

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UNA PEROXIDASA DE NABO EN *Aspergillus niger*

Norma Azucena Rodríguez Cabrera, Sergio J. Romero, Blanca E. García, Carlos Regalado*
 DIPA, PROPAC, Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, C.U. Cerro de las Campanas, s/n. Querétaro, Qro. 76010, México. Fax: (442)1921304. norroca@yahoo.com.mx, *carlosr@uaq.mx

Palabras clave: *clonación, peroxidasa, expresión, Aspergillus niger*

Introducción. Las peroxidasas están ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos y tienen una gran variedad de aplicaciones, destacando su uso en síntesis orgánica, diagnóstico clínico, inmunoensayos enzimáticos y tratamiento de aguas residuales. Actualmente, se buscan fuentes alternativas de peroxidasa con mayor disponibilidad en la región, alta estabilidad térmica, especificidad por sustrato y bajos costos de extracción. Una alternativa es el nabo, ya que investigaciones previas han sugerido su uso exitoso en aplicaciones biotecnológicas como el tratamiento de aguas residuales (1,2) y en pruebas de diagnóstico clínico.

En este trabajo se propone la clonación y expresión de una peroxidasa (BnPA) de nabo (*Brassica napus* L. var purple top white globe) en el hongo *Aspergillus niger* para obtener mayor cantidad de la enzima en forma activa y realizar estudios de caracterización bioquímica y biofísica.

Metodología. El gen *BnPA* se amplificó por PCR y se clonó en el vector pGEM-T. El vector pGEMT::*BnPA* se digirió con la enzima *Xba*I y el inserto se subclonó en los vectores pIGF18 y pIGF-pyrG (Fig. 1).



Fig. 1. Estrategia general para la clonación de una peroxidasa (BnPA) de nabo en un vector de expresión fúngico.

Resultados y discusión. El DNA plasmídico de la clona TOPO::*BnPA* se usó como molde para amplificar una banda de aproximadamente 1 kb, que corresponde al gen *BnPA* (Fig. 2A). El amplicón se subclonó en el vector pGEM-T y la construcción se denominó pGEMT::*BnPA*. La digestión del plásmido pGEMT::*BnPA* con la enzima *Xba*I libera el inserto de 1 kb que corresponde al gen *BnPA* (carriles 2 y 3, Fig. 2B). Se realizó una digestión preparativa del inserto liberado y los vectores pIGF y pIGF-pyrG con la enzima *Xba*I y se purificaron del gel.

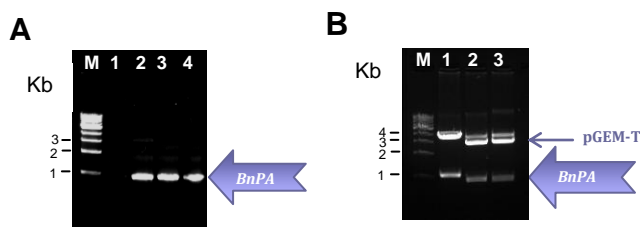


Fig. 2. (A) *BnPA* amplificado de TOPO::*BnPA*; (carril 1) control negativo. (B) *BnPA* liberado de pGEMT::*BnPA*; (carril 1) control positivo.

Los fragmentos se ligaron y transformaron en células competentes de *E. coli* y se obtuvieron 7 clonas de las cuales, solo una resultó positiva correspondiendo al vector pIGF-pyrG (carril 1, Fig 3). Con esta nueva construcción denominada pIGF-pyrG::*BnPA* se transformará la cepa AB.4 de *A. niger* y se expresará la proteína recombinante. El plásmido se integrará en el genoma de *A. niger* y la expresión de la peroxidasa estará bajo control del promotor del gen *glaA*.

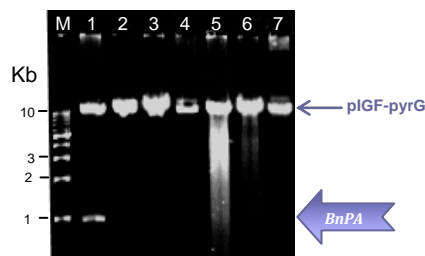


Fig. 3. Liberación de *BnPA* de las clonas pIGF-pyrG::*BnPA*.

Conclusiones. El gen *BnPA* se subclonó exitosamente en los vectores pGEM-T y pIGF-pyrG para su posterior expresión en el hongo *A. niger*.

Agradecimiento. Beca CONACYT 167074 a NARC.

Bibliografía.

- Duarte-Vázquez MA., Ortega-Tovar MA., García-Almendárez BE., Regalado C. (2003). Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. *J Chem Technol Biotechnol.* 78: 42-47.
- Quintanilla-Guerrero F., Duarte-Vázquez MA., García-Almendárez BE., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Regalado C. (2008). Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Biores. Technol.* 99(18): 8605-11.