

# Estrategia de verificación de calidad de las cepas de *Escherichia coli* conservadas en la Colección del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Diliana Celeste Pérez-Reytor\*, Iveldris Domínguez-Vázquez, Evelyn Olano-Ruiz, Angela Estela Sosa-Espinosa\*\*

Laboratorio Colección de Microorganismos de Interés Biotecnológico. Departamento de Seguridad y Ambiente. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). A.P. 6162, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

**email:** angela.sosa@cigb.edu.cu

---

La colección de microorganismos de interés biotecnológico del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología incluye diferentes cepas de bacterias y levaduras utilizables en la manipulación de genes mediante el empleo de la ingeniería genética y para la producción de proteínas recombinantes por métodos biotecnológicos. La colección de hospederos de *Escherichia coli* centraliza todas las cepas que se utilizan en los proyectos de investigación-desarrollo de la institución. Este microorganismo constituye una de las herramientas biológicas imprescindibles para el trabajo en ingeniería genética y la investigación molecular. La fidelidad de los resultados experimentales depende en parte de la calidad de los bancos de estas cepas, que está determinada por las condiciones de almacenamiento y las estrategias de evaluación de los mismos. La complejidad del manejo de esta colección está influida en gran medida por el hecho de que en los medios de propagación pueden crecer un gran número de contaminantes ambientales de difícil identificación. Mientras más similar es el contaminante a la cepa de interés, más difícil es lograr bancos puros con una estabilidad confiable para la conservación. En este trabajo se describe cómo se garantiza el control de calidad de los bancos de *Escherichia coli*. Los métodos y estrategias de verificación que se describen han sido desarrollados en nuestro laboratorio.

**Palabras clave:** Colección de cultivos, cepas de *Escherichia coli*, chequeo de pureza, ingeniería genética, investigación molecular.

---

## Introducción

Los institutos que se dedican a la manipulación de genes mantienen colecciones de cepas mutantes de *Escherichia coli* (*E. coli*) relativamente grandes, que se utilizan en el estudio molecular y como hospederos en la expresión de proteínas recombinantes. Diferentes casas comerciales y colecciones comercializan estos microorganismos, o se obtienen mutantes en el propio laboratorio a partir de cepas de diferentes orígenes. Esta bacteria está ampliamente caracterizada y constituye una de las herramientas biológicas imprescindibles para el trabajo en Ingeniería Genética y la investigación molecular (1).

Adicionalmente, las cepas derivadas de *E. coli* K12 están clasificadas, desde el punto de vista de la bioseguridad, como el vehículo más seguro para la clonación eficiente y la expresión de proteínas recombinantes. Debido a esto los mutantes que se generan en los laboratorios son comercializados y utilizados en todo el mundo para la expresión de ADN recombinante (2, 3).

Desde la creación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) en 1986, se establece una colección de cepas de *E. coli* de diversas procedencias y en las

diferentes áreas de trabajo cada investigador mantenía pequeños bancos de las cepas con las que realizaba su investigación. Como consecuencia no había una colección única, por lo que era común que bajo la misma denominación existieran cepas de diferentes orígenes, fuera difícil determinar el número de pases que se habían realizado y existieran diferentes criterios de evaluación de calidad de los bancos.

En el 1999 se centralizaron todas las cepas de *E. coli* como parte de la Colección Central de Microorganismos de Interés Biotecnológico (CMIB) del CIGB. La complejidad del manejo de esta colección depende en gran medida del hecho de que un gran número de contaminantes ambientales crecen en los medios de propagación de *E. coli*. Los coliformes contaminantes, provenientes de un fallo en la manipulación son muchas veces indistinguibles de la cepa de interés en los medios convencionales y, por tanto, es más difícil lograr bancos puros (4). Por otra parte, el hecho de que las cepas sean mutantes hace que establecer los requerimientos de conservación y las estrategias de verificación según lo reportado para las cepas de referencia de este microorganismo no sean confiables (5).

---

\* Licenciada en Microbiología; Master en Ciencias Bioquímicas en la mención de Biología Molecular; Aspirante a investigador.

\*\* Licenciada en Ciencias Biológicas; Master en Microbiología; Investigador auxiliar. Profesor adjunto.

En este trabajo nos propusimos implementar una estrategia general para la confección y chequeo de bancos de *E. coli* que permitiera la caracterización completa de los mismos, estableciéndose los parámetros de calidad específicos según las particularidades del trabajo con estas cepas.

## Materiales y Métodos

### Cepas de *E. coli*

La colección de hospederos de *E. coli* para el uso en biotecnología incluyó 38 cepas mutantes, de las cuales 33 pertenecen al serotipo K12, cuatro al serotipo B y una al serotipo C. Algunas cepas fueron adquiridas de colecciones reconocidas como: ATCC, New England Biolabs, Promega, Invitrogen, Stratagene y otras depositadas por diferentes investigadores. Las cepas de *E. coli* con su descripción se muestran en la Tabla 1.

### Confección de los bancos primarios y de trabajo

Las bacterias se cultivaron en placas de medio Luria-Bertani (LB) (Tryptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, Cloruro de Sodio 10 g/L). De las placas se tomó una colonia y se inoculó en precultivos con 5 mL de LB líquido. Los precultivos se crecieron a 37 °C con una agitación de 250 r.p.m., durante 12 h. De este cultivo se añadió 1 mL como inóculo a un Erlenmeyer que contenía 100 mL de medio LB y se cultivaron a 37 °C, con una agitación de 250 r.p.m., durante 6 h.

La biomasa se colectó por centrifugación del cultivo a 3000 r.p.m. durante 10 min. El precipitado de células se disolvió en LB con 15% de glicerol (Caledón) y se distribuyó en alícuotas de 1 mL que se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Este procedimiento se siguió para la confección de todos los Bancos de Células Primarios (BCP). Para la confección de los Bancos de Células de Trabajo (BCT) se tomó un vial del BCP del que se inoculó 100  $\mu$ L en un precultivo con 5 mL de medio LB y se procedió como se describe para la confección del BCP.

### Verificación de la viabilidad de los bancos

Para la verificación de la viabilidad de los bancos se hicieron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en solución salina (NaCl 0,9%) y se sembraron en medio LB, según el método descrito por Pérez-Reytor y colaboradores (6).

Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h; después de este tiempo se contaron las colonias y se calculó la viabilidad de los bancos. El número de viables se definió como la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC), contadas en cada traza multiplicada por 100 y por dilución para definir las como UFC/mL. Las especificaciones de calidad de los bancos se definieron para una viabilidad entre  $10^7$  y  $10^9$  UFC/mL.

### Verificación de la estabilidad a la conservación de los mutantes del sistema de reparación SOS

Para verificar la estabilidad de la cepa HB101 de genotipo *recA*, con relación al método de conservación, se sembraron 100  $\mu$ L del BCP en tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C, con agitación durante 6 h. Después de este tiempo se hicieron BCT en medio LB con glicerol al 15% y se conservaron a -70 °C.

Un vial de cada banco se descongeló en hielo durante 20 min y, luego de tomar 100  $\mu$ L de muestra se congeló nuevamente a la temperatura de conservación inicial. De la muestra se hicieron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  y se sembraron por el método de traza de dilución (6) en placas que contenían medio LB. Las placas se incubaron a 37 °C por 16 h. Luego se determinó la viabilidad por conteo directo de las colonias. Estos ciclos de descongelaciones se realizaron ocho veces con un intervalo de 1 h entre ellos. Como control del experimento se empleó la cepa RRI que es isógena para todos los marcadores genéticos y no contiene la mutación *recA* a la cual se le realizó el mismo procedimiento que se describe para la cepa HB101.

### Verificación de la pureza microbiológica mediante crecimiento en placa de medios indicadores

La pureza de los bancos de células se confirmó por siembra en placas Petri sobre superficie de medios agarizados. De cada banco se hicieron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en solución salina (NaCl 0,9%) y se sembraron por el método trazas de dilución sobre los medios siguientes: LB, Agar Mac Conkey, Agar Eosina Azul de Metileno, Agar Citrato de Simmons y Agar Tryptona Soya (7).

Como criterio de pureza microbiológica se tomó la morfología de las colonias y sus habilidades de crecimiento en los diferentes medios de cultivo, así como la homogeneidad de las células por tinción de Gram (4).

### Verificación de la identidad de las cepas por confirmación de los fenotipos de vías sintéticas, degradativas y resistencia a antibióticos

A partir de los bancos de cepas se hicieron diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en solución salina (NaCl 0,9%) y se sembraron por el método traza de dilución en medio LB, al cual se adicionó antibiótico a 25  $\mu$ g/mL, según el fenotipo de la cepa (6).

En el caso de la verificación de los mutantes auxotróficos se empleó el medio M9 (8), al cual se le adicionó glucosa al 0,2% y el aminoácido o las combinaciones de aminoácidos, según el genotipo de la cepa a verificar.

Para la verificación de los marcadores catabólicos se utilizó el medio M9 suplementado con los aminoácidos de auxotrofia, según la cepa. En una concentración de 0,2% se añadieron los azúcares correspondientes a la mutación catabólica señalada en la descripción de la cepa. En todos los casos se empleó como control positivo de crecimiento medios suplementados con glucosa al 0,2%.

Para la verificación particular de los mutantes catabólicos de las vías degradativas de galactosa y lactosa se utilizó el medio Mac Conkey No. 3 de la casa comercial Biocen.

### **Verificación de la identidad de las cepas mediante reacción en cadena de la polimerasa**

El ADN cromosomal se purificó según Sambrook (7). Para la cuantificación del ADN se hicieron diluciones seriadas 1/10 de la muestra en agua destilada estéril hasta  $10^{-2}$ . La muestra se evaluó por electroforesis sumergida en un gel de agarosa al 0,8% y se usó un sistema Tampón Tris Borato, con un voltaje constante de 120 V y se reveló con Bromuro de Etidio ( $10 \mu\text{g/mL}$ ).

El serotipo K12 de *E. coli* se verificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Como sonda se emplearon dos oligonucleótidos que son complementarios a una región del *orf264* que presenta una secuencia característica de *E. coli* K12. Un segundo par de oligonucleótidos fueron utilizados, los cuales eran complementarios a una zona típica del serotipo K12 de *E. coli*, correspondiente al elemento de inserción IS5. Como control positivo se utilizó un tercer par de oligonucleótidos complementario al gen *pal* que codifica para una lipoproteína asociada al peptidoglicano de la pared celular de la bacteria, el cual es conservado en las enterobacterias (9).

Las reacciones de amplificación fueron diseñadas con los siguientes parámetros: incubación inicial a 94 °C durante 3 min, seguidas por 35 ciclos a la misma temperatura de incubación, pero de una duración de 30 segundos y una incubación final de 72 °C durante 1,5 min. Los productos de la RCP se analizaron por electroforesis sumergida en un gel de agarosa al 0,8%; se usó un sistema Tampón Tris Borato, se mantuvo a voltaje constante de 120 V y se visualizó por inmersión del gel, después de la corrida en una solución Tampón que contenía Bromuro de Etidio ( $10 \mu\text{g/mL}$ ).

### **Resultados y Discusión**

La colección de hospederos de *E. coli* cuenta actualmente con 46 bancos de cepas mutantes que incluyen tanto las que se encontraban conservadas en el Ceparío en el momento de creada la colección como otras de nueva incorporación procedentes de los proyectos de investigación desarrollo (Tabla 1). Los bancos de cepas tienen una alta viabilidad ( $10^8$ - $10^9$  UFC/mL). Cada banco cuenta con tres réplicas, una de las cuales se mantiene a -20 °C y otra a

-70 °C. La comparación de la estabilidad de los bancos a dos temperaturas de almacenamiento permite acumular criterios de la influencia de la temperatura de conservación sobre la estabilidad de cada cepa en tiempo real.

Después de la centralización de las colecciones de *E. coli* de interés biotecnológico se establecieron procedimientos de trabajo únicos para lograr la caracterización de todas las cepas que circulaban en la entidad. Con vistas a homogeneizar los criterios de calidad de los bancos de cepas y su completa caracterización se estableció una estrategia de trabajo única que incluye la verificación de todas las propiedades de las cepas, así como chequeos de pureza, estabilidad genética y viabilidad en tiempo real.

Los bancos se confeccionan y se determina la viabilidad por el método traza de dilución (6). En todos los casos la viabilidad inicial estuvo entre  $10^8$  y  $10^9$  UFC/mL, lo que cumple con los parámetros de aceptación establecidos según las especificaciones de calidad para el caso de bancos de bacterias.

La diferencia encontrada en cuanto a los valores de viabilidad entre las distintas cepas puede estar determinada por afectaciones en el sistema de reparación SOS, lo que puede disminuir en estos mutantes la capacidad de reparar el daño provocado por la congelación.

La determinación de la viabilidad de las cepas como un criterio de la estabilidad a la conservación en tiempo real forma parte de los chequeos periódicos que se realizan dentro de la colección. Sin embargo, debido a las diferencias genotípicas que presentan el tiempo mínimo de chequeo debe ser establecido de forma individual.

### **Verificación rápida de la estabilidad a la conservación**

Una gran parte de los daños que puede ocasionar el método de conservación a las cepas que son de interés para los experimentos de clonaje y expresión de genes, puede medirse mediante el chequeo periódico del número de viables de los bancos después de conservados.

La periodicidad de estas pruebas depende de la resistencia de las cepas y de su capacidad de reparar el daño mediante su maquinaria genética. Otros autores han encontrado que la conservación por congelación a -70 °C de las cepas de *E. coli* puede ser de muchos años, sin que se afecte su viabilidad ni se pierdan las características genotípicas de interés por las cuales las cepas son valiosas (5). Sin embargo, como parte del establecimiento de la colección se determinó de forma rápida el daño sobre dos cepas que solo se diferencian en la mutación *recA*, lo que imposibilita a una de ellas reparar el daño en el ADN en caso de que este se produzca.

**Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* de la Colección de Microorganismos de Interés biotecnológico del CIGB.**

N° Cepa	Alternativo	Genotipo
CMIB0001	BHB2688	<i>F</i> , <i>recA</i> , $\lambda^B$ ( <i>hEam4 b2 red3 imm434 cI<sup>+</sup> sam7</i> )
CMIB0002	BJ5183	<i>F</i> , <i>endA</i> , <i>sbcB</i> , <i>recBC</i> , <i>galK</i> , <i>met</i> , <i>str<sup>R</sup></i> , <i>thi-1</i> , <i>bioT</i> , <i>hsdR</i> , $\lambda^-$
CMIB0004	BL21(DE3)	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>r<sub>S</sub><sup>-</sup> m<sub>S</sub><sup>+</sup></i> ) <i>gal</i> , $\Delta$ <i>lon</i> , <i>dcm</i> ( $\lambda$ D69 que contiene la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV <sub>5</sub> )
CMIB0006	C1A	Protótrofa, no tiene sistema de restricción metilación
CMIB0007	C600	<i>F</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>supE44</i>
CMIB0008	C600HB	<i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>supE44</i>
CMIB0010	DH5 $\alpha$	[F' $\phi$ 80 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15] <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> , $\lambda^-$
CMIB0013	GC366	[F' <i>lacP</i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>proAB</i> ] <i>dam13::Tn9</i> $\Delta$ ( <i>lac-pro</i> )
CMIB0014	HB101	<i>F</i> <i>hsdS20</i> ( <i>r<sub>S</sub><sup>-</sup> m<sub>S</sub><sup>-</sup></i> ) <i>supE44</i> <i>recA13</i> <i>ara-14</i> <i>leuB6</i> <i>proA2</i> <i>lacY1</i> <i>rpsL20</i> <i>xyl-5</i> <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i>
CMIB0016	JM101	[F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacP</i> $\Delta$ M15], <i>thi</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>supE</i> , ( <i>rK<sup>+</sup></i> , <i>mK<sup>+</sup></i> )
CMIB0018	JM109	[F', <i>traD6</i> , <i>proAB</i> , <i>lacP</i> $\Delta$ M15] <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK<sup>+</sup></i> , <i>mK<sup>+</sup></i> ) <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> )
CMIB0019	LE 392	<i>F</i> -, <i>supF</i> , <i>supE</i> , <i>hsdR</i> , <i>galK2</i> , <i>trpR</i> , <i>metB1</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA</i> , <i>hsdR</i> , <i>gal</i> T22
CMIB0021	MC1061	<i>F</i> -, $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7696, <i>araD139</i> , $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>hsdR</i> , <i>rpsL</i> , <i>strA</i>
CMIB0022	MC1066	<i>F</i> -, <i>hsdR</i> , <i>rps1</i> <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>trpC9839</i> , <i>ura3</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacX74</i> , <i>pyr::Tn5</i>
CMIB0023	MM294	<i>F</i> , <i>endA1</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR</i> , <i>supE44</i>
CMIB0027	POP 2136	<i>F</i> -, <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>mcrA+</i> <i>mcrB+</i> , <i>hsdR</i> , <i>endA1</i> , <i>tetR</i> , <i>thi-1</i> , <i>aroB</i> , <i>mal</i> , $\lambda^-$
CMIB0029	RRI	<i>F</i> , <i>hsdS20</i> ( <i>r<sub>S</sub><sup>-</sup> m<sub>S</sub><sup>-</sup></i> ) <i>supE44</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>gal</i> K2
CMIB0030	TG-1	[F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacP</i> $\Delta$ M15], <i>thi</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>supE</i> , <i>hsdS</i>
CMIB0031	W3110	<i>F</i> -, <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> in ( <i>rrnD-rrnE</i> )
CMIB0032	W3110 <i>trpA</i>	<i>F</i> -, <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> in ( <i>rrnD-rrnE</i> ), <i>trpA</i>
CMIB0034	W3110 <i>trpD</i>	<i>F</i> -, <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> in ( <i>rrnD-rrnE</i> ), <i>trpD</i>
CMIB0035	XL-1 Blue	[F', <i>proAB</i> , <i>lacP</i> $\Delta$ M15, <i>Tn10</i> ], <i>endA</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , $\lambda^-$
CMIB0038	TOP10 F'	F' [ <i>lacP</i> $\Delta$ Z <i>Tn10</i> $\Delta$ ter <sup>R</sup> ] <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> ), <i>hsdS MR-mrr</i> 173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galK</i> , <i>galU</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> .
CMIB0039	BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>Thi</i> , <i>supE</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) [ <i>mutS::Tn10</i> ][F' <i>proAB</i> , <i>lacP</i> $\Delta$ M15]
CMIB0041	BL-21(DE3) PC1	BL21(DE3) <i>EndA::Ter<sup>R</sup></i> transformada con el plásmido pRB1020 derivado del pET15b
CMIB0042	RV308	$\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>galISH::OP308</i> , <i>strA</i>
CMIB0043	XL-1 Blue MRA	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183, $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> , <i>hsdS MR-mrr</i> )173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>
CMIB0044	XL-1 Blue MRA p2	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183, $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> , <i>hsdS MR-mrr</i> )173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> (p2 <i>lysogen</i> )
CMIB0045	GM2163	<i>F</i> -, <i>ara14</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi1</i> , <i>fluA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>galK12</i> , <i>galT2</i> , <i>supE44</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>dam13::Tn9</i> ( <i>cam<sup>R</sup></i> ), <i>dcm6</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i>
CMIB0046	XL-1 Blue MRF-	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183, $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> , <i>hsdS MR-mrr</i> )173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacP</i> $\Delta$ M15, <i>Tn10</i> ]
CMIB0047	XL0LR	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183, $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> , <i>hsdS MR-mrr</i> )173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacP</i> $\Delta$ M15, <i>Tn10</i> ] <i>Su-</i> (nonsuppressing) $\lambda^B$ ( <i>lambda</i> resistant)
CMIB0048	BL21(DE3) codonPlus RIL	<i>F</i> - <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>r<sub>S</sub><sup>-</sup> m<sub>S</sub><sup>-</sup></i> ) <i>dcm+</i> , <i>Tet<sup>R</sup></i> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> <i>het</i> [ <i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> <i>Cam<sup>R</sup></i> ]
CMIB0049	BL21(DE3) codonPlus RP	<i>F</i> - <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>r<sub>S</sub><sup>-</sup> m<sub>S</sub><sup>-</sup></i> ) <i>dcm+</i> , <i>Tet<sup>R</sup></i> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> <i>het</i> [ <i>argU</i> , <i>proL</i> <i>Cam<sup>R</sup></i> ]
CMIB0050	DH10B	F' <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> ), <i>hsdS MR-mrr</i> 173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galK</i> , <i>galU</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> .
CMIB0051	MM294(Cre)	MM294-Cre: F' $\lambda^-$ <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>lacZ::cI857-Cre</i>
CMIB0052	JC8679	<i>F</i> -, <i>supE44</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>ara-14</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thr1</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>his4</i> , <i>argE3</i> , <i>his-328</i> , <i>recB21</i> , <i>recC22</i> , <i>sbcA23</i> , <i>rpsL31</i> , <i>phn1</i> , <i>tsx-33</i> , $\lambda^B$
CMIB0054	MKH13	$\Delta$ <i>putA101</i> , $\Delta$ <i>proP2</i> , $\Delta$ <i>proU608</i>
CMIB0055	XL-1 Blue MRF Kan	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183, $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> , <i>hsdS MR-mrr</i> )173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>+</sup></i> $\Delta$ M15, <i>Tn5</i> ]( <i>Kan<sup>R</sup></i> )

La presencia de la mutación *recA* en la cepa HB101 diferenció la velocidad de recuperación de las cepas en medio sólido después de cada descongelación. Para la cepa RRI se obtuvo crecimiento después de 14 h de incubación a 37 °C en todos los pases, mientras que la cepa HB101 creció a las 14 h sólo en el primer pase y este tiempo de visualización de las colonias fue haciéndose mayor hasta llegar a ser de 30 h en el octavo ciclo.

Si una condición de almacenamiento no es adecuada o si una cepa es sensible a una condición predeterminada entonces debe esperarse que la disminución de las células viables en el tiempo sea mayor. Al final de los ocho ciclos de descongelaciones sucesivas no encontramos pérdida de la viabilidad con relación al número inicial de viables del banco en las dos cepas comprobadas.

Debido a estas evidencias y de acuerdo con lo reportado en la literatura en cuanto a la resistencia de *E. coli* a la congelación (10), se estableció que el intervalo de tiempo para el chequeo de la viabilidad en tiempo real se realizara cada dos años a partir de la fecha de confección de los bancos de la colección y de un año para las cepas *recA*. Como criterio de calidad del banco se tiene en cuenta no solo la comparación de la viabilidad sino también que el tiempo de visualización de las colonias sobre medio sólido no sea mayor de 16 h.

### **Verificación de la pureza microbiológica de los bancos**

Uno de los problemas fundamentales en la conservación está relacionado con la contaminación de los cultivos con microorganismos que tienen características morfológicas y tintoriales similares a la cepa a conservar. Es por ello que el empleo de una estrategia que permita descartar la presencia de contaminantes a bajas concentraciones en el medio de crecimiento permite la obtención de un cultivo puro del microorganismo de interés.

Tal es el caso de las especies del género *Pseudomonas* que se encuentran comúnmente en los cultivos cuando hay fallos en la esterilización de los medios. En nuestra estrategia de verificación de pureza estos contaminantes solo se observaron en el medio Citrato de Simmons, donde la *E. coli* no tiene la habilidad de crecer (4).

Las cepas de *E. coli* de nuestra colección son mutantes que difieren en varios marcadores de sus genotipos, por lo que sus características en los medios de cultivo son diferentes a las reportadas para *E. coli* salvaje. Teniendo en cuenta esto y la evaluación de los contaminantes frecuentes en el ambiente de laboratorio se diseñó una estrategia de chequeo que incluye: el empleo de los medios indicadores Agar Mac Conkey, Agar Citrato de Simmons, Agar Triptona Soya y Agar Eosina Azul de Metileno y el método de siembra en placa

trazas de dilución (6). Esta estrategia dio un criterio de pureza y permitió hacer una diferenciación entre los contaminantes más frecuentes y las cepas de *E. coli* en una proporción de un contaminante por 10<sup>9</sup> UFC del microorganismo de interés (4).

La presencia en el cultivo de contaminantes no detectados por el método de verificación de pureza, anteriormente descrito, puede variar los resultados de las investigaciones, tal es el caso de contaminaciones con especies de bacilos que esporulan y se mantienen viables en el medio de cultivo aún en condiciones en que los nutrientes han disminuido pero no proliferan en los medios con concentraciones altas de sales o a temperaturas de 37 °C. Debido a esto, otro criterio de pureza es el crecimiento en medios de propósito general como el Agar Triptona Soya y a temperatura de crecimiento de 25 °C durante 24 h, que propicia el crecimiento de bacilos ambientales.

### **Verificación de fenotipos de vías sintéticas, degradativas y resistencia a antibióticos**

En las cepas mutantes de *E. coli* la verificación de los genotipos descritos es fundamental para garantizar el mantenimiento de los marcadores listados y poder detectar posibles reversiones que puedan afectar los resultados en el proceso investigativo. Todas las cepas de la colección mostraron el resultado esperado en el análisis fenotípico de acuerdo con su genotipo, no encontrándose pérdida de las mutaciones en ninguna de ellas durante la conservación. Esta verificación valida que cada mutante mantiene los marcadores por los cuales ha sido almacenado y que lo hace útil en el trabajo en Biología Molecular.

### **Reacción en cadena de la polimerasa**

Según Pérez-Reytor y colaboradores (4), otros contaminantes reportados son cepas de *E. coli* salvajes, provenientes del entorno ambiental que pueden ser frecuentemente introducidas como contaminantes en los cultivos y son el resultado de alguna mala manipulación en el momento de la confección de los bancos. Ya que una de las prácticas habituales para la obtención de cultivos puros es partir de una colonia, se corre el riesgo si el cultivo está contaminado con una cepa ambiental de *E. coli*, de seleccionarla como la cepa de interés.

En el caso de cepas protótrofas son indistinguibles de estos contaminantes por todos los métodos convencionales de verificación de pureza. Debido a esto se emplea la RCP para autenticar el serotipo K12 al cual pertenece la mayor cantidad de cepas de la colección.

Todas las cepas que pertenecen al serotipo K12 amplificaron las tres bandas pertenecientes al gen *pal*, al elemento de inserción IS5 y al grupo de genes *orf24* (Figura 1). Las cepas pertenecientes a los serotipos B y C amplificaron la banda

correspondiente al gen *pal*, característico de las enterobacterias, como muestra la figura donde se comparan los patrones de bandas observados en un gel de electroforesis para *E. coli* K12, *E. coli* C, *E. coli* B y la cepa control *E. coli* 0157:H7.

La verificación de la mutación típica de las cepas de interés biotecnológicos da un criterio de bioseguridad, ya que garantiza la no patogenicidad de las mismas. El hecho de que la técnica de RCP sea muy sensible no da por sí sola un criterio de pureza pero complementa los criterios de calidad obtenidos por el crecimiento en medios indicadores.

### Estrategia de verificación

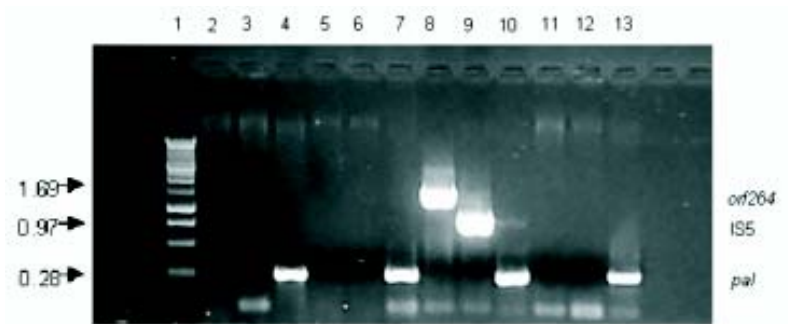
Una vez realizadas las diferentes pruebas a todos los bancos de la colección se estableció una estrategia única de verificación de los bancos que se muestra en la Figura 2. La misma se adoptó para la confección tanto de los BCP como de los BCT que se realizan en el Ceparío del CIGB.

Los métodos de chequeo para la verificación de la pureza y la estabilidad genética de las cepas de *E. coli* de interés biotecnológico posibilitan la caracterización y el chequeo de un gran número de bancos con el empleo de un mínimo de tiempo, manipulación y con criterios únicos de autenticación.

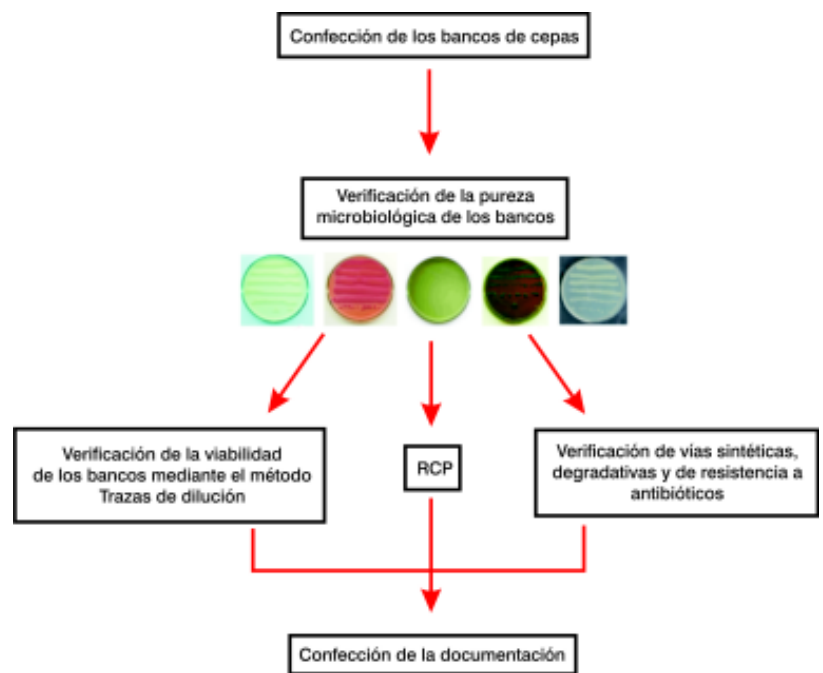
El diseño de estrategias propias desarrolladas en nuestro laboratorio garantiza que las cepas de la colección mantengan los marcadores moleculares que las hacen útil para el trabajo biotecnológico y posibilita que los resultados interlaboratorios sean comparables.

### Referencias

1. Karp PD, Keseler IM, Shearer A, Latendresse M, Krummenacker M, Paley SM, et al. Multidimensional annotation of the *Escherichia coli* K12 genome. *Nucleic Acids Research* 2007;35:7577-90.
2. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 1999; 10:411-21.
3. Saïda F, Uzan M, Odaert B, Bontems F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Current Protein and Peptide Science* 2006;7(1):47-56.
4. Pérez-Reytor DC, Campos LY, Domínguez I, Sosa AE. Verificación rápida de la pureza microbiológica



**Figura 1.** RCP que identifica la presencia de *E. coli* K12. (1) Patrón de peso molecular HindIII. (2, 3,4) *E. coli* 0157:H7. (5, 6, 7) *E. coli* C1A. (8, 9,10) *E. coli* W3110. (11, 12,13) *E. coli* BL-21(DE3) La banda de 0,28 kb pertenece al gen *pal*, la de 0,97 kb pertenece al elemento de inserción IS5 y la de 1,69 kb pertenece a una región del *orf24* con una secuencia característica de *E. coli* K12.



**Figura 2.** Estrategia general para el chequeo y aprobación de los bancos de cepas de *E. coli* de la Colección de Microorganismos de interés biotecnológico del CIGB.

- de bancos de *Escherichia coli* K12. *Biología Aplicada* 2003; 20(4):231-7.
5. Sidyakina TM y VE Golimbet. Viability and genetic stability of the bacterium *Escherichia coli* HB101 with the recombinant plasmid during preservation by various methods. *Cryobiology* 1991;28:251-4.
6. Pérez-Reytor DC, Domínguez I y Sosa A E. Evaluación del método de siembra en placa traza de dilución en el control de calidad de bancos de mutantes de *Escherichia coli* K12. *Biología Aplicada* 2002; 19 (3):169-73.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. "Plasmid vectors" in *Molecular cloning: a laboratory manual*. T.I. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press Ed; 1989.
8. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the Third edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press Ed; 2001.

9. Kuhnert P, Nicolet J. Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* Strains. Applied and Environmental Microbiology 1995; 61:4135-9.
10. Israeli E, Shaffer BT, Hoyt JA. Survival differences among freeze-dried genetically engineered and wild-type bacteria. Applied and Environmental Microbiology 1993;59:594-8.

---

## **Strategy to verify quality of *Escherichia coli* strains kept in the collection of the Center of Genetic Engineering and Biotechnology**

### **Abstract**

The Collection of Biotechnological-Interest Microorganisms of the CIGB includes several bacteria and yeast strains used in gene manipulation by means of genetic engineering and the production of recombinant proteins. The *E. coli* host collection contains all the strains used in the research projects of the institution. This microorganism is an important tool for genetic engineering and molecular research. Accuracy of results depends on the quality of the microorganism banks, which it is determined by the storage conditions and the evaluation strategies of these microorganisms. The complexity of the management of this collection is influenced by the fact that a great number of contaminants may grow in the propagation media and they are difficult to identify. The more similar is the pollutant to the strain of interest, the harder it is to obtain pure banks with reliable stability and conservation. This work describes how quality control is ensured in the *E. coli* banks. The verification methods and strategies described here have been developed in our laboratory.

**Keywords:** Culture collection, *E. coli* strains, purity assay, Genetic Engineering, Molecular Research.

---

*Recibido: Octubre de 2009*

*Aceptado: Diciembre de 2009*