



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



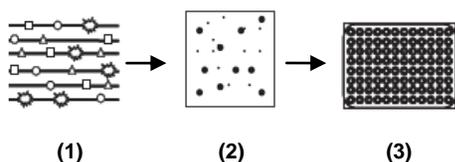
OBTENCION DE MUTANTES DE LA INULOSACARASA (isiA4)

Roberto Icken Hernández López, María Elena Rodríguez Alegría y Agustín López-Munguía Canales, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Cuernavaca Morelos, C.P.62250 agustin@ibt.unam.mx

Palabras clave: Inulosacarasa, DNS, PCR prone.

Introducción. La evolución dirigida es una estrategia metodológica que consiste en la construcción de bibliotecas de genes mutados, seguida de la selección de variantes con propiedades específicas. Una de las estrategias más eficaces para la construcción de bibliotecas, es mutar aleatoriamente el gen que codifica para la enzima silvestre induciendo cambios mediante errores en su replicación. Estos métodos generan miles de mutantes dentro de las que se espera encontrar una proteína con una propiedad de interés. El diseño de métodos de selección y/o escrutinio que discriminen de manera eficiente, es un punto crítico. La inulosacarasa (IsIA) de *L. citreum*, es una fructosiltransferasa (FTF) que sintetiza inulina (polímero de fructosa) de alto peso molecular a partir de sacarosa. IsIA4 es una versión truncada de la IsIA que consiste básicamente en el dominio catalítico (*del Moral*, 2008). A pesar de las características interesantes de la IsIA4, su aplicación potencial se ve limitada por su baja eficiencia catalítica. En este sentido el objetivo del trabajo fue generar librerías de mutantes del gen IsIA4 con el fin de obtener mutantes sobreproductoras. Para aislar las mutantes de manera automatizada no puede aplicarse el método de DNS de medición de actividad pues opera a 100° C. Por esta razón se adaptó el método de determinación de azúcares reductores, reportado por *Miller* en 1959, a bajas temperaturas, para así contar con un sistema automatizado de selección.

Metodología. Se construyeron dos bibliotecas de mutantes del gen IsIA4 en la cepa *E.coli TG1* (A y B) empleando la estrategia de *PCR prone* (1). Para el escrutinio, se purificó plásmido de las bibliotecas, y se transformaron en *E. coli C* permitiendo la selección de clonas sobreproductoras de polímero a partir de sacarosa. Se seleccionaron aquellas colonias que comparadas con la variante silvestre, formaron un halo mucoso visiblemente mayor (2). A dichas colonias se les midió actividad enzimática (3) por el método DNS modificado de azúcares reductores.



Resultados. Se modificó el método de *Miller* 1959, con el fin de adaptarlo a un robot automatizado capaz de

analizar muestras en forma masiva directamente en las colonias. Se determinó la cinética de la reacción a diferentes temperaturas. En la tabla 1 se muestran las condiciones finales establecidas, comparadas con el método original. Bajo las nuevas condiciones de ensayo de DNS se logro medir actividades tan bajas como 0.015 U/ml en las colonias. Posteriormente se construyeron dos bibliotecas una de alta y otra de baja mutagenicidad. Se obtuvieron alrededor de 10000 colonias en cada biblioteca: se calculó una tasa mutagénica de 0.08% para el banco de baja mutagenicidad a partir de la secuencia de 5 clonas. Para el escrutinio se midió actividad enzimática de las cepas mucoides en presencia de sacarosa, por el método de DNS modificado. Actualmente se están analizando los bancos de mutantes de IsIA4 con la metodología de DNS descrita.

Tabla 1. Comparación del método DNS tradicional con el modificado.

	DNS original	DNS modificado
Volumen de reacción (mL)	5	0.15
Sensibilidad (g/L)	0.5-2	0.1-0.5
Temperatura °C,	Ebullición	45
Tiempo (min)	5	160

Conclusiones. Se construyeron dos bancos mutagénicos de IsIA4 empleando la técnica de *PCR prone*, uno de baja tasa de mutagénesis (A) y uno de alta (B). Se adaptó el método de DNS a 45°C para cuantificar pequeñas concentraciones de azúcares reductores a baja temperatura compatible con un robot. El método es sensible a niveles de actividad tan bajos como 0.015U/mL. Estas condiciones permiten analizar bancos mutagénicos de IsIA en un instrumento automatizado capaz de analizar muestras en forma masiva a 45°C.

Agradecimiento. Proyecto Conacyt Ciencia Básica 81637.

Bibliografía.

1. Del Moral S, et al., Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28, BMC Biochemistry 2008, 9:6 doi:10.1186/1471-2091-9-6.
2. Miller G, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry, 1959, Vol. 31, 3.