

CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE FÓSMIDOS DE *Micromonospora purpurea* PARA LA IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE CLÚSTERES BIOSINTÉTICOS DE NUEVOS PRODUCTOS NATURALES.

Saraí Bata, Beatriz Ruíz-Villafán, Silvia Guzmán-Trampe, Omar Jiménez-Rodríguez, Sergio Sánchez.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, CDMX, 04510, beatrizruiz@biomedicas.unam.mx

Palabras clave: genoteca, Micromonospora. validación

Introducción. La búsqueda constante de nuevos productos naturales con actividad farmacéutica potencial y/o biotecnológica, ha requerido el empleo y desarrollo de diversas herramientas como: la minería genómica, la construcción de bibliotecas genómicas, la bioinformática y el uso de bases de datos para la predicción, localización y expresión de nuevos clústeres biosintéticos (1). Gracias a estas herramientas se han identificado miles de clústeres, aún no caracterizados, para la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios de interés. Dentro de las variadas fuentes de búsqueda de nuevos productos naturales, la actinobacteria *Micromonospora purpurea* se perfila como una fuente prometedora, debido a que es la principal productora de gentamicina, calicheamicina y cuenta con un genoma abundante en clústeres biosintéticos crípticos poco explorados, principalmente para la síntesis de metabolitos por vías tipo NRPS, PKS y terpenos, que son grupos de genes de gran tamaño (> 20Kb) (2).

Dada la dificultad para amplificar clústeres biosintéticos grandes mediante PCR, el objetivo de este proyecto fue construir una biblioteca de fósidos del genoma de *Micromonospora purpurea* para la identificación preliminar de clústeres biosintéticos de nuevos productos naturales con alguna bioactividad.

Metodología. Se realizó el análisis bioinformático del genoma de *M. purpurea* con herramientas como Antismash, PRISM y BLAST para la predicción de clústeres biosintéticos. Para la construcción de la biblioteca de fósidos del genoma de *M. purpurea* se empleó el kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™. Para estimar el tamaño promedio del inserto y su distribución, se seleccionó una muestra aleatoria de 170 clonas. Se aislaron los fósidos mediante lisis alcalina y se digirieron completamente con Eco72 I, el tamaño del inserto se estimó mediante electroforesis en gel (3). Para la validación de la biblioteca se rastrearon mediante PCR tres genes constitutivos necesarios para el mantenimiento basal de la célula: *gyrB*, *rpoB* y *recA* (4, 5).

Resultados. Al realizar el análisis bioinformático del genoma de *M. purpurea* se encontraron 29 predicciones

para clústeres biosintéticos, de los cuales se identificaron los clústeres encargados de la biosíntesis de la gentamicina, calicheamicina, sioxantina, y deferoxamina. Para facilitar la identificación y obtención de clústeres biosintéticos de gran tamaño, se construyó una biblioteca de fósidos con el genoma de *M. purpurea* (7.76 Mb). Se obtuvieron 1,508 clonas con insertos. Se determinó que el tamaño del oscilaba entre 35-45 Kb. Se aseguró la representatividad de la biblioteca con base en el número de clonas obtenidas y al tamaño promedio del inserto, concluyendo que el genoma de *M. purpurea* está representado en la biblioteca 6.7X. En cuanto a la validación de la biblioteca, se determinó la presencia de los genes constitutivos elegidos.

Tabla 1. Presencia de genes constitutivos en la biblioteca de fósidos de *Micromonospora purpurea*

Gen constitutivo	Tamaño del gen / función	no. de veces identificado
<i>gyrB</i>	2040 pb / ADN girasa sub. B	7
<i>rpoB</i>	3441 pb / RNA polimerasa subunidad β	6
<i>recA</i>	1047 pb / recombinación ADN	6

Conclusiones. Se construyó una biblioteca de fósidos del genoma de *Micromonospora purpurea* con una representatividad del genoma de 6.7X, con un tamaño de insertos promedio de 37.1 ± 0.3 Kb. Se validó la cobertura de la biblioteca con la presencia de los genes constitutivos *gyrB*, *rpoB* y *recA* que se encuentran en promedio 6.3X.

Agradecimientos. A PAPIIT (IN202216), DGAPA UNAM; al programa NUATEI del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; quienes proporcionaron los recursos para desarrollar esta investigación.

Bibliografía.

- Guzmán-Trampe, M., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez S. (2017). *BioTecnología*. 21(1).47-62.
- Hirsch, A. y Valdés, M. (2010). *Soil Bio Biochem*. 42 (4). 536-542.
- Liu, C. *et.al.* (2016). *Crop J*. 4. 55-60.
- Carro, L. *et.al.* (2013). *Syst Appl Microbiol*. 35.73-80.
- Yifan, H., *et.al.* (2009). *Chinese J Oceanol Limnol*. 27(3). 519-526.

