



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## IDENTIFICACION DE UNA FAMILIA DE GENES DE LACASAS EN *T. hirsuta* Bm-2

Raúl Tapia-Tussell<sup>1,2</sup>; Daisy Pérez-Brito<sup>1</sup>; Alberto Cortés-Velázquez<sup>1</sup>; Gerardo Rivera-Muñoz<sup>2</sup> y Sara Solis-Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Calle 43 No.130, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200. E-mail:rtapia@cicy.mx; <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Mérida. Km 5 Carretera Mérida-Progreso S/N. C.P. 97118.

*Palabras clave:* genes de lacasa, Southern blot, *Trametes hirsuta*,

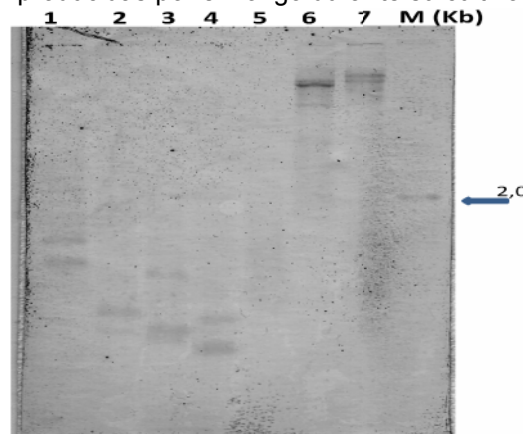
**Introducción.** La lacasa, es la más común de las enzimas modificadoras de la lignina producidas por los hongos de la podredumbre blanca (1). *Trametes hirsuta* es un organismo de este grupo muy promisorio en aplicaciones biotecnológicas por su alta producción de lacasas estables. Estas enzimas tienen un gran potencial en los procesos de biorremediación por su habilidad para degradar compuestos recalcitrantes (2). Frecuentemente los hongos producen isoformas de lacasas, por lo que más de un gen de estas enzimas es expresado en este grupo de organismos, aunque también las isoformas pueden ser producto de modificaciones postranscripcionales.

En este sentido el presente trabajo se enfocó en la identificación del gen de la lacasa en el genoma del hongo *Trametes hirsuta* (Bm-2) y en determinar si existe multiplicidad del mismo.

**Metodología.** El ADN genómico de Bm-2 se utilizó como molde para la amplificación del gen de lacasa, con los iniciadores Primer I/Primer II (3). El producto de amplificación fue clonado en el vector pGEM-T Easy para su secuenciación. **Southern blot:** El ADN<sub>g</sub> de Bm-2 fue digerido completamente, con seis enzimas de restricción. La hibridación se realizó con el fragmento obtenido en la amplificación de los sitios de uniones a cobre utilizando el Kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter II (Roche).

**Resultados.** En este estudio se utilizaron dos sitios de unión a cobre para obtener un amplicón que fue usado como sonda homóloga. El fragmento obtenido de 208 pb fue purificado y clonado. El análisis de las secuencias demostró que el producto de amplificación contenía la secuencia parcial del gen de lacasa y 100% de identidad con secuencias de lacasas del GenBank.

La Fig. 1 muestra la secuenciación parcial de nucleótidos y aminoácidos predicha del gen de la lacasa, así como un intrón putativo de 57 nucleótidos. Los sitios de unión a cobre están perfectamente conservados incluso en comparación con oxidasas multicobre de organismos superiores. La lacasa de *T. hirsuta* mostró un alto grado de similitud (74-84%) con otras lacasas de hongos ligninolíticos. El análisis de Southern (Fig.2) sugirió la presencia de al menos dos genes que codifican para las lacasas de *T. hirsuta* (Bm-2). Estos resultados podrían ser relacionados con dos isoformas de lacasas de 65 y 85 kDa producidas por el hongo durante su cultivo.



**Fig. 2** Hibridación Southern de *T. hirsuta* (Bm-2) Línea 1: *AluI*; línea 2: *RsaI*; línea 3: *MspI*; línea 4: *HaeIII*; línea 5: *BamHI*; línea 6: *HindIII*; línea 7: *EcoRI* y M: marcador de 1 kb plus. El fragmento de ~ 200 pb de Bm-2 fue utilizado como sonda en condiciones alta de astringencia.

**Conclusiones.** Se generó una sonda homóloga para *T. hirsuta*. Se identificaron al menos dos genes en el genoma del hongo.

**Agradecimiento.** A FOMIX-CONACyT por el financiamiento al proyecto.

### Bibliografía.

1. Campos R., Kandelbauer A., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., and Güitz G.M. (2001). *J. Biotechnol.* 89: 131-139.
2. Shleev, S. V., Morozova, O. V., Nikitina, O. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhnikov V. A. et al., (2004). *Biochimie.* 86: 693-703.
3. D'Souza, T.M., Boominathan, S.K., Reddy, C.A. (1996). *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (10): 3739-3744.

Lacasa *T. hirsuta* (Bm-2)

```
>Lac_3
1      CAT TGG CAT GGG TTT TTT CAG AAG GGG ACT AAC TGG GCT GAC GGC 45
1      H   W   H   G   F   F   Q   K   G   T   N   W   A   D   G   15
2      CCC GCC TTC GTG AAC CAA TGC CCG AIT GCC ACC GGA AAC TCT TTC 90
16     P   A   F   V   N   Q   C   P   I   A   T   G   N   S   F   30
91     CTC TAC GAC TTC ACC GCG ACC GAT CAA GCG ggt cag tgc acc acg 135
31     L   Y   D   F   T   A   T   D   Q   A   Intron III 45
136    caa tca tct ctc cat tgc tga acc tag cac ctc gaa tcc gta GGC 180
46     G 60

      CBR I
      2 3
      3 3

      CBR II
      3 3
```

**Fig. 1** Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos predichos del gen de la lacasa de *T. hirsuta* (Bm-2).