



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Expresión y comprobación de la actividad de la RNA polimerasa del bacteriófago SP6 en
Pichia pastoris. Prueba de concepto”.**

Tesis que presenta

Delia Zacnite García Vargas

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Rodolfo Marsch Moreno**

Ciudad de México

Junio, 2023

AGRADECIMIENTOS

A **CONACYT** por la beca otorgada durante la maestría (**778181**).

Al **CINVESTAV-IPN** por el apoyo financiero y por brindar posgrados de excelente calidad.

Al **Dr. Rodolfo Marsch Moreno** por aceptarme en su grupo de trabajo, por su apoyo, dirección, consejo, paciencia, enseñanzas y por compartirme su experiencia.

A la **Dra. María Eugenia Hidalgo Lara** y el **Dr. Luis Bernardo Flores Coterá** por sus consejos, aportaciones y observaciones.

A mis compañeros del laboratorio 50, el **M. en C. José Luis Sánchez Vargas, Anuar, Jorge** y **Gustavo** por sus consejos y hacer más amena la estancia.

A mi amigo el **M. en C. Oscar Ulises García Flores** por su apoyo y consejos.

A mi familia, **Alma Delia Vargas Colín, José Antonio García Espejel, Luis Antonio García Vargas, María José García Vargas, Junoen Guadalupe García Vargas** y **María Refugio Colín León**, por todo el amor, comprensión y apoyo durante toda mi vida, este logro también es suyo y la vida no me alcanzará para agradecerles.

A mi pareja el **M. en C. Alexis Jenatzy García Sebastián** por el amor, consejos y apoyo incondicional.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
RNA POLIMERASAS.....	3
RNA POLIMERASAS EN EUKARIONTES.....	5
<i>RNA polimerasas virales</i>	9
<i>PICHA PASTORIS</i> PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS.	12
<i>P. pastoris GS115</i>	14
GEN <i>UIDA</i> COMO REPORTERO.	14
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	18
GENERAL	18
ESPECÍFICOS.....	18
HIPÓTESIS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
MATERIALES BIOLÓGICOS.	19
1) <i>Cepas</i>	19
2) <i>Enzimas</i>	20
3) <i>Plásmidos, iniciadores y marcador de tamaño molecular</i>	21
REACTIVOS.....	24
MÉTODOS.....	24
1) <i>Propagación de E.coli</i>	25
2) <i>Propagación de los plásmidos molde</i>	25
3) <i>Ensamble de la secuencia de la RNA polimerasa de SP6 mediante Polimerización Azarosa de Fragmento (PAF)</i>	25
4) <i>Amplificación de los fragmentos que conforman al plásmido pGAP-ropSP6-GUS</i> 27	29
5) <i>Ensamble de la construcción pGAP-ropSP6-GUS</i>	29
6) <i>Análisis de restricción de: pJET-P_{GAP-ropSP6-AOX1T}, pJET-HIS4, pJET-P_{neo-cat-5'-UTR} y pJET-CYC1T-ORI-GUS</i>	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
1) DISEÑO DEL PLÁSMIDO pGAP-ropSP6-GUS	38
2) EXTRACCIONES DE DNA MOLDE: DNA GENÓMICO DE <i>P.PASTORIS</i>, pGAPZAA, pPICZAA, pBI121, pSUP2021, pMPJAS01, pUC57-KAN-SP6-5' Y pUC57-AMP-SP6-3'	41
3) ENSAMBLE DE LA SECUENCIA DE LA RNA POLIMERASA DE SP6 MEDIANTE POLIMERIZACIÓN AZAROSA DE FRAGMENTO (PAF)	45
4) AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS QUE CONFORMAN AL VECTOR pGAP-ropSP6-GUS	51
5) ENSAMBLE DEL PLÁSMIDO pGAP-ropSP6-GUS	51
a. <i>Ensamble tipo Golden Gate (New England BioLabs)</i>	52
b. <i>Ensamble por recombinación homóloga</i>	57

c. Ensamble por clonación dirigida.....	60
6) ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE: PJET-P _{GAP} -ROPSP6-AOX1T, PJET-HIS4, PJET-P _{NEO} -CAT-5'-UTR Y PJET-CYC1T-ORI-GUS.....	72
CONCLUSIONES.....	77
PERSPECTIVAS.....	78
REFERENCIAS.....	80
ANEXOS.....	82
ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO.....	82
i. Medio Luria-Bertani (LB).....	82
ii. Medio agar LB.....	82
iii. Medio Extracto de levadura peptona dextrosa (YPD).....	82
iv. Medio agar YPD.....	82
v. Medio base nitrógeno (YNB) agar.....	82
vi. Medio Terrific Broth (TB).....	82
ANEXO 2: REGULADORES.....	83
vii. TAE.....	83
ANEXO 3: SOLUCIONES.....	83
i. Cloruro de calcio 0.1 M y glicerol al 15%.....	83
ii. Regulador de lisis.....	83
iii. Solución I de Birnboim y Doly (BD).....	83
iv. Solución II de Birnboim y Doly.....	83
v. Solución III de Birnboim y Doly.....	84
ANEXO 4: PROCEDIMIENTOS.....	84
i. Células competentes.....	84
ii. Transformación química.....	84
iii. Extracción de DNA genómico de <i>P. pastoris</i> X-33.....	85
iv. Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep).....	85
v. Extracción de DNA plasmídico a mediana escala (midiprep).....	87
vi. Polimerización Azarosa de Fragmento (PAF).....	88
ANEXO 5: MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS.....	89

Índice de Tablas.

TABLA 1. CEPAS UTILIZADAS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO.....	19
TABLA 2. ENZIMAS UTILIZADAS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO.....	20
TABLA 3. PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO.....	21
TABLA 4. INICIADORES DISEÑADOS PARA EL DESARROLLO DEL PROYECTO.	23
TABLA 5. REACCIÓN TIPO GOLDEN GATE ENTRE pUC57-SP6-5' Y pUC57-SP6-3'.....	25
TABLA 6. RESTRICCIÓN CON BAMHI DE LIGACIÓN PUC57-SP6.	26
TABLA 7. SEGUNDA LIGACIÓN DEL PAF DE pUC57-SP6	26
TABLA 8. VOLUMEN DE CADA COMPONENTE PARA LA REACCIÓN DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN.....	26
TABLA 9. VOLUMEN UTILIZADO DE LOS COMPONENTES DE LA PCR DE LA SECUENCIA DE LA RNA POLIMERASA DE SP6.	27
TABLA 10. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN PARA LAS SECUENCIAS CYC1T-ORI, P _{EM7} -P _{GAP} , AOX1T, P _{NEO} , CAT Y 5'-UTR-AOX1 CON LA ENZIMA PLATINUM PCR SUPER MIX HIGH FIDELITY.	28
TABLA 11. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN PARA LA SECUENCIA HIS4 CON LA ENZIMA PHUSION™ HIGH- FIDELITY DNA POLYMERASE.	28
TABLA 12. REACCIÓN DE ENSAMBLE TIPO GOLDEN GATE UTILIZANDO LA ENZIMA PAQCI.	29
TABLA 13. CONDICIONES, VOLÚMENES DE RESTRICCIONES, LIGACIONES Y ENSAMBLE TIPO GOLDEN GATE UTILIZADOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES.	30
TABLA 14. CONDICIONES DE LAS REACCIONES DE LOS ENSAMBLES PARCIALES.....	31
TABLA 15. VECTORES EN LOS QUE FUERON CLONADOS CADA FRAGMENTO.....	33
TABLA 16. VOLUMEN DE REACCIÓN Y ESQUEMA DE TEMPERATURA EMPLEADAS PARA LA REACCIÓN DEL ENSAMBLE TIPO GOLDEN GATE DE P _{GAP} -ROPSP6-AOX1T.	34
TABLA 17. VOLUMEN DE UTILIZADO PARA VERIFICACIÓN DE LA CLONACIÓN DE P _{GAP} -ROPSP6-AOX1T EN pJET1.2/BLUNT MEDIANTE RESTRICCIÓN.	35
TABLA 18. VOLUMEN DE UTILIZADO PARA VERIFICACIÓN DE LA CLONACIÓN DE HIS4 EN pJET1.2/BLUNT MEDIANTE RESTRICCIÓN.	36
TABLA 19. VOLUMEN DE UTILIZADO PARA VERIFICACIÓN DE LA CLONACIÓN DE P _{NEO} -CAT-5'-UTR-AOX1 EN pJET1.2/BLUNT MEDIANTE RESTRICCIÓN.	36
TABLA 20. VOLUMEN DE UTILIZADO PARA VERIFICACIÓN DE LA CLONACIÓN DEL GEN UIDA EN pJET- CYC1T-ORI MEDIANTE RESTRICCIÓN.	37
TABLA 21. SECUENCIAS QUE CONSTITUYEN AL VECTOR pGAP-ropSP6-GUS. DNA ORIGEN, DE DONDE FUE APORTADO Y SU FUNCIÓN.	39
TABLA 22. FRAGMENTOS, TAMAÑO Y CUANTIFICACIÓN EN NANOGRAMOS Y PICOMOLES.....	52
TABLA 23. INTENTOS DE TRANSFORMACIÓN DEL ENSAMBLE DE GOLDEN GATE, CON VOLUMEN UTILIZADO PARA TRANSFORMAR.....	53
TABLA 24. COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN I DE BD.....	83
TABLA 25. COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN II DE BD.	83
TABLA 26. COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN III BD.	84
TABLA 27. MAPAS DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS Y GENERADOS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO.	89

Índice de Figuras.

FIGURA 1. COMPARACIÓN DE LAS RNA POLIMERASAS DE ACUERDO CON SUS SUBUNIDADES. TOMADA DE WERNER (2007).	5
FIGURA 2. ESTRUCTURAS DE LAS RNA POLIMERASAS EN EUKARIONTES. A. RNA POLIMERASA I, B. RNA POLIMERASA II Y C. RNA POLIMERASA III. TOMADA DE CRAMER ET AL; 2008.....	6
FIGURA 3. INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIONTES. TOMADA DE KOKUBO T. (2013).	7
FIGURA 4. ESTRUCTURA DEL BACTERIOFAGO SP6. TOMADA DE VIRALZONE.....	11
FIGURA 5. MODELAMIENTO POR HOMOLOGÍA EN SWISS MODEL DE RNA POLIMERASA DE SP6.....	12
FIGURA 6. PICHIA PASTORIS. TOMADA DE IGEM GEORGIA STATE UNIVERSITY.....	13
FIGURA 7. CEPAS DE PICHIA PASTORIS. TOMADA DE PICHIA PASTORIS: UNA PLATAFORMA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.	14
FIGURA 8. REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA B-GLUCURONIDASA CON X-GLUC.	15
FIGURA 9. MARCADORES DE TAMAÑO MOLECULAR UTILIZADOS EN DEL DESARROLLO DEL PROYECTO. A. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER (THERMOSCIENTIFIC). B. 1KB DNA LADDER (NEB).	22
FIGURA 10. FASES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROYECTO.....	24
FIGURA 11. PROGRAMA DE TEMPERATURA (°C) Y TIEMPO (MINUTOS) UTILIZADO PARA AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE SP6.....	27
FIGURA 12. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN. A) UTILIZADO PARA CYC1T-ORI, P _{EM7} -P _{GAP} , AOX1T, P _{NEO} , CAT Y 5'-UTR-AOX1 B) UTILIZADO PARA HIS4.	28
FIGURA 13. PROGRAMA DE TEMPERATURA (°C) Y TIEMPO (MINUTOS) UTILIZADO PARA AMPLIFICAR LA SECUENCIA DEL ENSAMBLE P _{GAP} -ROPSP6-AOX1T.....	34
FIGURA 14. MAPA DE LA CONSTRUCCIÓN P _{GAP} -ROPSP6-GUS.....	38
FIGURA 15. SITIO DE RECONOCIMIENTO DE LA ENZIMA DEL TIPO IIS PAQCI.	40
FIGURA 16. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE P. PASTORIS. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-5 EXTRACCIONES DE DNA GENÓMICO DE P. PASTORIS.....	41
FIGURA 17. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO. A. P _{GAPZAA} . B. P _{PICZAA} . CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2 Y 3 DNA PLASMÍDICO.....	42
FIGURA 18. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA LINEALIZACIÓN DEL VECTOR P _{GAPZAA} CON ECORI. A. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN IN SILICO. B. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO LINEALIZADO. CARRIL 3. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR.....	42
FIGURA 19. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA LINEALIZACIÓN DEL VECTOR P _{PICZAA} CON ECORI. A. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN IN SILICO. B. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRIL 3. DNA PLASMÍDICO LINEALIZADO.....	43
FIGURA 20. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DEL DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO. A. P _{SUP2021} . CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-4 DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO. B. P _{MPJAS01} . CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-6 DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.	43
FIGURA 21. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA LINEALIZACIÓN DEL VECTOR P _{MPJAS01} CON LA ENZIMA HINDIII. A. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN IN SILICO. B. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRIL 3. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.....	44
FIGURA 22. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN A MEDIANA ESCALA DE PBI121 Y DE SU ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN. A. MIDIPREP DEL VECTOR PBI121. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2 -3 DNA EXTRAÍDO. B. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN IN SILICO CON LA ENZIMA ECORI. C. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN IN VITRO. CARRIL 1.	

GENERULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO. CARRIL 3. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR.....	45
FIGURA 23. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO. A. PUC57-KAN-SP6-5'. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-7. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO. B. PUC57-AMP-SP6-3'. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-6. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.....	46
FIGURA 24. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8 % DEL ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS ECORI Y HINDIII DE: PUC57-KAN-SP6-5'. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRILES 3-4. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	46
FIGURA 25. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8 % DEL ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS ECORI Y HINDIII DE: PUC57-AMP-SP6-3'. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRILES 3-4. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	47
FIGURA 26. ESQUEMA DE LA CONSTRUCCIÓN DE PUC57-KAN-SP6 MEDIANTE PAF.	48
FIGURA 27. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE PUC57-KAN-SP6. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. PUC57-KAN-SP6-5'. CARRILES 3-9. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.....	49
FIGURA 28. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8 % DEL ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS ECORV Y BAMHII DE LA COLONIA 4. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRIL 3. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	50
FIGURA 29. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LAS AMPLIFICACIONES. A. CARRIL 1. MARCADOR DE TAMAÑO MOLECULAR. CARRIL 2. CYC1T-ORI. CARRIL 3. P _{GAP} . CARRIL 4. AOX1T. CARRIL 5. HIS4. CARRIL 6. P _{NEO} . B. CARRIL 1. MARCADOR DE TAMAÑO MOLECULAR. CARRIL 2. CAT. CARRIL 3. 5'-UTR-AOX1. CARRIL 4. ropSP6.	51
FIGURA 30. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA RESTRICCIÓN DEL DNA DE λ CON PAQCI. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA DE λ RESTRINGIDO.	54
FIGURA 31. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8%. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA DE λ RESTRINGIDO CON HINDIII. CARRIL 3. DNA DE λ . RELIGADO.....	55
FIGURA 32. ENSAMBLE DE LAS SECUENCIAS P _{NEO} , CAT Y 5'-UTR-AOX1. A. ESQUEMA DE ENSAMBLE DE LOS FRAGMENTOS. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE B. PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. P _{NEO} . CARRIL 3. CAT. CARRIL 4. 5'-UTR-AOX1. B. ENSAMBLE. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. P _{NEO} -CAT-5'-UTR-AOX1	56
FIGURA 33. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LOS ENSAMBLES PARCIALES. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. A. CARRIL 2. CYC1T-P _{GAP} . CARRIL 3. P _{GAP} -ropSP6. B. CARRIL 2. ropSP6-AOX1T. CARRIL 3. HIS4-P _{NEO} . C. CARRIL 2. AOX1T-HIS4. D. CARRIL 2. 5'-UTR-CYC1T-ORI.....	57
FIGURA 34. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE AMPLIFICACIONES DE LOS ENSAMBLES PARCIALES. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. A. CARRILES 2-4. CYC1T-P _{GAP} . B. CARRILES 2-4. P _{GAP} -ropSP6. C. CARRILES 2-3 ropSP6-AOX1T. CARRIL 4. HIS4-P _{NEO} . D. CARRILES 2-4. AOX1T-HIS4.....	59
FIGURA 35. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE pJET-CYC1T-ORI. A. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-12. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO. B. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-7. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.	60
FIGURA 36. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE: A. AMPLIFICACIÓN DE CYC1T-ORI. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-5. AMPLIFICACIÓN.	

B. ANÁLISIS IN SILICO DE LA VERIFICACIÓN DE LA ORIENTACIÓN CON LAS ENZIMAS EcoRV Y PstI.	
C. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRILES 3-5. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	61
FIGURA 37. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE PBKS-P _{GAP} . A. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. PBKS. CARRILES 3-6. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO. B. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. PBKS. CARRILES 3-6. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.	62
FIGURA 38. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA RESTRICCIÓN DEL VECTOR PBKS-P _{GAP} CON LAS ENZIMAS NOTI Y HINDIII. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRILES 3-7. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	62
FIGURA 39. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA RESTRICCIÓN DEL VECTOR PBKS-P _{GAP} CON LA ENZIMA XHOI. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRILES 3-5. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	63
FIGURA 40. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE PJET- AOX1T. A. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-12. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO. B. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-6. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.	63
FIGURA 41. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA RESTRICCIÓN DEL VECTOR PJET- AOX1T CON LA ENZIMA BGLII. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRILES 3-8. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	64
FIGURA 42. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA RESTRICCIÓN DEL VECTOR PJET- AOX1T CON LA ENZIMA NOTI. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRIL 3. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	64
FIGURA 43. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8 % DEL DNA EXTRAÍDO DE: A. PJET-HIS4. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRILES 2-9. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO. B. PJET-P _{NEO} -CAT-5'-UTR. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRILES 2-9. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.	65
FIGURA 44. ESQUEMA DEL ENSAMBLE DE PGAP, ropSP6 Y AOX1T Y SU CLONACIÓN EN PJET1.2/BLUNT.	66
FIGURA 45. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE: A. ENSAMBLE DE P _{GAP} -ropSP6-AOX1T. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. ENSAMBLE. B. AMPLIFICACIÓN DEL ENSAMBLE. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. AMPLIFICACIÓN.	67
FIGURA 46. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE PJET- P _{GAP} -ropSP6-AOX1T. A. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRILES 2-13. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO. B. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRILES 2-8. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.	68
FIGURA 47. ESQUEMA DE ENSAMBLE DEL VECTOR PJET-CYC1T-ORI-GUS.	69
FIGURA 48. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LAS RESTRICCIONES DE LOS VECTORES PJET-CYC1T-ORI Y PBI121. A. ANÁLISIS IN SILICO. B. RESTRICCIÓN DE PJET-CYC1T-ORI CON LAS ENZIMAS SACI Y XHOI RELLENADO. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO. C. RESTRICCIÓN DE PBI121 CON LAS ENZIMAS SACI Y SCAI. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	70
FIGURA 49. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE PJET-CYC1T-ORI-GUS. CARRIL 1. GENE RULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. PJET-CYC1T-ORI. CARRILES 4-5. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.	71

FIGURA 50. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA VERIFICACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN pJET-CYC1T-ORI-GUS. A. ANÁLISIS IN SILICO. CARRIL 1. LINEALIZACIÓN CON SACI. CARRIL 2. RESTRICCIÓN CON SMAI Y SACI. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENERULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2 Y 5. DNA SIN RESTRINGIR. CARRILES 3 Y 6. LINEALIZACIÓN CON SACI. CARRILES 4 Y 7. RESTRICCIÓN CON SMAI Y SACI.	71
FIGURA 51. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO DE pJET-CYC1TORI-GUS. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRIL 2. pJET-CYC1T-ORI-GUSGUS. CARRILES 3-8. DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO.	72
FIGURA 52. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA VERIFICACIÓN DE LA CLONACIÓN DE P _{GAP} -ropSP6-AOX1T EN pJET. A. LINEALIZACIÓN CON XBAI Y LIBERACIÓN DE BANDA CON SWAI. A.1 ANÁLISIS IN SILICO. A.2 ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENERULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. LINEALIZACIÓN. CARRIL 3. LIBERACIÓN. CARRIL 4. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. B. VERIFICACIÓN DE LA ORIENTACIÓN CON NCOI. B.1 ANÁLISIS IN SILICO. B.2 ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENERULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRILES 2-4 DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO. CARRIL 5. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR.	73
FIGURA 53. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA VERIFICACIÓN DE LA CLONACIÓN DE HIS4 EN pJET. A. LINEALIZACIÓN CON SALI Y LIBERACIÓN DE BANDA CON SWAI. A.1 ANÁLISIS IN SILICO. A.2. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENERULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRIL 3. LINEALIZACIÓN. A.3. CARRIL 1. GENERULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. LIBERACIÓN DE BANDA. CARRIL 3. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. B. VERIFICACIÓN DE LA ORIENTACIÓN CON BSAI. B.1 ANÁLISIS IN SILICO. B.2 ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. GENERULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRIL 3. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	74
FIGURA 54. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA VERIFICACIÓN DE LA CLONACIÓN DE P _{NEO} -CAT-5'-UTR EN pJET. A. LINEALIZACIÓN CON BAMHI Y LIBERACIÓN DE BANDA CON SWAI. A.1 ANÁLISIS IN SILICO. A.2. ANÁLISIS IN VITRO CARRIL 1. GENERULER 1 KB PLUS DNA LADDER. CARRIL 2. LINEALIZACIÓN. CARRIL 3. LIBERACIÓN DE BANDA. B. VERIFICACIÓN DE LA ORIENTACIÓN CON HINDIII. B.1 ANÁLISIS IN SILICO. B.2 ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRIL 2. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR. CARRILES 3-8. DNA PLASMÍDICO RESTRINGIDO.	75
FIGURA 55. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA AL 0.8% DE LA VERIFICACIÓN DE LA CLONACIÓN DE GUS EN pJET-CYC1T-ORI. A. ANÁLISIS IN SILICO DE LINEALIZACIÓN CON SMAI Y LIBERACIÓN DE BANDA CON XBAI. B. ANÁLISIS IN VITRO. CARRIL 1. 1 KB DNA LADDER. CARRIL 2. LINEALIZACIÓN. CARRIL 3. LIBERACIÓN DE BANDA. CARRIL 4. DNA PLASMÍDICO SIN RESTRINGIR.	76
FIGURA 56. ESQUEMA DE ENSAMBLE DE pGAP-ropSP6-GUS.	78

Resumen

Las levaduras son sistemas de expresión muy utilizados en la producción de proteínas recombinantes de interés, sin embargo, están sujetas al control genético del organismo, la mayoría de los genes en las levaduras tienen tasas de transcripción de entre 2 y 30 mRNA por hora, y menos del 1% de los genes tienen más de una molécula de RNA polimerasa por gen.

Por otra parte, los virus tienen mecanismos de transcripción poco regulados y RNA polimerasas con especificidad alta en el reconocimiento del promotor y actividad transcripcional alta, como la del bacteriófago SP6, debido a lo anterior es muy utilizada en transcripción *in vitro*.

La RNA polimerasa de SP6 es una polimerasa dependiente de DNA, está conformada por un péptido de 874 aminoácidos, un peso molecular de 98.53 kDa, una unidad de esta polimerasa cataliza la incorporación de nucleótidos a razón de 1 nmol/h, mientras que el error en la incorporación de nucleótidos es de 1.34×10^{-4} por nucleótido copiado.

Hasta el momento no hay estudios publicados de la construcción de algún sistema que involucre la expresión funcional de la RNA polimerasa de SP6 en un organismo eucariota, pero sí hay reportes de la utilización de la RNA polimerasa del fago T7.

En este trabajo, como prueba de concepto, se estudiará la expresión y funcionalidad de la RNA polimerasa de SP6 en *Pichia pastoris*, la levadura más utilizada como sistema de expresión, al transcribir un gen de interés bajo el promotor de SP6, de esta manera se espera aislar al gen de la regulación del fondo genético.

Abstract

Yeasts are a widely used expression system to produce recombinant proteins of interest. However, they are subject to the genetic control of the organism. Most genes in yeasts have transcription rates between 2 and 30 mRNA per hour, and less than 1% of genes have more than one RNA polymerase molecule per gene.

On the other hand, viruses have poorly regulated transcription mechanisms and RNA polymerases with high specificity in promoter recognition and high transcriptional activity, as the bacteriophage SP6, which is widely used in *in vitro* transcription.

The RNA polymerase of SP6 is a DNA-dependent polymerase, it consists of a single chain of 874 amino acids and has a molecular weight of 98.53 kDa. One unit of this polymerase catalyzes the incorporation of nucleotides at a rate of 1 nmol/h, while the error in the incorporation of nucleotides is 1.34×10^{-4} .

To date, there are no published studies on the construction of a system involving the functional expression of SP6 RNA polymerase in a eukaryotic organism, but there are reports on the use of phage T7 RNA polymerase.

In this work, we will investigate the expression and functionality of SP6 RNA polymerase in *Pichia pastoris*, the yeast commonly used as an expression system, by transcribing a gene of interest under the SP6 promoter and thereby hopefully isolating the gene from regulation by genetic background.

Introducción

El término expresión génica se refiere al proceso por el que la información genética es decodificada para producir proteínas. El proceso comienza cuando la información de una secuencia de DNA es copiada en una molécula de RNA, este proceso es conocido como transcripción.

La transcripción es el mecanismo donde una enzima, llamada RNA polimerasa, utiliza una cadena de DNA como molde para producir una cadena de ribonucleótidos complementaria denominada RNA mensajero (mRNA), este paso es fundamental en la expresión génica.

En el caso de las células procariotas, el proceso de la transcripción se efectúa en el citoplasma, mientras que en las eucariotas es en el núcleo. Las fases que componen este mecanismo son: preiniciación, iniciación, elongación y terminación, en cada una de éstas participan complejos de proteínas que son ensamblados y desensamblados conforme avanza el proceso (Hartl, 2009).

Sin embargo, al ser un paso crítico en la expresión génica, la transcripción está regulada por diversos mecanismos que controlan el flujo de información, la mayoría de ellos actúan en el período previo al proceso donde las señales y moléculas deben unirse para ensamblar los complejos de preiniciación.

RNA polimerasas

Las RNA polimerasas se encuentran en todos los organismos: procariontes, eucariontes, arqueas y virus, y aunque algunos de estos tienen más de un tipo de polimerasa, todas presentan una estructura similar. Dicha estructura da una forma similar de “mano derecha ahuecada”, donde los dominios están representados por los dedos, la palma y el dedo pulgar (Delarue et al., 1990). El dominio representado por la palma es el sitio catalítico y el más conservado en los diferentes tipos de polimerasas, mientras que los dedos y el pulgar varían significativamente en relación con su función.

El mecanismo general por el que se efectúa este proceso es:

1. Unión al molde, secuencias iniciadoras (cebadores) y los ribonucleótidos trifosfatos.
2. Incorporación del nucleósido monofosfato en la cadena nascente de RNA.
3. Liberación del pirofosfato.
4. Traslocación a lo largo del molde.

Las RNA polimerasas interactúan con distintas proteínas para llevar a cabo su función, las ayudan a: reconocer las secuencias promotoras dentro del material genético, sintetizar los cebadores, mejorar la especificidad de unión al molde, desenrollar la estructura de doble hélice del DNA y modular su actividad enzimática según los requerimientos de la célula, entre otras. También requieren de un ion metálico divalente (generalmente Mg^{2+} o Mn^{2+}) (Parker, 2006). Todas las funciones las lleva a cabo gracias a su estructura terciaria y cuaternaria, ya que en algunas especies la RNA polimerasa está conformada por diferentes subunidades. Algunas de estas subunidades aisladas son catalíticamente activas y otras sólo cuando se encuentran ensambladas el complejo de transcripción.

Los organismos procariontes sólo tienen un tipo de RNA polimerasa que cataliza todos los tipos de RNA necesarios para la célula, está formada por cinco subunidades: dos α , β , β' y ω , para llevar a cabo la función de la enzima se asocia el factor σ . La subunidad α tiene la función del ensamble de la RNA polimerasa, mientras que las de β y β' es formar el sitio catalítico, por otra parte, la función específica de ω no se ha estudiado y finalmente la unión transitoria del factor σ a la enzima ayuda al reconocimiento del promotor (Sutherland & Murakami, 2018).

Las arqueas, siendo organismos procariontes, sólo tienen una RNA polimerasa. Sin embargo, ésta es homóloga a la RNA polimerasa II de eucariontes y está conformada por 12 subunidades (Fig.1), las cuales han sido designadas con letras y se dividen en tres grupos de acuerdo con la función a la que están asociadas: catálisis (A'/A", B'/B" o B), ensamble (L, N, D y P) y funciones auxiliares (F, E, H y K) (Werner, 2007).

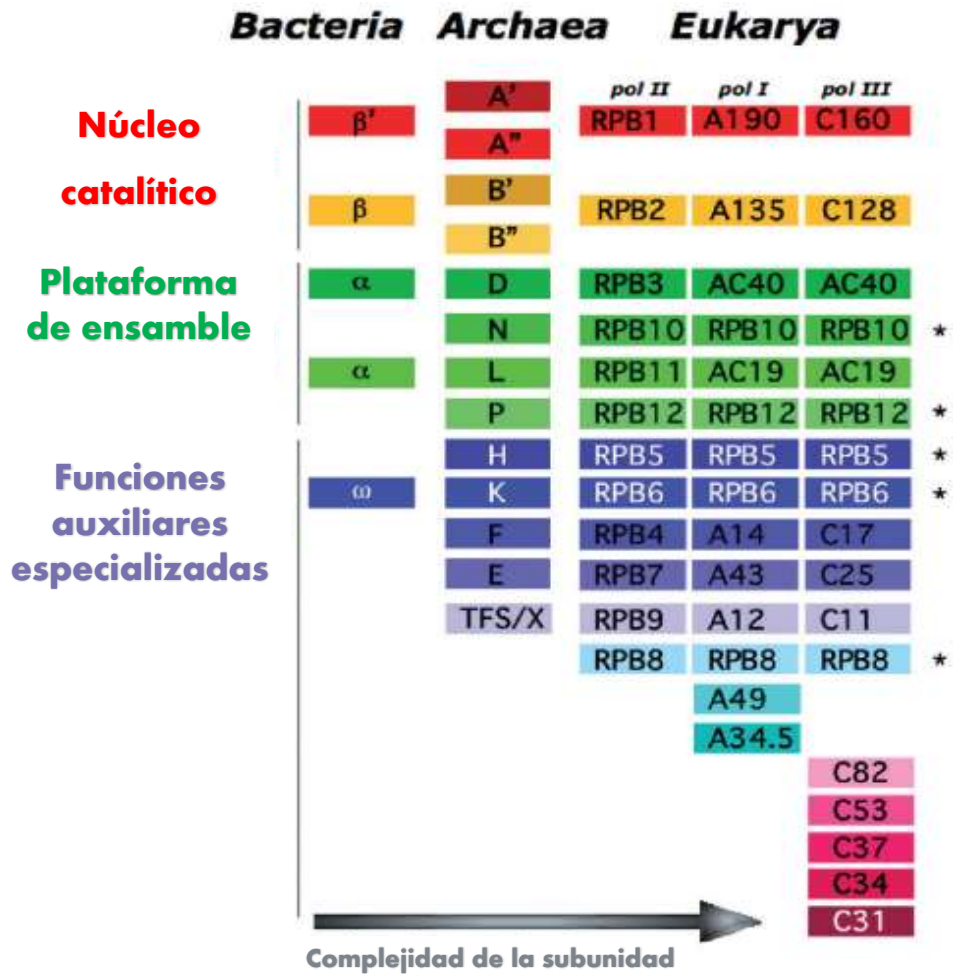


Figura 1. Comparación de las RNA polimerasas de acuerdo con sus subunidades. Tomada de Werner (2007).

RNA polimerasas en eucariontes.

En eucariontes hay tres tipos de RNA polimerasa de acuerdo con el tipo de RNA por sintetizar (Fig. 2): RNA polimerasa I que participa en la transcripción de RNA ribosómico (rRNA); RNA polimerasa II transcribe RNA mensajero (mRNA), microRNAs (miRNAs), RNA nuclear pequeño (snRNA) y RNA nucleolares (snoRNAs); y finalmente la RNA polimerasa III: transcribe los RNA de transferencia (tRNA) y el rRNA 5S (Drouin & Carter, 2010).

Estas RNA polimerasas están compuestas por 14, 12 y 17 subunidades respectivamente, de las que 10 corresponden la estructura de un núcleo conservado, mientras que las demás les dan las características necesarias para llevar a cabo sus funciones.

La RNA polimerasa II es la más estudiada, ya que tiene la función de producir los RNA mensajeros que posteriormente se traducen en proteínas. Esta RNA polimerasa al efectuar su actividad sobre un gran conjunto de genes regulados debe tener la capacidad de interactuar con una serie de factores que se acoplan durante la iniciación o elongación del transcrito (Cramer et al., 2008).

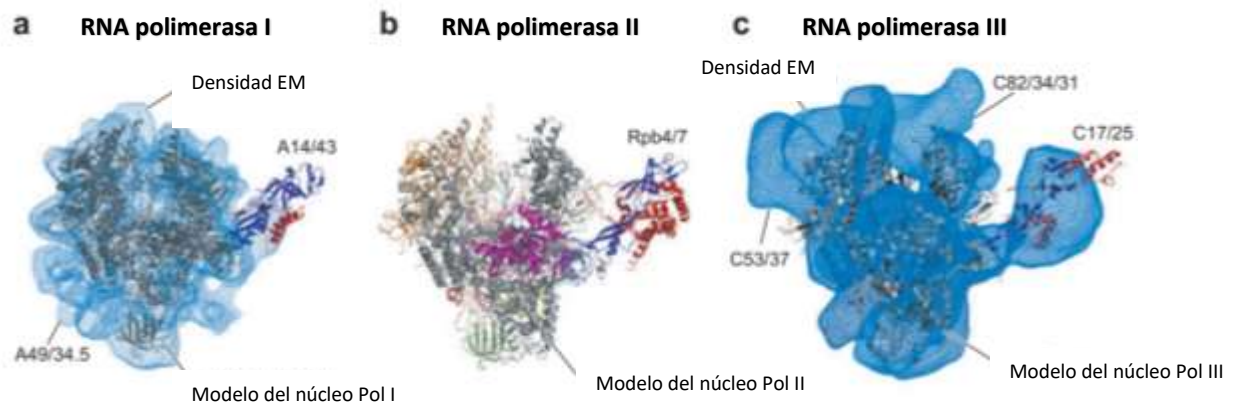


Figura 2. Estructuras de las RNA polimerasas en eucariontes. a. RNA polimerasa I, b. RNA polimerasa II y c. RNA polimerasa III. Tomada de Cramer et al; 2008

Transcripción en eucariontes

En las células eucariotas, de manera general, la transcripción inicia con la formación del complejo de preiniciación en el promotor del gen, dicha formación está mediada por la proteína de unión a la caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés). Este complejo está compuesto por factores específicos de transcripción (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH), coactivadores y el complejo de RNA polimerasa (Fig. 3).

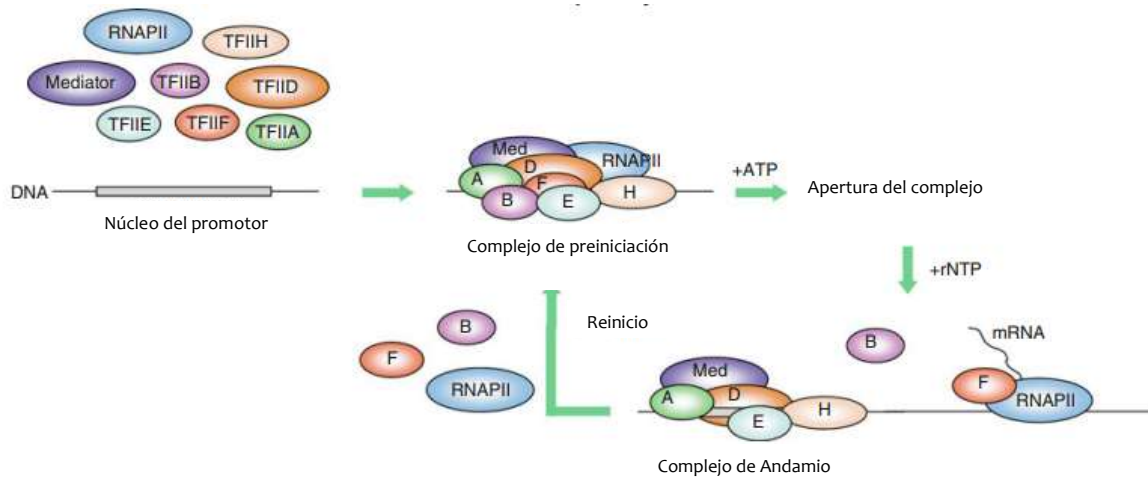


Figura 3. Inicio de la transcripción en eucariotes. Tomada de Kokubo T. (2013).

El complejo es estimulado cuando un activador se une al promotor, que sufrió un cambio de estructura permitiéndole el reconocimiento de la región, causando que TBP se una al promotor, dicha unión hace que el TFIIB se ponga en contacto con el DNA y que su dominio N-terminal se extienda hasta el sitio de inicio de la transcripción, dándole soporte a la RNA polimerasa. TFIIE se une al complejo y recluta a TFIIH que tiene actividad de helicasa, lo que provoca que se desestabilice la cadena doble de DNA formando una burbuja. Esta región es estabilizada por TFIIIF, que a su vez estimula a la RNA polimerasa a seguir la elongación. Si la transcripción avanza más de seis bases, TFIIB es desplazado y la RNA polimerasa escapa del promotor transcribiendo el resto del gen (Levy et al., 2000). La terminación ocurre por diferentes procesos, se puede detener usando un factor de terminación, a través de un mecanismo similar al de terminación dependiente de rho en bacterias. O bien al transcribir una secuencia de terminación que incluye un tramo de poliuracilo, sin embargo, este mecanismo de terminación de la transcripción necesita de la unión de un complejo que se asocia a la polimerasa, desestabilizando su unión a la cadena de DNA. Al mismo tiempo, el RNA naciente es sometido a diferentes procesos de maduración, los cuales pueden ser: el corte de intrones y empalme de exones, la adición de un 7-metilguanilato en el extremo 5' y la poliadenilación en el extremo 3'.

Regulación de la transcripción en eucariontes.

En los organismos se “prenden y apagan” los genes dependiendo de las necesidades que vayan surgiendo, como adaptarse al medio, requerimientos nutricionales, etc. El control de todo este proceso de manera general se lleva a cabo en la transcripción, gracias a numerosos factores reguladores que se pueden clasificar en dos tipos: elementos reguladores *cis* y *trans*.

Los elementos del tipo *cis* son secuencias de DNA no codificante que regulan la expresión de genes, como los promotores que se encuentran cerca del sitio de inicio de la transcripción y que en su secuencia tienen los elementos necesarios para el reclutamiento de todo el instrumental necesario para el inicio de ésta. Sin embargo, también puede existir regulación de secuencias alejadas al sitio de inicio de la transcripción, como el caso de los potenciadores (enhancers, en inglés) y silenciadores, cuya actividad no se ve afectada por la distancia u orientación con respecto al promotor (Narlikar & Ovcharenko, 2009).

Por ejemplo, los genes que son transcritos por la RNA polimerasa II necesitan tener dos elementos centrales en el promotor: la caja TATA y la secuencia Inr, que son sitios de unión para factores de transcripción, además podemos encontrar algunas otras secuencias río arriba cercanas a las cajas TATA que funcionan para estimular la transcripción como la cajas CG y CCAAT (Cooper, 2000).

Mientras que los elementos *trans*, son proteínas que interactúan con los elementos *cis* para llevar a cabo la regulación. Estas proteínas, llamadas factores de transcripción (TF por sus siglas en inglés), tienen diferentes dominios funcionales como de unión a DNA, de interacción entre proteínas, señales de tráfico intracelular, de unión a ligando o una combinación de estos. De manera que esos factores regulan procesos como el reclutamiento de las RNA polimerasas, la metilación del DNA, modificaciones químicas y desplazamiento del nucleosoma, entre otras.

Los factores de transcripción se pueden dividir en tres clases de acuerdo con el tipo de dominio de unión al DNA que contienen:

1. Zinc estabilizado (Zn^{+2}), es el dominio más abundante en todos los organismos y se puede subdividir en dedos de zinc C2H2, C6 (nudillos de zinc o clúster binuclear de zinc), y C4 o dedos de GATA.
2. Tipo cremallera, es el segundo dominio más abundante y está caracterizado por un dominio de dimerización y una región básica. Se subdividen en proteínas bZIP (también llamadas cremalleras de leucina), cuyo dominio de dimerización consiste en repetidos de leucina, y proteínas bHLH, que tiene hélices α anfipáticas emparejadas, separadas por un bucle de longitud variable seguida de una región básica.
3. Hélice-Giro-Hélice (HTH, por sus siglas en inglés), este factor está estrechamente relacionado con el homeodominio que es represor o activador en procariontes (Barbay, 2019).

Para activar o reprimir la transcripción, los TFs pueden reclutar el complejo de iniciación de la transcripción, evitar o fortalecer la unión de la RNA polimerasa al promotor, reclutar otros complejos que activan o reprimen la transcripción y catalizan o reclutan enzimas para hacer la modificación de las histonas (Narlikar & Ovcharenko, 2009).

RNA polimerasas virales.

En los virus, el tipo de RNA polimerasa se basa en el tipo de genoma y necesidades específicas, por lo que existen RNA polimerasas dependientes de DNA o de RNA. Además, de tener los dominios representados por los dedos, palma y pulgar, a veces contienen otros cuyas funciones están relacionadas con otros aspectos de la transcripción de su genoma (Lambris, 2012).

Las enzimas virales presentan ventajas como que sintetizan transcritos al menos el doble de rápido que las enzimas del hospedero y no necesitan cofactores proteicos adicionales para reconocer el promotor. Esta última es de gran importancia, ya que las RNA polimerasas de origen eucarionte y procarionte, aunque son multiméricas, necesitan de varias proteínas para poder reconocer el sitio apropiado para llevar a cabo

su función, por ejemplo, en las procariontas hay una variedad de factores σ que son reguladas por diferentes eventos como respuesta a estrés, diferenciación, movilidad y formación de esporas.

RNA polimerasas dependientes de DNA

Los virus de DNA, como lo indica su nombre, tienen DNA como material genético, generalmente de doble cadena (dsDNA) y algunos de una cadena (ssDNA). Estos virus utilizan polimerasas dependientes de DNA para replicar su material genético.

Las RNA polimerasas dependientes de DNA de bacteriófagos pueden tener de 1 a 15 subunidades para llevar a cabo su función dentro del procarionte, los fagos que tienen una enzima con una subunidad pequeña utilizan tanto su enzima como la del hospedero (Choi, 1989).

Ejemplos de virus que utilicen RNA polimerasas dependientes de DNA son los bacteriófagos T7, T3 y SP6, las cuales son fáciles de sobreexpresar en *Escherichia coli*. Esto, aunado a las ventajas presentadas anteriormente, hacen que estas polimerasas sean utilizadas ampliamente como herramientas en la transcripción *in vitro* (Kane, 2013).

RNA polimerasa de SP6

El bacteriófago SP6 es un fago de DNA de doble cadena que infecta a *Salmonella entérica* serovar Typhimurium LT2. Morfológicamente es parecido a T7, sin embargo, parece genéticamente distinto debido a que en su extremo derecho del genoma tiene aproximadamente 5 kb que no están presentes en otros miembros del grupo de T7 y, aunque contiene genes homólogos a los de T7, parece que estos sufrieron una reorganización inusual (Kassavetis et al., 1982). Después de la infección de SP6, una de las primeras proteínas en ser inducida es la RNA polimerasa. Ésta es dependiente de DNA, de un solo péptido de 874 aminoácidos, un peso molecular de 98.53 kDa, requiere de un ion de Mg^{2+} y tiene especificidad

alta en el reconocimiento de su promotor de 19 pares de bases dando como resultado una actividad transcripcional alta.

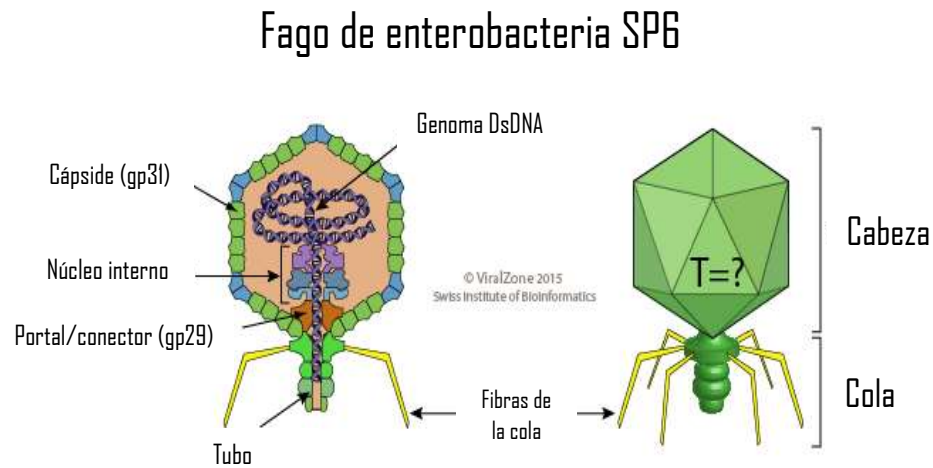


Figura 4. Estructura del bacteriófago SP6. Tomada de ViralZone.

En su secuencia de aminoácidos, el programa PFAM puede identificar dos dominios: uno del aminoácido 7 al 298, que corresponde a dominio N-terminal y está implicado en la interacción con las regiones del promotor del DNA y la cadena de RNA naciente (marcada en color rojo en la Figura 5) y otro del aminoácido 443 al 874 que corresponde al dominio de RNA_pol, que es el relacionado con la polimerización de los ribonucleótidos complementarios a la secuencia del DNA molde (secuencia en color azul en la Fig. 5).

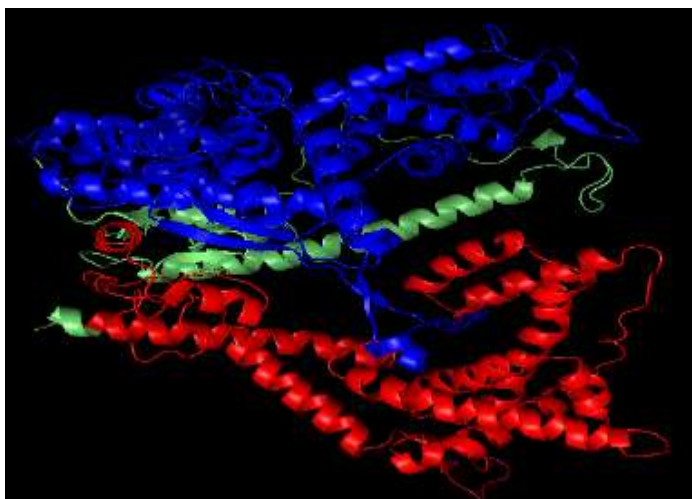


Figura 5. Modelamiento por homología en Swiss Model de RNA polimerasa de SP6.

La actividad óptima de esta enzima es en Tris·HCl a pH 7.5, además, es inhibida en baja concentración de sales, mientras que no se inactiva irreversiblemente a alta concentración y se puede almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a concentración menor a $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ en glicerol al 50% por un año sin perder actividad (Butler & Chamberlins, 1982).

Una unidad de polimerasa cataliza la incorporación de nucleótidos a razón de 1 nmol/h , esta tasa es proporcional al número de unidades utilizadas, mientras que el error en la incorporación de nucleótidos es de 1.34×10^{-4} por nucleótido copiado o 1.48 incorporaciones erróneas por una molécula de RNA sintetizado de aproximadamente 11,000 nt (Pugachev et al., 2004).

Pichia pastoris para producción de proteínas.

Las levaduras, como herramienta de producción de proteínas heterólogas, comenzaron a ser utilizadas alrededor de los años 80 del siglo pasado, son los organismos adecuados para la producción de proteínas porque combinan la habilidad de hacer modificaciones postraduccionales, como eucariontes que son, con la facilidad de la manipulación genética y el crecimiento rápido de los procariontes.

Aunque en un principio la primera levadura utilizada como sistema de expresión fue *Saccharomyces cerevisiae* se tuvieron problemas como la inestabilidad

plasmídica, bajo rendimiento en la producción y la hiperglicosilación, lo que llevó a explorar otras posibilidades (Fickers, 2014).

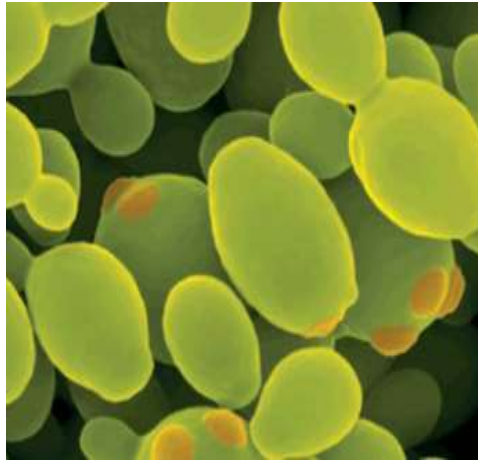


Figura 6. *Pichia pastoris*. Tomada de iGEM Georgia State University.

Una de éstas es *P.pastoris*, que es una levadura metilotrófica, es decir que puede metabolizar el metanol como fuente de carbono. Actualmente, es muy utilizada debido a que se obtiene una concentración celular alta en medios no complejos, tiene promotores fuertes como el del gen de la alcohol oxidasa 1 (P_{APX1}) o el del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (P_{GAP}), por lo que *P. pastoris* supera de 10 a 100 veces la producción de proteínas heterólogas a comparación de *S. cerevisiae*. También secreta pocas proteínas endógenas al medio, de tal manera que las proteínas heterólogas secretadas se encuentran parcialmente puras haciendo más sencilla la purificación de éstas, finalmente, es un sistema probado y aceptado por agencias reguladoras, como la FDA, ya que las proteínas que produce no están contaminadas con endotoxinas.

Por todo esto, se han producido en *P.pastoris* gran variedad de proteínas, desde xilanasas, proteasas, lipasas, amilasas, hasta proteínas de interés médico como citoquinas, inhibidores de coagulación, precursores de la insulina y fragmento C de la toxina tetánica, entre otros (Serrano-Rivero et al., 2016).

Sin embargo, los promotores para expresar proteínas en este organismo están fuertemente regulados y el rendimiento final de éstas depende estrechamente de los

pasos individuales de la expresión génica (transcripción y traducción), ya que están involucrados muchos mecanismos reguladores.

P. pastoris GS115

Las cepas de expresión generadas de *P. pastoris*, son derivadas de la tipo silvestre NRR-Y11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL, USA).

Cepa	Genotipo	Fenotipo	Características
Y-11430	Silvestre	Silvestre	Consumo de metanol alto
X-33	Silvestre	Silvestre	Consumo de metanol alto
GS115	<i>his4</i>	Mut ⁺ ,His ⁻	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina
KM71	<i>his4, arg4, aox1::ARG4</i>	Mut ⁺ ,His ⁻	Consumo de metanol bajo, auxótrofa a histidina
MC100-3	<i>his4, arg4, aox1::SARG4, aox2::PHIS4</i>	Mut ⁺ ,His ⁻	Incapaz de consumir el metanol, auxótrofa a histidina
SMD1168	<i>pep4, his4</i>	Mut ⁺ His ⁻ deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa A
SMD1165	<i>prb1, his4</i>	Mut ⁺ His ⁻ deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa B
SMD1163	<i>pep4, prb1, his4</i>	Mut ⁺ His ⁻ deficiente en proteasas	Consumo de metanol alto, auxótrofa a histidina, no produce proteinasa A, proteinasa B, ni carboxipeptidasa Y

Figura 7. Cepas de *Pichia pastoris*. Tomada de *Pichia pastoris: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas*.

La cepa más utilizada es la GS115, que tiene un genoma de 9.43 Mpb, es Mut⁺, lo que significa que puede utilizar el metanol como fuente de carbono obteniéndose una densidad celular alta y también tiene una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*), de tal manera que es auxótrofa para histidina, por lo que se puede utilizar como marcador de selección (De Schutter et al., 2009).

Gen *uidA* como reportero.

En el presente proyecto se eligió el gen *uidA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa, esta enzima en presencia del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Gluc) lleva a cabo una reacción donde se obtiene un precipitado azul intenso de dicloro-dibromo-índigo, lo que hace sencillo comprobar el sistema.

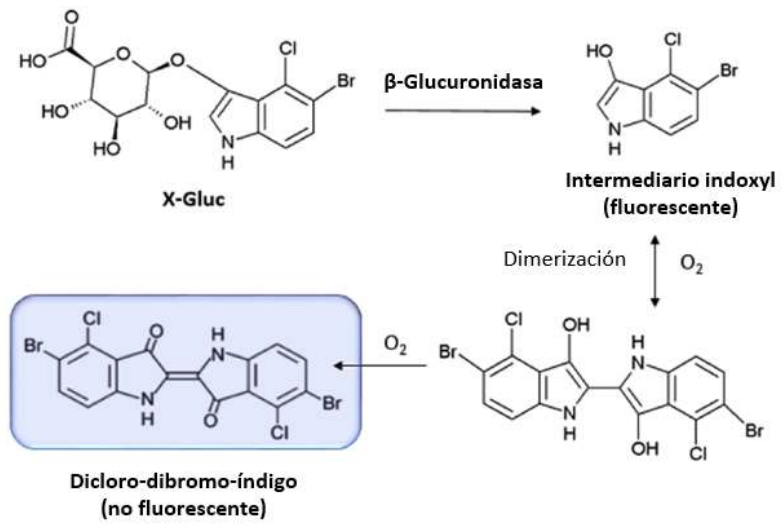


Figura 8. Reacción enzimática de la β-glucuronidasa con X-Gluc.

Antecedentes

Los bacteriófagos, también conocidos sólo como fagos, comenzaron a ser aislados a principios de los años 20 del siglo pasado de organismos como *Staphylococcus sp.* o *Shigella sp.*, actualmente sabemos que son las entidades biológicas más abundantes del planeta. Su estudio nos ha permitido establecer, mejorar y comprender las teorías básicas de la biología molecular, además de que son una fuente para el desarrollo de nuevas tecnologías en la ingeniería genética debido a sus componentes biológicos, estos han sido adaptados a la biología sintética como los elementos que actúan en el RNA. Uno de estos elementos que es importante resaltar son las RNA polimerasas, ya que no requieren de proteínas auxiliares para la iniciación de la transcripción y, además, han demostrado ser eficientes en la transcripción *in vitro* de genes de interés. Por ejemplo, la RNA polimerasa producida por el bacteriófago SP6, que es muy utilizada para la transcripción *in vitro* debido a que es altamente específica en el reconocimiento del promotor y tiene actividad transcripcional alta.

En 1988 Martin J. Tymms y Beth McInnes, demostraron la eficiencia alta de la RNA polimerasa de SP6 al expresar análogos del interferón α *in vitro*, donde utilizaron esta RNA polimerasa acoplada a un lisado de reticulocitos de conejo, y finalmente obtuvieron mayor producción de interferón que en el sistema utilizando sólo *Escherichia coli*. El estudio de esta polimerasa llevó a Hiroaki Sagawa y colaboradores a construir un sistema de expresión de dicha enzima en *E. coli* en 1995, en dicho estudio se desarrolló un sistema en células estrictamente controlado donde se inducía una expresión suficiente de RNA polimerasa.

La RNA polimerasa de SP6 es muy utilizada para la transcripción *in vitro* y hasta el momento no hay estudios publicados de la construcción de algún sistema que involucre a la RNA polimerasa de SP6 y un organismo eucariota, pero sí hay reportes de la utilización de la RNA polimerasa de T7.

En 1998, Elizabeth Wirtz y colaboradores, utilizaron un sistema de expresión basado en la RNA polimerasa de T7 en *Trypanosoma brucei*, donde como gen reportero utilizaron luciferasa y encontraron que la transcripción es vigorosa y procesiva en

moldes de la cromatina de este eucarionte inferior. En el 2004, Nguyen y colaboradores reportaron la utilización de la RNA polimerasa de T7 en plantas, donde demostraron que la enzima viral reconocía su promotor y era capaz de transcribir el gen *uidA*, además, al hacer un análisis comparativo de expresión encontraron que con la enzima de T7 obtuvieron una transcripción tres veces mayor que utilizando el promotor *rbcSa-3A* y era comparable a la obtenida utilizando CaMV 35S. También se ha reportado el uso de la RNA polimerasa de T7 en levaduras, como en la tesis doctoral de Inbal Vaknin presentada en 2016. En la que presentó dos sistemas en *S. cerevisiae*: en el primero sólo con múltiples copias de la polimerasa, mientras que en el segundo el gen se integró en el genoma, en ambos casos se confirmó la expresión y la actividad funcional.

Finalmente, en 2021 Yan Kun y colaboradores construyeron un sistema de expresión estable en *S. cerevisiae* basado en la RNA polimerasa de T7 y la viriporina de VIH-1, esta última para incrementar la permeabilidad de la membrana nuclear y que los transcritos producidos por la RNA polimerasa de T7 puedan salir del núcleo para poder ser traducidos eficientemente.

Justificación

Las levaduras son sistemas de expresión ampliamente utilizados, sin embargo, su transcripción está fuertemente regulada, la mayoría sus genes tienen tasas de transcripción de entre 2 y 30 mRNA por hora y menos del 1% tienen más de una molécula de RNA polimerasa por gen. Por lo que se busca hacer más eficiente este sistema con la RNA polimerasa bacteriófago SP6, que ha demostrado ser eficiente en la transcripción *in vitro* de genes de interés.

Objetivos

General

Expresar la RNA polimerasa funcional del bacteriófago SP6 en *Pichia pastoris* GS115 como prueba de concepto.

Específicos

- Diseñar y mandar a sintetizar el gen de la RNA polimerasa de SP6 y los iniciadores de los componentes necesarios para la construcción.
- Amplificar y clonar los elementos necesarios para construcción.
- Construcción del plásmido pGAP-ropSP6-GUS (P_{GAP} , ropSP6, AOX1T, HIS4, P_{neo} , cat, 5'-UTR-AOX1, P_{SP6} , uidA, CYC1T, ORI).
- Propagar el plásmido pGAP-ropSP6-GUS en *E.coli*.
- Transformar a *Pichia pastoris* GS115 mediante electroporación con el vector recombinante.
- Seleccionar las transformantes de *Pichia pastoris* que expresen la RNA polimerasa mediante la complementación del gen HIS4.
- Verificar la expresión de la RNA polimerasa del bacteriófago SP6 producida por *Pichia pastoris* y determinar la actividad de la RNA polimerasa mediante la actividad de la proteína GUS.

Hipótesis

Una cepa de *Pichia pastoris* que exprese constitutivamente la RNA polimerasa del bacteriófago SP6, aislará la expresión de un gen de interés (como el gen GUS) bajo el promotor de SP6 del control genético de la levadura, esto validará la prueba de concepto.

Materiales y métodos

Materiales biológicos.

1) Cepas.

Las cepas utilizadas para el desarrollo de este proyecto se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas en el desarrollo del proyecto.

Cepa	Genotipo	Procedencia	Referencia
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ [<i>mrr-shdRMS-mcrBC</i>] ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ[<i>ara-leu</i>] 7697 <i>galU galK</i> λ- <i>rpsL</i> [StrR] <i>endA1 nupG</i></i>	Colección del laboratorio 50	(Ferenc, 2017)
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Silvestre	Donada por Laboratorio 51 de la Dra. Maria Eugenia Hidalgo Lara	(Serrano-Rivero, Marrero-Domínguez, & Fando-Calzada, 2016)
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>his4</i>	Donada por Laboratorio 51 de la Dra. Maria Eugenia Hidalgo Lara	(Serrano-Rivero, Marrero-Domínguez, & Fando-Calzada, 2016)

2) Enzimas

Las enzimas empleadas en el desarrollo del proyecto se utilizaron como recomienda el proveedor y se recolectaron en la Tabla 2.

Tabla 2. Enzimas utilizadas en el desarrollo del proyecto.

Tipo de enzima	Nombre	Unidades (U/ μ l)	Proveedor	Temperatura óptima ($^{\circ}$ C)
Restricción Tipo IIs	BsaI	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	BamHI	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	Anza TM 38 ScaI	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo IIs	PaqCI	10	NEB	37
Restricción Tipo II	HindIII	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	Anza TM 22 SmaI	5	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	Anza TM 20 SacI	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	XhoI	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	NcoI	10	NEB	37
Restricción Tipo II	SwaI	10	NEB	37
Restricción Tipo II	XbaI	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	Anza TM 14 SalI	20	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	EcoRV	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	EcoRI	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	NotI	10	NEB	37
Restricción Tipo II	PstI	10	ThermoFisher	37
Restricción Tipo II	BglIII	10	ThermoFisher	37
DNA ligasa	DNA ligasa de T4	5	ThermoFisher	37
DNA Polimerasa	Phusion TM High-Fidelity DNA Polymerase	2	ThermoFisher	72

DNA polimerasa	Platinum PCR Super Mix High Fidelity	0.022	ThermoFisher	68
----------------	--------------------------------------	-------	--------------	----

3) Plásmidos, iniciadores y marcador de tamaño molecular.

Los vectores utilizados para la amplificación de los elementos necesarios para el ensamble de la construcción y su clonación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Plásmido	Marcador de selección (antibiótico)	Procedencia
pGAPZ α A	Zeocina (Zeo)	Donada por el laboratorio 51 de la Dra. Maria Eugenia Hidalgo Lara
pPICZ α A	Zeocina (Zeo)	Donada por el laboratorio 51 de la Dra. Maria Eugenia Hidalgo Lara
pBI121	Kanamicina (Km ₅₀)	Donado por la Dra. Nayelli Marsch Martínez
pSUP2021	Cloranfenicol (Cm ₅₀)	Colección del laboratorio 50
pMPJAS01	Cloranfenicol (Cm ₅₀)	Donado por el laboratorio 19 del Dr. Fermín Pérez Guevara
pUC57-Kan-SP6-5'	Kanamicina (Km ₅₀)	Sintetizado en Synbio Technologies
pUC57-Amp-SP6-3'	Ampicilina (Ap ₁₀₀)	Sintetizado en Synbio Technologies
pJET1.2/Blunt	Ampicilina (Ap ₁₀₀)	ThermoFisher
pBluescript II KS (+)	Ampicilina (Ap ₁₀₀)	Donado por el laboratorio 48 del Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

En este proyecto se utilizaron dos marcadores de tamaño molecular, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermoscientific) y 1 kb DNA Ladder (NEB), cuyo patrón de bandeado se muestra en la Figura 9.

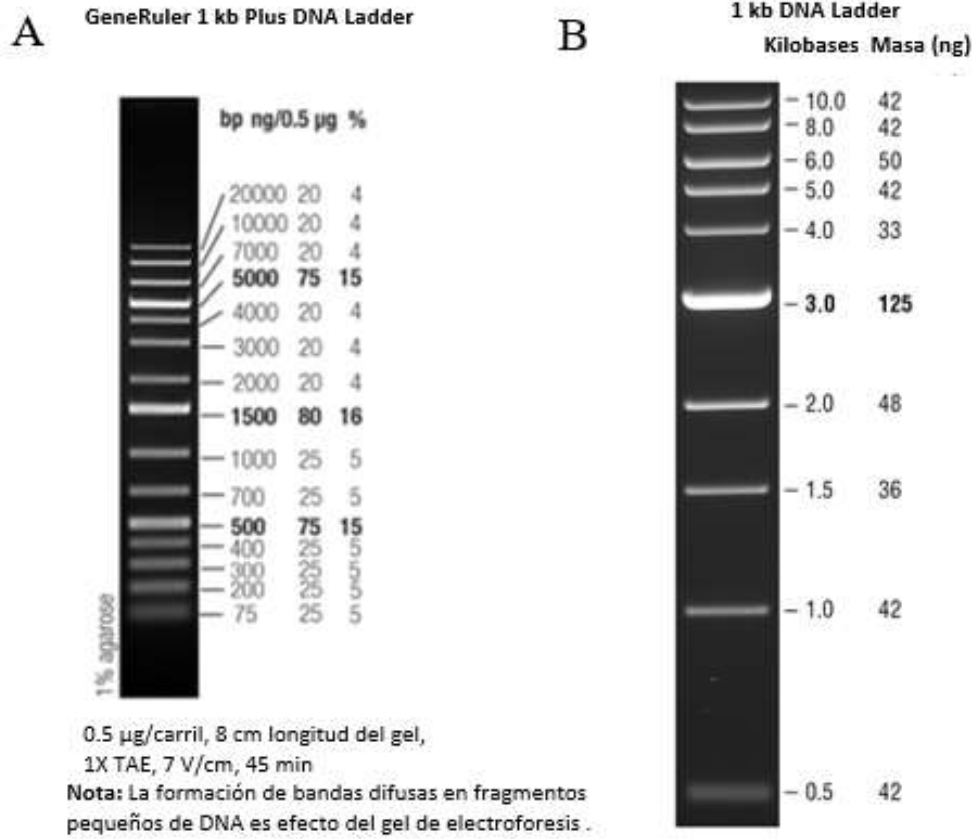


Figura 9. Marcadores de tamaño molecular utilizados en del desarrollo del proyecto. A. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermoscientific). B. 1kb DNA Ladder (NEB).

Los iniciadores diseñados para amplificar cada fragmento que conforma al plásmido pGAP-ropSP6-GUS y que fueron mandados a sintetizar en T4 Oligo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Iniciadores diseñados para el desarrollo del proyecto.

Fragmento amplificado	Iniciador	Secuencia (5' → 3')	Sitio de restricción	Amplicón (pb)
CYC1T-ORI	DZ01-F	GCGCGAGCTCGTCCGACGGCGGCCCA	SacI	1078
	DZ02-R	GCCGCACCTGCGTCAACATGCATGACCAAATCCCTTAA	PaqCI	
P _{EM7}	DZ03-SUP	GACCAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAC	XhoIp	48
	DZ04-INF	TCGAGTGTCTGATTATACTATGCCGATATAC	XhoIp	
	DZ05-F	CGCGCACCTGCATGCATGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTA	PaqCI	
P _{GAP}	DZ06-F	GGCCCTCGAGAGATCTTTTTTTGTAGAAATGTCTT	XhoI	532
	DZ07-R	GCCGCACCTGCCACCATTGCCGTGAATTCCTCTTTTCGAAATAGTTGTTCAATTGAT	PaqCI	
pUC57-Kan-SP6-5'	DZ08-F	GCGCCACCTGCGGCGCAATGGTGGACCTACACGCT	PaqCI	1448
	DZ09-R	CGCGGTCTCACATTAGAGACCCTTACGTCGA	BsaI	
pUC57-Amp-SP6-3'	DZ10-F	CCGGGTCTCTAATGTCTTGGATGA	BsaI	1235
	DZ11-R	CGGCCACCTGCTTCCTCAGCAAAAACGTATTCAGAGT	PaqCI	
AOX1T	DZ12-F	GGCCACCTGCTTTGCTGAGGAATTCACGTGGCCCA	PaqCI	504
	DZ13-R	GCGCCACCTGCACTGGCACAAACGAAGGTCTCACTTAAT	PaqCI	
HIS4	DZ14-F	GCCCCACCTGCGTTTGTGCCAGTTTGCTGTCCAACT	PaqCI	2941
	DZ15-R	CGGGCACCTGCCTACAAAACCAAGGGGACATGTAATT	PaqCI	
P _{neo}	DZ16-F	CGGGCACCTGCACGTTTTTACATGGCGATAGCTAGACT	PaqCI	215
	DZ17-R	CGGGCACCTGCCATGAAAACATCCTGTCTCTTGATCAGAT	PaqCI	
cat	DZ18-F	CGGGCACCTGCCATCTTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAA	PaqCI	790
	DZ19-R	CGGGCACCTGCCTAAATTCATACCTGACCTCCATAGC	PaqCI	
5'-UTR-AOX1	DZ20-F	GCCGCACCTGCTATTGAATTTAGGTGACACTATAGACCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTTAT	PaqCI	475
	DZ21-R	CGGCCCGGGGGCCGGCTGGGCCACGT	XmaI	

Reactivos.

Los reactivos utilizados en el desarrollo de este proyecto fueron de las marcas Sigma, B.D. Difco e Invitrogen y se utilizaron como recomienda el proveedor o como indica el procedimiento.

Métodos.

Los métodos, que se describen a continuación, se utilizaron para el desarrollo de este proyecto, para el que se propuso una estrategia de tres fases (Figura 8).



Figura 10. Fases del diseño experimental del proyecto.

1) Propagación de *E.coli*.

E. coli TOP10 fue cultivada en matraces con medio Luria-Bertani (LB) a 150 rpm y 37°C o en placas con medio agar LB a 37°C.

2) Propagación de los plásmidos molde

Los plásmidos utilizados para amplificar las secuencias del vector diseñado fueron propagados en *E. coli* mediante transformación química, las transformantes seleccionadas en agar LB adicionado con antibiótico (kanamicina 50 µg/ml (Km₅₀) o ampicilina 100 µg/ml (Ap₁₀₀)) y extraídos con una técnica modificada de la de Birnboim y Doli en pequeña o mediana escala (miniprep o midiprep), ambos protocolos se describen en el Anexo 4.

3) Ensamble de la secuencia de la RNA polimerasa de SP6 mediante Polimerización Azarosa de Fragmento (PAF).

La secuencia de la RNA polimerasa de SP6 se mandó a sintetizar en dos secciones, cada sección se clonó en el vector pUC57 con diferente marcador de selección, por lo que se procedió a hacer la unión de ambas secuencias. Se siguió la metodología de la polimerización azarosa de fragmento de manera que:

- A. Se hizo una reacción tipo Golden Gate (Tabla 5) donde se mezclaron los vectores y se incubaron con la enzima BsaI y T4 DNA ligasa a temperatura ambiente toda la noche, al día siguiente, se inactivaron las enzimas a 65°C durante 15 min.

Tabla 5. Reacción tipo Golden Gate entre pUC57-SP6-5' Y pUC57-SP6-3'.

Componentes para reacción tipo Golden Gate	Volumen (µl)
pUC57-Kan-SP6-5'	4
pUC-Amp-SP6-3'	4
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	2
BsaI	2
T4 DNA ligasa	2
Agua destilada estéril	6
Volumen total	20

B. A la reacción anterior se le agregó la enzima BamHI, se incubó 2 h a 37°C.

Tabla 6. Restricción con BamHI de ligación pUC57-SP6.

Componentes para reacción de restricción 2	Volumen (µl)
pUC57-Kan-SP6	20
BamHI	2
Agua destilada estéril	3
Volumen total	25

C. Pasado ese tiempo se hizo una reacción de ligación, la cual se incubó toda la noche a 22°C.

Tabla 7. Segunda ligación del PAF de pUC57-SP6

Componentes para reacción de ligación 2	Volumen (µl)
pUC57-Kan-SP6	10
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	3
T4 DNA ligasa	2
Agua destilada estéril	15
Volumen total	30

D. Finalmente, se inactivó la ligasa y a la reacción se le agregó la enzima ScaI para eliminar el replicón pUC57-Amp.

Tabla 8. Volumen de cada componente para la reacción de restricción y ligación.

Componentes para reacción de restricción 3	Volumen (µl)
pUC57-Kan-SP6	30
ScaI	2
Agua destilada estéril	3
Volumen total	35

De la reacción anterior se tomaron 6 µl para transformar 100 µl de células competentes *E. coli* TOP10, las células se sembraron en placas de agar LB Km₅₀ y se seleccionaron colonias para posteriormente extraer DNA plasmídico mediante la técnica de minipreps (Anexo 4-iv).

Posteriormente se amplificó esta secuencia con Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase en una reacción de 20 µl, las condiciones utilizadas para amplificar se encuentran esquematizadas en la Figura 11, así la reacción en la Tabla 9.

Tabla 9. Volumen utilizado de los componentes de la PCR de la secuencia de la RNA polimerasa de SP6.

Componentes	Volumen (µl)
Regulador Phusion HF (5X)	4
dNTP's (10 mM)	1
Iniciador sentido:DZ08-F	1
Iniciador antisentido: DZ11-R	1
pUC57-SP6	1
DMSO	1
Phusion High-Fidelity DNA polymerase	0.2
Agua destilada estéril	10.8

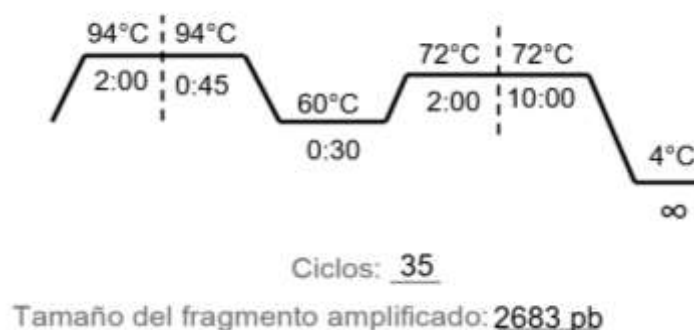


Figura 11. Programa de temperatura (°C) y tiempo (minutos) utilizado para amplificar la secuencia de SP6.

4) Amplificación de los fragmentos que conforman al plásmido pGAP-ropSP6-GUS

Los fragmentos CYC1T-ORI, P_{GAP}, AOX1T, P_{neo}, cat y 5'-UTR-AOX1 se amplificaron en reacciones de 25 µl utilizando Platinum PCR Super Mix High Fidelity. Mientras que la secuencia del gen de *HIS4* se amplificó en 20 µl utilizando Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase. Las reacciones están descritas en las Tablas 9 y 10, los programas se esquematizan en la Figura 8. Finalmente, se hizo el seguimiento de

las amplificaciones en gel de agarosa al 0.8% con el marcador de tamaño molecular GeneRuler 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 10. Reacción de amplificación para las secuencias *CYC1T-ORI*, $P_{EM7-P_{GAP}}$, *AOX1T*, P_{neo} , *cat* y 5'-UTR-*AOX1* con la enzima Platinum PCR Super Mix High Fidelity.

Componentes	Volumen (μ l)
DNA	1
Primer F (10 μ M)	1
Primer R (10 μ M)	1
Platinum PCR Super Mix High Fidelity	22

Tabla 11. Reacción de amplificación para la secuencia *HIS4* con la enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase.

Componentes	Volumen (μ l)
Regulador Phusion HF (5 X)	4
dNTP's (10 mM)	1
Iniciador sentido: DZ14-F	1
Iniciador antisentido: DZ15-R	1
DNA genómico de <i>P. pastoris</i>	1
DMSO	1
Phusion High-Fidelity DNA polymerase	0.2
Agua destilada estéril	10.8

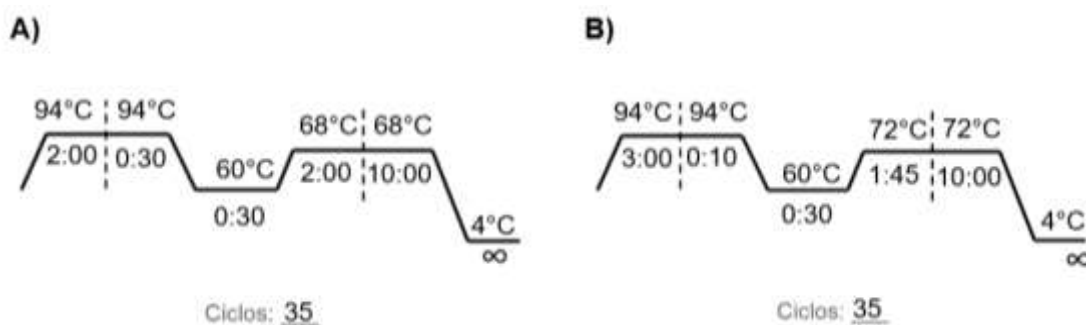


Figura 12. Programa de amplificación. A) Utilizado para *CYC1T-ORI*, $P_{EM7-P_{GAP}}$, *AOX1T*, P_{neo} , *cat* y 5'-UTR-*AOX1* B) Utilizado para *HIS4*.

5) Ensamble de la construcción pGAP-ropSP6-GUS.

a) Ensamble tipo Golden Gate (New England BioLabs).

La cuantificación de los fragmentos, que componen a la construcción, se hizo con ayuda del marcador de tamaños GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific), con el programa Quantity One con el fotodocumentador GelDoc 2000 de BioRad, por lo que se hizo el seguimiento en gel de agarosa al 0.8%. Una vez hecha la cuantificación en nanogramos, se procedió a calcular los picomoles y el volumen necesario de cada fragmento para tenerlos en cantidades equimolares. Derivado de estos cálculos se obtuvieron los volúmenes necesarios que son presentados en la Tabla 12, además de los volúmenes de la enzima PaqCI, su activador, la T4 DNA ligasa, regulador de la T4 DNA ligasa (10 X) y agua destilada estéril para completar los 30 μ l de la reacción. Se probaron tres incubaciones diferentes:

- 1) A 37°C durante dos horas.
- 2) A temperatura ambiente toda la noche.
- 3) En un esquema de ciclos, recomendados por el proveedor, 37°C durante 1 min, seguido de 1 min a 16°C por 40 ciclos. Posteriormente a 37°C durante 5 min y finalmente 60°C durante 5 min.

Tabla 12. Reacción de ensamble tipo Golden Gate utilizando la enzima PaqCI.

Reactivo	Reacción de ensamble (μ l)
CYC1T-ORI	8.6
P _{GAP}	1.5
<i>ropSP6</i>	4.6
AOX1T	1
<i>HIS4</i>	1
P _{neo}	1
<i>cat</i>	1
5'-UTR-AOX1	1.5
Regulador DNA ligasa T4 (10 X)	3
Enzima PaqCI	1
Activador PaqCI (20 μ M)	0.25
T4 DNA ligasa	2
Agua destilada estéril	3.55

El ensamble resultante se transformó en *E. coli* TOP10, y las células se sembraron en placas con medio agar LB Cm₅₀, sin embargo, no se obtuvieron colonias transformantes, por lo que se evaluó cada componente de la reacción individualmente.

i. Evaluación de los componentes que conforman el ensamble.

La actividad enzimática PaqCI se evaluó restringiendo DNA de lambda (37°C por 1 h), mientras que para la actividad de la enzima T4 DNA ligasa se restringió DNA de lambda con la enzima HindIII, para posteriormente ligar dicha restricción (1 h a 37°C en ambos casos) y para evaluar el DNA se purificaron tres insertos con el kit DNA Clean & Concentrator de Zymo Research (siguiendo las instrucciones del proveedor) y se hizo una reacción de ensamble incubando en un esquema de ciclos. Las reacciones utilizadas se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones, volúmenes de restricciones, ligaciones y ensamble tipo Golden Gate utilizados para la evaluación de los componentes.

Evaluación actividad de la enzima PaqCI		
Componente	Volumen (µl)	Incubación
DNA de λ (0.3 µg/µl)	1	37°C → 1 h 65°C → 15 min
PaqCI	0.2	
Activador (20 µM)	0.2	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	1	
Agua destilada estéril	7.6	
Total	10	
Evaluación de la actividad de la enzima T4 DNA ligasa		
Componente de la reacción de restricción	Volumen (µl)	Incubación
DNA de λ (0.3 µg/µl)	2	37°C → 1 h 65°C → 15 min
HindIII	0.5	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	1	
Agua destilada estéril	7.6	
Total	10	
Componente de la reacción de ligación	Volumen (µl)	Incubación
DNA de λ restringido con HindIII	7	37°C → 1 h 65°C → 15 min
T4 DNA ligasa	0.2	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	1	
Agua destilada estéril	1.8	
Total	10	

Evaluación de la calidad DNA		
Componente	Volumen (μl)	Incubación
<i>P_{neo}</i>	4	37°C 1 min → 16°C 1 min por 40 ciclos 37°C 5 min 65°C 15 min 4°C ∞ Tamaño esperado 1480 pb
<i>cat</i>	4	
5'-UTR-AOX1	4	
PaqCI	1	
T4 DNA ligasa	2	
Activador (20 μM)	0.25	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	2	
Agua destilada estéril	2.75	
Total	20	

b) Ensamble por recombinación homóloga

El ensamble por recombinación homóloga se propuso debido a que en la evaluación del DNA se logró unir tres fragmentos, por lo que se planteó ensamblar los fragmentos por pares y combinándolos, de tal manera que compartieran una secuencia homóloga y posteriormente utilizar la maquinaria de *E.coli* de recombinación homóloga. Todas las reacciones de ensambles parciales se muestran en la Tabla 14 y fueron incubadas en el esquema de ciclos, posteriormente se hizo el seguimiento en gel de agarosa al 0.8%.

Tabla 14. Condiciones de las reacciones de los ensambles parciales.

Ensamble parcial: CYC1T-ORI- <i>P_{EM7-PGAP}</i>		
Componente	Volumen (μl)	Incubación
CYC1T-ORI	2	37°C 1 min → 16°C 1 min por 40 ciclos 37°C 5 min 65°C 15 min 4°C ∞ Tamaño esperado 1652 pb
<i>P_{EM7-PGAP}</i>	4	
PaqCI	1	
T4 DNA Ligasa	2	
Activador de PaqCI (20 μM)	0.25	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	1.5	
Agua destilada estéril	4.25	
Total	15	
Ensamble parcial: <i>P_{EM7-PGAP-ropSP6}</i>		
Componente	Volumen (μl)	Incubación
<i>P_{EM7-PGAP}</i>	4	37°C 1 min → 16°C 1 min por 40 ciclos 37°C 5 min 65°C 15 min 4°C ∞
<i>ropSP6</i>	2	
PaqCI	1	
T4 DNA Ligasa	2	
Activador de PaqCI (20 μM)	0.25	

Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	1.5	Tamaño esperado 3357 pb
Agua destilada estéril	4.25	
Total	15	
Ensamble parcial: <i>ropSP6-AOX1T</i>		
Componente	Volumen (μl)	Incubación
<i>ropSP6</i>	2	37°C 1 min → 16°C 1 min por 40 ciclos 37°C 5 min 65°C 15 min 4°C ∞ Tamaño esperado 3102 pb
AOX1T	2	
PaqCI	1	
T4 DNA Ligasa	2	
Activador de PaqCI (20 μM)	0.25	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	1.5	
Agua destilada estéril	6.25	
Total	15	
Ensamble parcial: AOX1T- <i>HIS4</i>		
Componente	Volumen (μl)	Incubación
AOX1T	1.5	37°C 1 min → 16°C 1 min por 40 ciclos 37°C 5 min 65°C 15 min 4°C ∞ Tamaño esperado 3445 pb
<i>HIS4</i>	2	
PaqCI	1	
T4 DNA Ligasa	2	
Activador de PaqCI (20 μM)	0.25	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	1.5	
Agua destilada estéril	6.75	
Total	15	
Ensamble parcial: <i>HIS4-P_{neo}</i>		
Componente	Volumen (μl)	Incubación
<i>HIS4</i>	1	37°C 1 min → 16°C 1 min por 40 ciclos 37°C 5 min 65°C 15 min 4°C ∞ Tamaño esperado 3095 pb
<i>P_{neo}</i>	1	
PaqCI	1	
T4 DNA ligasa	2	
Activador de PaqCI (20 μM)	0.25	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	1.5	
Agua destilada estéril	8.25	
Total	15	

Los ensamblajes parciales se obtuvieron con inespecificidades, por lo que se procedió a amplificarlos para purificarlos a partir de banda de gel. Sin embargo, debido a la concentración en la que se obtuvieron los ensamblajes en la purificación se perdió totalmente el DNA, así que no fue posible seguir con esta estrategia.

c) Ensamble por clonación dirigida.

Los fragmentos que constituyen el vector, que fueron amplificados previamente, se clonaron en dos vectores: pJET1.2/Blunt y pBluescript II KS (+) (Tabla 15), en una reacción de 20 µl incubada a 22°C durante toda la noche. Esta reacción fue transformada en células competentes de *E.coli* TOP10 y se seleccionó en placas de medio agar LB Ap₁₀₀, las clonas obtenidas se resembraron en medio agar LB Ap₁₀₀ para extraer DNA plasmídico con el protocolo de miniprep (Anexo 4-iv). Al ser una clonación de extremos romos, se hizo una restricción para conocer la orientación del fragmento dentro del vector.

Tabla 15. Vectores en los que fueron clonados cada fragmento.

Fragmento	Vector
CYC1T-ORI	pJET1.2/Blunt
P _{GAP}	pBluescript II KS (+)
AOX1T	pJET1.2/Blunt
<i>HIS4</i>	pJET1.2/Blunt
P _{neo-cat-5'} -UTR	pJET1.2/Blunt

i. Ensamble y clonación de pGAP-*ropSP6*-AOX1T.

La secuencia del promotor GAP fue clonada en pBluescriptII KS(+) restringido con EcoRV, mientras que la secuencia de la RNA polimerasa de SP6 se encuentra en el vector pUC57-Kan y el terminador de la alcohol oxidasa I se encuentra en el vector pJET1.2/Blunt (Tabla 15), por lo que se hizo una reacción tipo Golden Gate con estos plásmidos (Tabla 16) y se hizo el seguimiento en gel de agarosa al 0.8%. A partir del producto del ensamble se hizo una amplificación utilizando Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase y los iniciadores de los extremos, en este caso DZ06-F y DZ13-R, el resultado de la amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente, el DNA amplificado se clonó en pJET1.2/Blunt.

Tabla 16. Volumen de reacción y esquema de temperatura empleadas para la reacción del ensamble tipo Golden Gate de P_{GAP} -ropSP6-AOX1T.

Elemento	Volumen (μ l)	Incubación
pBKS- P_{GAP}	0.5	37°C 1 min \rightarrow 16°C 1 min por 40 ciclos 37°C 5 min 65°C 15 min 4°C ∞ Tamaño esperado \approx 3625 pb
pUC57-Kan-SP6	0.5	
pJET-AOX1T	0.5	
PaqCI	1.5	
T4 DNA ligasa	2	
Activador (20 μ M)	0.25	
Regulador T4 DNA ligasa (10 X)	2	
Agua destilada estéril	12.7	
Total	20	

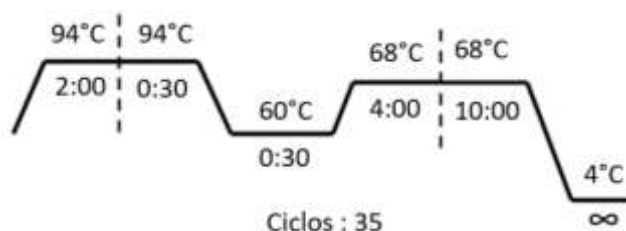


Figura 13. Programa de temperatura ($^{\circ}$ C) y tiempo (minutos) utilizado para amplificar la secuencia del ensamble P_{GAP} -ropSP6-AOX1T.

ii. Ensamble de pJET-CYC1T-ORI-GUS

La unión de la secuencia del gen *uidA* al vector pJET-CYC1T-ORI fue mediante enzimas de restricción. Por lo que el vector pJET-CYC1T-ORI se restringió con las enzimas XhoI (sitio fue rellenado con la enzima Klenow) y SacI, mientras que la secuencia del gen *uidA* se encuentra en el plásmido pBI121, y se liberó con las enzimas SacI y ScaI. Ambas restricciones se mezclaron, ligaron a 22°C toda la noche y el producto se usó para transformar células competentes de *E.coli* TOP10, las clonas fueron seleccionadas en medio agar LB Ap₁₀₀.

El DNA plasmídico se extrajo con el protocolo de miniprep y para corroborar la identidad del DNA se hizo una restricción para linealizar el vector con enzima SacI, sin embargo, al hacer esta restricción no se obtuvo la banda única que se esperaba por lo que se hizo otra restricción para corroborar la inserción del gen *uidA* con las enzimas

SmaI y SacI. Los resultados de esta restricción indicaron que el fragmento se había insertado dos veces, de tal manera que se restringió nuevamente con la enzima SmaI para liberar el fragmento y posteriormente se religó el vector, se transformó y se extrajo DNA plasmídico.

- 6) Análisis de restricción de: pJET-P_{GAP-rop}SP6-AOX1T, pJET-HIS4, pJET-P_{neo-cat-5'}-UTR y pJET-CYC1T-ORI-GUS.

Los cuatro vectores que contienen los nueve fragmentos fueron analizados mediante enzimas de restricción; en todos los casos el vector fue linealizado, se liberó el fragmento del inserto del resto del vector y finalmente, se verificó la orientación con una enzima que tuviera sitio de restricción tanto en el vector como en el inserto.

La liberación del fragmento en tres de los casos se hizo con la enzima SmaI ya que esta enzima tiene dos sitios de restricción en los extremos del sitio de clonación del vector pJET1.2/Blunt, sólo el inserto correspondiente a CYC1T-ORI-GUS se liberó con la enzima XbaI.

El primer vector en ser analizado fue pJET-P_{GAP-rop}SP6-AOX1T, éste fue linealizado con la enzima XbaI y se verificó la orientación con la enzima NcoI, las reacciones utilizadas se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Volumen de utilizado para verificación de la clonación de P_{GAP-rop}SP6-AOX1T en pJET1.2/Blunt mediante restricción.

Restricción	Componente	Volumen (µl)
Linealización	pJET- P _{GAP-rop} SP6-AOX1T	0.5
	XbaI	0.25
	Regulador Tango (10 X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	8.25
	Total	10
Liberación de fragmento	pJET- P _{GAP-rop} SP6-AOX1T	0.5
	SmaI	0.25
	Regulador 3.1 (10 X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	8.25
	Total	10
Verificación de la orientación	pJET- P _{GAP-rop} SP6-AOX1T	0.5
	NcoI	1

	Regulador 3.1 (10 X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	7.5
	Total	10

La restricción para verificación de la orientación del inserto del vector pJET-*HIS4* se hizo con la enzima BsaI, mientras la linealización se hizo con la enzima SalI, como se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Volumen de utilizado para verificación de la clonación de *HIS4* en pJET1.2/Blunt mediante restricción.

Restricción	Componente	Volumen (μl)
Linealización	pJET- <i>HIS4</i>	0.5
	SalI	0.25
	Regulador Anza (10 X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	8.25
	Total	10
Liberación de fragmento	pJET- <i>HIS4</i>	0.5
	SwaI	0.25
	Regulador 3.1 (10 X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	8.25
	Total	10
Verificación de la orientación	pJET- <i>HIS4</i>	0.5
	BsaI	1
	Regulador G (10 X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	7.5
	Total	10

La reacción de restricción para linealizar el vector pJET-P_{neo-cat-5'-UTR}-AOX1 se hizo con BamHI, mientras que la verificación de la orientación del fragmento insertado se hizo con la enzima HindIII.

Tabla 19. Volumen de utilizado para verificación de la clonación de P_{neo-cat-5'-UTR}-AOX1 en pJET1.2/Blunt mediante restricción.

Restricción	Componente	Volumen (μl)
Linealización	pJET-P _{neo-cat-5'-UTR} -AOX1	0.5
	BamHI	0.25
	Regulador BamHI (10X)	1

	Agua destilada estéril c.b.p	8.25
	Total	10
Liberación de fragmento	pJET-P _{neo-cat-5'-UTR-AOX1}	0.5
	SmaI	0.25
	Regulador 3.1 (10X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	8.25
	Total	10
Verificación de la orientación	pJET-P _{neo-cat-5'-UTR-AOX1}	0.5
	HindIII	1
	Regulador R (10X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	7.25
	Total	10

Finalmente, el vector pJET-CYC1T-ORI-GUS fue linealizado con la enzima SmaI y se liberó el fragmento desde el origen de replicación hasta el gen reportero con la enzima XbaI.

Tabla 20. Volumen de utilizado para verificación de la clonación del gen uidA en pJET-CYC1T-ORI mediante restricción.

Restricción	Componente	Volumen (µl)
Linealización	pJET-CYC1T-ORI-GUS	0.5
	SmaI	0.25
	Regulador Anza (10 X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	8.25
	Total	10
Liberación de fragmento	pJET-CYC1T-ORI-GUS	0.5
	XbaI	0.25
	Regulador Tango (10 X)	1
	Agua destilada estéril c.b.p	8.25
	Total	10

Resultados y discusión.

Los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo del proyecto se presentan a continuación.

1) Diseño del plásmido pGAP-ropSP6-GUS.

El vector pGAP-ropSP6-GUS (Fig.14) se diseñó para expresar la RNA polimerasa de SP6 constitutivamente en *P. pastoris*, y que ésta a su vez transcribiera un gen que estuviera bajo su promotor.

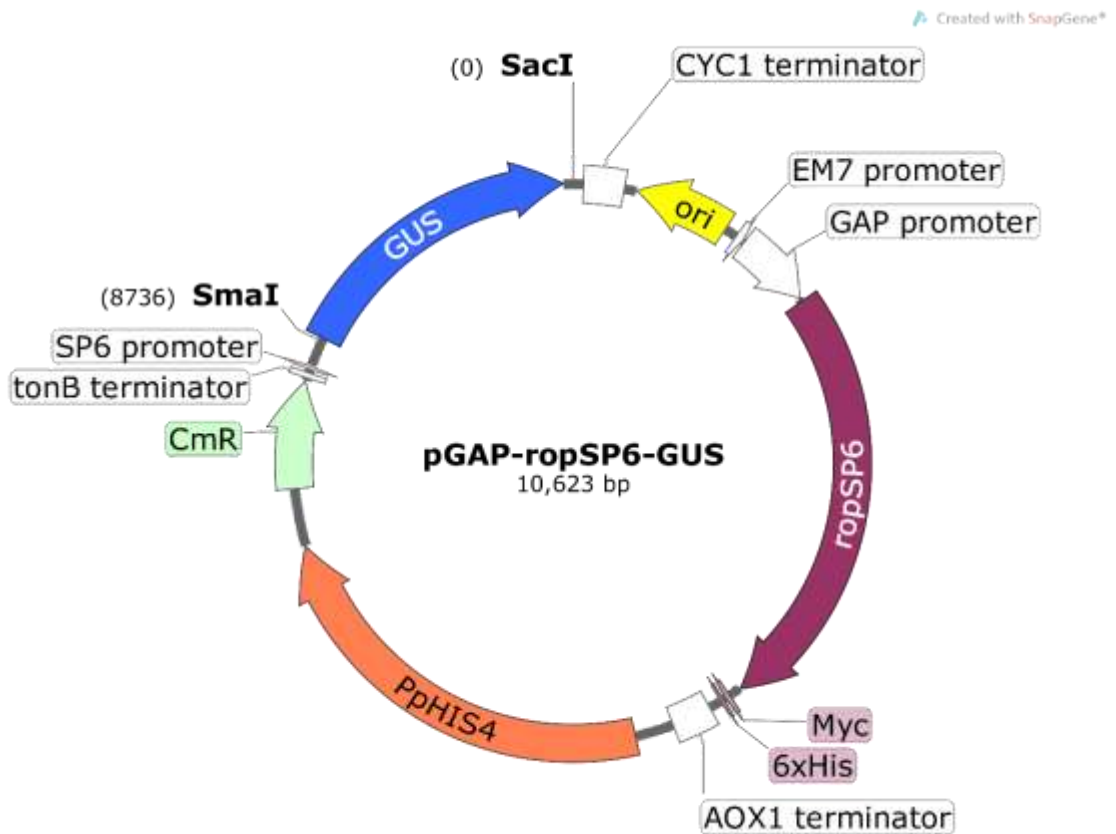


Figura 14. Mapa de la construcción pGAP-ropSP6-GUS.

Al no tener un molde de dónde amplificar la secuencia de la RNA polimerasa SP6 se mandó a sintetizar a Synbio Technologies, tomando como base la secuencia reportada en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus

siglas en inglés), con número de referencia NP_853568.1, esta misma secuencia se encuentra reportada en UniProtKB con referencia Q75R1.

La secuencia NP_853568.1 fue modificada, ya que se optimizó el uso de codones para *Pichia pastoris* y se hizo un cambio en la secuencia del segundo codón, con el fin de poder integrar la secuencia de Kozak para facilitar el reconocimiento del RNA mensajero en la levadura. También se dividió en dos partes y a cada una se le agregó un sitio de BsaI, para su unión.

La función que cumple cada elemento en el sistema, así como el DNA molde utilizado para su amplificación y de dónde se obtuvo dicho molde, se enlistan en la Tabla 21.

Tabla 21. Secuencias que constituyen al vector pGAP-ropSP6-GUS. DNA origen, de donde fue aportado y su función.

Secuencia	Función
Promotor EM7	Expresión constitutiva de la RNA polimerasa de SP6 en <i>E. coli</i> .
Promotor GAP	Expresión constitutiva de la RNA polimerasa de SP6 y, además, es un posible sitio de recombinación en el genoma de <i>P.pastoris</i> .
RNA polimerasa de SP6	Transcripción del gen <i>uidA</i> .
Epítipo MYC, etiqueta de histidinas y terminador AOX1	Etiquetas que permitirán la detección de la proteína recombinante y el terminador permitirá el procesamiento eficiente del sitio 3' de la RNAPolSP6.
Promotor, gen y terminador de histidina	Marcador de selección para la transformación en la cepa <i>GS115</i> de <i>P. pastoris</i> , ya que permitirá que dicha cepa crezca en ausencia de histidina en el medio.
Promotor <i>neo</i>	Promotor para la expresión del gen de resistencia a cloranfenicol de Tn5 en un sistema procarionte.
Gen de resistencia a cloranfenicol	Marcador de selección para <i>E. coli</i> .
Promotor SP6	Iniciar la transcripción del gen <i>uidA</i> por acción de la RNA polimerasa del bacteriófago.
5'-UTR de AOX1	Contribuir a la regulación y expresión del RNA mensajero transcrito por la RNA polimerasa de SP6.

Gen <i>uidA</i> (Mahran et al., 2020)	Gen reportero de la actividad de la RNA polimerasa del bacteriófago en <i>P. pastoris</i> , codifica para la β -glucuronidasa, enzima cuya reacción con el X-Gluc da como resultado la producción de un compuesto de coloración azul.
Terminador CYC1 y Origen de replicación	Regular el eficiente procesamiento del sitio 3' del mRNA del gen <i>uidA</i> y origen de replicación en <i>E. coli</i> para replicación de la construcción.

Los iniciadores para amplificar y ensamblar las secuencias que conforman al vector (Tabla 4), se diseñaron mediante dos técnicas: una basada en el ensamble de Golden Gate (patentada por New England BioLabs) y por polimerización azarosa de fragmento (PAF).

En la técnica basada en el ensamble de Golden Gate se utilizó la enzima del tipo IIs PaqCI, cuya secuencia de reconocimiento no palindrómica se muestra en la Figura 15, donde se ilustra que la enzima corta cuatro bases después de ésta, de tal manera que se utilizaron estas bases para generar el “puente” entre las secuencias.

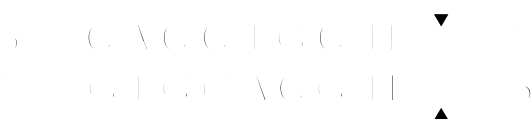


Figura 15. Sitio de reconocimiento de la enzima del tipo IIs PaqCI.

La secuencia del gen *uidA* contiene dos sitios de restricción de PaqCI, por lo que el ensamble de éste se planteó hacer con PAF (Anexo 4-vi), que consiste en la unión de una secuencia deseada a un vector a partir de un vector donador de dicha secuencia, a través de una serie de restricciones y ligaciones, en el caso específico de este proyecto se usaron SacI, XmaI y T4 DNA ligasa.

- 2) Extracciones de DNA molde: DNA genómico de *P.pastoris*, pGAPZ α A, pPICZ α A, pBI121, pSUP2021, pMPJAS01, pUC57-Kan-SP6-5' y pUC57-Amp-SP6-3'

Las secuencias necesarias para la construcción del vector se amplificaron de DNA plasmídicos y DNA genómico, los cuales se extrajeron como se menciona en el Anexo 4-iii-v.

El análisis electroforético del DNA genómico de *P. pastoris* X-33 obtenido a partir de la extracción se muestra en la Figura 16, en ésta podemos observar que en las cuatro extracciones se obtuvo buena calidad del DNA genómico, es decir que se observa poca degradación de DNA y baja concentración de RNA.

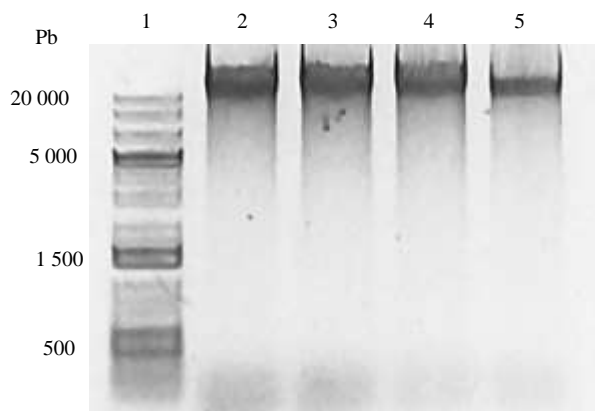


Figura 16. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción de DNA genómico de *P. pastoris*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-5 extracciones de DNA genómico de *P. pastoris*.

El análisis electroforético del DNA plasmídico obtenido de la extracción de las clonas transformadas con los vectores pGAPZ α A y pPICZ α A se muestra en la Figura 17, de estos vectores se amplificaron secuencias de promotores, terminadores y 5'-UTR de levadura.

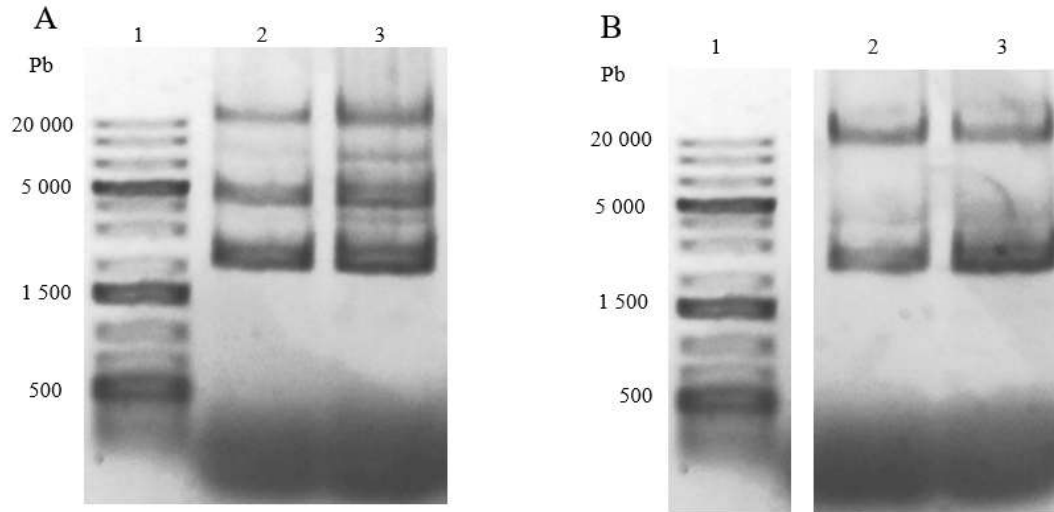


Figura 17. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción de DNA plasmídico. A. pGAPZαA. B. pPICZαA. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2 y 3 DNA plasmídico.

Los plásmidos fueron proporcionados por la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara, por lo que para corroborar su identidad se linealizaron con la enzima EcoRI, el análisis de restricción *in silico* e *in vitro* se muestra en la Figura 18 y 19, en la que podemos observar que el tamaño banda obtenida al restringir coincide con el esperado de 3,147 pb (Figura 18) y 3,593 pb (Figura 19), para pGAPZα y pPICZαA respectivamente.

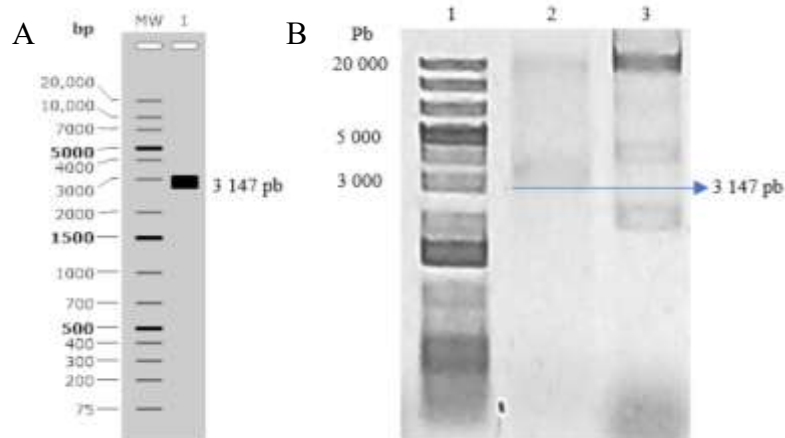


Figura 18. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la linealización del vector pGAPZαA con EcoRI. A. Análisis de restricción *in silico*. B. Análisis de restricción *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico linealizado. Carril 3. DNA plasmídico sin restringir.

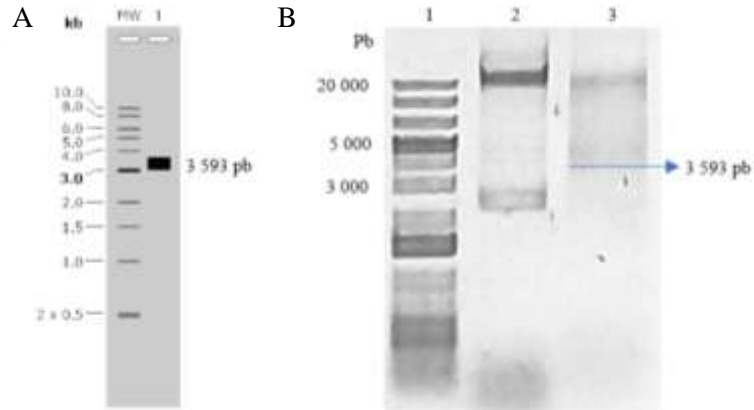


Figura 19. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la linealización del vector pPICZαA con EcoRI. A. Análisis de restricción *in silico*. B. Análisis de restricción *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carril 3. DNA plasmídico linealizado.

El análisis electroforético del DNA extraído de las clonas transformadas con los vectores pSUP2021 y pMPJAS01 se muestra en la Figura 20, de estos plásmidos se amplificaron el promotor de *neo* y la resistencia a cloranfenicol. La identidad de pMPJAS01 fue corroborada mediante una restricción con la enzima HindIII, en donde se esperaban obtener dos bandas: una de 3,586 pb y otra de 2,661 pb, las cuales también podemos observar en la Figura 21 en el análisis de restricción *in silico*,

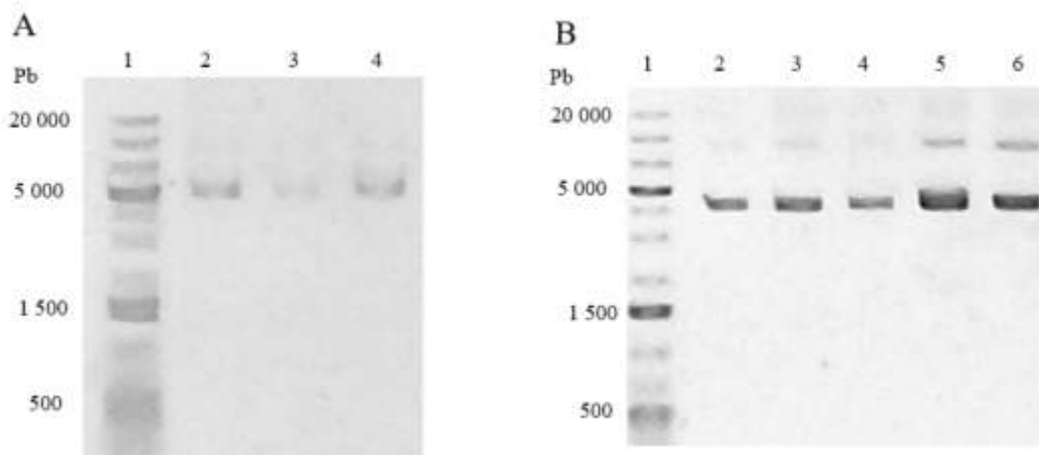


Figura 20. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% del DNA plasmídico extraído. A. pSUP2021. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-4 DNA plasmídico extraído. B. pMPJAS01. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-6 DNA plasmídico extraído.

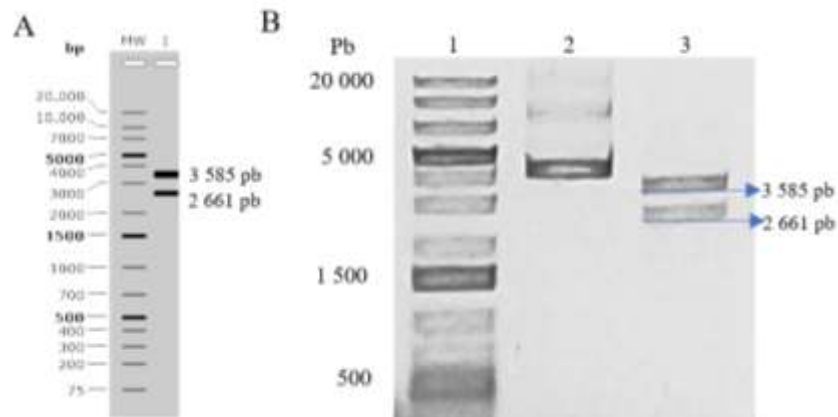


Figura 21. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la linealización del vector pMPJAS01 con la enzima HindIII. A. Análisis de restricción *in silico*. B. Análisis de restricción *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carril 3. DNA plasmídico restringido.

Finalmente, el análisis electroforético de la extracción del DNA plasmídico de pBI121 se muestra en la Figura 22, de este material genético se liberó el gen reportero *uidA*. La identidad de este plásmido fue corroborada mediante la restricción con las enzimas EcoRI y HindIII, en donde se libera una banda de 3,032 pb y la otra banda restante tiene un tamaño de 11,726 pb. Este análisis se puede observar en la Figura 22C, en donde se observa que las bandas obtenidas en la restricción coinciden con lo esperado.

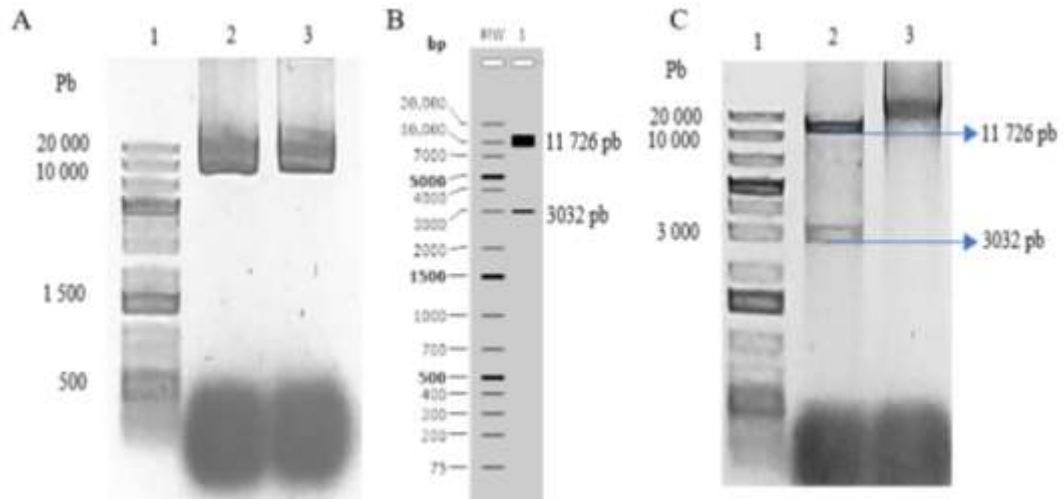


Figura 22. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción a mediana escala de pBI121 y de su análisis de restricción. A. Midiprep del vector pBI121. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-3 DNA extraído. B. Análisis de restricción *in silico* con la enzima EcoRI. C. Análisis de restricción *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico restringido. Carril 3. DNA plasmídico sin restringir.

3) Ensamble de la secuencia de la RNA polimerasa de SP6 mediante Polimerización Azarosa de Fragmento (PAF).

Los plásmidos pUC57-Kan-SP6-5' y pUC57-Amp-SP6-3' contienen la secuencia de la RNA polimerasa de SP6, el análisis electroforético del DNA obtenido mediante la extracción se presenta en la Figura 23.

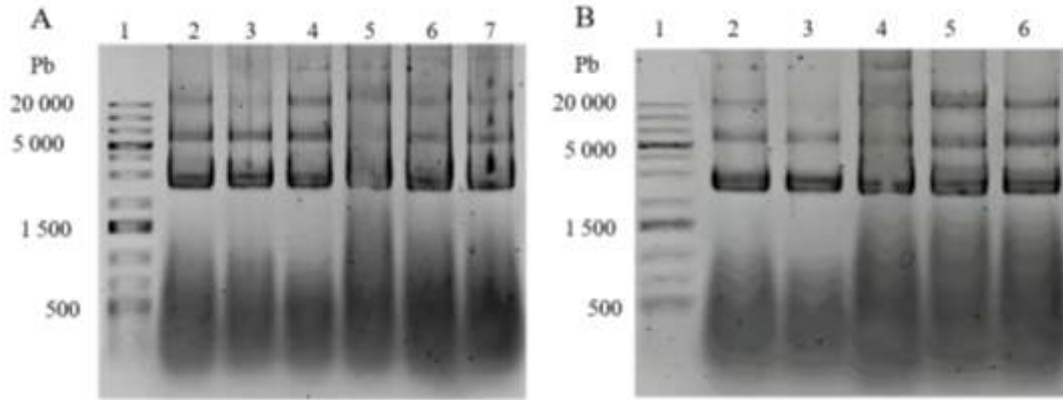


Figura 23. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del DNA plasmídico. A. pUC57-Kan-SP6-5'. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-7. DNA plasmídico extraído. B. pUC57-Amp-SP6-3'. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-6. DNA plasmídico extraído.

La identidad de estos plásmidos fue verificada mediante la restricción con las enzimas EcoRI y HindIII. En la Figura 24 se muestra el análisis de restricción del vector pUC57-Kan-SP6-5', en donde de acuerdo con el análisis *in silico* se esperaban obtener tres bandas: 2,590, 780 y 587 pb. (Fig. 24A), éstas se obtuvieron al hacer el análisis *in vitro* como se aprecia en la Figura 24B, la banda de 567 pb no se visualiza por completo debido a la alta concentración de RNA.

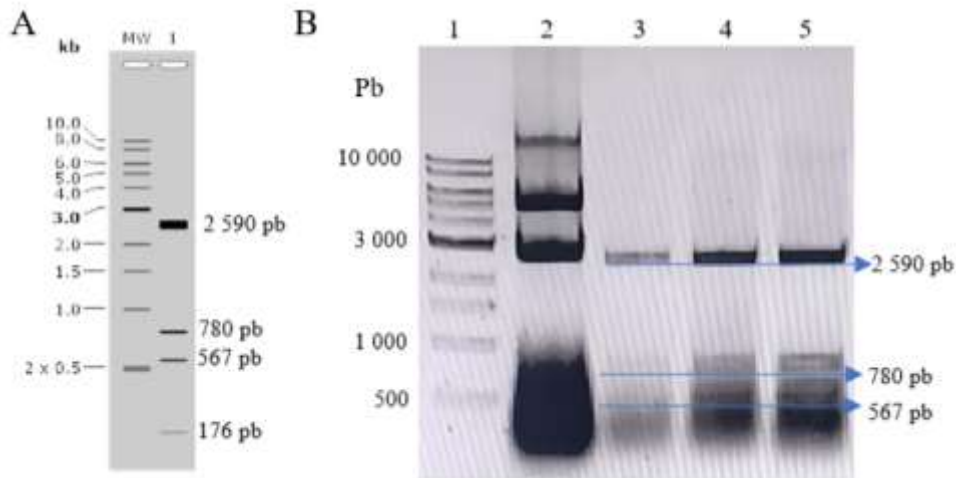


Figura 24. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8 % del análisis de restricción con las enzimas EcoRI y HindIII de: pUC57-Kan-SP6-5'. A. Análisis *in silico*. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carriles 3-4. DNA plasmídico restringido.

El análisis de restricción del vector pUC57-Amp-SP6-3' se muestra en la Figura 25, en el que se corroboró la identidad del vector ya que se pueden observar dos bandas de las esperadas (2,635 y 1,208 pb), la banda de 101 pb no se aprecia en la restricción debido a la presencia de RNA.

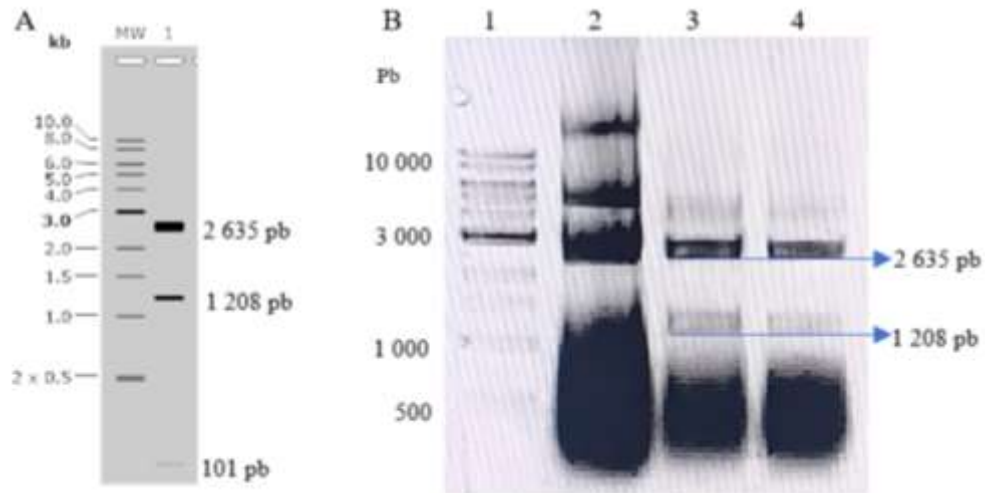


Figura 25. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8 % del análisis de restricción con las enzimas EcoRI y HindIII de: pUC57-Amp-SP6-3'. A. Análisis *in silico*. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carriles 3-4. DNA plasmídico restringido.

La unión de las secuencias se hizo como se describe en la sección de materiales y métodos, y se esquematiza en la Figura 26.

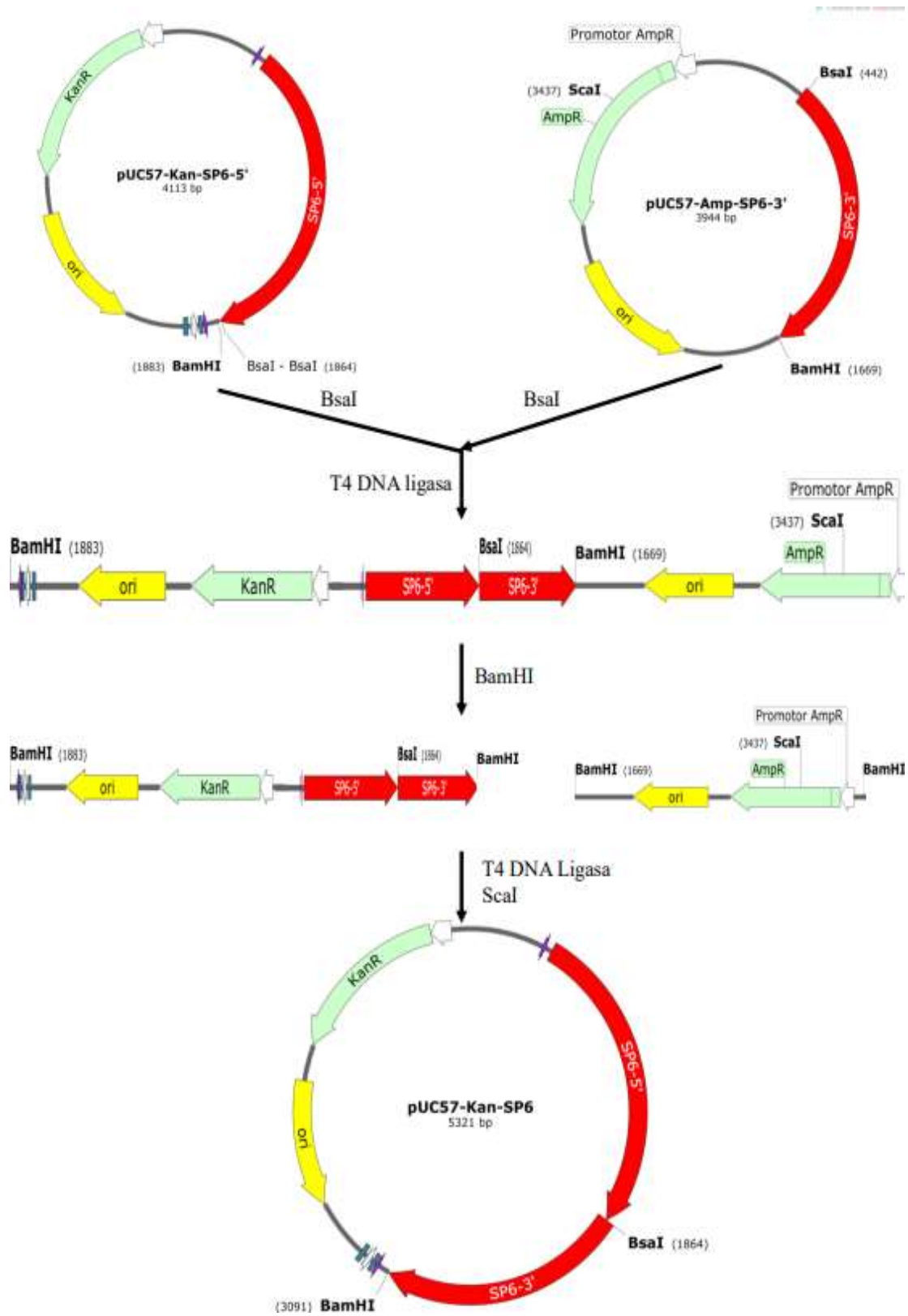


Figura 26. Esquema de la construcción de pUC57-Kan-SP6 mediante PAF.

Siete clonas se obtuvieron de la transforación del PAF de pUC57-Kan-SP6, de las cuales se extrajo DNA plasmídico y el resultado se muestra en la Figura 27.

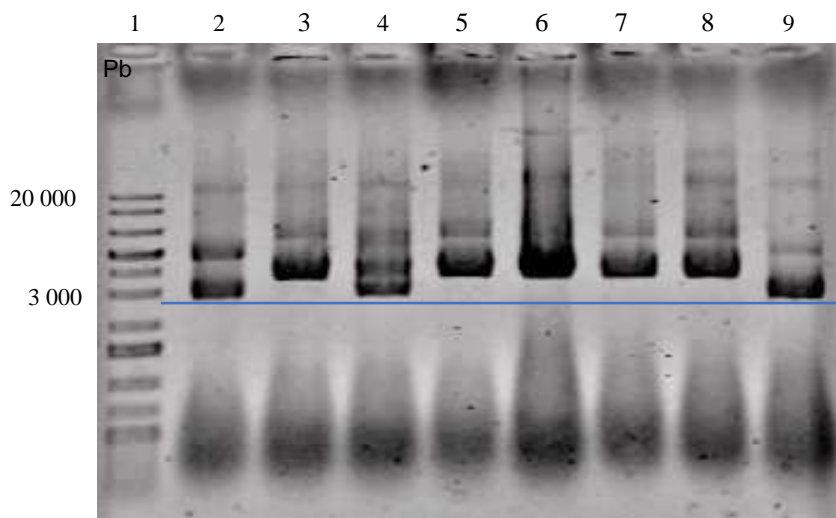


Figura 27. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del DNA plasmídico de pUC57-Kan-SP6. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. pUC57-Kan-SP6-5'. Carriles 3-9. DNA plasmídico extraído.

En el carril 1 se cargó la muestra correspondiente al vector pUC57-Kan-SP6-5', que contiene el fragmento de la secuencia 5' de la RNA polimerasa de SP6, a este vector se le unió el fragmento de la secuencia 3' mediante PAF, por lo que podríamos considerar este patrón de corrimiento como el del vector vacío, esto nos permite comparar el DNA plasmídico obtenido a partir de la extracción de las clonas y verificar mediante este patrón aquellas que probablemente tengan las dos secuencias porque se debería afectar el patrón de corrimiento.

El DNA plasmídico de los carriles 3, 5, 6, 7 y 8, correspondientes a las clonas 1, 3, 4, 5 y 6, muestran un patrón diferente del vector pUC57-Kan-SP6-5', por lo que éstas son las que se analizaron mediante restricción con las enzimas EcoRV y BamHI, en donde se obtienen tres bandas de: 3,358, 1,188 y 775 pb.

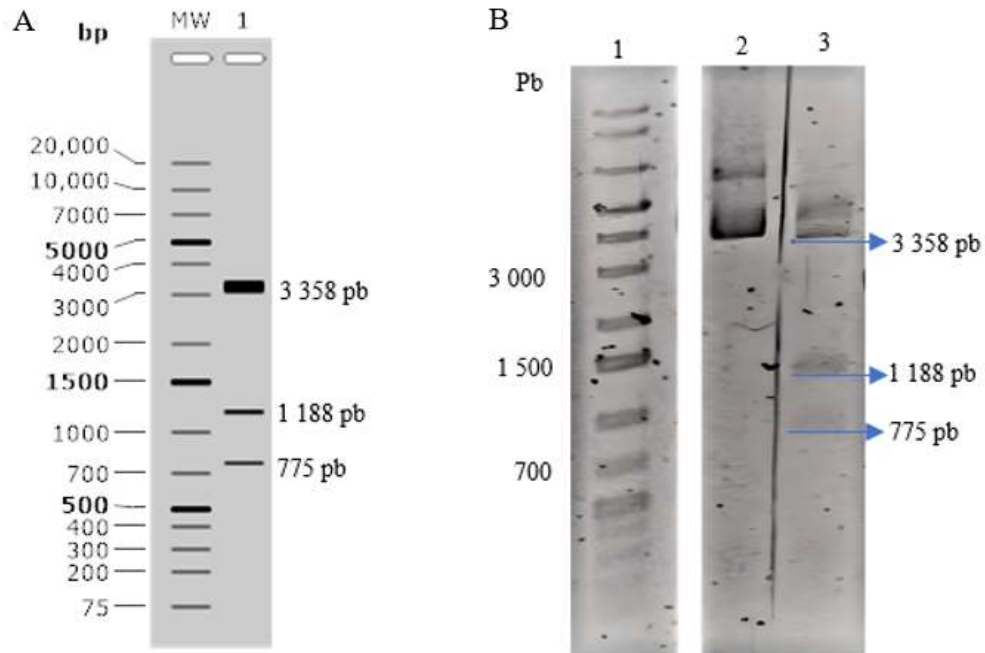


Figura 28. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8 % del análisis de restricción con las enzimas *EcoRV* y *BamHII* de la colonia 4. A. Análisis *in silico*. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carril 3. DNA plasmídico restringido.

En la Figura 28 se puede apreciar el análisis de restricción en donde podemos observar que el tamaño de las bandas obtenidas en la restricción coinciden con el análisis *in silico*, por lo que podemos asegurar que el DNA plasmídico analizado de las clonas tiene la secuencia completa de la RNA polimerasa de SP6.

4) Amplificación de las secuencias que conforman al vector pGAP-ropSP6-GUS.

Los fragmentos que conforman al vector pGAP-ropSP6-GUS se amplificaron como se menciona en la sección de materiales y métodos, el análisis electroforético de estas amplificaciones se muestra en la Figura 29.

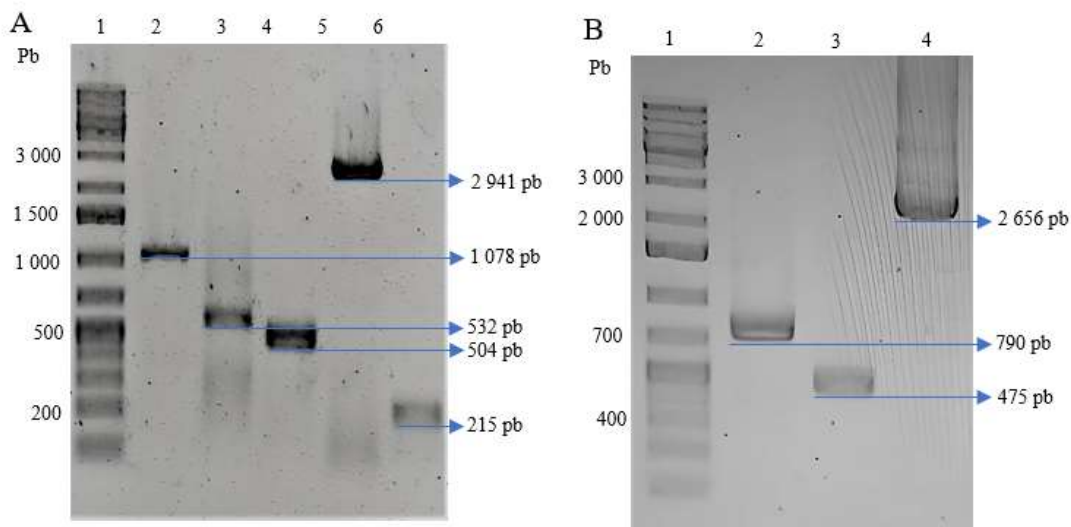


Figura 29. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de las amplificaciones. A. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2. *CYC1T-ORI*. Carril 3. *P_{GAP}*. Carril 4. *AOX1T*. Carril 5. *HIS4*. Carril 6. *P_{neo}*. B. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2. *cat*. Carril 3. *5'-UTR-AOX1*. Carril 4. *ropSP6*.

Los tamaños de las bandas obtenidos en la amplificación coinciden con los esperados según la Tabla 4.

5) Ensamble del plásmido pGAP-ropSP6-GUS.

Las secuencias de los fragmentos que constituyen al vector pGAP-ropSP6-GUS se amplificaron para poder ensamblarlos mediante la técnica de Golden Gate, sin embargo, se tuvieron algunos problemas, los cuales se abordaran en los siguientes puntos.

a. Ensamble tipo Golden Gate (New England BioLabs).

La estimación de la concentración de cada fragmento amplificado se presenta en la Tabla 22.

Tabla 22. Fragmentos, tamaño y cuantificación en nanogramos y picomoles.

Fragmento	Tamaño (pb)	Cuantificación (ng)	Cuantificación (pmoles)
CYC1T-ORI	1,078	10-15	0.015
P _{EM7} -P _{GAP}	574	30	0.087
AOX1T	504	40	0.13
<i>HIS4</i>	2,941	40	0.13
P _{neo}	215	15	0.116
<i>cat</i>	790	15	0.116
5'-UTR-AOX1	475	30	0.087
<i>ropSP6</i>	2,683	40	0.028

El ensamble de Golden Gate se hizo conforme lo mencionado en el apartado de materiales y métodos, los intentos de transformación con dicho ensamble se muestran de manera resumida en la Tabla 23.

Tabla 23. Intentos de transformación del ensamble de Golden Gate, con volumen utilizado para transformar.

Células competentes	Ensamble/control positivo/control negativo	Volumen de DNA (µl)	Resultado
DH5α	Ensamble Golden Gate: pGAP-SP6rop	5-8	No hay crecimiento
	Control positivo: pMPJAS01	3	Crecimiento
	Control negativo: sin DNA	0	No hay crecimiento
TOP10	Ensamble Golden Gate: pGAP-SP6rop	5-8	No hay crecimiento
	Control positivo: pMPJAS01	3	Crecimiento
	Control negativo: sin DNA	0	No hay crecimiento
TOP10	Ensamble Golden Gate: pGAP-SP6rop	5	No hay crecimiento
	Control positivo: pMPJAS01	3	Crecimiento
	Control negativo: sin DNA	0	No hay crecimiento
TOP10	Ensamble Golden Gate: pGAP-SP6rop	5	No hay crecimiento
	Control positivo: pMPJAS01 religado	4	Crecimiento
	Control negativo: pMPJAS01 restringido con HindIII	4	No hay crecimiento
DH5α	Ensamble Golden Gate: pGAP-SP6rop	8	No hay crecimiento
	Control positivo: pMPJAS01 religado	4	Crecimiento
	Control negativo: pMPJAS01 restringido con HindIII	4	No hay crecimiento

Los intentos de transformación con los ensambles obtenidos mediante Golden Gate fueron infructuosos, de manera que se procedió a evaluar cada componente dentro del sistema para determinar qué es lo que fallaba.

i. Evaluación de los componentes que conforman el ensamble.

El primer componente en ser evaluado fue la enzima PaqCI, en donde se comparó el patrón obtenido de la restricción con el análisis *in silico*, los cuales se muestran a continuación.

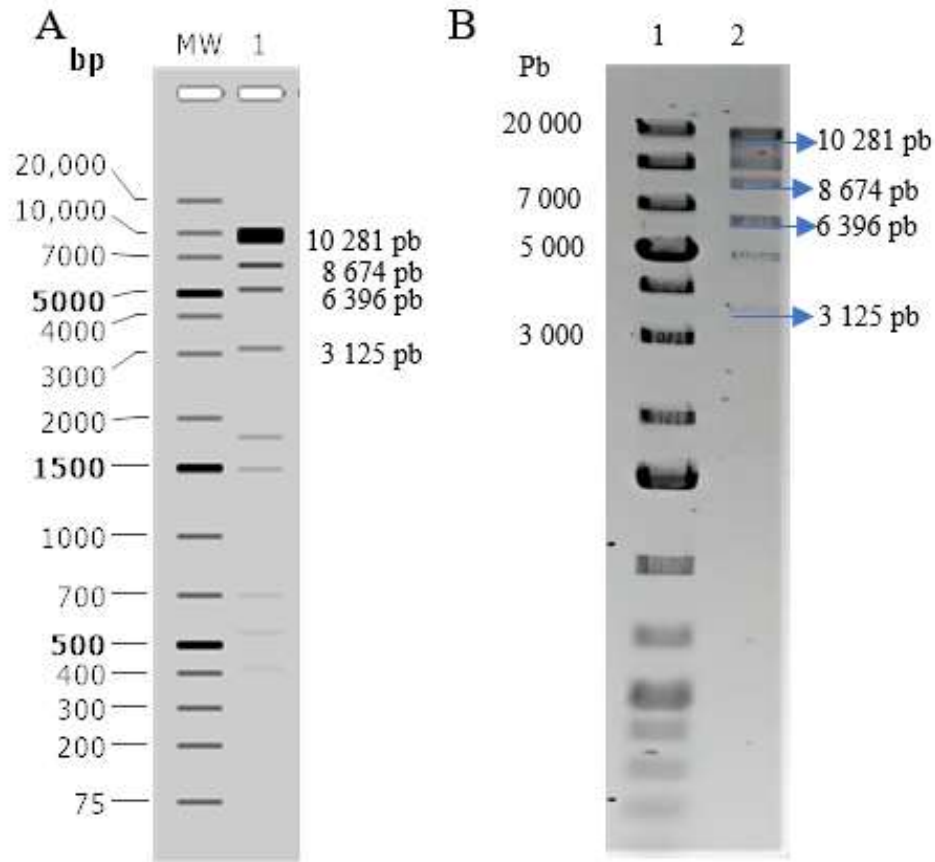


Figura 30. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la restricción del DNA de λ con PaqCI. A. Análisis *in silico*. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA de λ restringido.

La restricción *in silico* (Fig. 30A) da como resultado trece bandas de tamaños entre 10,281 pb y 30 pb, en la restricción hecha en el laboratorio (Fig. 30B) no se aprecian todas las bandas, sin embargo, se pueden observar bandas en los tamaños de 3,125, 6,396, 8,674 y 10,281 pb las cuales coinciden con el patrón, en la parte superior se aprecia DNA con cortes parciales. Con el resultado obtenido, podemos corroborar

que la enzima PaqCI tiene una adecuada actividad de restricción, por lo que este componente no estaba fallando.

La T4 DNA ligasa fue el segundo componente a evaluar y nos basamos en la definición de la unidad, por lo que se probó como se menciona en la sección de métodos.

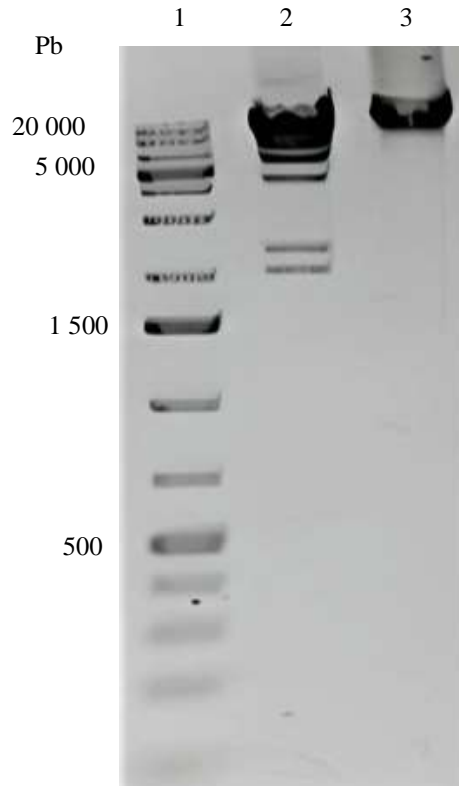


Figura 31. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA de λ restringido con HindIII. Carril 3. DNA de λ religado.

En la Figura 31, se muestra la restricción del DNA de λ con HindIII en el carril 2 y la ligación de este DNA en el carril 3, en el cual se observa que se ligó todo el DNA ya que sólo se aprecia una banda en la parte superior del carril.

Finalmente, se evaluó la calidad del DNA como se menciona en el apartado de métodos y el análisis electroforético tanto de la purificación de los fragmentos, como del resultado del ensamble se presenta a continuación.

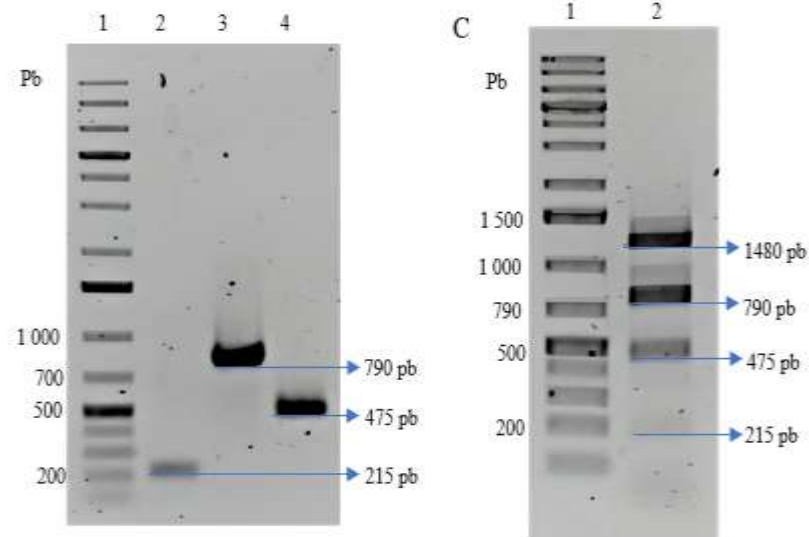
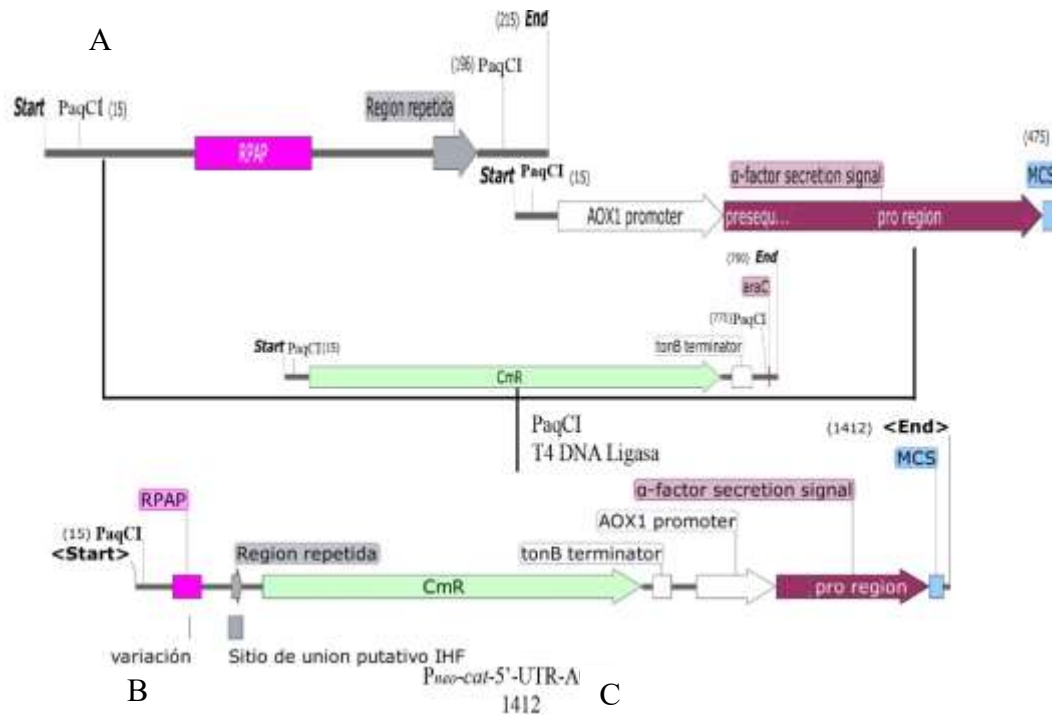


Figura 32. Ensamble de las secuencias P_{neo} , cat y 5'-UTR-AOX1. A. Esquema de ensamble de los fragmentos. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8%. B. Purificación de los fragmentos. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. P_{neo} . Carril 3. cat . Carril 4. 5'-UTR-AOX1. C. Ensamble. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. P_{neo} - cat -5'-UTR-AOX1

En la Figura 32C podemos observar bandas en los tamaños de 215, 475 y 790 pb, aunque también aparece una banda entre 1,000 y 1,500 pb, que coincide con el tamaño de aproximadamente 1,480 pb que es la unión de los tres fragmentos, por lo

que el ensamble funcionó, así que a partir de este momento se decidió purificar todos los insertos con kit.

b. Ensamble por recombinación homóloga

El análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de los ensambles parciales se muestra a continuación.

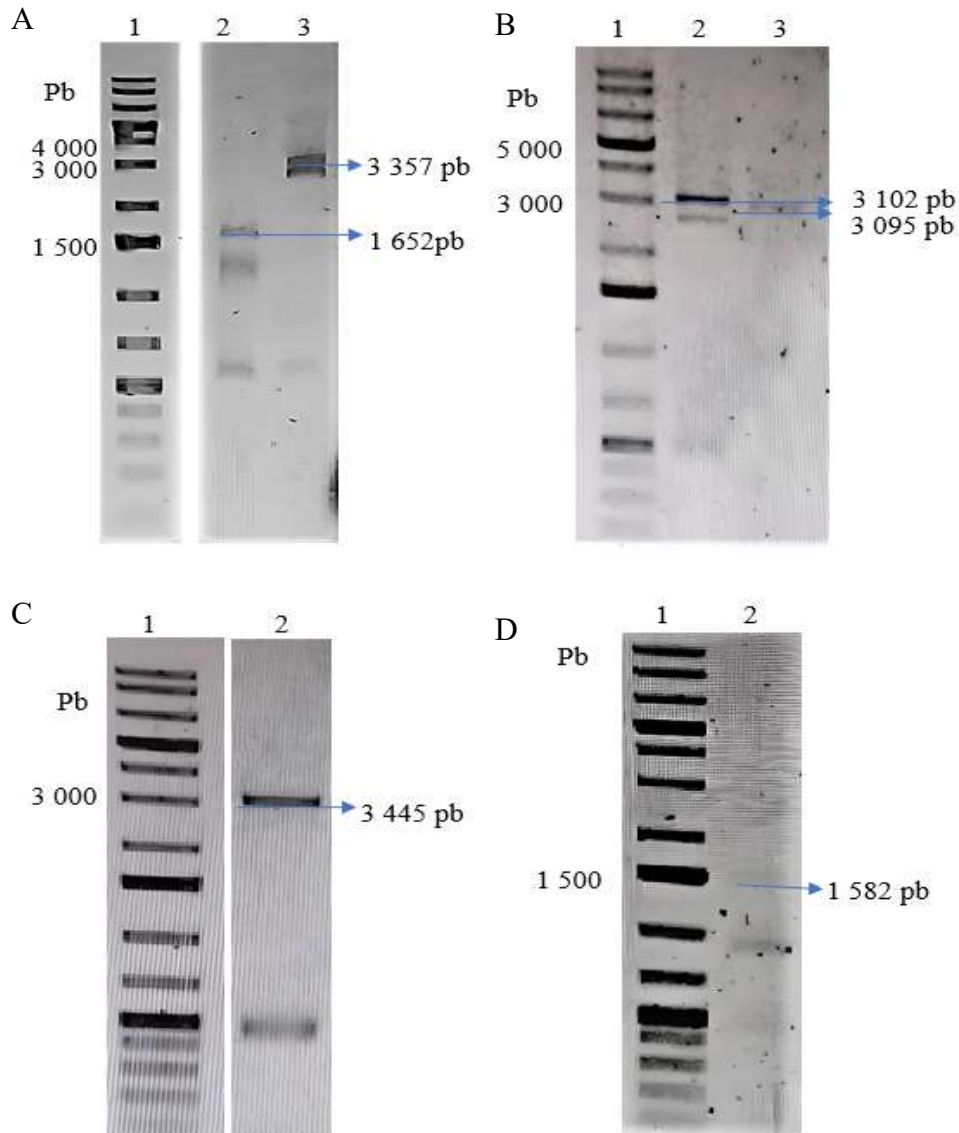


Figura 33. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de los ensambles parciales. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. A. Carril 2. *CYC1T-P_{GAP}*. Carril 3. *P_{GAP}-ropSP6*. B. Carril 2. *ropSP6-AOX1T*. Carril 3. *HIS4-P_{neo}*. C. Carril 2. *AOX1T-HIS4*. D. Carril 2.5'-UTR-*CYC1T-ORI*.

Los ensamblajes parciales de las secuencias *CYC1T-P_{GAP}* y *P_{GAP}-ropSP6* se pueden apreciar en la Figura 33A, en donde el tamaño esperado del ensamblaje parcial es de 1,652 y 3,357 pb respectivamente, sin embargo, en el análisis electroforético también se observan otras bandas correspondientes a los fragmentos residuales.

El tamaño de los ensamblajes parciales de *ropSP6-AOX1T* y *HIS4-P_{neo}* son 3,102 y 3,095 pb, en la Figura 33B en el primer carril se aprecia una banda arriba del tamaño de 3,000 pb, que corresponde al tamaño esperado de *ropSP6-AOX1T*. En el segundo carril respectivo a *HIS4-P_{neo}*, se observa una banda cerca de los 3,000 pb, sin embargo, por la posición no se puede asegurar que sea el ensamblaje parcial puesto que el tamaño de secuencia de *HIS4* es de 2,941 pb.

La Figura 33C muestra el análisis electroforético del ensamblaje parcial *AOX1T-HIS4*, pero las dos bandas que se aprecian son los de los fragmentos no ensamblados, *AOX1T* con aproximadamente 504 pb e *HIS4* con 2,941 pb, por lo tanto, no hubo ensamblaje.

Finalmente, en el ensamblaje parcial de *5'-UTR-CYC1T* se muestra en la Figura 33D en donde el tamaño esperado era de 1,582 pb y cerca de la banda de 1,500 pb del marcador se observa una ligera banda y esta vez no se puede confundir con las bandas de los fragmentos *5'-UTR-AOX1* y *CYC1T* puesto que el tamaño de estos es de 1,078 y 475 pb respectivamente.

Los ensamblajes parciales que aparentemente se obtuvieron con éxito se amplificaron, ya que la concentración obtenida de estos no es suficiente para un ensamblaje por recombinación homóloga.

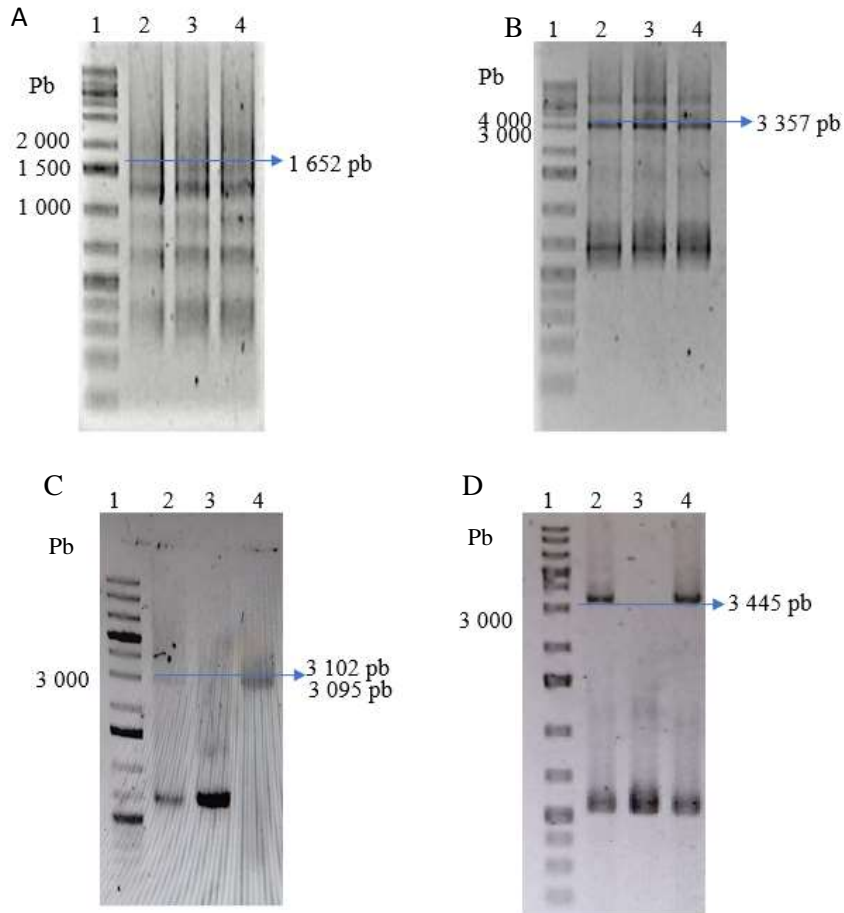


Figura 34. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de amplificaciones de los ensamblajes parciales. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. A. Carriles 2-4. *CYCIT-P_{GAP}*. B. Carriles 2-4. *P_{GAP}-ropSP6*. C. Carriles 2-3 *ropSP6-AOXIT*. Carril 4. *HIS4-P_{neo}*. D. Carriles 2-4. *AOXIT-HIS4*.

El análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de las amplificaciones de los ensamblajes parciales se muestra en la Figura 34, se colocó una flecha azul para indicar en qué tamaño se esperaba ver la banda de la amplificación, sin embargo, en la Figura 34A, B y C no se obtuvo amplificado y en todos se obtienen inespecificidades que incluso están en mayor concentración que la secuencia amplificada.

El ensamblaje por recombinación homóloga fue descartado por la dificultad para obtener los ensamblajes parciales sin inespecificidades.

c. Ensamble por clonación dirigida.

En la Tabla 15, de la sección de métodos, se indicó en qué vector fueron clonados cada uno de los fragmentos, por lo que a continuación se presentan los análisis en gel de agarosa al 0.8% de las extracciones de DNA plasmídico de las clonas.

Las clonas sembradas para la extracción del DNA plasmídico del vector pJET-CYC1T-ORI fueron 17, de las que sólo se obtuvieron cuatro clonas aparentemente positivas (Fig. 35). Mediante amplificación se corroboró la inserción del fragmento CYC1T-ORI y finalmente se determinó que todas las colonias contenían el inserto en la misma orientación con la restricción de las enzimas EcoRV y PstI (Fig. 36).

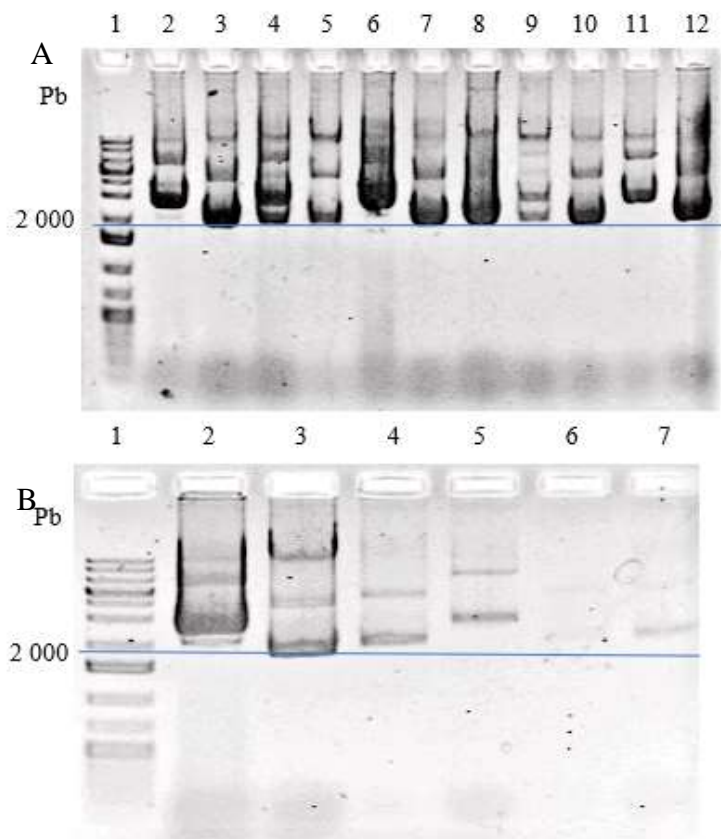


Figura 35. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del DNA plasmídico de pJET-CYC1T-ORI. A. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-

12. DNA plasmídico extraído. B. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-7. DNA plasmídico extraído.

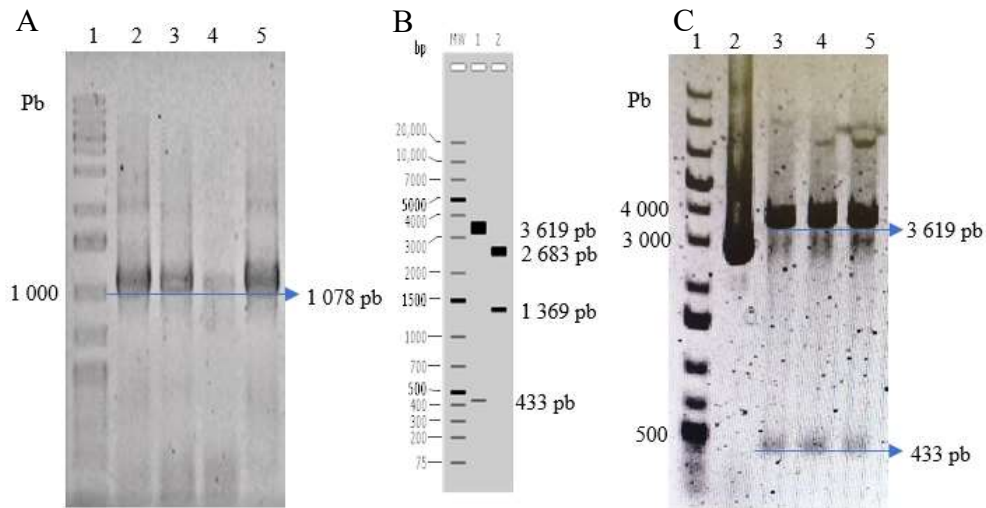


Figura 36. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de: A. Amplificación de CYCIT-ORI. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-5. Amplificación. B. Análisis *in silico* de la verificación de la orientación con las enzimas EcoRV y PstI. C. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carriles 3-5. DNA plasmídico restringido.

El fragmento P_{GAP} fue clonado en pBKSII(+) y se obtuvieron seis clonas aparentemente positivas (Fig. 37), que al corroborar la inserción mediante restricción con las enzimas NotI y HindIII todas resultaron positivas, ya que se obtuvieron las dos bandas esperadas de: 2,912 y 581 pb como se ve en la Figura 38, aunque como se puede ver en dicha imagen no se restringió el DNA por completo. La orientación fue corroborada con la enzima XhoI en las clonas 2, 4 y 7, en donde sólo la colonia 7 estaba en una posición diferente de las otras (Fig. 39).

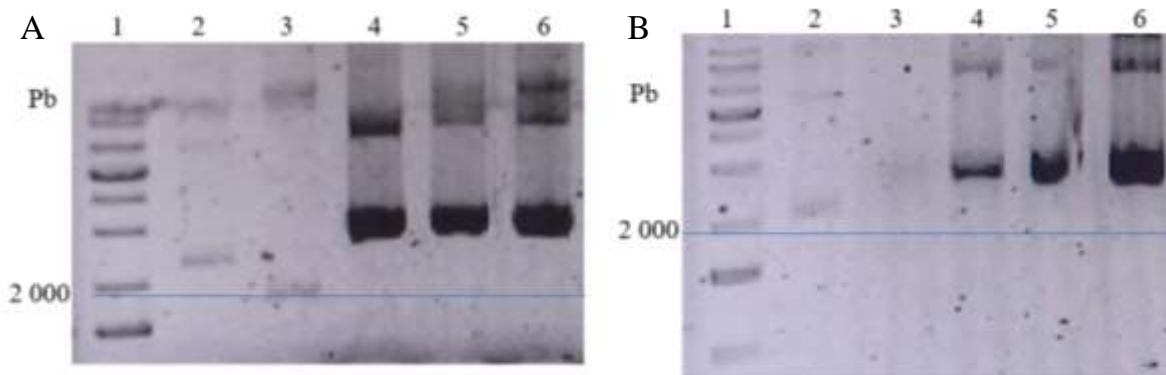


Figura 37. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del DNA plasmídico de pBKS-P_{GAP}. A. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. pBKS. Carriles 3-6. DNA plasmídico extraído. B. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. pBKS. Carriles 3-6. DNA plasmídico extraído.

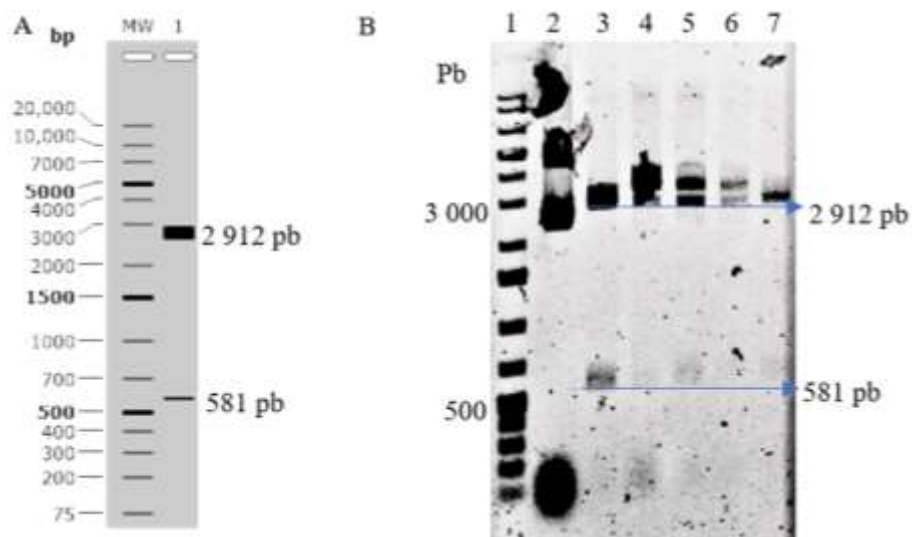


Figura 38. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la restricción del vector pBKS-P_{GAP} con las enzimas NotI y HindIII. A. Análisis *in silico*. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carriles 3-7. DNA plasmídico restringido.

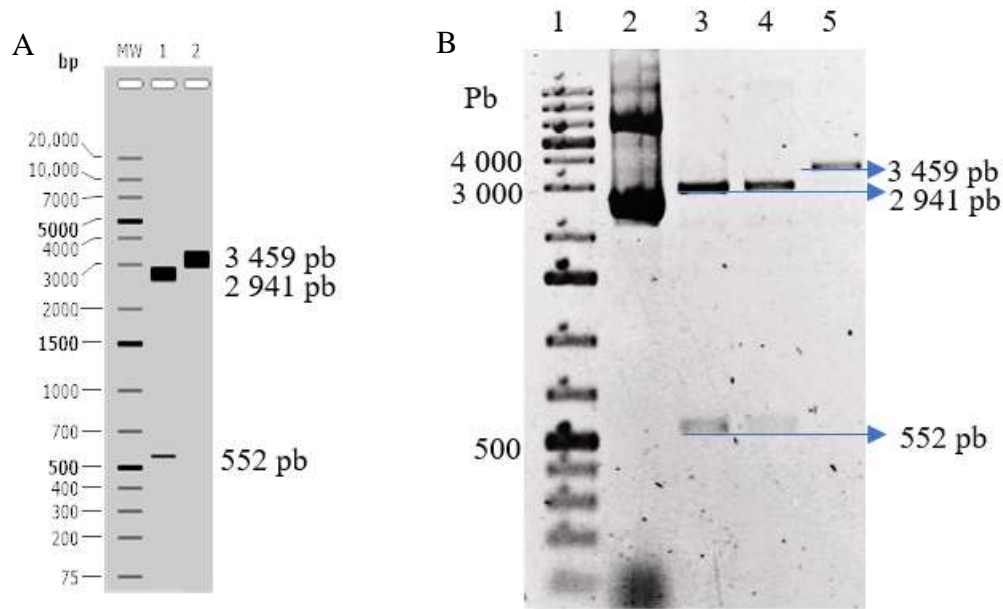


Figura 39. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la restricción del vector pBKS-P_{GAP} con la enzima XhoI. A. Análisis *in silico*. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carriles 3-5. DNA plasmídico restringido.

Para el vector pJET-AOX1T se obtuvieron 13 clonas aparentemente positivas (Fig. 40), de las cuales se analizaron seis liberando el inserto con la enzima BglII confirmando la clonación (Fig.41), y la orientación se verificó con la enzima NotI (Fig.42).

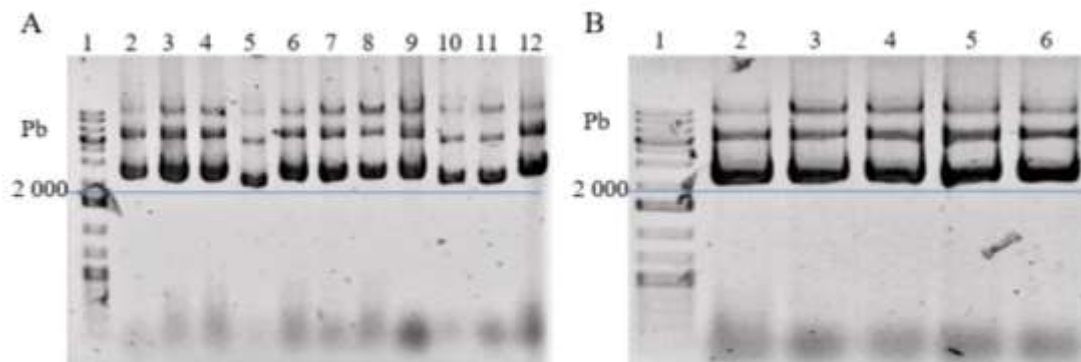


Figura 40. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del DNA plasmídico de pJET- AOX1T. A. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-12. DNA plasmídico extraído. B. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-6. DNA plasmídico extraído.

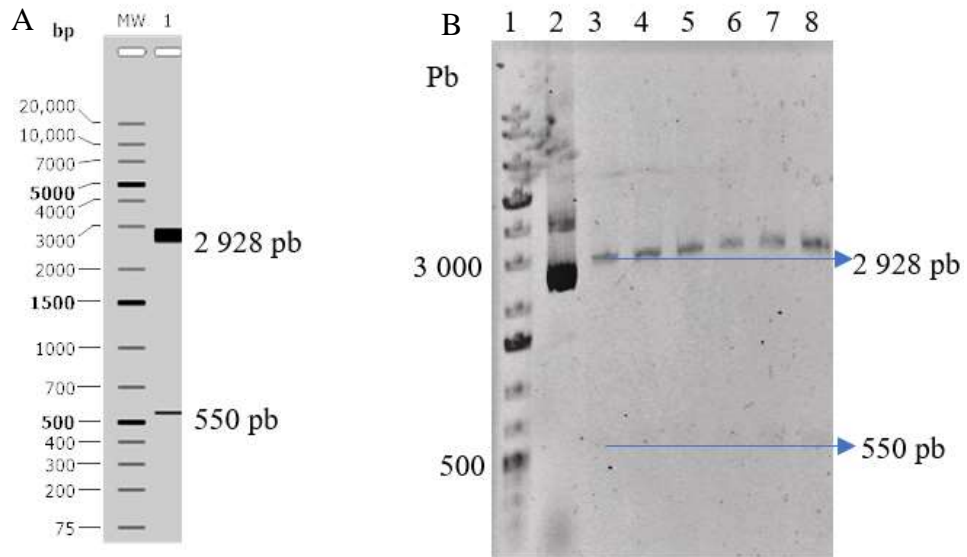


Figura 41. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la restricción del vector pJET- AOX1T con la enzima BglIII. A. Análisis *in silico*. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carriles 3-8. DNA plasmídico restringido.

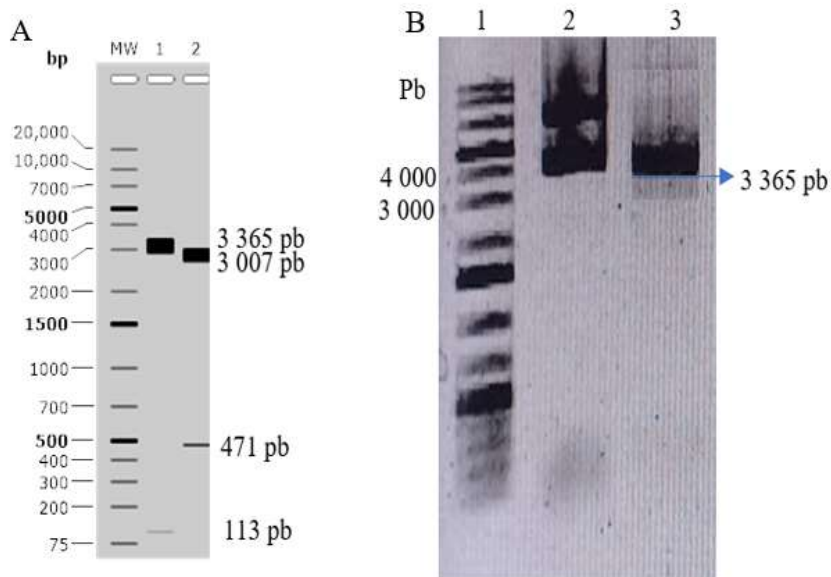


Figura 42. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la restricción del vector pJET- AOX1T con la enzima NotI. A. Análisis *in silico*. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carril 3. DNA plasmídico restringido.

La clonación del fragmento de *HIS4* y *P_{neo-cat}-5'-UTR-AOX1* en el vector pJET1.2/Blunt, dio como resultado 1 y 12 clonas aparentemente positivas respectivamente, el análisis electroforético de la extracción se muestra en la Figura 43 pero el análisis de la comprobación de la clonación se abordará más adelante.

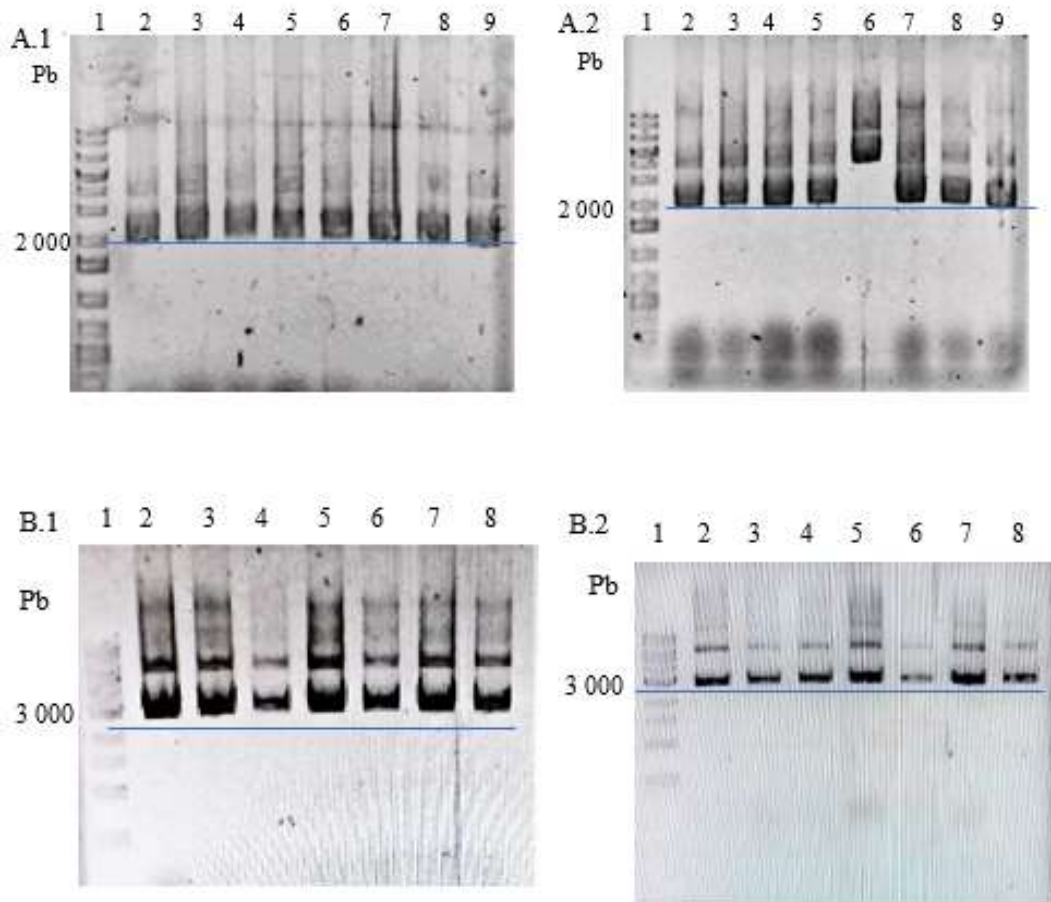


Figura 43. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8 % del DNA extraído de: A. pJET-*HIS4*. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carriles 2-9. DNA plasmídico extraído. B. pJET-*P_{neo-cat}-5'-UTR*. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carriles 2-9. DNA plasmídico extraído.

a) Ensamble y clonación de pGAP-ropSP6-AOX1T

El ensamble de los fragmentos P_{GAP}, *ropSP6* y AOX1T se hizo como se muestra en la Figura 44.

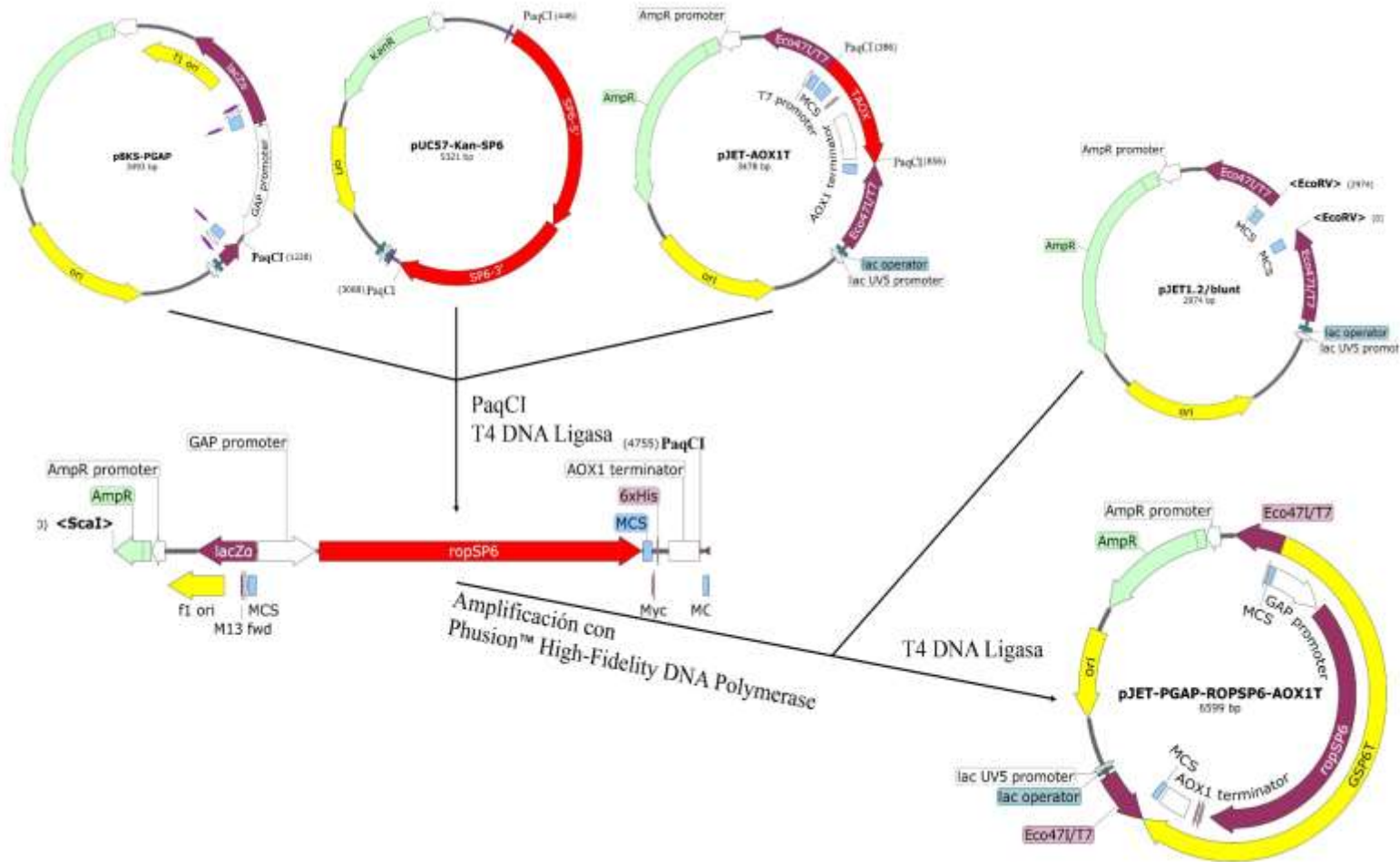


Figura 44. Esquema del ensamble de PGAP, *ropSP6* y AOX1T y su clonación en pJET1.2/Blunt.

El análisis en gel de agarosa al 0.8% del ensamble de P_{GAP} , *ropSP6* y AOX1T (cada uno se encuentra en vectores diferentes) se presenta en la Figura 45A, en donde podemos observar una banda en el tamaño aproximado de 3,761 pb, que es el tamaño esperado al unir los tres fragmentos. Sin embargo, también se aprecian bandas de mayor tamaño, que corresponden al DNA plasmídico que no se ensambló y que se pudo ligar entre sí.

La amplificación del ensamble de P_{GAP} -*ropSP6*-AOX1T se hizo con una polimerasa de alta fidelidad para poder hacer la clonación en el vector pJET1.2/Blunt, el análisis electroforético de dicha amplificación se puede apreciar en la Figura 45B en donde se obtuvo una banda en 3,761 pb que corresponde al tamaño del ensamble.

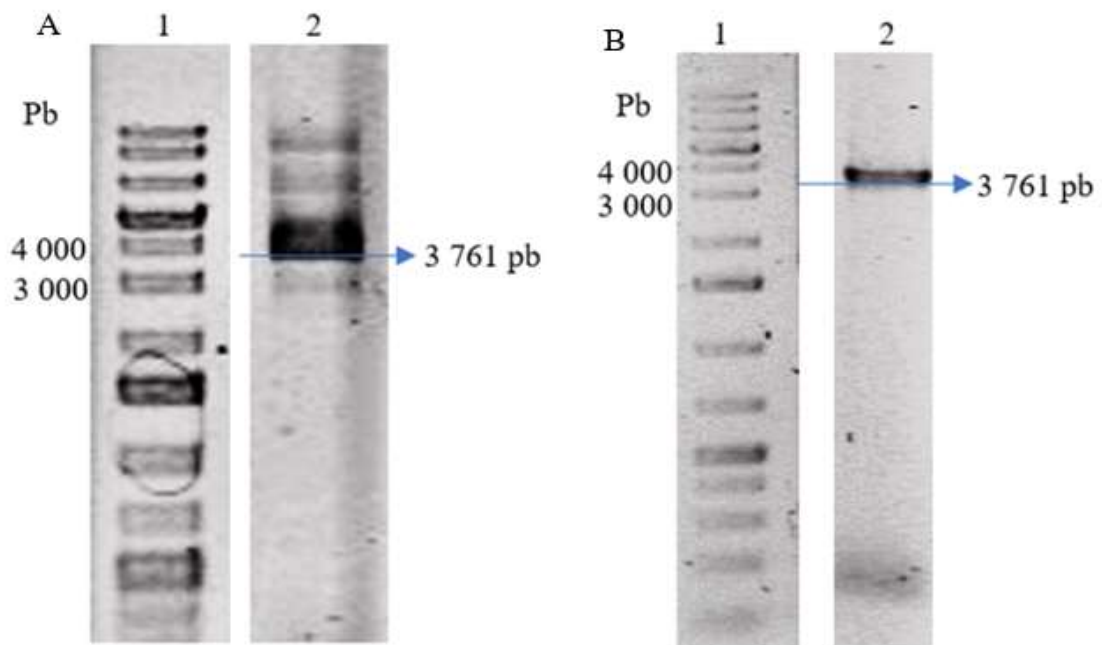


Figura 45. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de: A. Ensamble de P_{GAP} -*ropSP6*-AOX1T. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. Ensamble. B. Amplificación del ensamble. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. Amplificación.

En la clonación de pJET- P_{GAP}-ropSP6-AOX1T se sembraron 20 colonias, de las cuales la mitad fueron aparentemente positivas, como se muestra en la Figura 46, el análisis de estas colonias se presenta en la siguiente sección.

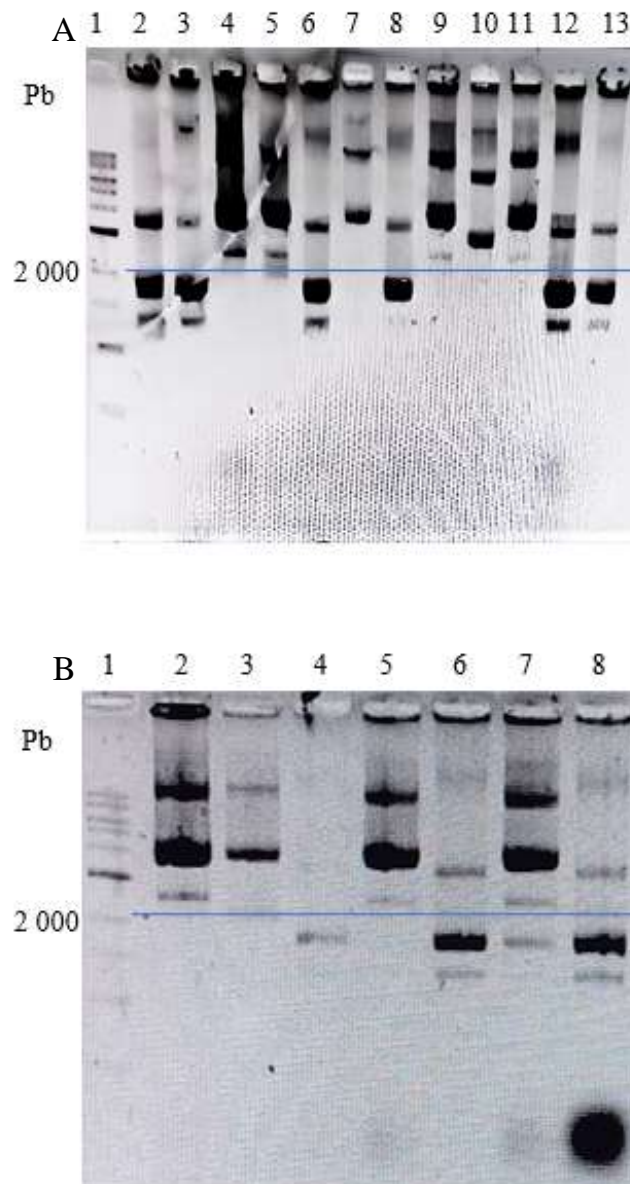


Figura 46. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del DNA plasmídico de pJET- P_{GAP}-ropSP6-AOX1T. A. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carriles 2-13. DNA plasmídico extraído. B. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carriles 2-8. DNA plasmídico extraído.

i. Ensamble de pJET-CYC1TORI-GUS

El ensamble del gen *uidA* al vector pJET-CYC1T-ORI se hizo como se muestra en la Figura 47.

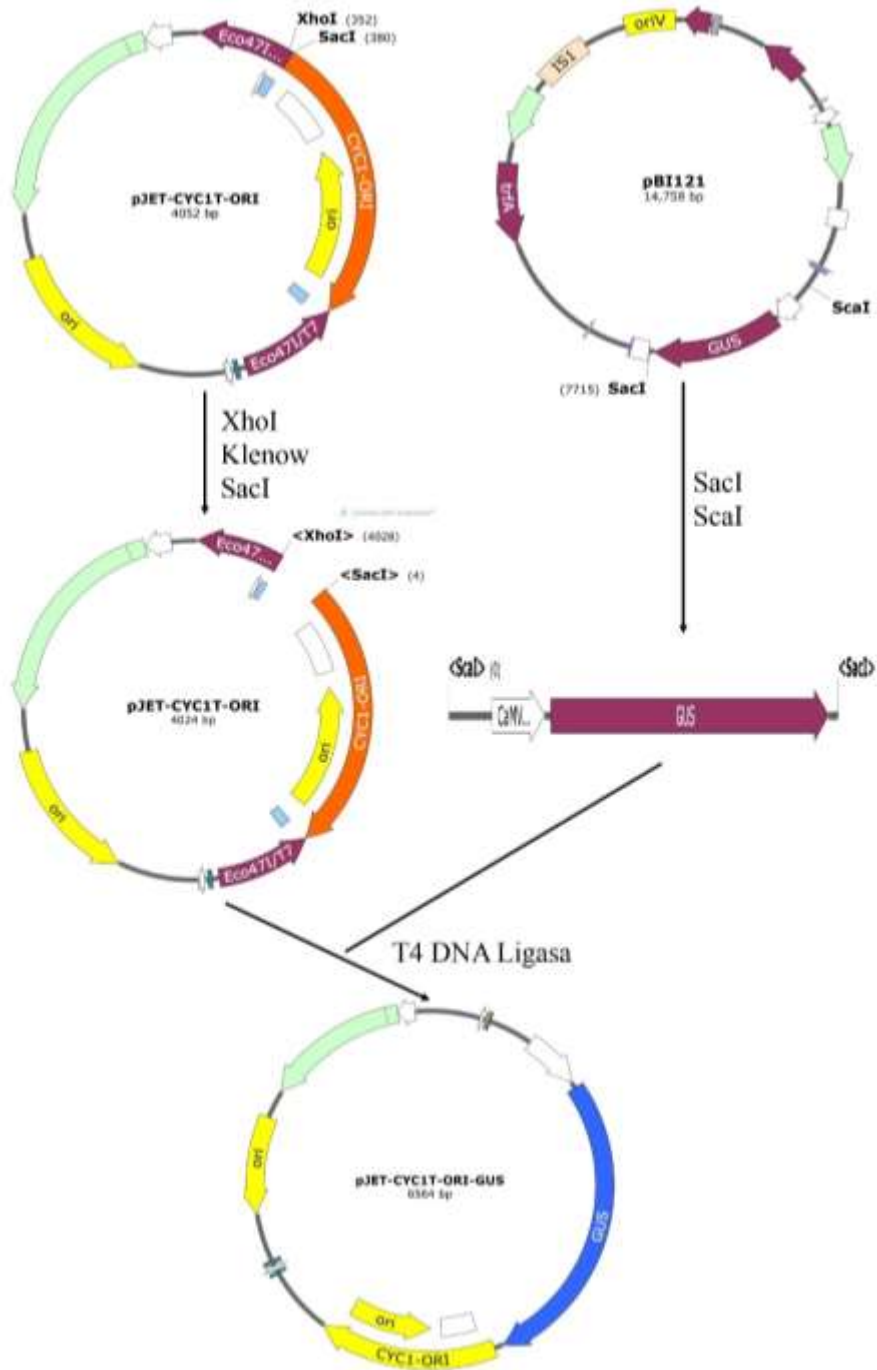


Figura 47. Esquema de ensamble del vector pJET-CYC1T-ORI-GUS.

El análisis electroforético de las restricciones de los vectores pJET-CYC1T-ORI y pBI121 que se utilizaron para el ensamble se muestran en la Figura 48, en la que podemos observar que el vector pJET-CYC1T-ORI no se restringió por completo, mientras que se aprecia en pBI121 la banda del fragmento de interés liberado de 2,536 pb.

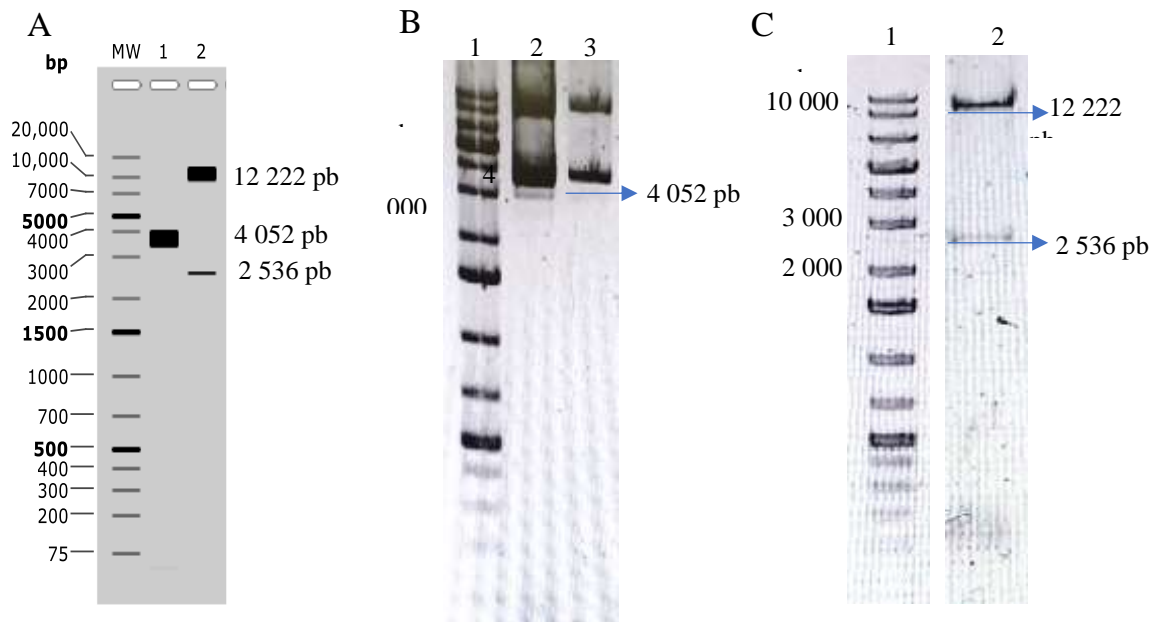


Figura 48. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de las restricciones de los vectores pJET-CYC1T-ORI y pBI121. A. Análisis *in silico*. B. Restricción de pJET-CYC1T-ORI con las enzimas *SacI* y *XhoI* rellenado. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico restringido. C. Restricción de pBI121 con las enzimas *SacI* y *ScaI*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico restringido.

La transformación del ensamble de pJET-CYC1T-ORI-GUS dio como resultado dos clonas de las cuales se extrajo el DNA plasmídico, donde aparentemente las dos contenían el inserto, ya que se éstas presentaron una modificación en el patrón de corrimiento con respecto al vector pJET-CYC1T-ORI como se puede ver en la Figura 49, donde el carril 2 es el vector vacío y los carriles 4 y 5 son el DNA plasmídico de las clonas aparentemente positivas.

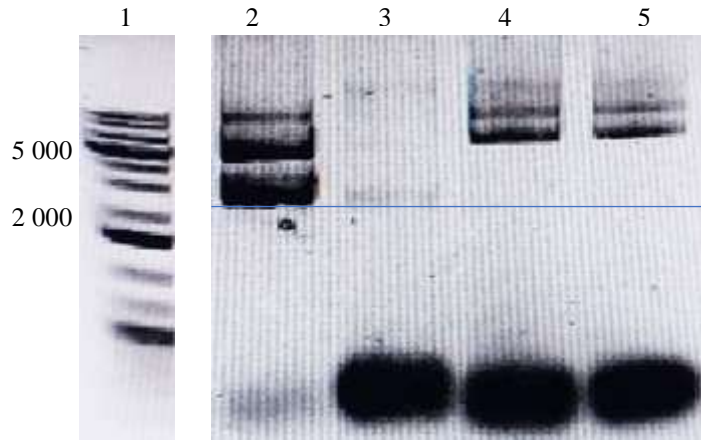


Figura 49. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del DNA plasmídico de pJET-CYCIT-ORI-GUS. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. pJET-CYCIT-ORI. Carriles 4-5. DNA plasmídico extraído.

El análisis de restricción con la enzima SacI debía linealizar el vector obteniendo una banda de 6,564 pb, sin embargo, al hacer el seguimiento en gel de agarosa al 0.8% (Fig. 50B) podemos observar que se liberó una banda en el tamaño de 2,500 pb. El análisis se complementó con otra restricción con SacI y SmaI que liberó el fragmento (Fig. 50B), en donde los tamaños obtenidos de banda coincidieron con los esperados. Por lo tanto, se concluyó que el fragmento se había insertado dos veces.

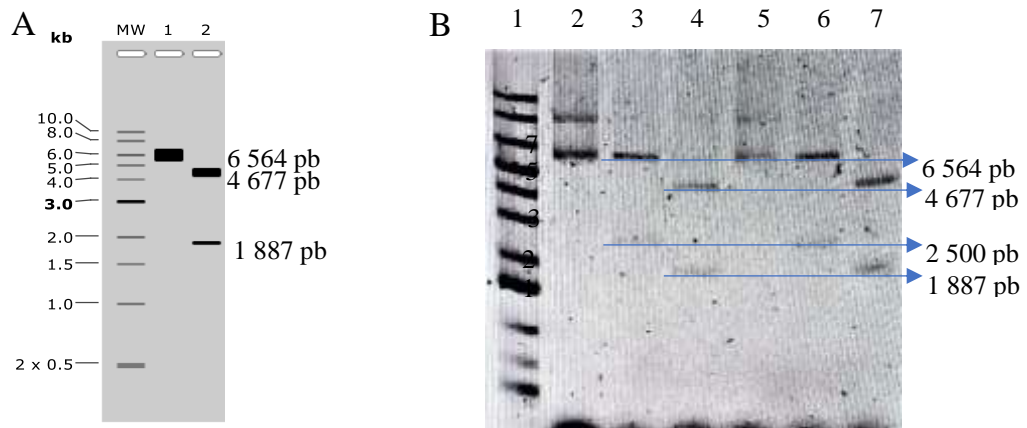


Figura 50. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la verificación de la construcción pJET-CYCIT-ORI-GUS. A. Análisis *in silico*. Carril 1. Linealización con SacI. Carril 2. Restricción con SmaI y SacI. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2 y 5. DNA sin restringir. Carriles 3 y 6. Linealización con SacI. Carriles 4 y 7. Restricción con SmaI y SacI.

La religación y clonación del ensamble con un único fragmento del gen *uidA* dio seis clonas positivas (Fig. 51), cuyo análisis de restricción será descrito en la siguiente sección.

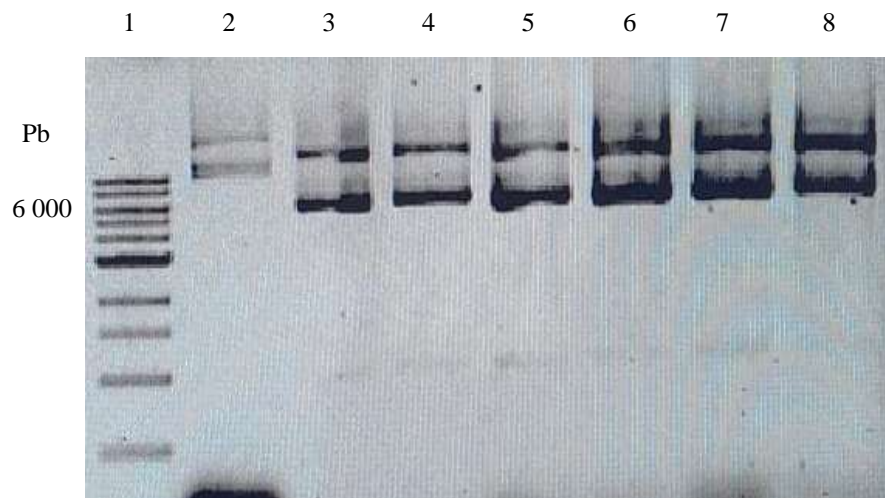


Figura 51. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la extracción del DNA plasmídico de pJET-CYC1T-ORI-GUS. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carril 2. pJET-CYC1T-ORI-GUS. Carriles 3-8. DNA plasmídico extraído.

- 6) Análisis de restricción de: pJET-P_{GAP}-*ropSP6*-AOX1T, pJET-*HIS4*, pJET-P_{neo-cat}-5'-UTR y pJET-CYC1T-ORI-GUS.

El análisis de restricción del vector pJET-P_{GAP}-*ropSP6*-AOX1T se muestra en la Figura 52, en la linealización con la enzima XbaI se esperaba obtener una banda de 6,599 pb que coincide con lo obtenido. En la liberación de fragmento con SmaI se obtuvo una banda de 4,218 pb que corresponde a P_{GAP}-*ropSP6*-AOX1T y otra banda de 2,381 pb que es el resto del vector pJET. Finalmente, la verificación de la orientación se hizo con la enzima NcoI y se obtuvieron las dos orientaciones en las clonas extraídas.

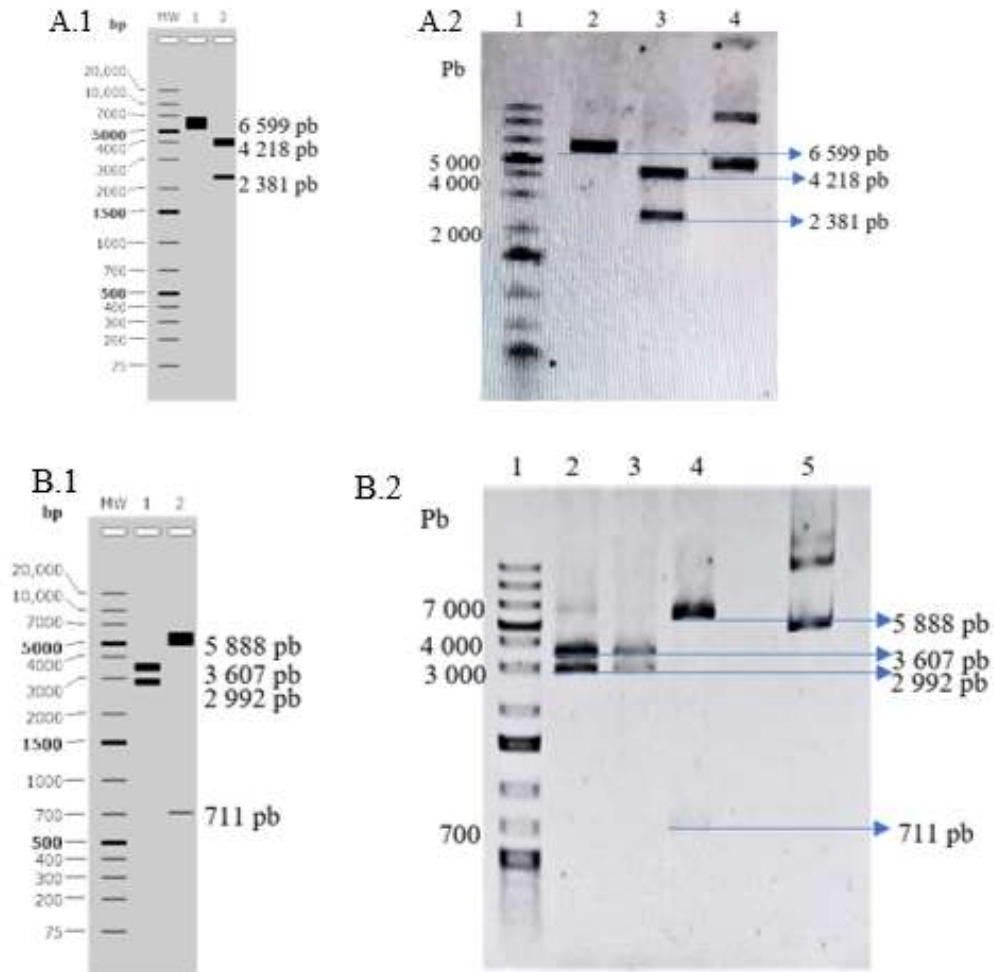


Figura 52. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la verificación de la clonación de $P_{GAP-ropSP6}$ -AOX1T en pJET. A. Linealización con XbaI y liberación de banda con SmaI. A.1 Análisis *in silico*. A.2 Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. Linealización. Carril 3. Liberación. Carril 4. DNA plasmídico sin restringir. B. Verificación de la orientación con NcoI. B.1 Análisis *in silico*. B.2 Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carriles 2-4 DNA plasmídico restringido. Carril 5. DNA plasmídico sin restringir.

El análisis del DNA extraído de la única clona positiva de la construcción de pJET-HIS4 se muestra en la Figura 43A.1 y 43A.2. Primero, se hizo la linealización con la enzima SalI donde el tamaño de banda esperado era de 5,915 pb, lo cual coincidió con la banda obtenida (Fig.53A.2). Además, en la liberación de fragmento se obtuvieron las dos bandas esperadas: una de 3,534 pb, que corresponde al inserto y otra de 2,381 pb que es lo que resta de pJET (Fig.53A.1 y 53A.3). En la Figura 53B se observan los resultados de verificar la orientación de esta clona, que fue determinada

con la enzima BsaI, y se obtuvo en la orientación de 5' a 3' (el mapa se encuentra en el Anexo 5).

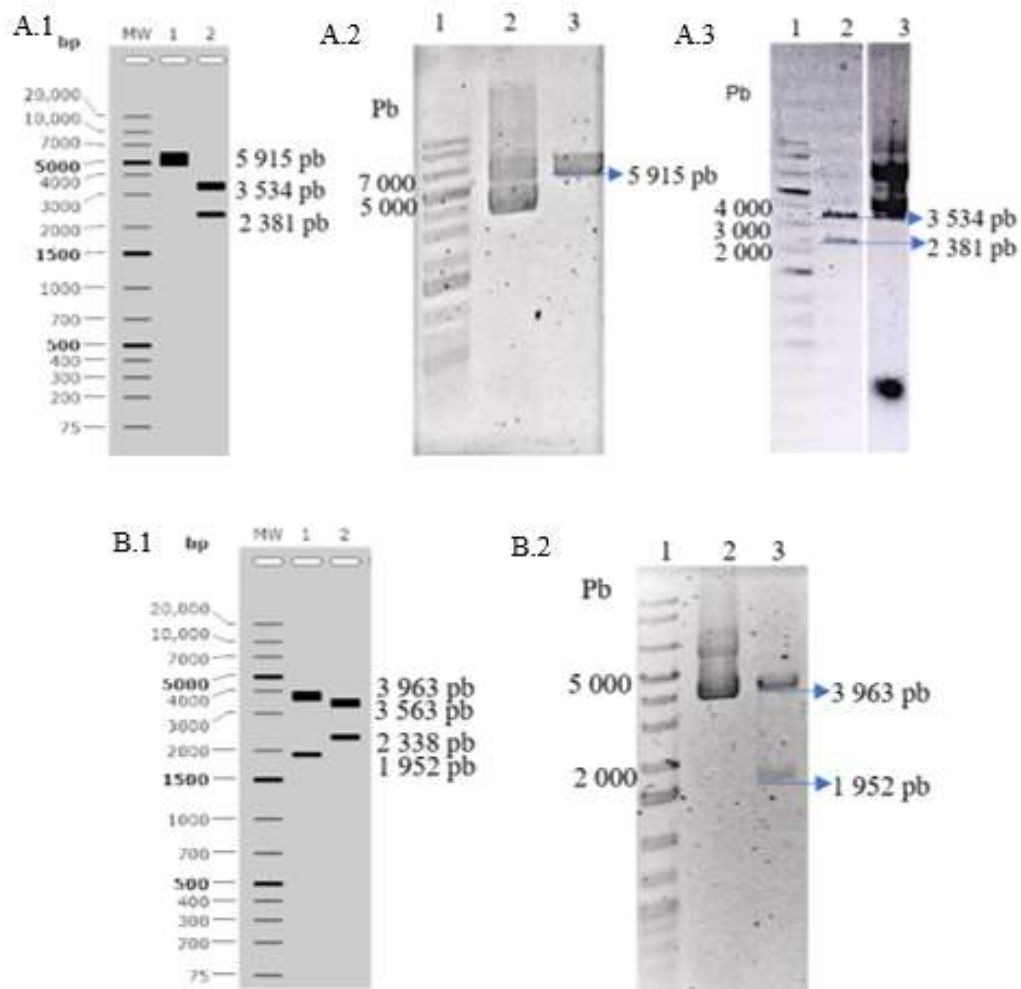


Figura 53. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la verificación de la clonación de *HIS4* en pJET. A. Linealización con *SalI* y liberación de banda con *SwaI*. A.1 Análisis *in silico*. A.2. Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carril 3. Linealización. A.3. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. Liberación de banda. Carril 3. DNA plasmídico sin restringir. B. Verificación de la orientación con *BsaI*. B.1 Análisis *in silico*. B.2 Análisis *in vitro*. Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carril 3. DNA plasmídico restringido.

La clonación de *P_{neo-cat}-5'-UTR* en pJET fue verificada mediante restricciones (Figura 54) como se mencionó en el apartado anterior de métodos. El resultado de la linealización con *BamHI* coincidió con lo esperado en el análisis *in silico*, que era una

banda de 4,386 pb, mientras que en la liberación de fragmento con la enzima *SwaI*, se obtuvieron las dos bandas del inserto (2,005 pb) y del resto del vector pJET (2,381 pb). En este caso todas las clonas se encontraban en una misma orientación denominada de 3' a 5' (consultar el mapa en el Anexo 5).

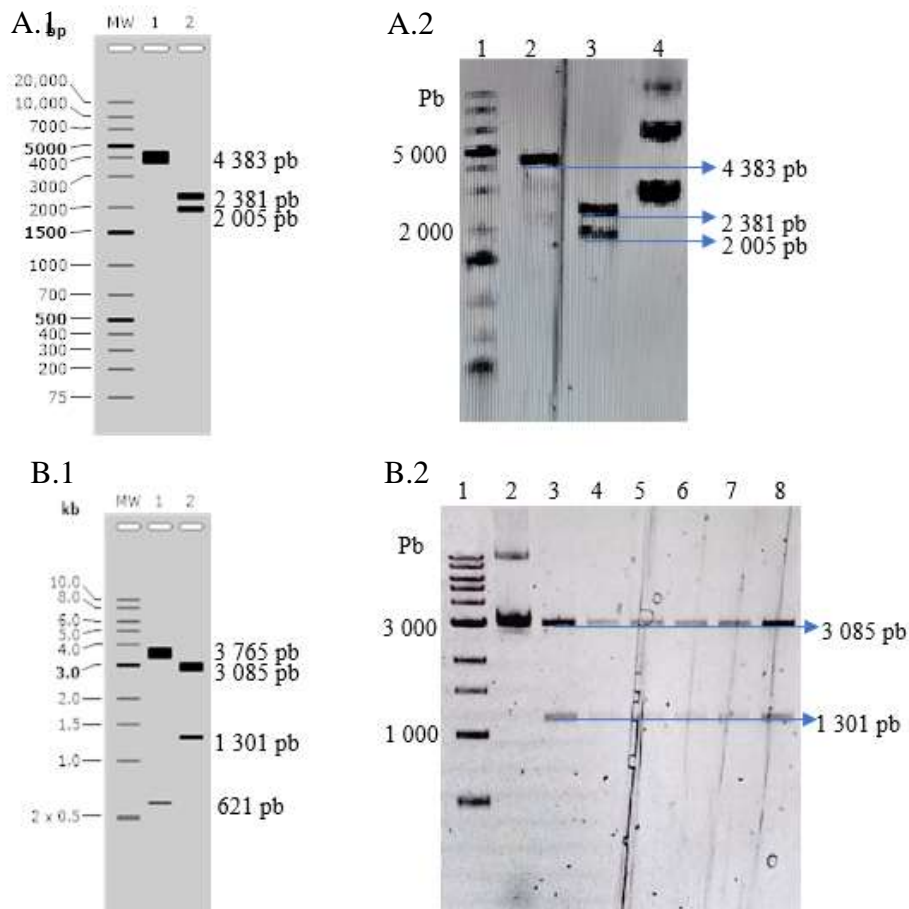


Figura 54. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la verificación de la clonación de *P_{neo}-cat-5'-UTR* en pJET. A. Linealización con *Bam*HI y liberación de banda con *Swa*I. A.1 Análisis *in silico*. A.2. Análisis *in vitro* Carril 1. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2. Linealización. Carril 3. Liberación de banda. B. Verificación de la orientación con *Hind*III. B.1 Análisis *in silico*. B.2 Análisis *in vitro*. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carril 2. DNA plasmídico sin restringir. Carriles 3-8. DNA plasmídico restringido.

Finalmente, el análisis de restricción del vector pJET-CYC1T-ORI-GUS (Fig.55) se hizo mediante la liberación de fragmento completo (CYC1T-ORI-GUS)

con la enzima XbaI donde la banda correspondiente a esta secuencia era de 2,975 pb, lo cual coincide con lo obtenido. Mientras que la linealización del vector, que se hizo con la enzima SmaI, dio una banda de 6,564 pb que era lo esperado.

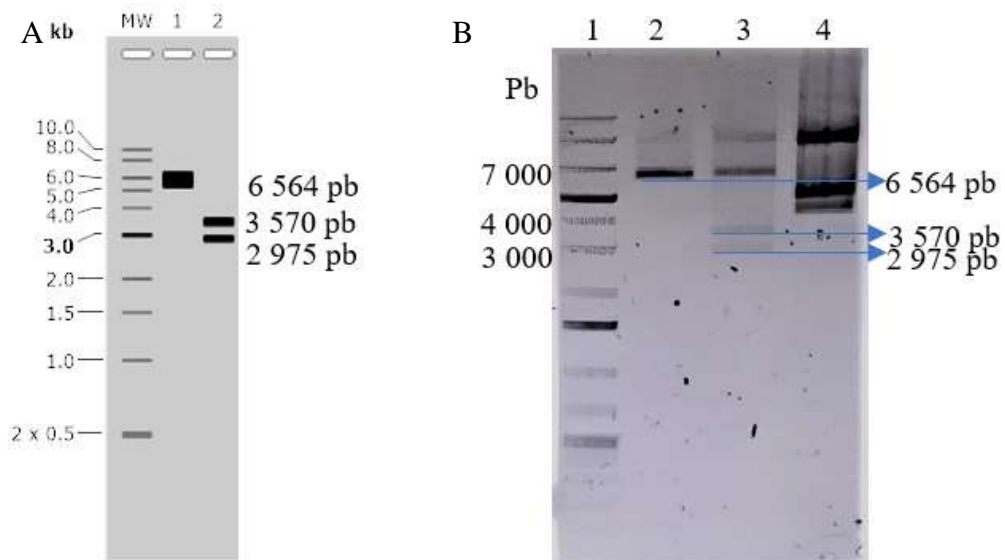


Figura 55. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de la verificación de la clonación de GUS en pJET-CYC1T-ORI. A. Análisis *in silico* de linealización con SmaI y liberación de banda con XbaI. B. Análisis *in vitro*. Carril 1. 1 kb DNA Ladder. Carril 2. Linealización. Carril 3. Liberación de banda. Carril 4. DNA plasmídico sin restringir.

Conclusiones

- Los fragmentos no se lograron unir en un solo paso mediante ensamble tipo Golden Gate con la enzima PaqCI.
- Los fragmentos: P_{GAP} , AOX1T, *HIS4* y CYC1T-ORI, fueron amplificados y clonados en el vector pJET1.2/Blunt y pBluescript.
- La secuencia de la RNA polimerasa de SP6, optimizada con uso de codones para *P. pastoris*, se unió mediante Polimerización Azarosa de Fragmento con la enzima BsaI.
- Los módulos $P_{GAP-ropSP6-AOX1}$ y $P_{neo-cat-5'-UTR}$ fueron ensamblados mediante ensamble tipo Golden Gate a partir de los fragmentos clonados en vector.
- El gen *uidA* se unió a la secuencia del terminador del CYC1T, en el vector pJET-CYC1T-ORI, mediante los sitios de restricción de SacI, ScaI y XhoI rellenado
- Las nueve secuencias que conforman al vector pGAP-ropSP6-GUS se unieron en cuatro vectores cuya identidad fue corroborada.

Perspectivas

En el proyecto no se cumplió con el objetivo general debido a problemas de tiempo y técnicos, por lo que se propone la siguiente estrategia para terminar de ensamblar el vector y poder evaluar la hipótesis que se planteó.

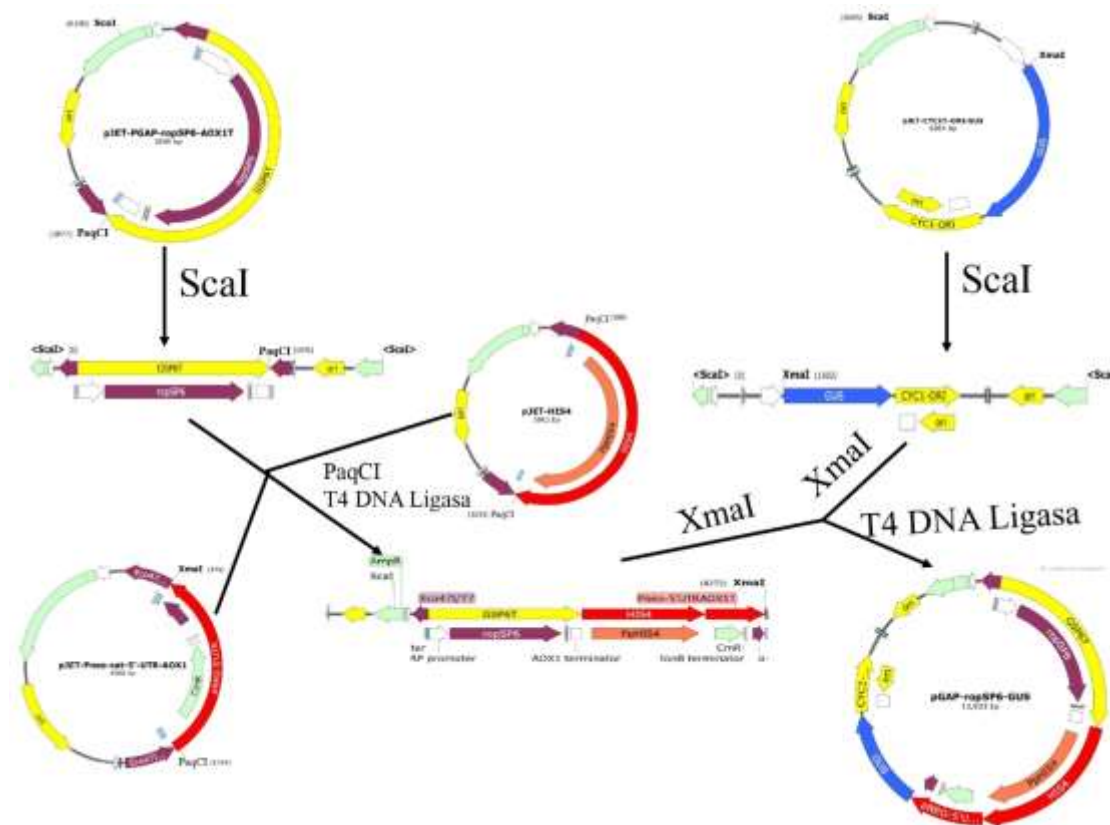


Figura 56. Esquema de ensamblaje de pGAP-ropSP6-GUS.

Restringir con la enzima ScaI los vectores pJET-P_{GAP-ropSP6-AOX1T} en la orientación 5'-3' (para ver los mapas consulte el Anexo 5) e inactivar la enzima.

Posteriormente los vectores pJET-P_{GAP-ropSP6-AOX1T} (restringido con ScaI) pJET-HIS4 y pJET-P_{neo-cat-5'-UTR}, se colocan en una reacción del tipo Golden Gate con la enzimas PaqCI y T4 DNA ligasa, para que el producto sea el ensamblaje de la secuencia P_{GAP-ropSP6-AOX1T-HIS4-Pneo-cat-5'-UTR} con vector pJET residual a los extremos y finalmente restringir esta construcción con la enzima XmaI.

El vector pJET-CYC1T-ORI-GUS también se restringe con las enzimas ScaI y XmaI y se liga al ensamble resultante del Golden Gate y restringido con XmaI.

Esta mezcla de reacción se transforma en células competentes, para después extraer DNA plasmídico y verificar mediante restricción la identidad del vector obtenido. Con el vector identificado se transforma a *P. pastoris* y se siembra en placas de YNB (medio base nitrógeno) suplementado con X-Gluc para evaluar la actividad de la β -glucuronidasa, ya que si la cepa modificada presenta una coloración azul, la RNA polimerasa de SP6 aparentemente se produce y funciona.

Referencias

- Barbay, D. (2019). *Characterization of transcriptional regulatory proteins in Pichia pastoris*.
- Butler, E. T., & Chamberlins, M. J. (1982). Bacteriophage SP6-specific RNA Polymerase I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 257(10), 5772–5778.
- Choi, K. H. (1989). Viral Molecular Machines. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9>
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (2nd ed.). Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9904/>
- Cramer, P., Armache, K. J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G. E., Dengl, S., Geiger, S. R., Jasiak, A. J., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C. D., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, J. F., & Vannini, A. (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. In *Annual Review of Biophysics* (Vol. 37, pp. 337–352). <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.130008>
- De Schutter, K., Lin, Y. C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van De Peer, Y., & Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27(6), 561–566. <https://doi.org/10.1038/nbt.1544>
- Delarue, M., Poche, O., Tordo, N., Moras, D., & Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Engineering, Design and Selection*, 3(6), 461–467. <https://doi.org/10.1093/protein/3.6.461>
- Drouin, G., & Carter, R. (2010). Evolution of Eukaryotic RNA Polymerases. *Encyclopedia of Life Sciences, September*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022872>
- Ferenc, M. (14 de Noviembre de 2017). *addgene*. Obtenido de addgene Blog: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-common-lab-e-coli-strains>
- Fickers, P. (2014). *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2(3), 354–363. <http://crmb.aizeonpublishers.net/content/2014/3/crmb354-363.pdf>
- Hartl, D. L. U. (2009). Genetics, Genomics. In *Elsevier Inc.* (7th ed.).
- Kane, C. (2013). Transcription. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Vol. 4, Issue c, pp. 85–92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01551-5>

- Kassavetis, G. A., Butler, E. T., Roulland, D., & Chamberlin, M. J. (1982). Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. II. Mapping of SP6 DNA and selective in vitro transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5779–5788. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83847-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83847-4)
- Lambris, J. D. (2012). Advances in Experimental Medicine and Biology. Viral Molecular Machines. In M. G. Rossmann & V. B. Rao (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (1 st, Vol. 726). <https://doi.org/978-1-4614-0979-3>
- Levy, A. R. R. A., Rojas-villarraga, A., & Levy, R. A. (2000). Cancer and Autoimmunity. In *Cancer and Autoimmunity*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-50331-2.x5000-0>
- Mahran, E., Keusgen, M., & Morlock, G. E. (2020). New planar assay for streamlined detection and quantification of β -glucuronidase inhibitors applied to botanical extracts. *Analytica Chimica Acta: X*, 4, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.acax.2020.100039>
- Narlikar, L., & Ovcharenko, I. (2009). Identifying regulatory elements in eukaryotic genomes. In *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (Vol. 8, Issue 4, pp. 215–230). <https://doi.org/10.1093/bfpg/elp014>
- Parker, J. (2006). RNA Polymerase. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 1746–1747. <https://doi.org/10.1002/0470862106.id708>
- Pugachev, K. v., Guirakhoo, F., Ocran, S. W., Mitchell, F., Parsons, M., Penal, C., Girakhoo, S., Pougatcheva, S. O., Arroyo, J., Trent, D. W., & Monath, T. P. (2004). High Fidelity of Yellow Fever Virus RNA Polymerase. *Journal of Virology*, 78(2), 1032–1038. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.1032-1038.2004>
- Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, R., & Fando-Calzada, K. (2016). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(2), 67–77.
- Sutherland, C., & Murakami, K. S. (2018). An Introduction to the Structure and Function of the Catalytic Core Enzyme of Escherichia coli RNA Polymerase. *EcoSal Plus*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0004-2018>
- Werner, F. (2007). Structure and function of archaeal RNA polymerases. *Molecular Microbiology*, 65(6), 1395–1404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05876.x>

Anexos.

Anexo 1: Medios de cultivo.

i. Medio Luria-Bertani (LB)

Rehidratar 6.25 g de medio LB Broth Miller (Sigma, 25g/l) en 250 ml de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

ii. Medio agar LB

Rehidratar 10 g de medio LB Agar Miller (Sigma, 40 g/l) en 250 ml de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 min, posteriormente vaciar en cajas Petri.

iii. Medio Extracto de levadura peptona dextrosa (YPD)

Para 250 ml de medio pesar 2.5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona y 5 g de glucosa. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

iv. Medio agar YPD

Para 250 ml de medio pesar lo del punto anterior y agregar 5 g de agar. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

v. Medio base nitrógeno (YNB) agar

Rehidratar 1.675 g de medio YNB (Invitrogen), 5 g de dextrosa y 5g de agar en 250 ml de agua destilada. Esterilizar a 121°C durante 15 min, posteriormente vaciar en cajas Petri.

vi. Medio Terrific Broth (TB)

Rehidratar 11.75 g de medio TB (Invitrogen) agregando 1 ml de glicerol para 90 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Para extracción de plásmido a mediana escala adicionar 10 ml de una solución de fosfatos estéril (K_2HPO_4 , 0.17 M + KH_2PO_4 , 0.72 M).

Anexo 2: Reguladores

vii. TAE

Para un litro de solución madre 50 X: 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M.

Anexo 3: Soluciones

i. Cloruro de calcio 0.1 M y glicerol al 15%.

Para 200 ml pesar 2.94 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, agregar 30 ml de glicerol y aforar a 200 ml con agua. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

ii. Regulador de lisis

200 mM Tris-HCl pH 8.5

250 mM NaCl

25 mM EDTA

0.5% SDS

iii. Solución I de Birnboim y Doly (BD)

Tabla 24. Componentes de la solución I de BD.

Solución	Volumen (ml)	Concentración final (mM)
Tris-HCl 1 M pH 8	1.25	25
EDTA 0.25 M	2	10
Glucosa 1 M	2.5	50
Agua destilada c.b.p.	50	

iv. Solución II de Birnboim y Doly

Tabla 25. Componentes de la solución II de BD.

Solución	Volumen (ml)	Concentración final
NaOH 1 N	5	0.2 N
SDS 10%	2.5	1%
Agua destilada c.b.p.	25	

v. Solución III de Birnboim y Doly

Tabla 26. Componentes de la solución III BD.

Solución	Volumen (ml)
Acetato de potasio 5 M	30
Ácido acético glacial	5.75
Agua destilada c.b.p.	50

Anexo 4: Procedimientos

i. Células competentes

Las células competentes de *E. coli* TOP10 se prepararon con cloruro de calcio, todo el proceso se llevó a cabo en esterilidad, con 200 µl de un cultivo de toda la noche se inocularon 20 ml de medio fresco y se incubaron a 37°C con agitación vigorosa durante 90 min o hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 a 600 nm. Pasado ese tiempo, se enfrió rápidamente el cultivo y el medio se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml estériles y fríos. Se centrifugaron por 35 s, se descartó el sobrenadante para agregar 100 µl de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M y glicerol al 15% y se resuspendieron las células. Se centrifugó nuevamente por 25 s, se descartó el sobrenadante y finalmente se resuspendieron en 33 µl de la solución de CaCl₂ y glicerol. Estas células se pueden almacenar a -70°C o utilizarlas directamente para transformación.

ii. Transformación química

A las células competentes se les agregaron de 2 a 3 µl de plásmido mezclando suavemente y se incubaron en hielo por 20 min. Posteriormente se incubó a 42°C durante 1 min y se incubaron nuevamente en hielo por 20 min. Pasado ese tiempo, se añadió 1 ml de medio LB y las células fueron incubadas a 37°C en agitación durante 1 h. Finalmente, se sembraron en placas con medio agar LB con antibiótico, como marcador de selección, que fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Al

propagarse seis diferentes plásmidos fue necesario preparar placas de medio agar LB con diferentes antibióticos, cuya función es de marcador de selección (Tabla 3).

iii. Extracción de DNA genómico de *P. pastoris* X-33

Tres asadas de biomasa obtenida en placa con medio YPD agar, fueron transferidas a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml con 300 µl de regulador de lisis y la biomasa fue triturada con un pistilo estéril. Además, para asegurar el rompimiento de las células se le agregaron perlas de vidrio y se agitó en vórtex (agitador orbital marca Vortex Genie®). Posteriormente se colocó en un baño de etanol 100% a -70°C hasta que se congelara y finalmente se llevó a una incubación a 65°C durante 1 min, para de nuevo agitar en vórtex, esto se hizo cuatro veces.

A las células lisadas se les adicionó 200 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se agitaron en vórtex y se incubaron a -20°C durante 20 min. Pasado ese tiempo, las células se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm, se transfirió el sobrenadante, sin restos de la pastilla, a un nuevo tubo de microcentrífuga en condiciones de esterilidad y se le adicionó un volumen igual al recuperado de etanol al 100 % con el que se mezcló. El sobrenadante se incubó a -20°C por 15 min, se centrifugó 20 min a 10,000 rpm, se decantó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1 ml etanol al 70%, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 10,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se secó la pastilla a 65°C aproximadamente 15 min. La pastilla fue resuspendida en 40 µl de agua destilada estéril a 65°C, y se trató con 1 µl de RNasa (10 mg/ml) incubando a 37°C durante 1 min. Finalmente, se hizo el seguimiento en un gel de agarosa al 0.8%.

iv. Extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep).

La extracción de DNA plasmídico se hizo utilizando una modificación del método de Birnboim y Doly (1979). Por lo que, en una placa con medio selectivo, la cual fue dividida en seis sectores previamente, se sembró una colonia obtenida en la transformación por sector y las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche para

la obtención de biomasa. Se transfirió esta biomasa a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregaron 150 μ l de solución I BD para resuspender completamente en vórtex. De la solución II BD se agregaron 300 μ l y se agitó por inversión, esperando que la solución se ponga transparente para incubar 4 min en hielo. Posteriormente, se agregan 300 μ l de solución III BD, se agitó vigorosamente y se incubó en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a la máxima velocidad, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se mezcló con 700 μ l de isopropanol. Después, se incubó en hielo 20 min, nuevamente se centrifugó a 4°C durante 10 min para remover el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 4°C durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla en un termoblock a 65°C durante 15 min. Se resuspendió en 40 μ l de agua destilada estéril y para ayudar a la resuspensión se incubó a 65°C durante 5 min. Finalmente, se monitorean 2 μ l en gel de agarosa al 0.8% y el resto se almacenó a -20°C.

En los vectores cuyo marcador de selección es zeocina, se utilizó una estrategia diferente ya que en el laboratorio no se cuenta con este antibiótico. Por lo que las células transformadas se cultivaron en medio Terrific Broth (TB) a 37 °C a agitación constante durante 12 h, pasado ese tiempo se agregó cloranfenicol (50 mg/ml) y se incubaron 4 h a las mismas condiciones. Posteriormente, se centrifugaron los medios saturados de biomasa, se hizo un lavado con agua destilada, nuevamente se centrifugaron y se descartó el sobrenadante; con la pastilla resultante se hizo el protocolo de extracción.

En el caso del vector pBI121, las células transformadas fueron proporcionadas en medio sólido, por lo que se tomó con el asa un poco de agar inoculado y se inoculó un matraz de 20 ml de medio LB con Km₅₀, se incubaron a 37 °C con agitación constante toda la noche. Posteriormente con una asada se inoculó una placa con medio agar LB con Km₅₀ incubándola a 37 °C toda la noche, las colonias que crecieron se sembraron en placas con medio selectivo y de éstas se tomó la biomasa para hacer el protocolo de extracción a mediana escala, que se describe a continuación.

v. Extracción de DNA plasmídico a mediana escala (midiprep).

Con las colonias que crecieron en el medio selectivo se inocularon 50 ml de medio TB con Km₅₀ y se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 min en tubos de centrífuga de 50 ml, se descartó el sobrenadante y se agregaron 3 ml de la solución I BD, se resuspendió e incubó en hielo 5 min para posteriormente agregar 6 ml de la solución II BD, se agitó y se volvió a incubar en hielo 4 min. Se agregaron 6 ml de solución III BD, se agitó vigorosamente, se incubó 10 min en hielo y se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos, se mezcló con 12 ml de isopropanol y se incubó 20 min en hielo. Posterior a este tiempo, se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril. El mililitro se repartió en dos tubos para microcentrífuga y a cada tubo se le agregó 10 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), después se agregó 100 µl de acetato de amonio 10 M y 400 µl de fenol y se agitó alternadamente durante 5 min. Posteriormente, se mezcló con 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), de la misma manera se agitó alternadamente durante 5 min para poder centrifugarlo durante 5 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y a éste se le agregó de 1 a 2 volúmenes de éter saturado con agua, el tubo se agitó y se dejó reposar por 30 segundos para la separación de las fases, se retiró el éter y se volvió a agregar éter saturado, este paso se repitió cuatro veces. Pasadas las cuatro repeticiones y se retiró la mayor cantidad de éter, se incubó el tubo abierto a 65°C de 5 a 15 min para remover los restos de este solvente, entonces se mezcló con 500 µl de isopropanol agitando por inversión y se incubó 20 min en hielo.

Los tubos fueron centrifugados a 4°C durante 15 min a 12,000 rpm, el sobrenadante se descartó y se agregó con 1 ml de etanol al 70 %, para de nuevo ser centrifugado 5 min a 12,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se secó a 65°C durante 15 min. Se resuspendió en 200 µl de agua destilada estéril, para ayudar a este proceso se incubó a 65°C durante 2-5 min. Finalmente, se analizaron 2 µl en gel de agarosa al 0.8% y el resto se almacenó a -20°C.

vi. Polimerización Azarosa de Fragmento (PAF).

En esta metodología el plásmido destino y el plásmido que contiene el fragmento de interés se cortan con una enzima cuyo sitio compartan o con enzimas de sitios compatibles, esto permite la formación del Polímero Azaroso de Fragmentos, se inactivan las enzimas y los DNAs se ligan entre sí en condiciones de concentración alta de DNA (1-4 μg en 5 μl de mezcla de ligación para plásmidos de 3 a 7 kb) y el tiempo suficiente para que se forme un PAF. El polímero se corta con la enzima que separará fragmentos de DNA formados por pares de fragmentos ligados (resolución) y se liga nuevamente para la recircularización de los plásmidos, pero en condiciones de concentración baja de DNA (1 μg en 250 μl de mezcla de ligación). Finalmente, sólo si es posible, se cortan los DNA recircularizados con una última enzima de restricción que no corte la construcción deseada, pero sí los fragmentos y replicón no deseados y se transforma la cepa de *E. coli* apropiada.

Anexo 5: Mapas de los plásmidos

Los mapas de los plásmidos utilizados y generados en el desarrollo del proyecto, así como el mencionado en perspectivas a futuro, con los sitios de restricción utilizados, se enlistan a continuación.

Tabla 27. Mapas de los plásmidos utilizados y generados en el desarrollo del proyecto.

