

# SOBREEXPRESSION CONTROLADA DE LA ENZIMA UNG DE *ESCHERICHIA COLI*.

Cecilia Cabello, Gabriel J. Márquez<sup>1</sup>, Manuel Mansur.  
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, PO Box 6162, Habana, Cuba.  
Fax. 53-7-214764.e-mail: [gabriel.marquez@cigb.edu.cu](mailto:gabriel.marquez@cigb.edu.cu)

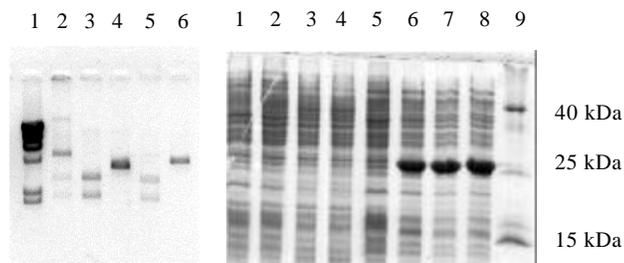
Palabras clave: UNG, clonaje, sobreexpresión.

**Introducción.** La enzima Uracilo N-Glicosidasa (UNG) juega un papel importante en los mecanismos de reparación del ADN y en la actualidad se ha expandido su uso en el diagnóstico para evitar la obtención de falsos positivos en técnicas de PCR. La posibilidad de producir grandes cantidades de la misma de fuentes recombinantes es de un atractivo indiscutible. Si a lo anterior se le une la posibilidad de un control estricto del momento de su expresión así como de la localización celular del producto el sistema es biotecnológicamente interesante.

Con este trabajo se persiguió la obtención de una fuente recombinante de UNG de *E. coli* para su sobreexpresión controlada tanto en tiempo como en localización celular.

**Metodología.** La cepa utilizada para aislar el gen de la UNG fue la cepa salvaje *E. coli* C1a. Los experimentos de clonaje se realizaron en la cepa XL1-Blue y los de expresión en MC1061. Los oligonucleotidos utilizados para el PCR fueron AGCGCCATGGCTAACGAATTAACCT para el extremo 5' del gen, y para el extremo 3' el AGCGAATTCCAAATTTACTCACTCTCTGC 3'. Todas las técnicas de biología molecular utilizadas se realizaron según Sambrook (1). El vector de expresión final utilizado fue el pTrcHisA de Invitrogen.

**Resultados y Discusión.** El resultado del chequeo de posibles recombinantes finales se observa en la figura 1, izquierda. Como se observa el 2, el 3 y el 5 son recombinantes positivos.

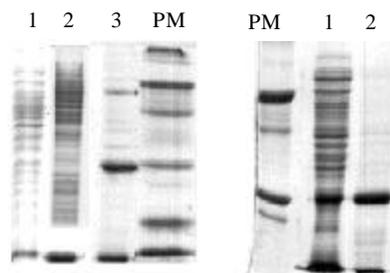


**Figura 1. Izquierda:** Análisis de posibles recombinantes, (1): marcador  $\lambda$ HindIII; (2-5): digestión SphI de posibles recombinantes; (6): digestión SphI de un control negativo. **Derecha:** Análisis de expresión en SDS-PAGE del clon pTrcUng5. (1): cultivo control negativo sin IPTG; (2-4): control negativo 3, 5 y 7 h posteriores a la inducción con IPTG; (5): clon pTrcUng5 antes de la inducción; (6-8): 3, 5 y 7 h posteriores a la inducción del clon pTrcUng5 con IPTG. (9) patrón de peso molecular.

Se continuó con el clon 5, al que se le realizaron estudios de control sobre la expresión y porcentaje de expresión después de la inducción, figura 2, derecha.

Además se estudio la localización en cultivo tanto en medio mínimo como en medio rico, a 28 y a 37 °C, observándose una fracción apreciable citoplasmática para la condición de medio mínimo a 28 °C, figura 2. En el resto de los casos la proteína se expresó en un 100 % como cuerpo de inclusión. Todo este comportamiento de solubilidad es coherente con la teoría de la formación de cuerpos de inclusión "in vivo"(2).

Figura 2. SDS-PAGE de cultivos del clon pTrcUng5 a 28°C.



Izquierda: cultivo en LBA; (1): antes de la inducción; (2y3): sobrenadante y precipitado de ruptura. Derecha: cultivo en medio mínimo; (1y2): sobrenadante y precipitado de ruptura.

La proteína purificada del clon mostró un N-terminal hasta el aminoácido 35 igual al reportado en la base Swissprot(3) y una actividad uracilo N-glicosidasa similar a un control positivo de enzima comercial.

**Conclusiones.** Con el presente trabajo se evidenció la posibilidad de la sobreexpresión de la UNG fuertemente controlada bajo un promotor híbrido lac-triptofano y la factibilidad de aumentar la solubilidad "in vivo" del producto del gen manipulando las condiciones de cultivo.

## Bibliografía.

1. Sambrook, J (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
2. Wetzel, R. (1992) *Protein Engineering: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, 191-219.
3. Bairoch, A. and Apweiler, A. (1997) The SwissProt protein sequence data bank and its supplement TREMBL, *Nucleic Acids Res.* 25: 31-36