



GEN DE UNA NUEVA PROTEASA CISTEÍNICA DE *Jacaratia mexicana*

Paola Zárate-Segura, Erick Miguel Ramos-Martínez, *María del Carmen Oliver-Salvador

Departamento de Bioprocesos, UPIBI-IPN, Av. Acueducto s/n, Col. Barrio la Laguna Ticomán, México, D. F., 07340. Tel/Fax 57296000 ext. 56367 oliveripn@yahoo.com.mx, pbzars@yahoo.com

Palabras clave: cDNA, proteasa cisteínica, *Jacaratia mexicana*

Introducción. Las proteasas o peptidasas son enzimas que se utilizan en diversos procesos industriales, principalmente en la tecnología de alimentos, y como medicamentos. Por otra parte se prefiere el uso de proteasas de origen vegetal, como la papaina. Se ha demostrado que las proteasas de *Jacaratia mexicana* pueden competir favorablemente en aplicaciones industriales donde se usa la papaina (1). Dado que esta planta no ha sido domesticada, el objetivo de este trabajo es buscar una alternativa de producción de estas enzimas, utilizando un sistema más sencillo y controlable que dicha planta silvestre como *Escherichia coli* (2).

Metodología. La extracción de RNA_{Total}, se realizó a partir de hojas de plántulas de *J. mexicana* de 12-15 cm de altura, germinadas en medio Knop. Para la extracción de RNA_{Total} de las hojas se utilizó un PureLink micro-tomidi Total RNA Purification System, Invitrogen. Con el RNA_{Total} extraído se realizó la síntesis de cDNA por RT-PCR, se amplificó por PCR un fragmento interno con oligos diseñados en nuestro laboratorio de aprox. 500 pb, éste se insertó en TOPO-TA (Invitrogen). Posteriormente se diseñaron iniciadores internos para la amplificación de los extremo 5' y 3' del gen por la técnica de RACE (Amplificación rápida de los extremos codificantes) y se secuenciaron los insertos clonados en TOPO-TA, se depuró la secuencia y se comparó con la secuencia de aminoácidos de la mexicana (3,4).

Resultados y discusión. Se obtuvo 250 µg/g de RNA_{TOT} de hoja con un rendimiento estimado de (25.7%), valor similar al obtenido por nuestro grupo de trabajo a partir de hojas de plantas adultas de *J. mexicana* y al obtenido con hojas de papaya (*Carica papaya*) (4). La secuencia interna del gen amplificada por PCR a partir de cDNA con los iniciadores diseñados en el laboratorio fue de aprox. 500 pb, con la técnica de 3' y 5'RACE se obtuvo la secuencia del gen completo de aprox. 1500pb. A partir del análisis. del gen se localizó la secuencia de la proteína madura (642pb), dicha secuencia es similar con respecto a otras proteasas cisteínicas de origen vegetal (5). El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la mexicana reportada por el grupo de trabajo (3,5) mostró un 85% de similitud con respecto a la proteína madura (Fig. 1). Además la secuencia del gen no presentó cambios significativos en la región del sitio activo. La perspectiva del trabajo es la sobreexpresión de la proteína en un sistema más amigable que la planta nativa

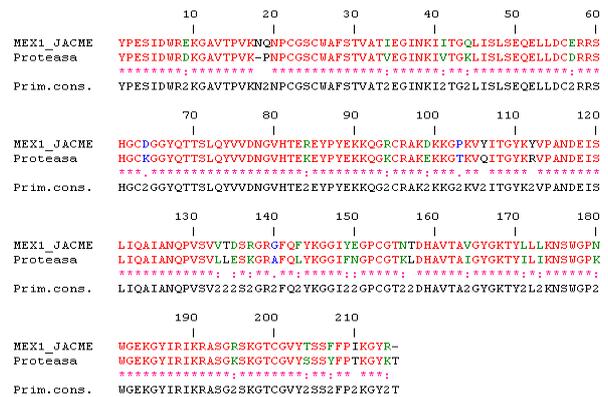


Fig. 1 Comparación de secuencias de proteinasas cisteínicas de *Jacaratia mexicana*

Conclusiones. La secuencia del gen tiene alta similitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de mexicana de *Jacaratia mexicana*.

Agradecimiento. Proyecto financiado por la SIP-IPN proyectos: 20070156 y 20080579. *Becario SIBECOFA-IPN.

Bibliografía.

1. Briones-Martínez, R., Cruz, M., Cortés-Vázquez, M. y Oliver-Salvador, M. (1994). Preparaciones Enzimáticas de Interés Industrial. *Información Tecnológica* (Chile). 5(1), 57-62.
2. Revell D., Cummings N., Baker K., Collins M., Taylor, M., Summer I., Pickersgill R., Connerton I. y Goodenough P. "Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNAs encoding papaya proteinase omega from *Carica papaya*". *Gene*, 127, 221-225. 1993.
3. Oliver, M., "Purificación, Caracterización y Cristalización de la Proteasa cisteínica del látex de *Pileus mexicanus*: Mexicana". Tesis de Doctorado. ENCB, 1999.
4. Taylor, M., Al-sheikh M., Revell D., Summer I. y Connerton I. cDNA cloning and expresion of *Carica papaya* prochymopapain isoforms in *Escherichia coli*. *Plant Science*. 145: 41-47, 1999.
5. Gavira J., González-Ramírez L., Oliver-Salvador M., Soriano-García M. and García-Ruiz J.(2007). Structure of themexicaín-E-64 complex and comparison with other cysteine proteases of the papain family. **D63**: 555-563.