XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
SIPAL Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras
VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras

CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR DE CLONACIÓN MÚLTIPLE PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE *Amycolatopsis mediterranei*, PRODUCTOR DE RIFAMICINA.

Karla S. Macedo, Armando Mejía, Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa México D.F. Edificio S-153. Tel.58046453 Fax. 58044712. ama@xanum.uam.mx

Palabras clave: *A. mediterranei, vector de clonación, citocromo P450.*

Introducción. La rifamicina B, es un antibiótico del grupo de las ansamicinas, ampliamente usada para el tratamiento clínico de la tuberculosis, lepra e infecciones micobacterianas relacionadas con el SIDA (1). Uno de los pasos limitantes para la producción de rifamicina B es la incorporación de oxígeno al intermediario rifamicina W, reacción mediada por el gen *rif-orf5*, que codifica para un citocromo P450 monooxigenasa (2). Otro factor limitante para el mejoramiento genético de este microorganismo, es que no se cuenta con un vector adecuado para la clonación de genes de interés. Por esta razón, a partir de plásmidos endógenos, se han desarrollado vectores de clonación, utilizados ampliamente para el mejoramiento de cepas y producción de metabolitos (3). Sin embargo, ninguno de ellos cumple con todos los requerimientos para *A. mediterranei*, como por ejemplo: marcador de selección estable, bi-funcionalidad, promotor y sitio múltiple de clonación.

Los objetivos de este trabajo fueron dos, el primero consistió en la construcción de un vector de clonación *universal* y el segundo, aumentar la dosis génica del gen *rif-orf5*, para favorecer la incorporación de oxígeno en este paso limitante de la biosíntesis de rifamicina B.

Metodología. Plásmido usados: pIJ4026 (4) que contiene el gen de resistencia a eritromicina *ermE*. pULVK2 (3), plásmido bifuncional con un origen de replicación para *Amycolatopsis* y otro para *E. coli*, con marcador de resistencia a kanamicina.
Las aplificaciones se hicieron por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
RT-PCR para la obtención de cDNA del gen *orf5*.
Transformación por electroporación. Digestiones y ligaciones de acuerdo a la técnica del fabricante (Promega).

Resultados y discusión. Se construyó el plásmido pUAMKM1 (Fig.1), posee un tamaño aproximado de 7.4 kb. Este plásmido facilitará la manipulación genética de *Amycolatopsis* debido a la presencia de un nuevo marcador de selección, resistencia a eritromicina, así mismo fue posible ampliar el sitio de multiclonaje. En la figura 2, se observan los fragmentos obtenidos por PCR de tamaño de 1266pb y 300pb, correspondientes al gen *orf5* y al promotor *permE* respectivamente.

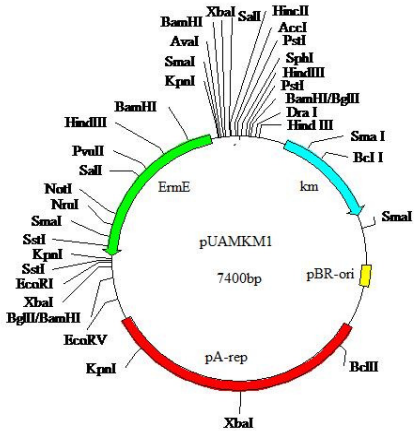

Fig. 1. Mapa de restricción del plásmido construido pUAMKM1.

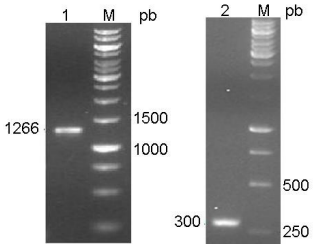

Fig. 2. Fragmentos de PCR obtenidos. 1) Gen orf5, 2) promotor permE, M) marcador de peso molecular.

Conclusiones. Se construyó un vector de clonación para el género *Amycolatopsis* de 7.4 kb, donde se clonó el gen *orf5* con el promotor *permE.*

Agradecimiento. CONACyT (SEP-2003-C02-44911/A1).

Bibliografía.

1. August P., Tang L., Yoon Y., (1998). Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chemistry & Biology.* 5:69-79.
2. Xu J., Wan E., Kim C. (2005). Identification of tailoring genes involved in the modification of the polyketide backbone of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Microbiology* 151:2515–2528.
3. Malhotra, S., Lal R., (2007). The genus *Amycolatopsis*: Indigenous plasmids, cloning vectors and gene transfer systems *Indian Journal of Microbiol.* 47:3-14.
4. Tuteja D., Dua M., Khanna R., (2000). The importance of homologous recombination in the generation of large deletions in hybrid plasmids in *Amycolatopsis mediterranei. Plasmid.* 43:1-11.