

### CLONACIÓN DE UNA ISOPEROXIDASA DE NABO (*Brassica napus* var. purple top white globe) EN UN SISTEMA BACTERIANO

Alejandra Medina Valle\*, Blanca García Almendárez, Sergio Romero Gómez, Carlos Regalado González<sup>†</sup>  
Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, CU,  
Cerro de las Campanas s/n Col. las Campanas. Querétaro 76010 Qro. Fax: (442) 1921304  
\*alem48@hotmail.com, †carlosr@uaq.mx

Palabras clave: isoperoxidasa, nabo, expresión.

**Introducción.** En las plantas, diversos procesos fisiológicos son mediados por enzimas llamadas peroxidasas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como aceptor de electrones. Las peroxidasas son utilizadas en diversas aplicaciones industriales y analíticas (1). La fuente principal de peroxidasas es el rábano picante (*Armoracia rusticana*) que no crece bien en México por lo que se han buscado fuentes alternativas, de entre ellas, las isoperoxidasas de nabo (*Brassica napus*) presentan buena actividad enzimática y son termoestables (1). La clonación de peroxidasas de plantas en *Escherichia coli* se ha llevado a cabo con éxito, así como su posterior plegamiento y activación (2). El objetivo de este trabajo es clonar una isoperoxidasa de nabo (*Brassica napus* var. purple top white globe), expresarla en *E. coli* y plegarla *in vitro* para obtenerla en forma activa.

**Metodología.** Se cosechó nabo de 5 semanas y se extrajo RNA total por el método del trizol. Mediante reacción de RT-PCR se sintetizó el DNA complementario (cDNA) el cual se utilizó como plantilla para amplificar el gen de peroxidasa (*BnPA*) utilizando oligonucleótidos específicos: PA1F 5'-aataatggctgtagcaaacctcgtc-3' y PA1R 5'-ctagtcctcgcattttcacattc-3'. Se realizó la construcción pGEM-T::BnPA con la que se transformó por choque térmico *E. coli* JM109 y se extrajo DNA plasmídico. Se comprobó la presencia del inserto por PCR y se envió para su secuenciación. Se diseñaron oligonucleótidos para insertar la secuencia en el vector de expresión pET28a usando sitios para *Nde*I y *Hind*III, PA2F: 5'-acatatgcagttaaacccaacgttttactc-3' y PA2R: 5'-aaagcttctaggattgtccattaaccaccttac-3' (las secuencias de restricción se encuentran subrayadas).

**Resultados y discusión.** Se obtuvo RNA total de concentración 2.35 µg/µl y una relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> mayor a 2. La reacción de PCR con PA1F y PA2R amplificó un fragmento de 1098 pb correspondiente al gen *BnPA*. La amplificación con PA2F y PA2R produjo una banda de 932 pb correspondiente al tamaño del gen *BnPA* que codifica para la proteína madura. El análisis de la secuencia nucleotídica de BnPA revela una homología del 99% con la peroxidasa de nabo reportada en la base de datos NCBI con número de acceso AY423440 (3), y

89% con el gen ATP29a de *A. thaliana* (No. de acceso AY519360). La proteína deducida consta de 358 aminoácidos, peso molecular de 37 kDa y pI de 4.65. Las diferencias en homología no se encuentran dentro de los sitios conservados entre las peroxidasa de plantas, y se deduce que no afectarán el plegamiento o la actividad enzimática. Se liberó el inserto de pGEM-T::BnPA con *Nde*I y *Hind*III y se hizo la construcción pET28::BnPA y actualmente trabajamos en la expresión de la proteína.

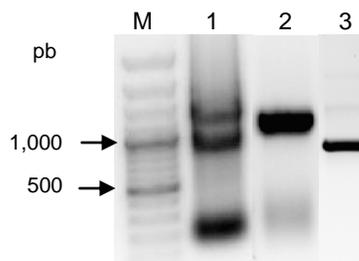


Fig. 1. (M) Marcador de peso molecular (Fermentas), (1) RNA total, (2) cDNA, 1098 pb, (3) producto de PCR con oligos PA2F y PA2R, 932 pb.

**Conclusiones.** Se extrajo RNA de buena calidad a partir de nabo, que permitió sintetizar un cDNA. Se logró ligar este cDNA en un vector de clonación, y se obtuvo la secuencia que codifica para una peroxidasa ácida de nabo.

**Agradecimiento.** A la beca otorgada por CONACyT a AMV.

#### Bibliografía.

- Regalado, C., García-Almendárez, B.E., y Duarte-Vázquez, M.A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* 3 (1-2): 243-256.
- Smith, A.T., Santama, N., Dacevs, S., Edwards, M., Bray, R.C., Thomeleyn, R.N.F. y Burke, J.F. (1990). Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca<sup>2+</sup> and heme. *J. Biol. Chem.* 265 (22): 13335-13343.
- Romero-Gómez, S., Duarte-Vázquez, M.A., García-Almendárez, B.E., Mayorga-Martínez, L., Cervantes-Avilés, O., y Regalado, C. (2008). A putative peroxidase cDNA from Turnip and Analysis of the encoded protein sequence. *Plant Foods Hum Nutr.* 63 (4): 157-162.