



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE NisB EXPRESADA HETERÓLOGAMENTE EN *E. coli*

Luis Marco Antonio Salazar Ocampo, Blanca Estela García Almendárez, Carlos Regalado. DIPA, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U., Cerro de las Campanas, s/n, Col. Las Campanas, Querétaro, 76010, Qro. México, carlosr@uaq.mx

Palabras clave: enzima, NisB, deshidratasa.

Introducción. La nisina es el lantibiótico más estudiado y usado a nivel comercial en diversos productos alimenticios la cual es producida por *Lactococcus lactis ssp. lactis* [1]. Debido a que no se han reportado mecanismos de resistencia por las bacterias sensibles, se utiliza ampliamente como conservador a nivel mundial [2]. La biosíntesis de la nisina está controlada por un conjunto de 11 genes que codifican el precursor así como las enzimas necesarias para modificarla y secretarla, entre otras funciones. NisB es la primera enzima que actúa sobre el precursor deshidratando aminoácidos clave [3].

El objetivo del trabajo fue clonar y expresar la enzima NisB en *E. coli* Rosetta.

Metodología. El gen *nisB* (2982 pb, NCBI No. FJ972141) se extrajo del vector pGEM-T mediante digestión con las enzimas de restricción *NheI* y *XhoI*. Posteriormente, el vector de expresión pET28a se digirió con las mismas endonucleasas para luego ligar *nisB* usando la enzima T4 DNA ligasa en una relación vector:inserto 1:2. La construcción se usó para transformar la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) [4]. Se identificaron las clonas positivas a la transformación mediante PCR directo de colonia. La proteína se sobre-expresó usando IPTG como inductor cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0.4. La proteína se expresó fusionada con una cola de histidinas, misma que sirvió para purificarla mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado IMAC (Ni-NTA). Se cuantificó la proteína por Bradford.

Resultados. En la figura 1 se muestra el resultado del PCR directo de colonia donde se identificaron las clonas positivas a la transformación.

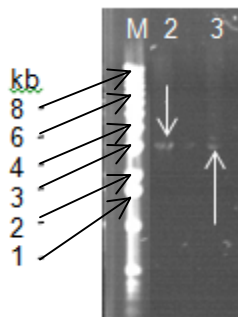


Fig. 1. Productos de PCR usando clonas transformadas como plantilla. Carriles: M, marcador de tamaño molecular de 1 kb; 2 y 3, colonias positivas a la transformación.

Una vez expresada la proteína, ésta se purificó mediante IMAC en la figura 2 muestra la sobre expresión de NisB (Carril 3). Se observa también la presencia de una banda mayoritaria que tiene un peso molecular muy cercano al esperado que es de 117 kDa (carriles 4-6). La cantidad de proteína en las fracciones provenientes de IMAC se muestra en la Tabla 1. El rendimiento de NisB purificada fue de 1 mg por litro de cultivo.

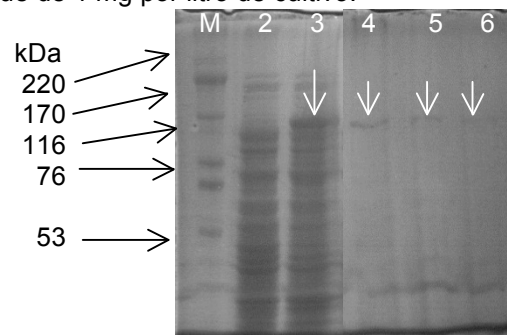


Fig 2. Análisis de la sobre expresión y purificación de la enzima NisB. Carriles: M, marcador de peso molecular de alto rango; 2, muestra antes de la inducción; 3, muestra posterior a la sobre expresión, 4-6, fracciones obtenidas de IMAC.

Tabla 1 Cuantificación de NisB purificada mediante IMAC.

Muestra	[$\mu\text{g/mL}$]	Vol. (mL)	μg proteína
Proteína recombinante solubilizada	434.4	5	2172
Fracción 1	73.05	1	73.05
Fracción 2	58.54	1	58.54
Fracción 3	14.70	1	14.70

Conclusiones. Se clonó de manera exitosa el gen *nisB* en el vector pET28a. Se sobre expresó la enzima NisB recombinante, misma que fue purificada y cuantificada, permitiendo de esta manera realizar análisis de la actividad *in vivo* e *in vitro* de la enzima.

Agradecimientos. A CONACYT por beca de Maestría y al apoyo del CONCYTEQ.

Bibliografía.

- Breukink T. E., Weidemann I., van Kraaij C., Kuiper O. P., Sahl H. G. y de Kruijff B. (1999). *Science*. 286: 2361-2364.
- Chatterjee C., Paul M., Xie L. y van der Donk (2005). *Chem Rev.* 105: 633-683.
- Xie L., Chatterjee C., Balsara R., Okeley N. M. y van der Donk (2002). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 295: 952-957
- Novagen (2006). Cloning inserts in pET vectors. En *pET system manual* 11a ed. Alemania. 3-80.