



Sobreexpresión del gen y purificación de la proteína recombinante His₁₀-GreA de *Bacillus subtilis*

Hilda Cecilia Leyva Sánchez¹, Armando Obregón Herrera¹ y Mario Pedraza Reyes¹

¹ U DE G. hilcesanchez@gmail.com

La participación de la transcripción en los procesos mutagénicos ha sido demostrada en microorganismos que replican activamente su material genético, así como en células sin división. En *B. subtilis* se han descrito 7 diferentes factores transcripcionales, i.e., NusA, NusB, NusE, NusG, Mfd, GreA y Rho. Durante la transcripción, estas proteínas facilitan el corte endonucleolítico del ARN desalineado, generando un nuevo extremo 3' que pueda ser extendido por la ARN polimerasa, previniendo así el paro de la transcripción durante la elongación y aumentando la fidelidad de este proceso. Evidencias genéticas recientes de nuestro grupo de trabajo, demostraron que *greA* participa en la promoción de eventos de mutagénesis asociados a la fase estacionaria en células de *B. subtilis* nutricionalmente estresadas.

Para investigar los mecanismos que propician eventos mutagénicos que favorecen la proliferación de esta bacteria bajo condiciones que limitan su crecimiento, nuestro laboratorio analiza la interconexión entre GreA y las rutas de reparación de ADN involucradas en eliminar lesiones propiciadas por el estrés oxidativo como la 8Oxo-G, sitios abásicos (AP) y bases erróneamente apareadas. Para abordar este objetivo se pretende implementar un sistema de transcripción *in vitro* que nos permita investigar la contribución de GreA en estos eventos mutagénicos.

En el presente trabajo se reporta la obtención de una construcción génica en el vector pET19-b para sobreexpresar al gen *greA* de *B. subtilis* en el huésped heterólogo *Escherichia coli*. Se demostró que la cepa recombinante portando esta construcción fue capaz de inducir la expresión de *greA* y generar una proteína recombinante His₁₀-GreA. La proteína recombinante se purificó a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad metálica, tal y como lo reveló un análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En conclusión, se obtuvieron fracciones altamente puras de la proteína His₁₀-GreA de *B. subtilis*, la cual mostró una masa molecular de alrededor de 17 kDa.