

CLONACIÓN DEL GEN DE UNA CELULASA DE 140 kDa DE *Cellulomonas flavigena* CON AFINIDAD A CELULOSA CRISTALINA.

Sánchez Herrera L.M., Ruiz Medrano R., Xoconostle Cázares B, Magaña Plaza I. Ortega López J. Biotecnología y Bioingeniería. Lab. Proteínas y Lab. Biología Molecular. CINVESTAV-IPN # 2508 Col. San Pedro Zacatenco. México,D.F. O7360 E-mail:. lmsanche@mail.cinvestav.mx.

Celulasas, clonación, Cellulomonas

Introducción. El aprovechamiento de los productos de la hidrólisis de la celulosa depende en buena parte del mejoramiento de los sistemas enzimáticos capaces de degradarla eficientemente, para ello es necesario un conocimiento más detallado del mecanismo de hidrólisis y sobre todo de las características estructurales y funcionales de las enzimas que participan. Las endo- β -1,4-glucanasas y exo- β -1,4-glucanasas actúan sinérgicamente en el rompimiento de la celulosa a celobiosa, mientras que la β -1,4-glucosidasa convierte la celobiosa a glucosa. Algunas bacterias, levaduras y hongos son conocidas por producir una o más de estas enzimas, sin embargo la bioquímica y biología molecular de estas enzimas no es del todo conocida. *Cellulomonas flavigena* posee un alto potencial celulolítico contando con al menos cuatro endoglucanasas que pueden separarse cromatográficamente (2).

En el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos: Clonar y secuenciar el gen que codifica para la proteína de 140 kDa de *Cellulomonas flavigena* (CBP140), determinar la homología entre la CBP140 y las secuencias presentes en la base de datos e identificar el dominio catalítico (CD) y el dominio de unión a celulosa (CBD).

Metodología. Se diseñaron oligonucleótidos para *C. flavigena* a partir de los siguientes 16 residuos del extremo amino terminal de la proteína de 140 kDa: A G S D T F T R A L Q T V Q D T. (Primer CBP140). Con la siguiente secuencia P A S F T L N G A T, reportada por Gli Gilkes y cols. en 1989 para el CBD (Clfx) de *C. Flavigena*, se diseñó el oligonucleótido reverso (Cf1r). El diseño de otros oligonucleótidos se realizó con base en las secuencias parciales reportadas para *C. flavigena* en el banco de datos del NCBI. Los productos de PCR obtenidos se ligaron al vector comercial pCR II (Invitrogen). Estos fragmentos se utilizarán como sonda en el escrutinio en un banco genómico generado en el vector λ . Con base en el análisis de la secuencia, se identificará el dominio catalítico (DC) y el dominio de unión a celulosa (CBD). Se determinará experimentalmente la capacidad de la proteína heteróloga para unir celulosa cristalina

Resultados y Discusión. Mediante la técnica de PCR utilizando DNA de *Cellulomonas flavigena* como templado y diferentes pares de iniciadores se obtuvieron tres productos de DNA de 500, 1100 y 2500 pb (figura 1). Estos fueron clonados en el vector bacteriano pCR II Topo, las clonas recombinantes seleccionadas se caracterizaron por mapa de restricción. El DNA plasmídico se purificó para su

posterior secuenciación. Se realizaron ensayos de hibridación tipo Southern utilizando DNA genómico de *C. flavigena* digerido con la enzima *Bam*HI para caracterizar por restricción a este gen de *C. flavigena*. Se utilizaron los fragmentos de PCR marcados radiactivamente como sonda. La hibridación se realizó en condiciones poco severas para favorecer la detección de secuencias relacionadas. Se observaron bandas de 2000, 1800 y 300 pb (figura 2). Considerando que la sonda empleada detecta diversas bandas, interpretamos este resultado como la detección de una familia de genes que están presentes en esta bacteria celulolítica. Resultados similares, reportados por Akhtar y cols, 1988, sugieren también la presencia de una multifamilia.

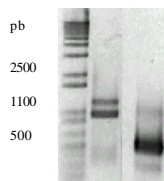


fig.1 Gel de agarosa 1% mostrando los productos de PCR

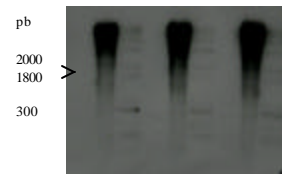


fig. 2 Ensayo tipo Southern

Perspectivas. Los fragmentos de DNA obtenidos de 500, 1100 y 2500 pb se utilizarán como sonda en el escrutinio en un banco genómico de *C. flavigena*, construido en nuestro laboratorio usando el vector lambda DASH. Las clonas recombinantes que hibriden con las sondas serán secuenciadas para su posterior análisis e identificación del CD y CBD.

Agradecimiento. Este trabajo se realizó con apoyo del proyecto de CONACYT 26309-B a Jaime Ortega L. , 31527-B a Beatriz Xoconostle C. y la beca para estudios de maestría 144392 a Leticia Mónica Sánchez Herrera.

Bibliografía:

1. Henrissat, B and Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*. 1997, 7:637-644.
2. Akhtar, M.W., Duffy, M, Dowds, B.C.A., Sheehan, M.C and McConnell. D.J. Multigene families of *Cellulomonas flavigena* encoding endo- β -1,4-glucanasas (CM-cellulasas). *Gene*, 74 (1988) 549-553.