

EXPRESION Y PURIFICACION DE UN DOMINIO DE UNION A CELULOSA (CBD) TIPO II DE *Cellulomonas flavigena*

Fidel R. Mujica Lengua, Beatriz Xoconostle Cázares, Roberto Ruíz Medrano y Jaime Ortega López.
CINVESTAV-IPN. Av. IPN Nro. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, México, D.F., C.P. 07360.
Fax 57473800 Ext. 4305. jortega@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, dominio de unión a celulosa, purificación.

Introducción. El CBD de las celulasas bacterianas y fúngicas contribuye significativamente a la actividad hidrolítica frente a la celulosa nativa (3). A la fecha se han identificado más de 180 CBDs diferentes, siendo los CBDs de la familia II específicos de celulasas bacterianas y tienen un tamaño promedio de 110 aminoácidos (1). Este dominio en general tiene un gran potencial en biotecnología, ya que se puede utilizar como etiqueta para la purificación por afinidad de proteínas recombinantes (2). En el presente trabajo se reporta por primera vez la clonación, expresión, purificación y caracterización de un CBD de *Cellulomonas flavigena*.

Metodología. Se diseñaron oligonucleótidos degenerados por alineamiento con las secuencias de aminoácidos reportadas para CBDs bacterianos en la base de datos. El producto de PCR se clonó en el vector pCRII-TOPO (3.9 kb) con el cual se transformó *E. coli* cepa TOP10F'. La expresión del polipéptido se realizó a partir de cultivos de *E. coli* recombinante inducidos con IPTG 1mM, por 12h, 220 rpm, a 28°C. Posteriormente, la proteína se purificó por cromatografía de intercambio iónico y se caracterizó funcionalmente.

Resultados y Discusión. ADN genómico extraído y purificado de *C. flavigena* sirvió como templado para la PCR, que luego de ajustar las condiciones, permitió obtener un producto de 330 pb; el mismo que fue confirmado al digerir con *EcoRI* el plásmido proveniente de *E. coli* transformada (Fig.1).

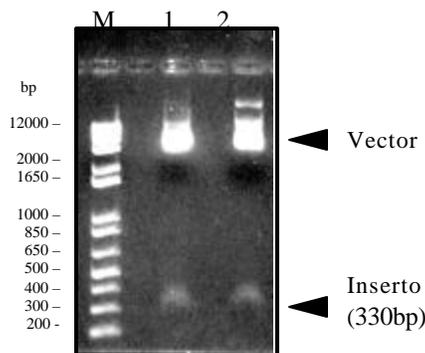


Fig. 1 Identificación de los productos de PCR por digestión del plásmido. Se observan los insertos provenientes de la PCR con el primer par de oligos (1) y con el segundo par (2).

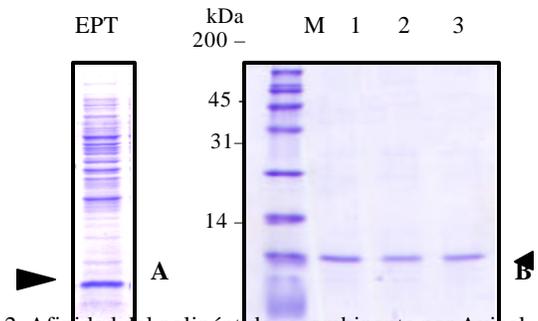


Fig. 2 Afinidad del polipéptido recombinante por Avicel. Panel (A), Perfil del extracto protéico total. Panel (B), Proteína unida a Avicel después de lavar la muestra con Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 (1), adicionado de NaCl 0.8 M (2) o Urea 4 M (3) y eluida con amortiguador de corrida

El análisis de los extractos protéicos de *E. coli* recombinante en geles de poliacrilamida, señalan que el polipéptido expresado se acumula en la fracción soluble. Para demostrar que esta proteína se expresa en forma funcional (Fig.2), 1 ml del extracto protéico total se interaccionó con 10 mg de celulosa microcristalina (Avicel), observándose que la interacción fue estable aún en las tres condiciones de lavado. La fracción soluble se sometió a un solo paso de purificación en una columna de intercambio catiónico obteniéndose un rendimiento de 8.4 mg/l de proteína pura, que representó el 12% de la proteína total soluble (Panel A).

Conclusiones. El tamaño molecular del producto amplificado y clonado, así como el peso molecular del polipéptido expresado y su afinidad por celulosa microcristalina (Avicel), permiten concluir que la proteína corresponde a un CBD de tipo II.

Agradecimiento. Al CONACYT por el financiamiento del proyecto 26309-B otorgado a JOL. A la SRE por la beca concedida a FRML.

Bibliografía.

1. Bayer, E., Chanzy, H., Lamed, R. and Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol* 8:548-557.
2. Bhat, M. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355-383.
3. Carrard, G., Koivula, A., Söderlund, H. and Beguin, P. (2000). Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *PNAS* 97(19): 10342-47.

FORMATO DE PRESENTACION

Nombre del autor principal o responsable del trabajo:

Fidel Rodolfo Mujica Lengua.

Institución o empresa:

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.

Departamento:

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

Domicilio completo:

Eje Central Lázaro Cárdenas 466. Edificio Revolución de 1910. Dpto. 502.

Teléfonos (con clave lada):

Tel. 55971197 (domicilio).

Tel. 57473800 Ext. 4381 (CINVESTAV).

Fax (con clave lada):

Fax 57473800 Ext. 4305 (CINVESTAV).

Correo electrónico:

frmujical@starmedia.com

Título del trabajo:

Expresión y purificación de un dominio de unión a celulosa (CBD) tipo II de *Cellulomonas flavigena*.

Modalidad de presentación:

Oral.

Area temática:

III.