



EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS MÓDULOS DE UNIÓN A CELULOSA CBMII Y CBMIII DE LA CBP105 DE *Cellulomonas flavigena*

Luz María Aldaz Martínez¹, Lucero de los Ángeles Ramón Luing² y Jaime Ortega López².¹ Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-IPN, ² Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, México D.F. C.P. 07360. Tel: 50613800 ext. 4381. Fax. 50613313, kyxyz@gmail.com

CBP105, Cellulomonas flavigena, Módulo de unión a carbohidrato.

Introducción. La CBP105 es una endoglucanasa producida por *Cellulomonas flavigena* constituida por un dominio catalítico, un módulo de unión a carbohidrato tipo III, dos dominios de unión a fibronectina tipo III y un módulo de unión a carbohidrato tipo II (1). Los módulos de unión a carbohidratos o CBM (por sus siglas del inglés Carbohydrate-Binding Module) se han utilizado como herramienta en la purificación de proteínas recombinantes de interés biotecnológico. Los CBMs se clasifican en familias de acuerdo a características estructurales y afinidad a determinado carbohidrato (2); en el caso de la CBP105 se ha sugerido que el CBMII tiene mayor afinidad a celulosa que el CBMIII (1).

En este trabajo se reporta la clonación, expresión y purificación del CBMII y el CBMIII recombinantes de la CBP105 como la primer etapa para determinar las constantes de afinidad a celulosa de ambos CBMs.

Metodología. Los fragmentos de DNA que codifican para los CBMII y CBMIII de la CBP105 se amplificaron por PCR y se clonaron de manera direccionada en el vector de expresión pColdI (Takara) obteniéndose las construcciones pColdI-CBMII y pColdI-CBMIII respectivamente; con éstas se transformaron células químicamente competentes de *E. Coli BL21 DE* (3) para la expresión de los CBMs. Para determinar las mejores condiciones de expresión de cada CBM se realizaron ensayos con diferentes condiciones de inducción (0.1, 0.5 y 1mM de IPTG) y temperatura de cultivo (16, 30 y 37 °C). A partir de un cultivo de 2L inducido con 1 mM de IPTG por 24 h a 30 o 37 °C. Se purificaron los CBMs por cromatografía de afinidad a níquel de las fracciones soluble e insoluble, en condiciones nativas o desnaturizantes. Las proteínas provenientes de cuerpos de inclusión se replegaron por dilución simple de 8M a 1M de urea y se interaccionaron con celulosa. Los CBMs purificados tanto de la fracción soluble como a partir de cuerpos de inclusión se interaccionaron con celulosa microcristalina (Sigmacell50, Sigma) durante 12 h a 4°C .y después de lavar la celulosa se trato con amortiguador de Leamli y se analizó por SDS-PAGE.

Resultados y discusión. El CBMII se expresó tanto en forma soluble como insoluble. La mayor expresión del CBMII en forma soluble se obtuvo manteniendo el cultivo a 30°C e induciéndolo 1mM IPTG (carril 2, figura1); mientras

que el CBMIII solo se expresó en forma insoluble; en el carril 5 de la figura 1 se muestra el perfil electroforético del extracto total, después de la inducción con 1 mM de IPTG a una temperatura de 37°C. El CBM II se purificó a partir de su forma soluble (carril 3, figura 1), y el CBMIII solo se purificó a partir de cuerpos de inclusión (carril 6, figura 1). Ambos CBMs recombinantes se adsorbieron a la celulosa microcristalina (carriles 4: CBMII y carril 7: CBMIII). La interacción con la celulosa de las proteínas provenientes de cuerpos de inclusión se llevó a cabo también a 1 M urea y no se observaron cambios significativos en la adsorción a celulosa de ambos CBMs.

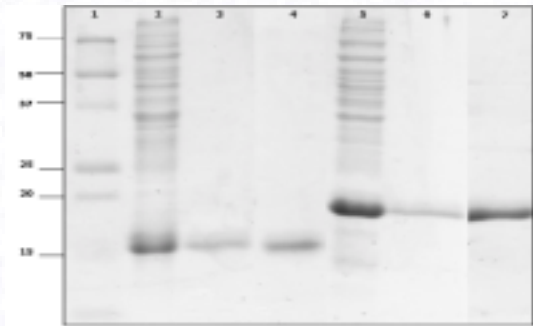


Figura 1. Expresión, purificación e interacción con celulosa de los CBM II y CBMIII de la CBP105. 1: Marcador de peso molecular (BioRad), 2: CBMII; extracto total después de 24 horas de inducción con 1mM IPTG a 30°C; 3: CBMII purificado; 4: CBMII adsorbido a la celulosa; 5: CBMIII; extracto total después de 24h de inducción con 1mM IPTG, 37°C; 6: CBMIII purificado; 7: CBMIII adsorbido a celulosa.

Conclusiones. Se probó que los CBMII y CBMIII recombinantes de la CBP105 mantienen su afinidad a celulosa, aun cuando se purifiquen de cuerpos de inclusión.

Agradecimientos. Al CONACYT por el financiamiento del proyecto 40387_Z y al Dr. Jaime Ortega por su apoyo, tiempo y confianza.

Bibliografía.

- Mejía, T. (2001). Purificación y caracterización bioquímica de dos celulasas de 70 y 105 kDa producidas por *Cellulomonas flavigena*. Tesis de Maestría. CINVESTAV- IPN.
- Linder, M & Terri, T. (1997) The roles and function of cellulose-binding domains. minireview. *Journal of biotechnology. ELSEVIER*. 57(1997)15-28.