

## CLONACION Y EXPRESION DEL GEN *mela* DE *Rhizobium etli* EN *Escherichia coli*.

Natividad Cabrera, Silvia Piñero, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar y Guillermo Gosset. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001. Chamilpa, Cuernavaca Mor., CP 62210 México. Fax (777) 3 17 23 88. gosset@ibt.unam.mx

*Palabras clave:* melanina, tirosinasa, *Escherichia coli*.

**Introducción.** Las melaninas son polímeros con un papel protector en una gran variedad de organismos. Debido a sus características físico-químicas, tienen aplicaciones diversas: pueden ser utilizadas como resinas de intercambio iónico ó catiónico, como semiconductor amorfo, fotoprotector, antioxidante y agente antiviral. Existen varios tipos de melaninas, siendo las más comunes la feomelanina y la eumelanina. En su biosíntesis el principal paso es la oxidación de la L-Tirosina, vía L-dopa, a dopaquinona, estas reacciones son catalizadas por la enzima tirosinasa (1). En forma silvestre *Escherichia coli* no tiene el gen que codifica para la tirosinasa y por lo tanto no puede sintetizar melanina. El objetivo del presente trabajo fue la clonación y expresión en *E. coli* del gen *mela* que codifica para una tirosinasa de *Rhizobium etli* CE3.

**Metodología.** Se utilizó la secuencia reportada del gen *mela* de *R. etli* CE3 para amplificar por PCR el gen *mela* a partir de ADN total de *R. etli* CE3 y se clonó en el plásmido pTRC99A (2). La expresión del gen quedó bajo el control del promotor fuerte *trc*, el cual se induce por IPTG. Este plásmido se denominó pTRCmela. Las cepas utilizadas en este trabajo fueron, XL1-Blue de *E. coli* como huésped del plásmido pTRCmela y W3110 de *E. coli* como cepa productora de melanina. Para la detección de melanina se utilizaron placas de agar caseína (1) las cuales contienen tirosina y las colonias se tornan negras cuando se forma eumelanina y para su producción cultivos líquidos con medio M9-glucosa. Ambos medios se suplementaron con ampicilina 200 µg/ml, IPTG 0.1mM, CuSO<sub>4</sub> 40 µg/ml y tirosina 2 g/l y 0.4 g/l, respectivamente. La melanina fue cuantificada espectrofotométricamente a 400 nm.

**Resultados y discusión.** Se realizó un patrón de restricción del plásmido pTRCmela con las enzimas NcoI y XmaI, se obtuvieron dos fragmentos de ADN, uno de 1850 pb y otro de 4176 pb, que corresponden al gen *mela* y al plásmido pTRC99A, respectivamente (figura 1).

La cepa W3110 transformada con el plásmido pTRCmela y sus respectivos controles se sembraron en las placas de agar caseína y se incubaron a 30°C. Como se observa en la figura 2, las transformantes presentaron un fenotipo de pigmentación oscura, las cepas W3110 controles no presentaron este fenotipo. La producción de melanina se evaluó en cultivos líquidos encontrándose que la producción se da únicamente durante la fase estacionaria de los cultivos, con una productividad de 16 mg de melanina/l.h.

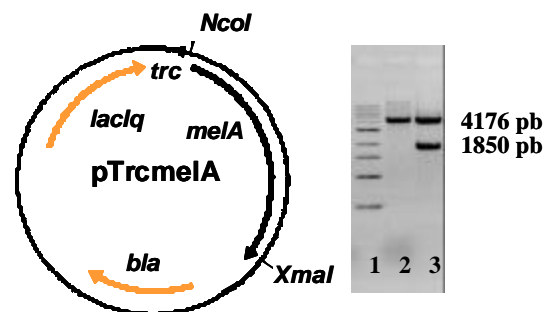


FIGURA 1. Patrón de restricción de los plásmidos pTRC99A (carril 2) y pTRCmela (carril 3) con las enzimas de restricción NcoI y XmaI.

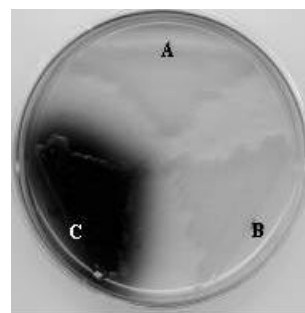


FIGURA 2. Producción de eumelanina en placas de agar caseína por la cepa W3110/pTRCmela (C). Las cepas controles no producen eumelanina, W3110/pTRC99A (B) y W3110 (A).

**Conclusiones.** Se clonó y expresó el gen *mela* de *R. etli* CE3 en *E. coli*. La cepa W3110 de *E. coli* transformada con el plásmido pTRCmela produjo eumelanina a partir de tirosina. En cultivos líquidos se determinó que se obtienen rendimientos de conversión de tirosina en eumelanina cercanos al 100% del teórico.

**Agradecimiento.** Se agradece el apoyo financiero del proyecto de CONACYT NC-230.

### Bibliografía.

1. Wang, G, Aazaz, A, Peng, Z y Shen, P. (2000). Cloning and expression of a tirosinase gene *mel* from *Pseudomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Letters*. 185: 23-27.
2. Amann, E, Ochs, B y Abel, K-J. (1988). Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 69: 301-315.

