



## CLONACIÓN MOLECULAR DEL GEN DE LA $\beta$ -glucosidasa DE *Cellulomonas flavigena*

Jazmín Huerta-Cantillo, Roberto Ruiz-Medrano, M. Carmen Montes-Horcasitas y M. Eugenia Hidalgo-Lara\*

\*Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV. Av. IPN No. 2508 San Pedro Zacatenco.

CP 07360. México D. F. Fax (55)5061-3313. E-mail: [ehidalgo@cinvestav.mx](mailto:ehidalgo@cinvestav.mx)

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*,  $\beta$ -glucosidasa, PCR, celulosa

**Introducción.** *Cellulomonas flavigena* es una bacteria bacilar, mesofílica, Gram(+), anaerobia facultativa, quimioorganotrófica, con un 72.7-74.8% de G+C en su genoma. Este microorganismo se caracteriza por producir celulasas, xilanasas y amilasas. La forma más abundante de los carbohidratos presentes en los sistemas biológicos, es la celulosa, que es un homopolisacárido formado por  $\beta$ -D-glucosas unidas con enlaces glicosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$ ; siendo la unidad disacárida repetitiva, la  $\beta$ -celobiosa (1). La conversión de celulosa a productos solubles requiere la acción de exo- $\beta$ -1,4-glucanasas, endo- $\beta$ -1,4-glucanasas y  $\beta$ -1,4-glucosidasas (1). La  $\beta$ -glucosidasa tiene aplicación potencial en el aprovechamiento y biodegradación de desechos agrícolas. La  $\beta$ -glucosidasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos en la celobiosa, ha sido estudiada en bacterias, levaduras, hongos y humanos (2,3). En *C. flavigena*, se ha detectado la actividad de  $\beta$ -glucosidasa, pero hasta ahora no existen reportes sobre la caracterización de la enzima pura, ó sobre la clonación del gen codificante. El objetivo de este trabajo fue aislar y clonar el gen que codifica para la  $\beta$ -glucosidasa de *C. flavigena*.

**Metodología.** *C. flavigena* se cultivó a 37°C por 24 h a 150 rpm en el medio que contenía ( $L^{-1}$ ): 5.5 g NaCl, 2.5 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.1 g  $CaCl_2$ , 0.1 g  $MgSO_4$ , 2 g extracto de levadura y 1 g glicerol. Se obtuvo una sonda molecular específica para  $\beta$ -glucosidasa por PCR, utilizando: 1) DNA genómico de *C. flavigena*, 2) un par de oligonucleótidos iniciadores (BGD y BGR2) diseñados a partir de secuencias conservadas en  $\beta$ -glucosidasas microbianas reportadas en las bases de datos SwissProt y TrEMBL, y 3) la enzima Taq DNA polimerasa. El fragmento amplificado (1.2 kb) se clonó en el vector pDrive (Qiagen) y el producto de ligación se transfirió a células de *E. coli DH5a*. Las clonas transformantes, seleccionadas por su crecimiento en medio selectivo y por  $\alpha$ -complementación en presencia de IPTG y X-gal (tinción azul/blanco), se analizaron por digestión del ADN plasmídico con la enzima de restricción *EcoRI*. La secuencia de nucleótidos (nt) se determinó en un secuenciador Modelo 3100 Genetic analyser (Applied BioSystems). La secuencia obtenida se comparó con secuencias previamente reportadas en las bases de datos (Swiss-Prot y TrEMBL), mediante el programa BLAST.

**Resultados y discusión.** El análisis electroforético de los productos de PCR mostró la amplificación de un sólo fragmento de aprox. 1.2 kb, el cual se purificó y clonó en el vector pDrive, dando lugar al plásmido pDrive-BG. Se obtuvieron 13 clonas transformantes de *E. coli DH5a*/pDrive-BG: una colonia blanca (C1), 4 colonias azul claro (B2, B4, B5 y D4) y 8 colonias azul oscuro (J1 a J8). El ADN

plasmídico de las clonas C1, B4 y J7 se digirió con la enzima *EcoRI* (Fig. 1). En las clonas C1 y B4 se observó la liberación de un inserto de 1.2 kb. En el caso de la clona J7 sólo se detectó una banda correspondiente al vector pDrive (3.85 kb) (Fig. 1).

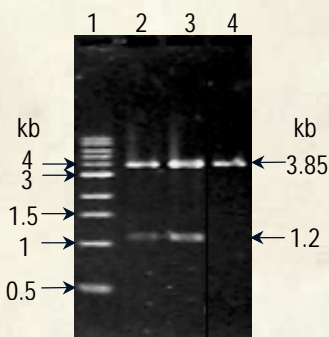


Figura 1. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de ADN plasmídico digerido con *EcoRI*. 1) Marcador de DNA "1kb ladder", 2) Clona C1, 3) Clona B4, 4) Clona J7.

La clona C1, que contiene una secuencia de 1266 nt y que codifica para una proteína predecida de 422 residuos de aminoácidos (aa), presentó un 86% de identidad con la  $\beta$ -glucosidasa de *Cellulomonas fimi* y una homología de aprox. 60% con otras  $\beta$ -glucosidasas bacterianas. El fragmento obtenido corresponde en tamaño a aprox. el 80% del gen de la  $\beta$ -glucosidasa de *C. fimi*.

**Conclusiones y perspectivas.** Se logró elucidar aprox. el 80% de la secuencia de nt del gen que codifica para la  $\beta$ -glucosidasa de *C. flavigena*. El fragmento obtenido contiene la parte central de la región codificante para  $\beta$ -glucosidasa, incluyendo el dominio catalítico. La fracción faltante, aprox. 20%, corresponde a los extremos 5' y 3' del gen. El producto predecido de 422 aa presentó alta homología con otras  $\beta$ -glucosidasas microbianas; indicando un buen grado de conservación en este grupo de enzimas. Actualmente, estamos determinando la secuencia de nt faltante a partir de una clona genómica de *C. flavigena*. La clonación del gen permitirá la sobreexpresión y caracterización de la  $\beta$ -glucosidasa de *C. flavigena* para su potencial aplicación biotecnológica.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por el CINVESTAV, México D. F.

### Referencias.

1. Chaplin, M. F.; Bucke, C. 1990. Pag. 157-159. *Enzyme Technology*. 1ra. Edición. Editorial Cambridge University Press. EUA.
2. Esen, A. 1993. Pag. 1-12. *Bioquímica y Biología Molecular de  $\beta$ -glucosidasas*, 1ra Edición. American Chemical Society, Washington, DC.
3. Gacesa, P.; Hubble, J.; 1990. Págs. 103-110. *Tecnología de las Enzimas*. 1ra. Edición. Editorial Acirbia S.A.