el cual contiene el gen Taq polimerasa (Gómez et al., 2002). Los componentes de este vehículo genético, nos permiten controlar el momento del inicio de la producción de Taq polimerasa dentro de *E. coli* mediante el uso de una molécula activadora (inductor). Además, la extracción, almacenamiento y estabilidad de la enzima puede mejorarse mediante la utilización de soluciones específicas compuestas de Tris-HCl, dextrosa, EDTA, DTT, detergentes y/o glicerol (Ferralli et al., 2007). Este enfoque ofrece una alternativa accesible y reproducible, particularmente en laboratorios con recursos limitados, y permite generar cantidades suficientes de enzima para su uso en PCR, demostrando tanto su viabilidad práctica como su potencial aplicación educativa y de transferencia tecnológica.

Objetivos

Expresar Taq polimerasa recombinante funcional para su aplicación en PCR.

Materiales y Métodos

Cuatro cultivos independientes de *E. coli* TOP10 con el plásmido pTTQ18 conteniendo el gen de la Taq polimerasa se sembraron en medio de cultivo LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 1.5% agar bacteriológico) con ampicilina (50 mg/L), pH 7.0 \pm 0.2. Los cuatro cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, una colonia de *E. coli* TOP 10 se tomó por picadura y se colocó en 15 mL de caldo LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de

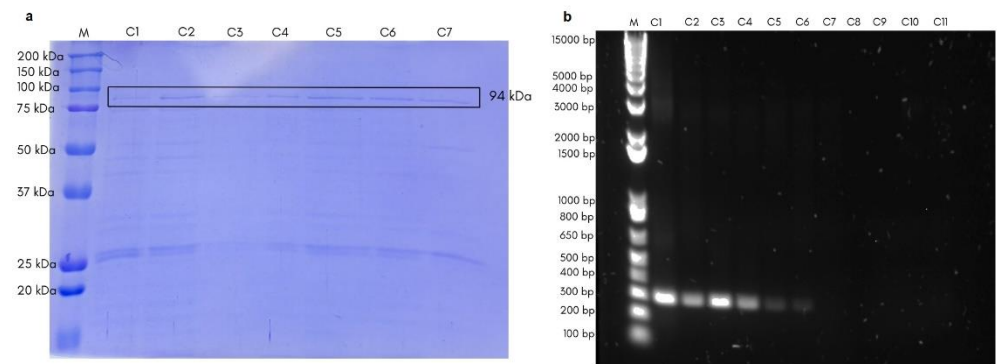


Figura 3. (a) Electroforesis SDS PAGE para identificar Taq polimerasa con un tamaño de 94 kDa. Carriles: Marcador (Precision Plus Protein) 1 control negativo (Cultivo no inducido), 2-3 taq recombinante 1, 4-5 taq recombinante 2 y 6-7 taq recombinante 3. (b) Electroforesis de productos de PCR. Carriles: Marcador (1Kb plus) 1 control positivo (taq comercial), 2-4 taq recombinante 1 μ L, 5-7

levadura, 10 g/L NaCl) con ampicilina (50 mg/L), pH 7.0 \pm 0.2. De cada cultivo se realizó una resiembra y los 4 cultivos resembrados en caldo se incubaron a 37 °C por 72 horas. Del cultivo *E. coli* TOP 10 se tomaron 200 μ L, la absorbancia de cada muestra se midió a 600 nm y el UFC se determinó mediante una curva de calibración abs vs UFC. Finalmente, en 3 cultivos se agregó 30 μ L de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (0.1 M) y 1 cultivo se apartó como control negativo (sin IPTG). Los 4 cultivos se incubaron a 37 °C por 24 horas. Después de la incubación, los cultivos se repartieron en microtubos con 1 mL y fueron centrifugados a 8871 x g por 5 min. El sobrenadante de los tubos se decantó y el pellet se resuspendió en 70 μ L buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM dextrosa, 1 mM EDTA); el pellet resuspendido se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. En cada tubo se añadió 70 μ L de buffer B (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM KCl, 0.5% Tween 20, 0.5% Triton X-100), los tubos se incubaron en baño María a 75 °C por 30 min y cada 5 minutos se mezcló por inversión. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 9660 x g por 5 minutos y 120 μ L se separaron en nuevos microtubos. Finalmente, el sobrenadante recuperado se le añadió 120 μ L de buffer de almacenamiento (50mM Tris-HCl pH 7.9, 100mM NaCl, 0.5 mM DTT, 1% Triton X-100, 50% Glicerol) y las muestras fueron almacenadas a 4 °C. La enzima extraída dentro de las muestras se identificó mediante electroforesis SDS-PAGE con 20 μ L de extracto, comparando las bandas observadas con un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein BIO-RAD). Asimismo, con la Taq polimerasa extraída se realizó una PCR de punto final para evaluar la funcionalidad con 1 μ L y 2 μ L del extracto proteico (Figura 2). Finalmente, la concentración del extracto proteico a 94 kDa se determinó mediante densitometría con el software ImageJ (<https://imagej.net/ij/>).

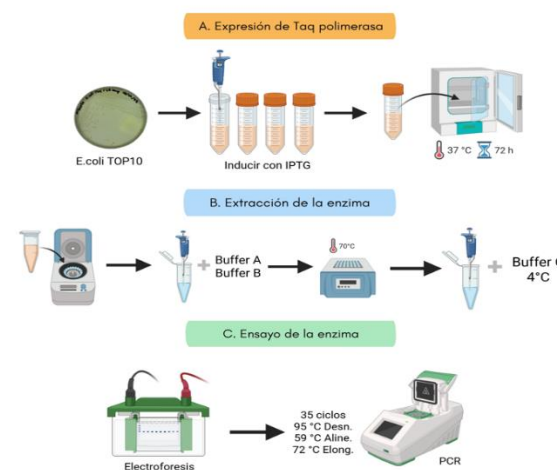


Figura 2. Metodología para la producción de Taq polimerasa recombinante. Paso 1: Cultivar *E. coli* TOP 10 en medio LB ampicilina. Paso 2: Inducir expresión con IPTG. Paso 3: Incubar a 37°C por 72 horas. Paso 4: Centrifugar y recuperar el pellet. Paso 5: Agregar misma cantidad de buffer A y B. Paso 6: Baño maría por 30 min a 70°C. Paso 7: Agregar misma cantidad de buffer al sobrenadante recuperado. Paso 8: Realizar una electroforesis SDS PAGE. Paso 9: Evaluar enzima en PCR.

Resultados y Discusión

La Taq polimerasa recombinante se identificó a 94 kDa en la electroforesis SDS-PAGE realizada (Figura 3) que corresponde al tamaño esperado de esta enzima (Ferralli et al., 2007). Sin embargo, se puede observar presencia de otras proteínas y es común debido a la presencia de cuerpos de inclusión por proteínas mal plegadas (Bhatwa et al., 2021). Por otro lado, dentro del primer carril se percibe una tenue banda a 94 kDa, que podría corresponder a proteínas endógenas de

peso molecular similar a la Taq polimerasa producida (Torres, 2025). Asimismo, comparando con resultados ya publicados, esta tenue banda puede representar una expresión basal del gen de Taq polimerasa cuando no fue realizada una inducción (Fang et al., 2016; Hriňová et al., 2024). Con los extractos se realizó una PCR (Figura 3), y se identificó mayor amplificación con 1 μ L en comparación a 2 μ L del extracto proteico. Una cantidad alta de enzima como la añadida en 2 μ L, en relación con la cantidad de ADN molde y primers, induce efectos negativos como formación de productos no deseados o dímeros de primers (Ingr et al., 2015). Es decir, se pueden desbalancear las concentraciones dentro de la mezcla de componentes de la PCR y así afectar la amplificación del ADN, como lo demostraron Markoulatos et al. (2002). Finalmente, las enzimas presentaron concentraciones de 135-196 ng/ μ L y, en comparación con el control negativo que mostró una expresión basal de la proteína, se observó un ligero incremento en las muestras inducidas con IPTG, tal como lo reportaron Ferralli et al. (2007). Los extractos crudos presentaron concentraciones de 135-196 ng/ μ L, lo que equivale a aproximadamente 13-39 U/ μ L, considerando que 1 U corresponde a 5-10 ng de enzima pura. De este modo, la cantidad de proteína obtenida es suficiente para sustituir la dosis estándar de 1 U utilizada en una reacción de PCR de 25 μ L, demostrando que la enzima expresada en *E. coli* TOP10 posee un rendimiento comparable al de las preparaciones comerciales (Promega, 2025). En un análisis comparativo, el costo por reacción de Taq recombinante se estima en 0.37-0.92 MXN, frente a 3.67-9.18 MXN de la Taq comercial, lo que representa hasta 10 veces de ahorro y refuerza su viabilidad económica (ThermoFisher, 2025). Por lo tanto, no solo cepas como *E. coli* JM109, DH5 α y BL21 poseen la capacidad de producir la enzima Taq, sino que también *E. coli* TOP10 con el vector pTTQ18 puede hacerlo, ofreciendo mayor versatilidad y ampliando las oportunidades de producción con distintas cepas disponibles (Gómez et al., 2002; Ferralli et al., 2007; Abeldenov et al., 2014; Hriňová et al., 2024).

Conclusiones

La Taq polimerasa recombinante fue producida en cepas de *E. coli* TOP 10 que contenían el vector de expresión pTTQ18. Los resultados indican que *E. coli* TOP 10 produjo la enzima Taq polimerasa con un peso esperado de 94 kDa, con una concentración del extracto proteico entre 135-196 ng/ μ L y fue funcional en la PCR cuando se utilizó 1 μ L de extracto conteniendo la enzima, lo que demuestra su potencial uso en el laboratorio, su aplicabilidad en contextos educativos y de investigación de bajo costo.

Impacto Socioeconómico

La producción de Taq polimerasa recombinante en *Escherichia coli* es una alternativa para su uso en laboratorio dentro de técnicas como PCR; esta técnica se utiliza de manera cotidiana en la detección de enfermedades genéticas o por patógenos. La producción de esta enzima permite reducir costos por producción de ADN polimerasa a partir de *Thermus aquaticus* o su obtención de manera comercial.