

IDENTIFICACION DE UNA CELULASA DE 70 kDa DE *Cellulomonas flavigena*.

Odilia Pérez Avalos¹, Luis Miguel Salgado Rodríguez² y Teresa Ponce Noyola¹.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería¹, Departamento de Bioquímica². CINVESTAV-IPN. Av. IPN 2508, col. San Pedro Zacatenco, México, D. F. cp 07000. Fax 57473313. Tel 57477000 ext. 4318.e-mail:operez@mail.cinvestav.mx.

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena* y celulasa.

Introducción. Las celulasas son enzimas que participan en la degradación de la celulosa hidrolizando los enlaces glucosídicos β -1,4. Actualmente estas enzimas se usan en la industria textil para el desteñido de mezclillas, hidrólisis de mostos y detergentes quita pelusas (1).

El objetivo de este trabajo es la obtención del gen que codifica para una celulasa de 70 kDa de *Cellulomonas flavigena*.

Metodología. Una celulasa de 70 kDa de *Cellulomonas flavigena* se purificó hasta homogeneidad y se secuenció parcialmente. La secuencia de aminoácidos fue analizada y comparada en la utilería BLAST del GenBank (2). Con la secuencia de aminoácidos **AENEMK** obtenida, se diseñó el oligo A: 5'GCVGARAAYGARATGAAR3' para el extremo 5'y para la cadena complementaria se tomó la secuencia de aminoácidos **WDVVNEA** y se diseñó el oligo K con los nucleótidos 5'NGCYTCRTTNACNACRTC3'. Los oligos se usaron en reacciones de PCR usando como molde el DNA genómico de *C. flavigena*. Se obtuvo un producto de 240 pb (inserto); el cual fue purificado, rellenado y kinado. Se purificó nuevamente, se cuantificó y se secuenció. El inserto se clonó en el plásmido Bluescript II SK; se marcó radiactivamente con γ -³²P-dCTP para rescatar el gen respectivo, de la genoteca de *C. flavigena* contenida en lambda Fix II.

Resultados y Discusión. La secuencia de aminoácidos de la celulasa de 70 kDa de *C. flavigena* tuvo un 80% de homología, con la secuencia conservada de aminoácidos del dominio catalítico de la proteína Cex de *C. fimi* que tiene actividad de exoglucanasa. Mientras que la secuencia nucleotídica del inserto de 240 pb tiene homología de un 90 % con el gen *cex* de *C. fimi* (3). Para confirmar la presencia del gen homólogo a *cex* en la genoteca de *C. flavigena* se hicieron 3 tamizajes usando como sonda el inserto marcado de 240 pb. Se obtuvieron 2 unidades formadoras de placas líticas llamadas OPA1 y OPA3 (Fig. 1). Actualmente se está rescatando el gen para su posterior caracterización genética.

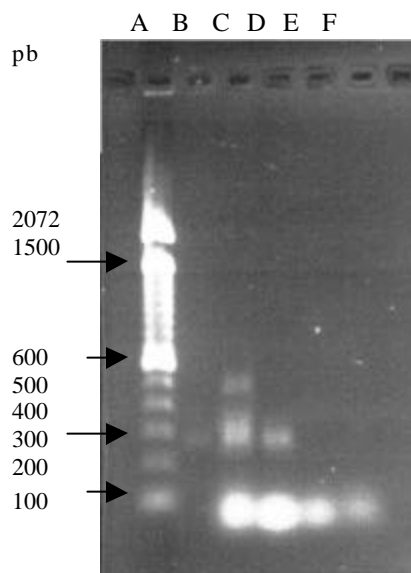


Fig. 1. A) marcador de 100 pb, B) inserto de 240 pb, C) unidad formadora de placas líticas OPA1, D) unidad formadora de placas líticas OPA3; E y F) controles negativos.

Conclusiones. Se tiene una clona positiva, en la cual ha sido confirmada la presencia del fragmento del gen de interés.

Agradecimientos. A la Q.F.B. Martha Mercado por el apoyo.

Bibliografía.

1. Tomme P, Warren R A, Gilkes N R. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37:1-81.
2. Altschul S F, Thomas L, Madden A, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman L. (1997). protein database search. *Programs. Nucleic. Res.* 25:3389-3402.
3. O'Neill G, Goh S H, Warren R A, Kilburn D G and Miller R C Jr. (1986). Structure of the gen encoding the exoglucanase of *Cellulomonas fimi* *Gene* 44:325-330.