

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL cADN QUE CODIFICA PARA LACTOFERRINA DE ORIGEN CAPRINO EN EL SISTEMA MICROBIANO DE *Escherichia coli*

G. Galaviz; B. Rivera-Chavira; S. Arévalo-Gallegos; J. Salazar-Martínez y Q. Rascón-Cruz*

grascon@uach.mx

Palabras clave. Lactoferrina, cabra, expresión.

Introducción. La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de 80 kDa que pertenece a la familia de las transferrinas. Consiste en una cadena polipeptídica simple plegada en dos lóbulos simétricos (-N y -C) conectados por una región de bisagra (1). Cada lóbulo tiene la capacidad de unir un átomo de Fe^{+2} o Fe^{+3} ; esta característica y su amplia distribución en el organismo (calostro, leche, saliva, sangre, orina, entre otros fluidos), hacen que a ésta le sean atribuidas múltiples funciones biológicas (antimicrobiano, antioxidante, inmunomodulador, regula la adsorción intestinal del hierro, etc.), siendo la más importante la protección contra infecciones microbianas. Esta proteína inhibe el crecimiento, tanto de bacterias Gram negativas como Gram positivas, además de ejercer acción protectora contra hongos y levaduras así como contra un amplio espectro de virus (2). En la actualidad, las Lf's de origen humano y bovino son las más caracterizadas e incluso ya son aisladas y purificadas a escala industrial, sin embargo, la información acerca de la Lf de cabra es escasa. Se han realizado algunos estudios de expresión, a nivel laboratorio, en la levadura *Pichia pastoris*.(3). El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar el cADN que codifica para la Lf caprina (cLf) y expresar la proteína en el sistema de *Escherichia coli*.

Metodología. El RNA total fue extraído a partir de glándula mamaria de cabra mediante el uso del kit de extracción de RNA por TRIzol (Invitrogen), en seguida se aisló el mRNA utilizando perlas magnéticas oligo (dT) (Dyna). El cADN de la cLf fue sintetizado a partir del mRNA mediante RT-PCR con el kit SuperScript™ One-Step (Invitrogen). Se utilizaron dos juegos de iniciadores diseñados en base a la secuencia del gen de Lf de *Capra hircus* (X78902), los iniciadores homólogos a la secuencia (cLfFw y cLfR) y los iniciadores modificados (cLf + BamatgFw y cLf-KpnR). El producto de PCR, fue clonado en el vector PCR 4-TOPO y después y mantenido en DH5- α , subclonado en el vector pET-32a, y mantenido en BL21/DE3 que fueron inducidas para que expresaran la proteína recombinante. Se analizó por Northern blot, a las 4 hrs de inducción a 30°C y con 1 mM de IPTG, la presencia de mRNA's recombinantes de cLf en 10 clonas.

Resultados y discusión. A partir de glándula mamaria caprina se obtuvo el RNA total y de este el RNAm. En la Fig. 1 se observa el producto de la reacción de RT-PCR con ambos juegos de iniciadores, el gel de agarosa muestra bandas de 2473 pb y 2257 pb, lo cual concuerda con el resultado esperado.

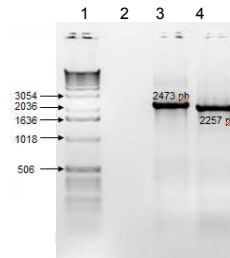


Fig.1 Obtención del cADN de cLf. Carriles 1)MPM, 2) Vacío, 3)Producto con primers homólogos, 4)Producto con primers modificados.

Se acuerdo a la caracterización de las construcciones con enzimas de restricción, se determinó un modelo del plásmido con el gen de cLf orientado con respecto al promotor Lac, el cual se aprecia en la Fig.2.

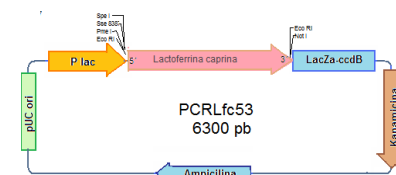


Fig. 2. Construcción obtenida con el gen cLf.

En el análisis por Northern blot de los mensajeros transcritos de cLf, se observó que en varias de las clonas que contenían el inserto no presentaba señal de hibridación muy intensa con la sonda, mientras que otras clonas la señal es muy marcada.

Conclusiones. Se logra la amplificación de un producto de PCR de aproximadamente 2.4 kb, lo cual concuerda con el tamaño del gen reportado en el NCBI. La transcripción del RNAm que se traduce a cLf no es igual en todas las clonas que presentaron la construcción, si no que hay variación, lo cual indica que se cuenta con clonas que pueden potencialmente producir mayor cantidad de proteína que otras.

Agradecimientos. A la empresa PROTEO, S.A de C.V., por su colaboración y apoyo en el financiamiento de este proyecto.

Bibliografía.

- 1) Brock, J. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell Biol.* 80:1-6.
- 2) Rodríguez, D., Vazquez, L. y Ramos, G. (2005). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47 (3-4): 102-111.
- 3) Chen, G., Yin, L., Chiang, I. y Jiang, S. (2007). Expression and Purification of Goat Lactoferrin from *Pichia pastoris* Expression System. *Journal of Food Sci.* 72: M67-M71.