

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 067**

21 Número de solicitud: 201330997

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

12

## PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**03.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.02.2015**

Fecha de la concesión:

**30.09.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**07.10.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/000113**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE HUELVA (100.0%)  
C/ Dr. Cantero Cuadrado, 6  
21071 Huelva (Huelva) ES**

72 Inventor/es:

**LEON BAÑARES, Rosa María y  
VILA SPINOLA, Marta**

74 Agente/Representante:

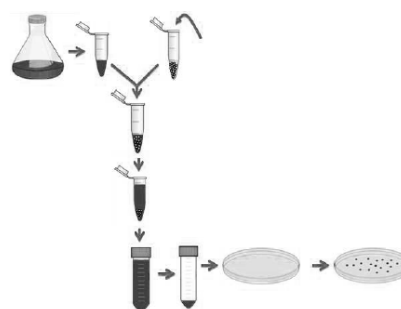
**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES Y KIT PARA LLEVAR A CABO DICHO PROCEDIMIENTO**

57 Resumen:

Procedimiento para la transformación de células vegetales y kit para llevar a cabo dicho procedimiento. La presente invención se refiere a un procedimiento de transformación de células vegetales que se realiza sin introducir en el genoma de la célula a transformar ninguna secuencia promotora o reguladora distinta al gen a transformar y el kit para llevar a cabo dicho procedimiento.

FIG. 1



ES 2 528 067 B1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la transformación de células vegetales y kit para llevar a cabo dicho procedimiento.

5

### Campo de la invención

La presente invención se encuadra en el campo general de la ingeniería genética y en particular se refiere a un procedimiento para la generación de células vegetales transgénicas.

10

### Estado de la técnica

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, mayoritariamente fotosintéticos, con gran importancia ecológica y con un enorme potencial biotecnológico. Varias especies se utilizan actualmente para la producción a gran escala de carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados y otros compuestos de alto valor añadido con aplicaciones en la industria alimentaria, dietética, cosmética y de química fina. Más aún, algunas especies de microalgas han sido propuestas como sistemas alternativos para la expresión de proteínas heterólogas, incluyendo anticuerpos y otras proteínas terapéuticas y en los últimos años ha habido un creciente interés en las microalgas como posible materia prima para una tercera generación de biocombustibles renovables con un balance neutral de carbono (Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, Posewitz MC. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*. 2010; 9(4):486-501).

15

20

25

A pesar del gran interés biotecnológico de las microalgas, no existe un método robusto para la transformación estable de la mayoría de las especies. La primera microalga modificada genéticamente fue la clorofita de agua dulce, *Chlamydomonas reinhardtii*, transformada en 1989 por complementación de mutantes con los correspondientes genes homólogos. La transformación genética de las diatomeas *Cyclotella triptica* and *Navicula saprophila* fué reportada por primera vez en 1995 y pronto aparecieron otros trabajos describiendo los protocolos para la transformación *Phaeodactylum tricornutum*. Desde entonces se han desarrollado un importante número de marcadores seleccionables, promotores y nuevos procedimientos para la introducción eficiente de ADN en el núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Phaeodactylum tricornutum*. Sin embargo, el número de especies transformadas apenas ha aumentado.

30

35

El uso de promotores heterólogos ha permitido la expresión transitoria y poco eficiente de genes heterólogos en algunas especies de algas verdes. Pero, en la actualidad, las mejores eficiencias de transformación y los transformantes más estables se obtienen con promotores endógenos. De hecho, la falta de promotores endógenos ha impedido la transformación genética en muchas especies.

40

Los métodos para introducir los genes deseados en la célula hospedadora son muchos y están bien descritos en la bibliografía científica. Los más usuales para la transformación de microalgas son: el bombardeo de microproyectiles o biolistic, la electroporación, fibras de carburo de silicio, el método de agitación con perlas de vidrio.

45

Existen métodos para minimizar las secuencias del vector o plásmido que acompañan al gen de interés y por lo tanto son insertados en el genoma de la célula hospedadora (Sizova, I.; Fuhrmann, M.; Hegemann, P. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 2001; 277: 221-229) pero todos insertan promotores o regiones reguladoras.

50

Existe pues la necesidad de encontrar un procedimiento de transformación de células en ausencia total de promotores o regiones reguladoras.

### Descripción de la invención

5 La presente invención soluciona los problemas planteados en el estado de la técnica ya que describe un procedimiento de transformación de células vegetales en la que la expresión del gen marcador no depende de ningún promotor o región reguladora, ni exógena ni endógena, que haya que introducir en el genoma. Además se evita la introducción innecesaria de  
10 secuencias de ADN indeseables en los transformantes, quedando estas reducidas al gen de interés y al gen marcador.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la transformación genética de células vegetales (de ahora en adelante procedimiento de la  
15 presente invención) que comprende las siguientes etapas:

- a) introducir en un medio de transformación, el gen marcador, el gen a transformar y un concentrado de las células vegetales a transformar,
- b) incubar y someter las células al procedimiento de transformación
- 20 c) separación de las células del medio de cultivo
- d) cultivar las células obtenidas en la etapa c) en un medio de selección

caracterizado por que en la transformación se realiza sin introducir en el genoma de la célula a transformar ninguna secuencia promotora o reguladora distinta al gen a transformar.  
25

En la presente invención el término "transformación" se refiere a la transferencia de un ácido nucleico y su integración al genoma nuclear de las microalgas u otras células vegetales para generar microalgas o células vegetales transgénicas.

30 En la presente invención el término "gen" se refiere a la secuencia de nucleótidos que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, habitualmente proteínas, pero también ARN mensajero, ribosómico o transferente.

En la presente invención el término "promotor" se refiere al fragmento de ácido nucleico que dirige la expresión del gen o genes (en procariontes) a los que precede. El promotor contiene elementos característicos que facilitan la unión de la ARN polimerasa, responsable de la transcripción del gen o genes situados a continuación promotor.  
35

En la presente invención el término "gen de interés" se refiere a el gen que quiere introducirse en el genoma del hospedador y suele codificar una proteína o péptido, aunque también puede ser transcrito a secuencias de ARN que no codifican ninguna proteína.  
40

En la presente invención el término "vector" se va a utilizar de forma equivalente al término "plásmido" y se refiere a un fragmento de ADN circular que tiene capacidad autónoma de replicación en bacterias de forma independiente del ADN cromosómico.  
45

En un aspecto más en particular de la presente invención, las células vegetales son microalgas.

50 En la presente invención el término "microalga transgénica" se refiere a aquella que contiene uno o varios transgenes o genes exógenos, introducidos en su genoma mediante transformación genética.

Más en particular, en el procedimiento de la presente invención, la transformación se realiza mediante agitación con perlas de vidrio, electroporación o bombardeo de partículas.

5 Más en particular, la relación gen de interés y gen marcador en el procedimiento de la presente invención, es superior a 3.

Más en particular, en el procedimiento de la presente invención, el gen marcador y el gen a transformar no están en el mismo plásmido.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la célula transformada mediante el procedimiento de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención (de ahora en adelante, kit de la presente invención) que comprende:

- 15
- el gen marcador
  - el gen a expresar
  - el tubo de transformación

20 Más en particular, el tubo de transformación comprende perlas de vidrio. Más en particular, el gen marcador y el gen a transformar están incluidos en tubos individuales.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit de la presente invención en un procedimiento para transformación de células vegetales según el procedimiento de la presente invención.

25

### **Descripción de las figuras**

La figura 1 muestra el esquema del protocolo de transformación empleado para la transformación de la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*.

30

La figura 2 muestra la placa con medio TAP-paromomicina mostrando las colonias de *Chlamydomonas reinhardtii* transformantes obtenidas.

La figura 3, muestra el análisis mediante PCR de algunos de los transformantes obtenidos elegidos de forma aleatoria. El ADN genómico de los transformantes: 2-1, 2-2 y 2-3 fue utilizado como molde para una reacción de PCR con cebadores específicos para el gen de interés *ars* (A) y marcador de resistencia *aphVIII* (B). C-, control negativo. MW, marcadores de peso molecular.

35

### **Descripción detallada de la invención**

Para llevar a cabo el procedimiento de la invención se utilizó un kit que contenía:

- 45
- El ADN marcador selectivo liofilizado. La cantidad adecuada para una reacción de transformación se suministró en tubos de plástico individuales.
  - La solución de re-suspensión, para rehidratar el ADN e incubarlo con el gen de interés.
  - La solución de transformación para el método de agitación con perlas de vidrio (opción A) o por electroporación (opción B)

50 El procedimiento al no basarse en promotores específicos o secuencias regulatorias, puede ser utilizado para la manipulación genética de diferentes especies vegetales, desde microalgas unicelulares a protoplastos de plantas superiores. Como la estrategia no se basó en promotores específicos o secuencias regulatorias, sólo el propio gen marcador selectivo y el gen de interés fueron insertados en el genoma microalgal, evitando la introducción de

secuencias de ADN indeseables en la especie transformada. Esto supuso una gran ventaja, teniendo en cuenta la susceptibilidad que los transgénicos y la introducción de ADN exógeno mediante transgénesis despierta en la opinión pública.

5 En el procedimiento de la presente invención el gen de interés y el gen marcador selectivo no estaban en el mismo plásmido, por lo que ambos genes fueron simultáneamente introducidos en diferentes *loci* del genoma. Se comprobó que la relación entre el gen de interés y el gen marcador selectivo tenía que ser superior a tres, para que prácticamente todos los transformantes seleccionados en el presencia del agente selectivo contengan el gen de interés.  
10 Después, los transformantes obtenidos, se sometieron a un sencillo cribado buscando aquellas con mayor expresión del gen de interés mediante RT-PCR.

*Ejemplo 1: Generación de C. reinhardtii transgénica con un kit para la transformación genética sencilla y eficiente de microalgas.*

15 Presentamos la descripción detallada de la transformación de la microalga modelo "*Chlamydomonas reinhardtii*" con el gen de interés que codifica la enzima "aril sulfatasa" (*ars*), usando el gen *aphVIII*, que confiere resistencia al antibiótico paromomicina como gen marcador selectivo. La transformación se llevó a cabo con el "Kit de transformación de microalgas". La figura 1 muestra un esquema que resume el proceso.  
20

La estirpe 704 de *Chlamydomonas reinhardtii*, que carece de pared celular, fue adquirida en el Culture Collection of Algae at the University of Texas (UTEX, Austin, TEX, USA) y mantenida en medio TAP.

25 El gen *aphVIII* sin promotor fue obtenido a partir del plásmido pSI104<sup>26</sup> por digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI . El gen *aphVIII* codifica la enzima aminoglicosido 3`-phosphotransferase de *Streptomyces rimosus*, que confiere resistencia al antibiótico paromomicina<sup>20</sup>.  
30

Las células de *C. reinhardtii* se dejaron crecer hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento (alrededor de  $1.6 \times 10^6$  células ml<sup>-1</sup>), fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio TAP fresco para obtener una suspensión celular 100 veces concentrada.

35 La solución de re-suspensión suministrada con el kit fue añadida al tubo de transformación, proporcionado con el kit, que contiene 0.3 g de perlas de vidrio estériles (0.4-0.6 mm diámetro) y el gen marcador selectivo, en este caso el gen *aphVIII*, liofilizado.

40 El gen de interés, en este caso el *ars*, se añadió a este "tubo de transformación", se mezcló exhaustivamente invirtiendo el tubo 4-5 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La relación entre el gen de interés y el gen marcador selectivo debe ser superior a tres.

45 La suspensión celular concentrada (0.6 mL) y la "solución de transformación opción A" se añadieron al tubo de transformación, que se agitó energicamente durante 8 segundos (el tiempo de agitación puede variar según la especie a transformar).

50 Las células transformadas se resuspendieron en 50 mL de medio TAP estéril y se incubaron toda la noche en la cámara de cultivo. Después de esta incubación en ausencia de antibiótico, el cultivo se recogió por centrifugación y las células precipitadas se resuspendieron en 0.8 mL de medio de cultivo y se inocularon en placas con medio TAP sólido y el correspondiente antibiótico, en este caso paromomicina (20 µg ml<sup>-1</sup>). Las colonias de microalgas transformadas son visibles tras 5-7 días de cultivo (Fig.2).

Varias colonias transformantes, elegidas aleatoriamente, se cultivaron en tubos de ensayo con 2 mL de medio TAP con paromomicina ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) para comprobar la inserción del gen marcador de selección (*aphVIII*) y del gen de interés (*ars*).

5 Tras dos o tres días de cultivo los 2 mL de cultivo se recogieron por centrifugación. El precipitado obtenido tras la centrifugación se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM EDTA, 2% SDS, 0.3M NaCl), se agitó vigorosamente durante 5 min y se incubó en hielo durante otros 5 min. El ADN fue extraído con fenol/cloroformo y precipitado con etanol absoluto toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 40  $\mu\text{L}$  of 5mM Tris-HCl, pH 8.0. El ADN genómico obtenido fue cuantificado y su grado de pureza comprobado con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

10  
15 El análisis mediante PCR del ADN genómico obtenido de las colonias resistentes a paromomicina con cebadores específicos para el gen marcador de selección y el gen de interés, demostró que todos los transformantes analizados habían integrado con éxito tanto el gen *aphVIII* como el gen *ars* en sus genomas. (Fig. 3).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la transformación genética de células vegetales caracterizada por que comprende las siguientes etapas:
- a) introducir en un medio de transformación, el gen marcador, el gen a expresar y un concentrado de las células vegetales a transformar,
  - b) incubar y someter las células al procedimiento de transformación
  - c) separación de las células del medio de cultivo
  - 10 d) cultivar las células obtenidas en la etapa c) en un medio de selección
- caracterizado por que en la transformación se realiza sin introducir en el genoma de la célula a transformar ninguna secuencia promotora o reguladora distinta al gen a transformar.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado por que las células vegetales son microalgas.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que la transformación se realiza mediante agitación con perlas de vidrio, electroporación o bombardeo de partículas.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la relación gen de interés y gen marcador es superior a 3.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el gen marcador y el gen a transformar no están en el mismo plásmido.
- 25 6. Célula transformada mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Kit para llevar a cabo el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende:
- gen marcador
  - gen a expresar
  - tubo de transformación
- 35 8. Kit según la reivindicación 7, caracterizado por que el tubo de transformación comprende perlas de vidrio.
9. kit según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, caracterizado por que el gen marcador y el gen a transformar están incluidos en tubos individuales.
- 40 10. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en un procedimiento para transformación de células vegetales según las reivindicaciones 1-5.

FIG. 1

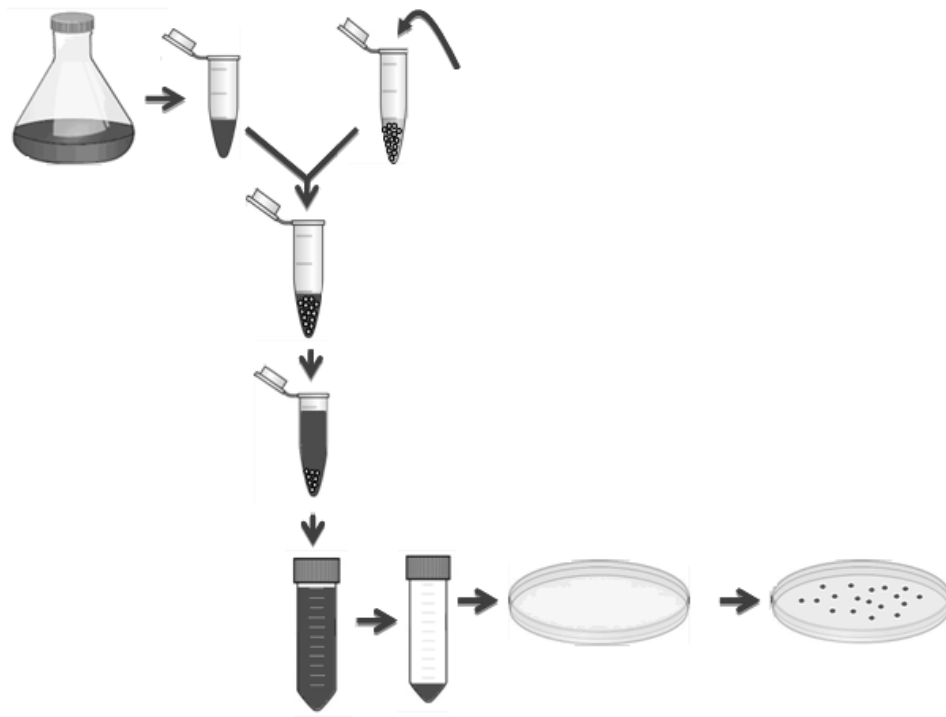




Fig. 2

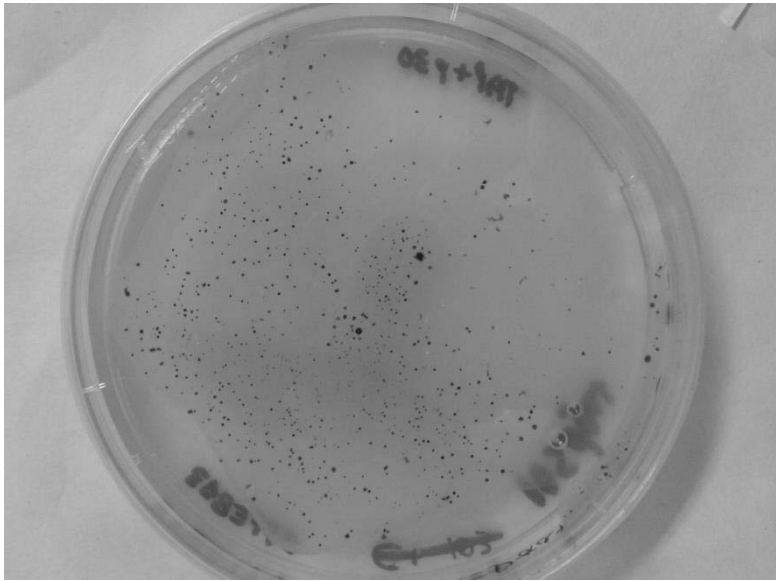


Fig. 3

