

## EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL SCO3986 DE *Streptomyces coelicolor*

Jesús Emiliano Campoy Román, Beatriz Ruiz Villafán, Sergio Sánchez Esquivel.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, UNAM. CP 04510  
campoy@ciencias.unam.mx

*Palabras claves:* *Streptomyces coelicolor*, regulador transcripcional, Sco3986

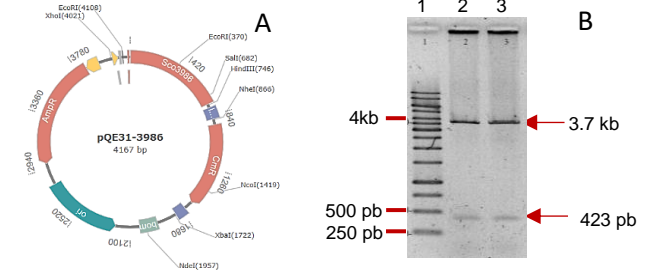
**Introducción.** El género *Streptomyces* posee un amplio interés en la biotecnología, debido a su extensa producción de metabolitos con actividad biológica. Dicha producción se ve afectada negativamente por fuentes de carbono como la glucosa. En general, en este género de bacterias, se ha visto que la enzima *glkA* participa en la regulación por carbono de la producción de metabolitos secundarios (1). En un análisis transcriptómico del modelo *Streptomyces coelicolor*, se descubrieron nueve reguladores transcripcionales dependientes de *glkA* (2). De éstos, dos pertenecen a la familia de reguladores GntR (los genes *sco3264* y *sco3986*) que por lo general participan en regulación por carbono y/o nitrógeno (2).

Para determinar el papel del regulador *sco3986* en la regulación por carbono en *Streptomyces*, se planteó como objetivo de este trabajo, clonar, expresar y purificar el posible regulador *sco3986* en *Escherichia coli*.

**Metodología.** El DNA genómico de *S. coelicolor* se aisló de acuerdo con el método reportado en (2). Para la amplificación del gen *sco3986* se diseñaron los siguientes cebadores FW: TGATGGATCCCATGACGCTCGCCGCCT y REV: CTGCAGTCATCTGTGCACCTGCCTTTC para clonar utilizando el método de ensamble de Gibson (3). El plásmido resultante se transformó por electroporación en células competentes de *E. coli* NEB5α. La construcción se comprobó por secuenciación de Sanger.

**Resultados.** *Clonación del gen sco3986.* Para clonar el gen por ensamble de Gibson, primero se hizo el diseño *in-silico* de la construcción pQE31-3986 (Fig 1A). Se eligió el plásmido de expresión pQE31 que contiene el gen *bla* para β-lactamasa, una secuencia codificante para un tallo 6xHis que está bajo el promotor T5, que a su vez está regulado por el operador *lac*. Se realizó el ensamble de Gibson usando

el kit NEBuilder, siguiendo las instrucciones del proveedor. El ensamble se transformó en células competentes de *E. coli* NEB5α. Posteriormente, se seleccionaron clones, se aislaron sus plásmidos y se digirieron con *EcoRI* para corroborar dos sitios de corte (3738 y 423 bp) (Fig 1B).



**Figura 1. A)** Mapa de la construcción pQE31-*sco3986*. **B)** Construcción pQE31-*sco3986* digerida con *EcoRI*. Marcador 1 kbp (carril 1) y plásmido digerido (Carriles 2 y 3).

*Secuenciación de pQE31-sco3986.* De las colonias obtenidas, solamente una tuvo la construcción esperada. Sin embargo, la secuencia de la clona muestra una mutación en el codón de inicio (delección de timina), lo cual corre el marco de lectura de *sco3986*.

**Conclusiones.** El gen *sco3986* fue clonado en el plásmido de expresión pQE31, no obstante, posee una mutación que corre el marco de lectura. La mutación se corregirá por mutagénesis dirigida.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo del proyecto de CONACYT AI-S9143, Agradecemos la asesoría de Berenice Hernández Cordero.

### Bibliografía.

1. Ruiz-Villafán, B., Cruz-Bautista, R., Manzo-Ruiz, M., Passari A.J., Villarreal-Gómez, K., Rodríguez-Sanoja, R. & Sánchez, S. (2021). *Microbial biotechnology*, 15(4), 1058-1072.
2. Romero-Rodríguez, A., Rocha, D., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V., Rodríguez-Sanoja, R., Segura-González, D., & Sánchez, S. (2016). *BMC microbiology*, 16(1), 1-16.
3. Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchinson III, C. A., & Smith, H. O. (2009). *Nature methods*, 6(5), 343-345.