

## CONSTRUCCION DE UNA POLIMERASA QUIMERA DEL FRAGMENTO KLENOW QUE INTEGRA EL PULGAR DE LA T7 ARN POLIMERASA

Imilla Arias-Olguín, Gilda Mena y Juan Manuel de la Fuente.  
Centro de Biotecnología. ITESM Campus Monterrey  
Sucursal de Correos "J" Monterrey, N.L.64849, México  
Fax: (8)328.41.36; e-mail: arolima@hotmail.com

Palabras clave: *Fragmento Klenow, mutagénesis por SOEing, PCR.*

**Introducción.** El Fragmento Klenow (FK) de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y la T7 ARN polimerasa (T7), son enzimas que llevan a cabo la polimerización de ácidos nucleicos (1). Su estructura se compone por tres subdominios análogos a una mano que retiene al templado de ADN (2). La T7 cataliza la incorporación de un mayor número de nucleótidos por evento, en comparación al FK, lo cual se atribuye a que su pulgar es de mayor tamaño, lo que supone favorece que el templado del ADN permanezca más tiempo en contacto con la polimerasa (3).

El objetivo del trabajo fué construir una polimerasa quimera a partir del Fragmento Klenow, al cual se le inserte el pulgar de la T7 para generar una polimerasa que sea más eficiente en el mecanismo de polimerización.

**Metodología.** Se diseñaron oligonucleótidos que permitieran amplificar los extremos N y C terminales del FK y que a su vez fuesen complementarios en sus extremos a los correspondientes que amplifican el pulgar de la T7 a fin de realizar mutagénesis por extensión de traslape (técnica de SOEing) (4). De forma paralela, los extremos N y C terminales de Klenow y el pulgar de la T7, se amplificaron por PCR tipo Touchdown (TD). Los tres productos de amplificación anteriores, se unieron entre sí utilizando el traslape de las secuencias extremo incorporadas en los oligonucleótidos. La fusión de los tres productos permitió la construcción quimera, misma que como fragmento *NdeI-HindIII* se clonó en pET3a. La construcción se llevó a *Escherichia coli* (BL21). El análisis de la construcción se realizó mediante PCR y restricción.

**Resultados y Discusión.** Se obtuvieron amplificaciones para los fragmentos amino, carboxi terminal de Klenow y la T7 ARN polimerasa de los tamaños esperados: 688, 842 y 240 pb respectivamente. Esto permitió llevar a cabo la mutagénesis por medio de la técnica de SOEing acoplado al PCR(TD) para amplificar y unir los productos de interés que se unieron entre sí debido a las secuencias complementarias que formaron traslapes entre ellos. La construcción de la polimerasa quimera de Klenow que integra al pulgar de la T7, se obtuvo

con la intensidad, especificidad y tamaño esperado de 1770 pb. En la clonación de la construcción en el plásmido pET3a se obtuvieron bandas intensas y específicas de 4,057 y 1770 pb correspondientes al plásmido y a la construcción. Se comprobó la presencia de la reconstrucción del FK al caracterizar las células transformadas de *Escherichia coli* (BL21) a través de PCR, en donde se obtuvo un solo producto con un tamaño de 1770 pb. Por otro lado, el análisis de restricción demostró que se podía visualizar la banda correspondiente a la reconstrucción total en electroforesis de agarosa.

**Conclusiones.** Se logró la construcción de la molécula recombinante del Fragmento Klenow, debido al diseño adecuado de los oligonucleótidos que hibridaron con alta especificidad. El uso del PCR ( TD ) permitió la hibridación óptima de cada oligonucleótido junto con la técnica de SOEing. Esto favoreció que los fragmentos ya mencionados, se unieran entre sí de forma precisa y dirigida. La polimerasa quimera permitirá analizar al pulgar en el contexto del FK para determinar su papel en procesividad.

**Agradecimientos.** Se agradece el gran apoyo que aportó para este trabajo la Dra. Rosamaria López Franco, Coordinadora del Centro de Biotecnología del ITESM Campus Monterrey.

### Bibliografía.

1.Arnold,E., Ding,J., Hughes,S.H y Hostomsky, Z. 1995.Structures of DNA and RNA polymerases and their interactions with nucleic acid substrates.Current Opinion in Structural Biology., 5:27-

38.

2.Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. & Steitz, T. A. 1992.Crystal structure at 3.5 A resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor.Science 256:1783-1790.

3.Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark, A. D. Jr., Lu X., Tantillo, C., Williams, R. L., Kamer, G., Ferris, A. L & Clark, P. 1993.Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 A resolution shows bent DNA.Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90:6320-6324.

4.Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L. R. 1989.Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.Gene, Elsevier Science Publishers B.V., 77: 51-59.