

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LIPASAS DE *Aspergillus nidulans* PW1

Carolina Peña., Rolf. Schmid, Stephan Lange y Amelia Farrés

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, México. Fax: (52)(55) 5622-5309.

Allmandring 31. Institute of Technical Biochemistry, . University of Stuttgart,. 70569. Stuttgart. Germany.

Correo electrónico: farres@servidor.unam.mx y carolpm@servidor.unam.mx

Lipasas, Aspergillus nidulans, clonación, expresión

Introducción.

Las lipasas tienen muchas aplicaciones en las áreas de tecnología de alimentos, ciencias biomédicas y en la industria química. En experimentos previos hemos purificado y caracterizado una lipasa termoalcalina en *A. nidulans*, derivándose de aquí el interés por el aislamiento, clonación y expresión de lipasas en este microorganismo(1). Otros autores han reportado la purificación de una lipasa activa a bajas temperaturas en *A. nidulans* (2). En el Genbank se han encontrado varias secuencias completas para lipasas en este microorganismo, entre otras una secuencia putativa de lipasa/esterasa dentro del “cluster” de la síntesis de esterigmatocistina (*stcI*) (3). En el presente trabajo éste se ha aislado, clonado y expresado en *E. Coli*, como un primer paso para la eventual caracterización de la proteína. Adicionalmente, se han analizado los posibles genes de lipasa dentro del genoma de *A. nidulans*, ya secuenciado; considerando las secuencias “EST” reportadas para la librería de cDNA. Se han encontrado al menos 5 secuencias putativas para lipasa y se busca en el presente trabajo su presencia en el genoma de la cepa PW1.

Metodología.

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar el gen (*stcI*), con sitios de restricción específicos para clonar dentro del vector de expresión pET20. Uno de ellos (CPElipR2) no contenía el codón de paro y permitía la expresión de la enzima fusionada a una cola de histidinas para facilitar su purificación. El producto de PCR obtenido se clonó y se transformó *E. Coli* (DH5a). Se comprobó la identidad del gen *stcI* mediante secuenciación. Los ensayos de expresión se realizaron en la cepa BL21. La búsqueda de secuencias en la cepa PW1 se realiza con técnicas computacionales y moleculares tradicionales, empleando una biblioteca de cDNA facilitada por R. Aramayo.

Resultados y discusión

Como se puede observar en la figura 1, se logró la sobreexpresión de la lipasa después de 1 y 3 horas de inducción, con peso molecular aproximado de 33 Kda. Sin embargo, no se pudo observar la actividad “in situ” de la misma (lado derecho), pero sí en microplacas con *n*-nafil acetato como sustrato y se comprobó la presencia de actividad después de 3 horas de inducción.

El gen *stcI* analizado corresponde a la EST 452/1592 reportado por Aramayo y posee pentapéptido consenso para otras lipasas (GASAG1), aunque al menos otras 28 secuencias presentes en dicho banco y homólogas a este tipo de enzimas no lo presentan.

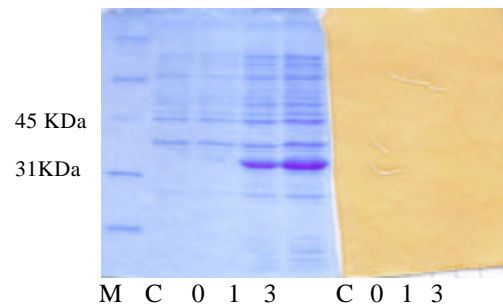


Figura 1: SDS-PAGE Análisis de las fracciones periplásmicas de *E. coli* BL21 DE3 antes y después de inducción. M=marcador de peso molecular, C= control negativo (clona con el vector sin el inserto después de 3 horas de inducción), 1 y 3= horas después de la inducción.

Conclusiones

Se logró la expresión de la lipasa/esterasa en *E. Coli*. Sin embargo la expresión de la enzima se ve afectada por la presencia de la cola de histidina fusionada a la misma, dado que no se logró observar actividad para este caso. Las secuencias de lipasa analizadas mostraron al menos 4 secuencias putativas de lipasa en *A. Nidulans* y la aislada corresponde a una de ellas. Se analizan las demás para buscar las correspondientes a la actividad termoalcalina y la que se expresa en frío.

Agradecimiento

Facultad de Química y DAAD (Deutscher Akademischer Austausch Dienst)

Bibliografía.

1. Peña C. 1998. Producción, purificación y caracterización de una lipasa en *A. nidulans*. Tesis de Maestría. UNAM.
2. Mayordomo I. et. al. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. J Agric Food Chem. 48(1):105-9.
3. Brown Dw. et. al. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. 20;93(4):1418-22.

