

# CONTRIBUCIÓN A LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN

Larissa Linares, Sergio Sánchez, Romina Rodríguez-Sanoja, Depto. Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Apto. Postal 70228, C.P. 04510, fax: (0155)56223855, [romina@correo.biomedicas.unam.mx](mailto:romina@correo.biomedicas.unam.mx)

*Palabras clave: bacterias lácticas amilolíticas,  $\alpha$ -amilasa, dominio de fijación al almidón*

**Introducción.** Los genes de la  $\alpha$ -amilasa de tres lactobacilos fueron secuenciados recientemente (1, 2), dichos genes presentan una estructura diferente a la reportada para el resto de las amilasas, la cual puede ser dividida en dos partes: la primera mitad codifica para el dominio catalítico y la segunda parte, formada por 5 secuencias repetidas (SR), directas e idénticas, da origen a una estructura que permite la adsorción de la enzima al gránulo de almidón insoluble (3) (fig.1). Hasta ahora se desconoce si las 5 SR actúan juntas como un dominio de fijación o bien si cada una de ellas puede adherirse y en conjunto actuar sinérgicamente.

Con este estudio se pretende contribuir a la caracterización de éste posible dominio, para lo cual se clonó una unidad de las 5 SR de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* con el objetivo de determinar si es posible la fijación del péptido resultante al almidón insoluble.

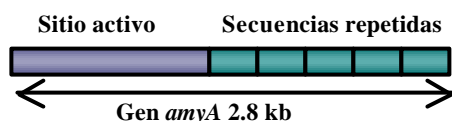


Fig. 1. Esquema del gen *amyA* de *Lb. amylovorus*

**Metodología.** Una de las 5 SR del Dominio de Fijación al Almidón (DFA) de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* fue amplificada por PCR y clonada en el vector pGEM-T easy. Verificada la secuencia, el fragmento correspondiente a una secuencia repetida fue subclonada en el vector de expresión pBAD-HisC.

Se establecieron las condiciones óptimas de expresión del péptido, añadiendo concentraciones crecientes del inductor (arabinosa al 0.002%, 0.02%, 0.2%) al final de la fase exponencial de crecimiento y se tomaron muestras a las 4, 8 y 12 h. Las proteínas resultantes fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Además, la presencia del péptido fue comprobada por Western Blot.

**Resultados y discusión.** Se llevó a cabo la clonación de una SR del DFA de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* en el vector de expresión pBAD-HisC. La construcción fue verificada secuenciando el plásmido obtenido (pBAD-F1) y

comparándolo con el gen que codifica para la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus*; encontrándose como se esperaba, una de las cinco secuencias repetidas completa. Además, se realizó una digestión con enzimas de restricción y en geles de agarosa se observó un fragmento con talla de 373 pb, la cual concuerda con lo esperado. En los ensayos de inducción se observó que la mejor condición de expresión fue con 0.2% de arabinosa y que la concentración del péptido aumenta con el tiempo.

La identificación por Western Blot del péptido clonado fue posible gracias a que el vector de expresión (pBAD-HisC) codifica para un tallo de histidinas. Así, utilizando el anticuerpo anti-histidina y por medio de una reacción colorida con la enzima peroxidasa se obtuvo una banda con el peso molecular estimado para el péptido clonado (25kDa).

**Conclusiones.** Se clonó una de las cinco secuencias repetidas del dominio de fijación al almidón de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* en el vector de expresión pBAD-HisC. Se expresó, por inducción con arabinosa, un péptido con PM aproximado de 25 KDa que fue identificado por Western Blot con el anticuerpo antihistidina. Las condiciones de inducción elegidas para la expresión del péptido son 0.2% de arabinosa por 12 hrs.

**Perspectivas.** Actualmente se realiza la clonación de DFA completo para comparar la capacidad de ambos péptidos para adsorberse al almidón insoluble.

**Agradecimientos.** Trabajo financiado por el proyecto CONACYT 38966-B.

## Bibliografía.

1. Giraud, E. and G. Cuny. 1997. Molecular characterization of the  $\alpha$ -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggest a common evolutionary origin. *Gene* 198:149-157.
2. Morlon-Guyot, J., R. F. Mucciolo, R. Rodríguez-Sanoja & J. P. Guyot. 2001. Characterization of the *L. manihotivorans*  $\alpha$ -amylase gene. *DNA Seq.* 12:27-373.
3. Rodríguez-Sanoja, R., J. Morlon-Guyot, J. Jorge, J. Pintado, N. Juge and J.P. Guyot. 2000. Comparative Characterization of Complete and Truncated Forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -Amylase and Role of the C-Terminal Direct Repeats in Raw-Starch Binding. *Appl. Env. Microbiol.* 66:3350-3356.