



## CLONACION DEL DOMINIO CATALITICO Y DEL MODULO DE UNION A CARBOHIDRATO TIPO III DE LA CBP105 DE *Cellulomonas flavigena*.

Myriam Sánchez Casco, Teresa Mejía Castillo y Jaime Ortega López.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. Ave. IPN # 2508, San Pedro Zacatenco, CP 07360 Mexico, DF. Fax 5061-3313. mysanchez@cinvestav.mx.

*Palabras clave:* *Cellulomonas flavigena*, endoglucanasa CBP105, celulosa.

**Introducción.** La celulosa es la mayor reserva de energía renovable en el planeta y su hidrólisis enzimática es una alternativa que se ha explorado ampliamente para aprovechar este polisacárido natural en la producción de etanol o como sustrato en otras fermentaciones. La mayoría de las celulasas están constituidas de varios dominios cuyo mecanismo molecular aún se desconoce (1). En un trabajo previo se purificó y caracterizó una endoglucanasa con afinidad a celulosa cristalina de aproximadamente 105 kDa (CBP105) producida por *Cellulomonas flavigena*. Por experimentos de digestión limitada con  $\alpha$ - quimiotripsina se encontró que esta enzima está constituida por al menos dos dominios de unión a carbohidrato (CBMIII y CBMII) y un dominio catalítico (CD). También se observó que la tasa de hidrólisis del fragmento CD-CBMIII fue tres veces mayor a la obtenida con la CBP105 (2).

Para probar que el aumento en la tasa de hidrólisis se debe a la eficiencia catalítica del CD de la CBP105, en el presente trabajo se clonaron los fragmentos de DNA correspondientes al CD y al CD-CBMIII en un vector de expresión.

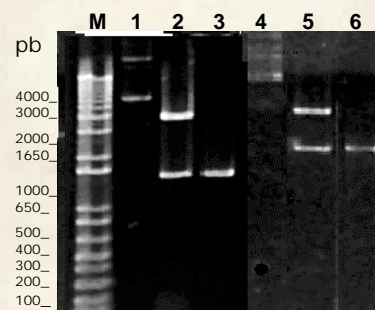
**Metodología.** Para amplificar por PCR los fragmentos de DNA correspondientes a los dominios CD y CD-CBMIII, se diseñaron los oligonucleotidos PET105, PET105CD y PET105CDIII. Los fragmentos amplificados se clonaron en el plasmido pCR 4-TOPO y se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las clonas candidatas se analizaron por "PCR colony" y el tamaño de los insertos se comprobó por una doble digestión con enzimas de restricción (3). Posteriormente los fragmentos de DNA se purificaron y subclonaron en el vector de expresión pET-39b(+).

**Resultados y discusión.** En la figura 1 se muestra la estructura propuesta para la proteína CBP105 y el alineamiento de los oligonucleotidos utilizados para amplificar los fragmentos correspondientes CD y CD-CBMIII.



**Figura 1. Estructura propuesta para la CBP105 de *C. flavigena*.**

CD dominio catalítico, CBMIII y CBMII módulo de unión a carbohidratos tipo III y II, FIII módulo de fibronectina tipo III. Las flechas indican la localización de los oligonucleotidos.



**Figura 2. Análisis del DNA plasmidico de las clonas 3CD y 4CIII.** DNA plasmidico (1), digestión con *EcoRI* y *HindIII* (2) y purificación del fragmento de la clona 3CD (3). DNA plasmidico (4), digestión con *EcoRI* y *HindIII* (5) y purificación del fragmento de la clona 4CIII(6).

En la figura 2 se muestra el análisis por restricción (con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*) de las clonas 3CD y 4CIII. En los carriles 2 y 5 se observa la liberación de los insertos cd y cd-cbmIII con los tamaños esperados de 1.5 y 2.2 kb respectivamente. Estos fragmentos purificados (carriles 3 y 6) se clonaron en el vector de expresión pET-39b(+). Para comprobar que se encuentren en fase se secuenciaron, para luego expresar y purificar tanto los fragmentos recombinantes como la proteína nativa para comparar su tasa de hidrólisis en CMC.

**Conclusiones.** Se clonaron los fragmentos de DNA que codifican para los dominios CD y CD-CBMIII en el vector de expresión pET-39b(+).

**Agradecimiento.** Agradecemos al CINVESTAV-IPN y CONACYT por el financiamiento del trabajo (proyecto 40387-Z) y por las becas otorgadas para maestría (MSC) y doctorado (TMC).

### Bibliografía.

1. Knauf, M. y Moniruzzaman, M., (2004). Lignocellulosic biomass processing A perspectiva. *Int. Sugar J.* vol (106): 147-150.
2. Mejía, T. (2001). Purificación y caracterización bioquímica de dos celulasas de 70 y 105 kDa producidas por *Cellulomonas flavigena*. Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN.
3. Sambrook, J. y Russell D. W., (2001), Plasmids and their usefulness in Molecular Cloning. En: *Molecular Cloning a laboratory manual*. Argentine, J. Ed. Cold Spring Harbor, New York. 1.32 – 1.42