

CLONACIÓN DEL EXTREMO 5' DEL GEN CODIFICANTE PARA LA β -MANOSIDASA DE *Cellulomonas flavigena*.

Jesús Alarcón-Bonilla, Patricia Pavón-Orozco, J. Alejandro Santiago-Hernández, Beatriz Xoconostle-Cázares, María Eugenia Hidalgo-Lara. Depto. de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. México, D.F. C.P. 07360. Tel. 5061-3800 ext. 4360. e-mail: ehidalgo@cinvestav.mx

Cellulomonas flavigena, β -manosidasa, mananos.

Introducción. Las mananas son polisacáridos constituidos principalmente por unidades de manopiranosas. Los hetero-1,4- β -D-mananos contienen manosa y glucosa en la cadena principal y se encuentran en árboles y plantas (1). La degradación de los mananos sigue un orden específico: las endo-1,4- β -manosidas rompen la cadena principal liberando manotriosa y manobiosa, posteriormente éstas son degradadas a manosa por la β -manosidasa, por último si están presentes la galactosa y los acetil-glicósidos son hidrolizados por la α -galactosidasa y acetil manano-esterasa, respectivamente. *Cellulomonas fimi* y *C. flavigena* son bacterias celulolíticas capaces de degradar mananos por la acción de una β -manosidasa, donde la importancia de ésta radica en su acción sinérgica con otras carbohidrolasas a nivel industrial (2,3). Actualmente se cuenta con un 52% de la secuencia de nucleótidos del gen codificante para la β -manosidasa de *C. flavigena*, correspondiente al dominio catalítico de la enzima.

Objetivo. Secuenciar el extremo 5' del gen codificante para la β -Manosidasa de *Cellulomonas flavigena*.



Fig. 1 Estructura 3D de β -1,4-manosidasa y sus dominios de *Cellulomonas fimi*

Metodología. De un cultivo de *C. flavigena* de 24 h. se obtuvo el DNA genómico usando el kit DNeasy (Qiagen). En función de la secuencia parcial del gen de interés (GenBank AM404313) se realizó un análisis de restricción seleccionando a *Pst*I para el extremo 5', se diseñaron los oligonucleótidos y adaptadores correspondientes (NEB) para esta enzima y se efectuó la digestión del DNA genómico. Posteriormente, se ligaron los adaptadores a los fragmentos obtenidos de la digestión con *Pst*I. Se amplificaron los fragmentos homólogos por PCR empleando la TaKaRa DNA polimerasa. Los fragmentos amplificados se clonaron en el plásmido pDrive y se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el plásmido

recombinante. Se seleccionaron las clonas en medio LB con kanamicina, X-Gal e IPTG. Posteriormente, se obtuvo del DNA plasmídico y se digirió con *Eco*RI para la liberación del inserto. Por último, se seleccionaron los plásmidos recombinantes por electroforesis para su subsecuente secuenciación.

Resultados y discusión. Como se puede apreciar en la figura 2, se encuentran los patrones electroforéticos del plásmido recombinante sin digerir (S) y digerido con *Eco*RI (D) de las 6 clonas positivas, de tal manera que se observan los insertos liberados entre 1.6 y 2 kb (5R, 7A y 8A) y de 1 kb (13R y 16R) seleccionados para su posterior secuenciación. Se pueden apreciar que en las clonas 5R, 13A y 16R se liberaron fragmentos menores a 1 kb que por su tamaño no son candidatos a ser secuenciados.

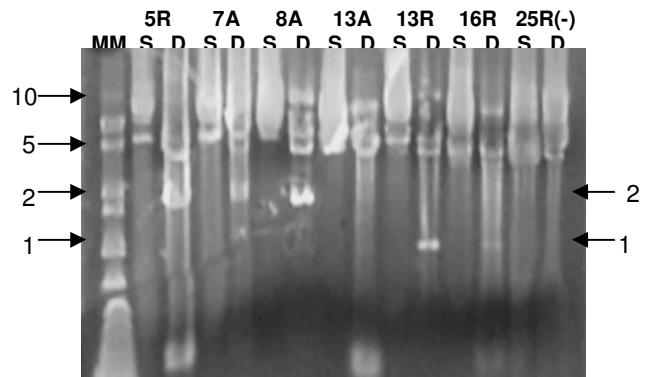


Fig. 2. Patrones electroforéticos del plásmido recombinante pDrive. Sin digerir (S) y digerido con *Eco*RI (D). MM: marcador Molecular

Conclusiones. Se obtuvieron seis clonas positivas que podrían contener el extremo 5' del gen codificante para la β -manosidasa de *C. flavigena*.

Bibliografía. 1) Gübitz G.M, Hayn M, Sommerauer M, Steiner W. "Mannan-Degrading Enzymes from *Sclerotium rolfsii*: Characterisation and synergism of two β -mannanases and a β -mannosidase" *Bioresource Technology* 58 (1996) 127-135.
2) Pavón O.P, (2007) Caracterización bioquímica y molecular de la β -manosidasa de *Cellulomonas flavigena*. Tesis.
3) Le Nours J., Anderson L, Stoll D., Stalbrand H., Lo Leggio L. "The structure and characterization of a modular endo- β -1,4-mannanase from *Cellulomonas fimi*" *Biochemistry* 44 (2005) 12700-12708