

CONSTRUCCION DE UN PLASMIDO ADECUADO PARA LA TRANSFORMACION DE *Amycolatopsis mediterranei*.

Angel E. Absalón, Francisco J. Fernández, Javier Barrios-González y Armando Mejía*.
Depto. Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. Av. Michoacán y purísima s/n
Col. Vicentina C.P. 09640 México, D.F., México. Fax: (5) 804 4712, e-mail: ama@xanum.uam.mx

Palabras clave: Rifamicina, vectores de clonación, *Amycolatopsis mediterranei*

Introducción. *Amycolatopsis mediterranei* es un actinomiceto productor del antibiótico rifamicina, el cual es activo contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*. (1)

Para realizar el mejoramiento genético de *A. mediterranei* es necesario contar con vectores de clonación adecuados. Sin embargo se han reportado pocos para este microorganismo, y estos, tienen la desventaja de ser de alto peso molecular (>7.1 Kb), lo que los hace inadecuados para la construcción de genotecas (2).

El plásmido pULVK2 (3) contiene un origen de replicación para *A. mediterranei* y un gen de resistencia a kanamicina. Si se compara con el plásmido pRL53 usado en *A. mediterranei* (2) tiene la ventaja de ser más pequeño. Sin embargo la resistencia a Kanamicina a pesar de ser un eficiente marcador de selección, en *E. coli*, en *A. mediterranei* se generan una gran cantidad de resistentes espontáneas, esto lo hace inadecuado como marcador de selección en este microorganismo (4).

Por su parte, el gen *erm E* de *S. erythraea* confiere resistencia a eritromicina, antibiótico al cual *A. mediterranei* es sensible, por lo que al incorporar este gen en el plásmido pULVK2 podría utilizarse como marcador de selección.

Metodología. Se construyeron dos oligonucleótidos con las secuencias de inicio y fin del gen *erm E*, para amplificar el gen por la técnica de PCR a partir del plásmido pJ4026. En ambos extremos de los oligonucleótidos, se adicionaron sitios de corte *Eco RI*. El fragmento amplificado se insertó en el plásmido pULVK2 y se realizó la transformación en *E. coli* XL1-Blue. Se seleccionaron y amplificaron transformantes que contenían un plasmido con un incremento en el tamaño de aproximadamente 1500 pb. De manera paralela se realizó una prueba de sensibilidad y de concentración mínima inhibitoria a eritromicina en *A. mediterranei* M18 (ATCC), y posteriormente se transformó con los plásmidos que contenían el inserto. Finalmente se crecieron las colonias transformantes en medio Bennet y se seleccionaron por crecimiento cuando al medio se le adicionaba eritromicina.

Resultados y Discusión. *A. mediterranei* M18 (ATCC) resultó ser sensible a 400µg/ml de eritromicina, decidiéndose usar una concentración de 500µg/ml para seleccionar a los transformantes.

Cabe señalar que el gen *Erm E* no puede utilizarse en la selección de transformantes de *E. coli* debido a que el promotor de dicho gen no se expresa adecuadamente en este microorganismo.

mediterranei; un gen de resistencia a kanamicina y el nuevo fragmento que confiere resistencia eritromicina. El tamaño final del plásmido es de 7.153 Kb, teniendo una capacidad de carga entonces de entre 3 y 5 Kb. Este plásmido es aproximadamente del mismo tamaño que los actualmente reportados para *A. mediterranei*; sin embargo existe la posibilidad de disminuir en 2 Kb el tamaño de este plásmido, ya que se ha reportado un origen de replicación más pequeño que el que posee actualmente (2).

Conclusiones. Se obtuvo el plásmido pUAMAE1 de 7.153 Kb que contiene el gen de resistencia a eritromicina, marcador con el que se logró seleccionar adecuadamente colonias transformantes, comprobándose así su funcionalidad en *A. mediterranei*

Bibliografía.

1. Hartmann G., Honikel K., Knusel F. y Nuesch J. (1967) *Biochem. Biophys. Acta.* 145:843.
2. Tuteja, D., Dua, M., Khanna R., Dhingra, N., Khanna M., Kaur, H., Saxena, M. y Lal R. (2000) *Plasmid* 43 1-11.
3. Kumar C.V., Coque J.R. y Martín J.F. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (11) 4086-4093.
4. Lal R., Khanna R., Dhingra N., Khanna M. y Lal S. (1998) *J. antibiotics.* 51(2):161-169.

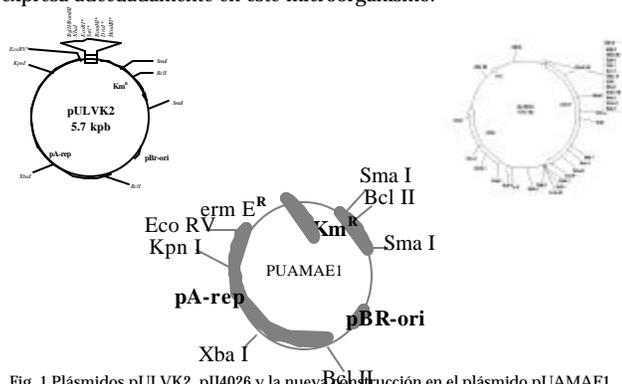


Fig. 1 Plásmidos pULVK2, pJ4026 y la nueva construcción en el plásmido pUAMAE1.

El plásmido obtenido pUAMAE1 tiene las siguientes características: un origen de replicación para *E. coli*, un origen de replicación para *A.*