



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

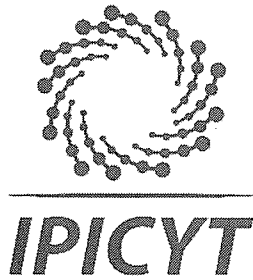
**“Análisis funcional de promotores derivados de
geminivirus en la microalga *Chlamydomonas
reinhardtii*”**

Tesis que presenta
Alejandro Romo Avalos

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Análisis funcional de promotores derivados de geminivirus en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alejandro Romo Avalos** y aprobada el nueve de julio del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Codirector de la tesis

Dr. Angel Gabriel Alpuche Solís
Codirectora de la tesis

Dr. Guillermo Pastor Palacios
Miembro del Comité Tutorial

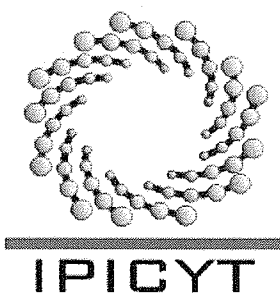
Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Miembro del Comité Tutorial



CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los Doctores Gerardo Rafael Argüello Astorga y Ángel Gabriel Alpuche Solís.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 636063 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., así como el apoyo de los proyectos de investigación: Ciencia Básica CONACYT No. 257528 y No. SEP-S-3711.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 196 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de julio del año 2019, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Fabiola Jaimes Miranda	Presidenta	IPICYT
Dr. Guillermo Pastor Palacios	Secretario	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Sinodal	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Alejandro Romo Avalos

sobre la Tesis intitulada:

Análisis funcional de promotores derivados de geminivirus en la microalga Chlamydomonas reinhardtii

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

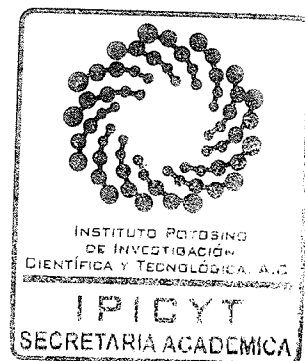
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de julio de 2019.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIAS

A mi madre y padre, los amo.

¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por la beca y apoyo brindado.

Al IPICYT, A.C. por las instalaciones y equipo facilitado en el desarrollo de esta tesis.

A los Doctores Gerardo Rafael Argüello Astorga y Ángel Gabriel Alpuche Solís por sus consejos, dirección y paciencia en este viaje llamado ciencia.

A mi comité tutorial, la Dra. Fabiola Jaimes Miranda y al Dr. Guillermo Pastor Palacios por esas charlas tan productivas y apoyo en la culminación de este gran proyecto.

A la Dra. Ruth Soria, por su apoyo incondicional, material y enseñanzas en este mundo de microalgas.

A cada uno de mis maestros, que con profesionalismo y entrega dieron lo mejor de sí para que obtuviera una formación de calidad.

A Karen Lizbeth Reyes Barrera y Jesús Aarón Avalos Calleros, por realizar con entusiasmo, alegría y compromiso su papel de padres de la ciencia en mi estancia de posgrado.

A Rosy y Salvador por estar siempre dispuestos a brindarme su ayuda.

A mis compañeros del laboratorio de biología molecular de plantas, que sin ellos la carga laboral sería más pesada.

A la Sra. Rosita, quien siempre alegra los días con su presencia y buen trabajo.

A mis amigos, que siempre me apoyaron en los momentos más difíciles y estresantes de esta etapa de mi vida profesional.

A ti, por todo.

CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Uso de organismos fotosintéticos para la producción de proteínas recombinantes	1
I.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2
I.2.1 Clasificación y morfología	2
I.2.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> como plataforma para la producción de proteínas de interés farmacéutico	4
I.3 Herramientas para la expresión mejorada de transgenes en <i>Chlamydomonas</i>	4
I.4 Familia <i>Geminiviridae</i>	6
I.4.1 Características generales de la familia <i>Geminiviridae</i>	6
I.4.2 Características generales de los Begomovirus	7
I.4.3 Replicación de los begomovirus	8
I.5 Vectores geminivirales como sistema de expresión génica en microalgas	11
I.5.1 Estudio de la actividad funcional de los promotores geminivirales	12
II. HIPÓTESIS	14

III.	OBJETIVOS	14
III.1	OBJETIVO GENERAL	14
III.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
IV.1	Cepas	15
IV.2	Plásmidos	15
IV.3	Enzimas de modificación	15
IV.4	Clonación de promotores begomovirales en vector de expresión pBI121	15
IV.5	Clonación de los genes reporteros GFP y GUS en el vector de expresión pChlamy_1	16
IV.6	Transformación nuclear de <i>Chlamydomonas</i> mediada por <i>Agrobacterium</i>	20
IV.7	Confirmación de líneas transgénicas por PCR	21
IV.8	Detección de la expresión de GFP por microscopía confocal	22
IV.9	Ensayo de actividad de GUS dirigida por promotores virales	22
IV.10	Extracción de proteína soluble total y cuantificación por Bradford	23
IV.11	Curva estándar para la cuantificación de la proteína GUS en <i>Chlamydomonas</i> por inmunoensayos	24
IV.12	Detección de la proteína GUS en líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i> por Dot Blot	26
IV.13	Cuantificación de proteína GUS en líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i> por ELISA indirecta	27
V.	RESULTADOS	28
V.1	Clonación de los genes reporteros GFP y GUS bajo la expresión del promotor Hsp70A/RbcS2 del vector de expresión pChlamy_1	28
V.2	Obtención de líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i>	31

V.3 Amplificación por PCR de los genes GUS y GFP en líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i>	32
V.4 Detección de la expresión de GFP por microscopía confocal	33
V.5 Ensayo histoquímico de GUS en líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i>	34
V.6 Curva estándar para la cuantificación de la proteína GUS	35
V.7 Detección de la proteína recombinante por inmunoensayo Dot blot	37
VI. DISCUSIÓN	38
VII. CONCLUSIONES	40
VIII. PERSPECTIVAS	40
IX. REFERENCIAS	41
X. ANEXOS	47
X.1 Medios de cultivo	47
X.2 Preparación de células <i>E. coli</i> TOP 10 calcio competentes	49
X.3 Transformación química de bacterias <i>E. coli</i> TOP 10	49
X.4 Miniprep	50
X.5 Maxiprep	51
X.6 Preparación de células electro competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	52
X.7 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 por electroporación	54
X.8 Transformación nuclear de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
X.9 Extracción de ADN total de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> por el método de Jeffrey Dodge-CTAB (modificado)	56
X.10 Extracción de proteína soluble total de <i>C. reinhardtii</i>	57
X.11 Cuantificación de proteína soluble total por método de Bradford	58
X.12 Determinación de proteína recombinante por Dot Blot	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de una célula de <i>Chlamydomonas</i> en interfase.	3
Figura 2. Vector de expresión pChlamy_1.	5
Figura 3. Estructura de resolución casi-atómica del virus del mosaico de la yuca africana por criomicroscopía electrónica.	7
Figura 4. Replicación por círculo rodante de los Geminivirus.	10
Figura 5. Sistema Algevir.	12
Figura 6 Metodología general para ensayo de actividad funcional de los promotores en <i>Chlamydomonas</i> .	16
Figura 7. Metodología para la generación del vector de expresión con el promotor Hsp70A-RbcS2 de <i>Chlamydomonas</i> que dirige los genes reporteros.	19
Figura 8 Metodología empleada para la transformación de <i>Chlamydomonas</i> mediada por <i>Agrobacterium</i> .	20
Figura 9. Metodología empleada para la detección de GFP por microscopía confocal.	22
Figura 10. Metodología para ensayo histoquímico de <i>Chlamydomonas</i> .	23
Figura 11. Metodología general para la extracción de proteína soluble total y cuantificación por Bradford.	23
Figura 12. Metodología empleada en la estandarización de la curva estándar para la cuantificación de GUS en líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i> .	25
Figura 13. Metodología realizada en el inmunoensayo Dot Blot.	26
Figura 14. Metodología general empleada en el ensayo de ELISA para la cuantificación de GUS.	27
Figura 15. Clonación del gen reportero GFP en el vector de expresión pChlamy_1.	29
Figura 16. Clonación del gen reportero GUS en el vector de expresión pChlamy_1.	30
Figura 17. Líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	31
Figura 18. PCR de GFP y GUS de líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i> .	32

Figura 19. Microscopia confocal para la detección de GFP bajo la expresión del promotor Hsp70A/RbcS2.	33
Figura 20. Localización histoquímica de GUS en líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i> .	34
Figura 21. Curvas estándar para la cuantificación de GUS.	36
Figura 22. Dot Blot de proteína soluble total de líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i> .	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para obtención de genes reporteros por PCR	17
Tabla 2. Condiciones de PCR para obtención de GFP y GUS.	17
Tabla 3. Condiciones de digestión y ligación para GFP y GUS.	18
Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la confirmación de genes reporteros en líneas transgénicas de <i>Chlamydomonas</i> .	21
Tabla 5. Condiciones de PCR para confirmación de inserción de genes reporteros en <i>Chlamydomonas</i> .	21

ABREVIATURAS

18S.	Gen de la subunidad 18S del ribosoma de <i>Chlamydomonas</i> .
BSA.	Albúmina de suero bovino.
CaMV 35S.	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.
CP.	Proteína de la cápside.
CTAB.	Bromuro de cetil trimetil amonio.
DTT.	Ditiotreitol.
ELISA.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
Fw.	Oligonucleótido sentido.
GFP.	Proteína verde fluorescente.
GUS.	β -Glucuronidasa.
Hsp70A.	Promotor de choque térmico 70A.
Hsp70B.	Promotor de choque térmico 70B.
Hsp70A/RbcS2.	Fusión de promotor choque térmico/subunidad pequeña de la RuBisCO.
IgG.	Inmunoglobulina del tipo G.
IPTG.	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
IR.	Región intergénica.
LB.	Luria Bertani.
ORF.	Marco de lectura abierto.
pCh.	Promotor de <i>Chlamydomonas</i> .
PST.	Proteína soluble total.
PVP.	Polivinilpirrolidona.
RbcS2.	Promotor de la subunidad pequeña de la RuBisCO.
RCR.	Replicación por círculo rodante.
REn.	Proteína potenciadora de la replicación.
Rep.	Proteína de la replicación.
Rv.	Oligonucleótido reverso.
TAE buffer.	Amortiguador de Tris-Acetato-EDTA.
TAP.	Tris-Acetato-Fosfatos.
TBE buffer.	Amortiguador de Tris-borato-EDTA.
TBS buffer.	Amortiguador de Tris-borato-salino.
TBS-T buffer.	Amortiguador de Tris borato-salino-Tween.
ToChLPV.	<i>Virus Chino del Tomate de La Paz</i> .
TrAP.	Proteína transactivadora.
TYLCV-Sin.	<i>Virus del Rizado Amarillo del Tomate-Sinaloa</i> .
TYLCV-SLP.	<i>Virus del Rizado Amarillo del Tomate-San Luis Potosí</i> .
uidA.	Gen que expresa la beta Glucuronidasa.
WT.	<i>Chlamydomonas</i> del tipo silvestre.
X-GAL.	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

RESUMEN

Análisis funcional de promotores derivados de geminivirus en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

El uso de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* como plataforma biológica para la producción de proteínas recombinantes, es prometedor por sus elevados rendimientos, bajo costo de producción, obtención de proteínas funcionales, y por considerarse a esta microalga como segura para el consumo humano.

La utilización de vectores virales para la producción de proteínas heterólogas en microalgas tiene enorme potencial biotecnológico, pero es una línea de investigación escasamente desarrollada. En el presente trabajo exploramos la funcionalidad de varios promotores provenientes de geminivirus, en *C. reinhardtii*, con el propósito de determinar su utilidad como parte de un sistema basado en elementos genéticos virales que se integre al genoma de la microalga y se escinda luego para replicarse como episoma. El promotor *Rep* del Virus Chino del Tomate de La Paz, ToChLPV, y los promotores *Rep* y *CP* de dos aislados del Virus del Rizado Amarillo del Tomate, TYLCV-Sin y TYLCV-SLP, con marcadas diferencias en el fenotipo infectivo, fueron fusionados transcripcionalmente a los genes reporteros *GUS* y *GFP*, e integrados a vectores de expresión derivados de los plásmidos binarios pBI121 y pChlamy_1. Para la construcción de los vectores virales utilizamos oligonucleótidos sintéticos con sitios únicos para endonucleasas específicas.

Los vectores generados fueron examinados experimentalmente en células de *Chlamydomonas* transformadas por cepas de *Agrobacterium tumefaciens* portadoras de los plásmidos binarios modificados. La funcionalidad y potencia relativa de los promotores geminivirales fue evaluada por medio de técnicas histoquímicas, inmunoensayos y el uso de microscopía de fluorescencia. La evidencia de los ensayos histoquímicos y de Dot Blot demostraron la funcionalidad de los promotores virales en la microalga, siendo los de *Rep* de ToChLPV y el de *CP* de TYLCV-Sin los más activos. Estos resultados abren la posibilidad de usar estos promotores para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en microalgas.

Palabras clave: Promotores virales, expresión episomal, microalgas, proteínas recombinantes, altos rendimientos.

ABSTRACT

Functional analysis of promoters derived from geminiviruses in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*.

The use of the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* as a biological platform for the production of recombinant proteins, is promising due to the high yields, low production costs, rendering functional proteins and also because is recognized as safe for human consumption.

The employment of viral vectors for the overexpression of heterologous proteins in microalgae, has a huge biotechnological potential, but is a research area sparsely developed. In the present work, we explored the functionality of several promoters from geminiviruses, in *C. reinhardtii*, with the aim of determine their use as part of a system based on geminiviral genetics elements to integrate into the microalgae genome and to split-out as an episome and replicate. The Rep promoter from Tomato Chino La Paz Virus, ToChLPV, the Rep and CP promoters from two isolated of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV-Sin and TYLCV-SLP, with strong differences in the infective phenotype, were merged transcriptionally to the GUS and GFP reporter genes, and integrated to the expression vectors derived from binary plasmids pBI121 and pChlamy_1. For the construction of the viral vectors we used synthetic oligonucleotides with unique sites for specific endonucleases.

The generated vectors were analyzed experimentally into *Chlamydomonas* cells transfected by *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring the modified binary plasmids. The functionality and relative strength of the geminiviral promoters were evaluated by histochemical techniques, immunoassays and fluorescence microscopy analyses. The evidence from histochemical and Dot Blot assays demonstrated the functionality of the viral promoters at microalgae, being the strongest promoters *Rep* ToChLPV and the *CP* of the TYLCV-Sin. These results open the possibility to use these promoters for overexpression of recombinant proteins into microalgae.

Key words: viral promoters, episomal expression, microalgae, recombinant proteins, high yields.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Uso de organismos fotosintéticos para la producción de proteínas recombinantes

Desde los inicios de la biotecnología moderna, los organismos fotosintéticos se han considerado los de mayor potencial para la producción de proteínas recombinantes, tanto de interés farmacéutico como alimenticio e industrial (Chen *et al.*, 2005). El uso de los organismos fotosintéticos como biorreactores para la producción a gran escala de proteínas recombinantes, tales como anticuerpos, vacunas, hormonas y otras biomoléculas, es un campo que aún no se ha explorado a un nivel congruente con el potencial productivo que teóricamente pueden alcanzar. Existen diferentes sistemas modelo utilizados para producir proteínas recombinantes, y ya en el 2003 Ma y colaboradores presentaron un gráfico comparativo con las limitaciones y ventajas que esos sistemas presentan, destacando a los cultivos de células vegetales por el bajo costo de almacenamiento, un bajo riesgo de contaminación, pequeñas diferencias en las modificaciones postraduccionales, menor costo de producción, escalamiento y purificación de los productos, así como una alta capacidad de re-escalamiento de la producción (Ma *et al.*, 2003; Mayfield *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de todas las ventajas descritas, existen algunos problemas con los bajos niveles de expresión de transgenes nucleares, por lo que los biotecnólogos se han visto en la necesidad de desarrollar nuevas técnicas y herramientas de transformación nuclear para aumentar los rendimientos de proteínas recombinantes (León-Bañares *et al.*, 2004; Daniell *et al.*, 2005).

Una alternativa de solución a esta problemática, es la evaluación de elementos reguladores de la expresión génica en sistemas modelo, como son los promotores heterólogos en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. El desarrollo de técnicas de transformación de ADN para este microorganismo, ha contribuido significativamente al creciente interés en *Chlamydomonas* como organismo modelo (Schroda *et al.*, 2000).

I.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

I.2.1 Clasificación y morfología

La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido utilizada ampliamente como sistema modelo para el estudio de procesos bioquímicos, genéticos, biosíntesis celular, función de los flagelos y más recientemente, en la producción de proteínas recombinantes (Mayfield *et al.*, 2003), debido a su facilidad de cultivo y la posibilidad de escalar el sistema para incrementar la producción.

C. reinhardtii pertenece a la división Chlorophyta, clase Chlorophyceae, orden Volvocales, familia Chlamydomonadaceae, género *Chlamydomonas* (Strasburger *et al.*, 1994). Las células de *Chlamydomonas* son reconocidas por su peculiar morfología ovalada, su tamaño oscila entre los 8 y 22 μm de diámetro, según el momento del ciclo celular en que se encuentre. En la parte apical de la célula se encuentran ubicados un par de flagelos que terminan en el interior de la célula, en los cuerpos basales que se encuentran conectados entre sí por fibras estriadas. Comúnmente, es posible apreciar dos vacuolas flagelares entre los cuerpos basales y el núcleo (Harris, 1989). El núcleo, a diferencia de las células vegetales que conforman las plantas superiores, está rodeado de un solo cloroplasto en forma de copa, que ocupa dos tercios del volumen celular, y en el que se encuentra situado el pirenoide (Harris, 2001). Este último es una estructura densa de gran importancia en las funciones vitales de la microalga, en la que se lleva a cabo la fijación del CO_2 , y puede acumular hasta el 90% de la enzima RuBisCo de la célula (Borkhsenius *et al.*, 1998). Dentro del cloroplasto se encuentra también un primitivo aparato visual llamado “eyespot” o estigma, que la célula utiliza para detectar la dirección e intensidad de la luz, gracias a la alta concentración de carotenoides en dicha microestructura (Kreimer, 2009). Por otra parte, las mitocondrias son mucho más pequeñas que el cloroplasto, ocupando tan solo el 3% del volumen total de la célula y se encuentran distribuidas a lo largo del citosol (Bennoun, 1995) (Figura 1).

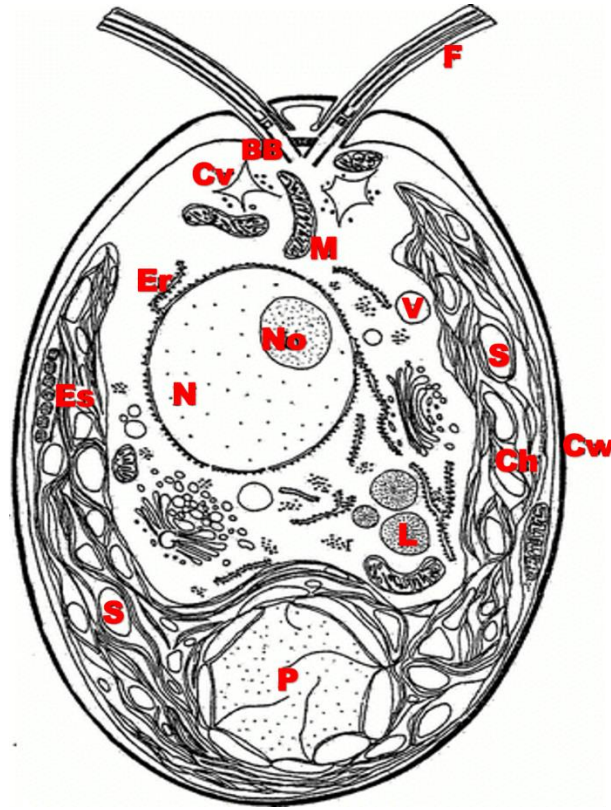


Figura 1. Representación de una célula de *Chlamydomonas* en interfase.

Longitud celular, 10 μm ; **BB**, Cuerpos Basales; **Ch**, Cloroplasto; **Cv**, Vacuola contráctil; **Cw**, Pared Celular; **Er**, Retículo endoplásmico; **Es**, "eyespot"; **F**, Flagelo; **G**, Aparato de Golgi; **L**, Cuerpos Lipídicos; **M**, Mitocondria; **N**, Núcleo; **No**, Nucleolo; **P**, pirenoide; **R**, Ribosoma; **S**, Saco de Almidón; **V**, Vacuola. (Harris, 2001).

Las células de *Chlamydomonas*, pueden cultivarse tanto en medio sólido como en medio líquido, a un pH neutro; el cultivo en suspensión de esta microalga no requiere la adición de vitaminas ni cofactores para su crecimiento (Harris, 1989; 2001) y el acetato es su principal fuente de carbono (Grossman, 2000; Dent *et al.*, 2001).

Una de las principales ventajas que presenta *C. reinhardtii*, es que su genoma ha sido secuenciado completamente, y una característica sobresaliente del mismo es el alto contenido de G+C, que va desde un 64% hasta un 70% en las regiones no codificantes (Merchant *et al.*, 2007).

I.2.2 *Chlamydomonas reinhardtii* como plataforma para la producción de proteínas de interés farmacéutico

El uso de microalgas para la producción de proteínas de interés farmacéutico es un campo que ya ha sido explorado con éxito (Franklin & Mayfield, 2004), llevando a cabo la expresión de vacunas funcionales, anticuerpos, proteínas terapéuticas y enzimas de interés industrial (Scranton *et al.*, 2015; Rosales-Mendoza, 2016). Mediante la transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas* se han producido con éxito proteínas de interés terapéutico, tales como anticuerpos derivados de IgG1, (Tran *et al.*, 2009), toxina B del cólera (Dressen *et al.*, 2010), factor de necrosis tumoral (Yang *et al.*, 2006), suero bovino amiloide asociado a glándulas mamarias (Manuell *et al.*, 2007), glutamato-descarboxilasa humana 65 (Wang *et al.*, 2008), entre otras. Por otro lado, la primera proteína recombinante producida en *Chlamydomonas* con un transgen nuclear fue la Eritropoyetina humana, con un rendimiento aproximado de 100 µg por litro de cultivo (Eichler-Stnahlberg *et al.*, 2009). Este bajo rendimiento se ha asociado a dificultades inherentes al sistema de expresión nuclear utilizado, pero los esfuerzos por mejorar las técnicas de expresión nuclear en esta microalga continúan al presente, con algunos resultados prometedores.

I.3 Herramientas para la expresión mejorada de transgenes en *Chlamydomonas*

La implementación de nuevas técnicas y herramientas para la expresión eficiente de genes heterólogos en *Chlamydomonas* ha representado un gran reto biotecnológico, desde la optimización de codones (Specht *et al.*, 2010), la búsqueda de promotores heterólogos más activos (Ruecker *et al.*, 2008; Díaz-Santos *et al.*, 2013), hasta el diseño de nuevos promotores de fusión derivados de la propia microalga (Scroda *et al.*, 2000).

En el año 2000 se publicó un estudio de la expresión génica nuclear dirigida por promotores constitutivos de la microalga, tales como, Hsp70A, Hsp70B, RbcS2 y β2tubulina. En dicho estudio se observó que todos los promotores, examinados

en forma individual aumentaban significativamente la expresión del transgen; sin embargo, al realizar combinaciones artificiales de esos promotores, se encontró que los niveles de expresión generados por un promotor de fusión Hsp70A/RbcS2, superaban a los valores esperados por un factor cercano a dos (Scroda *et al.*, 2000).

Gracias a esos datos, el promotor por excelencia para la expresión de transgenes a nivel nuclear en *Chlamydomonas* ha sido el promotor de fusión Hsp70A/RbcS2 (Kindle, 1989; Schroda *et al.*, 2000), que se encuentra comercialmente disponible en el vector de expresión pChlamyTM (Figura 2).

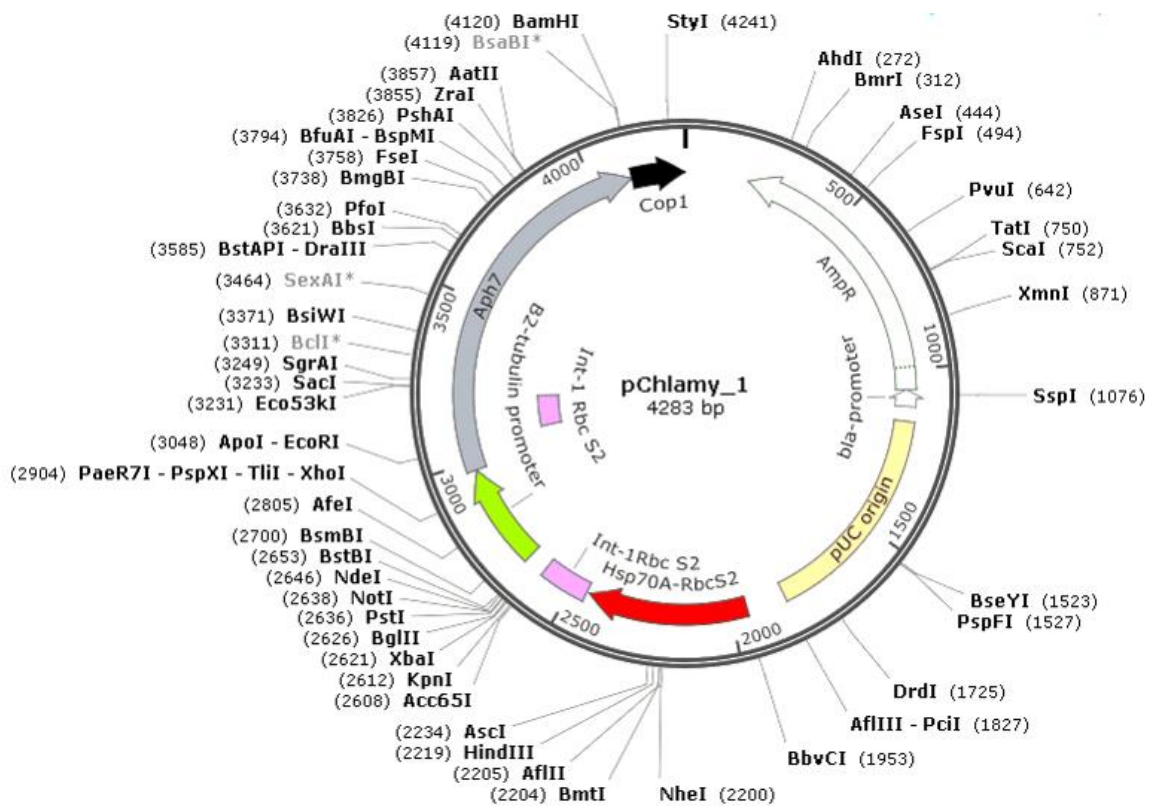


Figura 2. Vector de expresión pChlamy_1.

El promotor Hsp70A/RbcS2 se encuentra representado con la flecha de color rojo (Snap Gene). Thermo Fisher ScientificTM

Este y otros promotores híbridos derivados de la microalga han mostrado ser más eficientes que el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV), que es

el más utilizado en la biotecnología de plantas superiores (Diener *et al.*, 1990; Hippler *et al.*, 1998; Smart & Selman, 1993). Sin embargo, no se han analizado experimentalmente a otros promotores virales más potentes que el 35S (como ciertos promotores de geminivirus) como alternativas para aumentar la expresión de transgenes en *Chlamydomonas*.

I.4 Familia *Geminiviridae*

I.4.1 Características generales de la familia *Geminiviridae*

Los geminivirus constituyen la familia más extensa de virus de plantas que se conoce en la actualidad; estos virus deben su nombre a la morfología geminada que presentan sus cápsides. Muchos de los geminivirus causan enfermedades agrícolas devastadoras debido a su extensa dispersión mediada por su principal insecto vector, la mosquita blanca (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999). Su genoma está compuesto por una o dos moléculas de ADN de cadena sencilla que se empacan individualmente en cápsides separadas; los virus con un genoma no-segmentado (único) son conocidos como monopartitas, y los que tienen dos componentes genómicos (ADN-A y ADN-B) se denominan bipartitas (Figura 3). En cada componente genómico se encuentra una región intergénica no-codificante que incluye un elemento con el potencial de formar una estructura tallo-asa rica en G-Cs, en cuyo ápice reside la secuencia invariante TAATATT/AC, donde la proteína iniciadora de la replicación (Rep) genera un corte endonucleolítico para iniciar la replicación del ADN viral por un mecanismo de círculo rodante (Palmer & Rybicki, 1998).

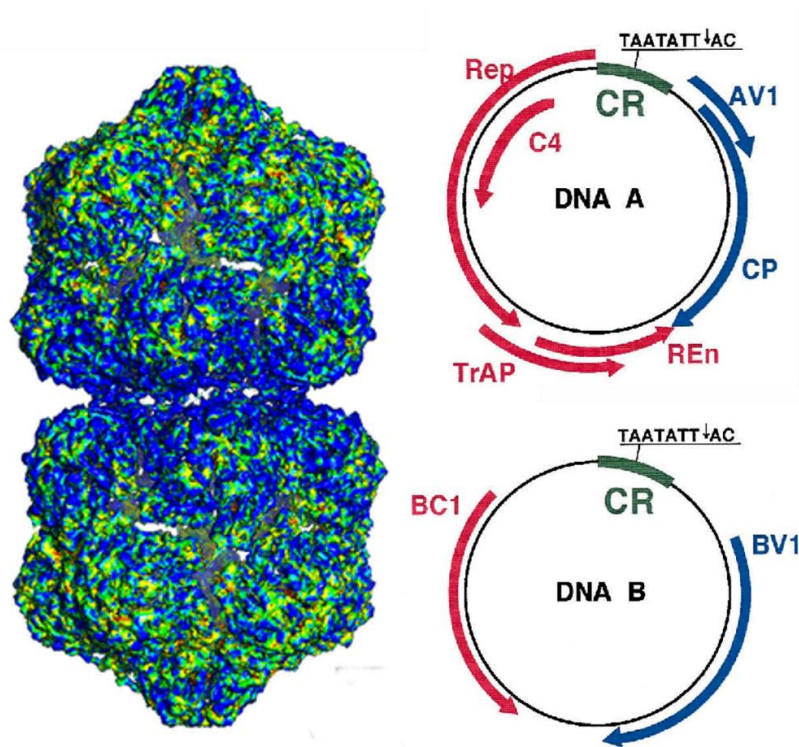


Figura 3. Estructura de resolución casi-atómica de la cápside de virus del mosaico de la yuca africana por criomicroscopía electrónica (izquierda). La organización genómica de un begomovirus bipartita se ilustra a la derecha (Hipp et al., 2017).

Dentro de la familia *Geminiviridae* se encuentran actualmente clasificados nueve géneros, con base en su organización genómica, el insecto vector específico, y el grupo de plantas que infectan: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus*, *Topocuvirus*, *Turncurtovirus*, *Eragrovirus*, *Becurtovirus*, *Grablovirus* y *Capulavirus* (Versani et al., 2014; Zerbini et al., 2017). El género *Begomovirus* es el más numeroso de la familia, con más de 380 miembros descritos (Rodríguez-Negrete et al., 2013; Brown et al., 2015).

I.4.2 Características generales de los Begomovirus

Las características principales que distinguen a los begomovirus del resto de los geminivirus son las siguientes: 1) transmisión específica por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*); 2) infectan solo plantas dicotiledóneas; 3) su genoma puede ser monopartita o bipartita. (Melgarejo et al., 2013; Castillo et al., 2003). El componente genómico A posee dos marcos de lectura abiertos (ORF's) en el sentido del virión (Bridson et al., 2010) y cuatro en el sentido complementario

(Fig. 3). Por otra parte, el componente B contiene únicamente dos ORF's, uno en cada sentido (Zhang *et al.*, 2012). Bajo la dirección de sus respectivos promotores, la expresión de estos ORF's (genes) da lugar a un total de seis proteínas funcionales con actividad importante en el mecanismo de infección:

- Gen C1: Codifica para la proteína iniciadora de la replicación, Rep.
- Gen C2: Codifica para la proteína con función de activador transcripcional, TrAP (Trans-Activating Protein).
- Gen C3: Codifica para la proteína potenciadora de la replicación, REn (Replication Enhancer protein).
- Gen C4: Codifica para la proteína con papel potenciador en supresión del silenciamiento génico transcripcional, además de tener un papel importante en el desarrollo de síntomas y el movimiento del virus.
- Gen V1: Codifica para la única proteína estructural de la cápside geminiviral.
- Gen V2: Codifica para una proteína con función similar a la proteína de movimiento, con actividad de desarrollo de síntomas e infección sistémica. Este gen no existe en los begomovirus del continente americano.

I.4.3 Replicación de los begomovirus

La estrategia principal utilizada por los begomovirus para llevar a cabo la replicación de su genoma de ADN monocatenario (ADNm_n) consiste en una primera etapa de conversión de su material genético en intermediarios de ADN bicatenario (ADN_{bc}), que posteriormente se utilizará como cadena molde para la amplificación y producción de su genoma (ADNm_n) mediante el mecanismo de replicación por círculo rodante (RCR) en el núcleo celular (Figura 4) (Jeske *et al.*, 2001; Preiss & Jeske, 2003; Pooggin, 2013).

En la RCR, la replicación inicia una vez que se ha convertido el ADN_{mc} en ADN_{bc}, y la proteína Rep se une al origen de replicación dentro de la región intergénica para efectuar un corte en la cadena +, dentro de la secuencia

altamente conservada 5'-TAATATT/AC-3'. Al realizar el corte, se genera un OH libre en el extremo 3', que utilizan las DNA-polimerasas de la célula huésped como iniciador ("primer") para la síntesis de la nueva cadena, mientras que al grupo fosfato que quedó libre en el extremo 5' del ADN cortado se queda unido a la proteína Rep mediante un enlace covalente con la tirosina en la posición 103 (Laufs *et al.*, 1995; Desbiez *et al.*, 1995; Luque *et al.*, 2002).

La elongación de la cadena de ADN continúa hasta cerrar el círculo y completar la replicación del genoma completo del virus. Al generarse la nueva región intergénica, con el elemento tallo-asa conservado, la nueva cadena es cortada de nuevo por la proteína Rep, y se libera una cadena circular de ADN dando lugar a la progenie viral (Jeske *et al.*, 2001; Pooggin, 2013).

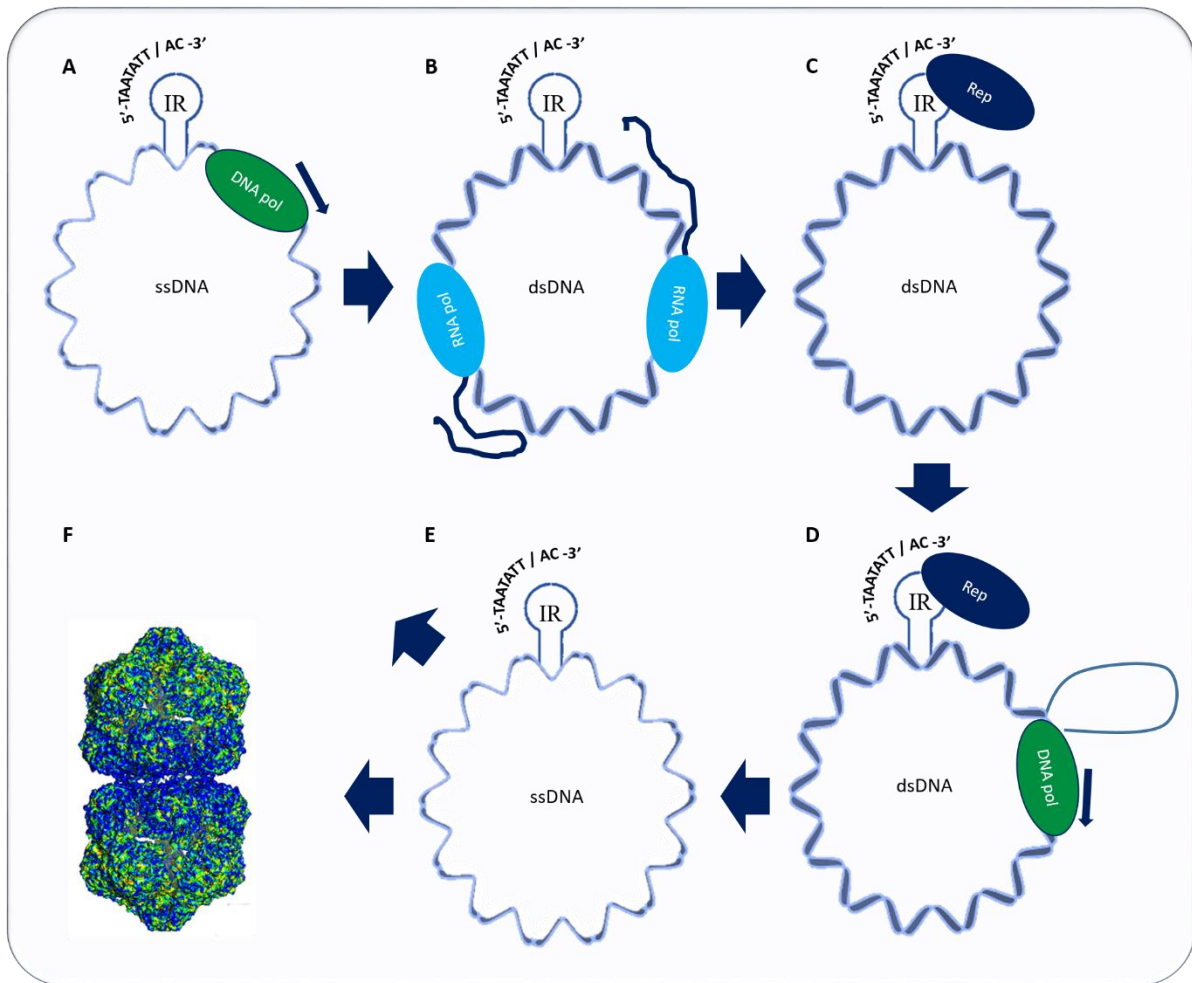


Figura 4. Replicación por círculo rodante de los Geminivirus.

A, al entrar al núcleo, el ADN_{mn} es convertido en ADN_{bc} por las DNA polimerasas del hospedero. **B**, al convertirse en una molécula de doble cadena, las ARN polimerasas del huésped son encargadas de producir los ARNm virales, los cuales darán lugar a la proteína Rep. **C**, Rep realiza el corte en la región intergénica de la cadena positiva en la secuencia 5'-TAATATT/AC-3'. Se genera un grupo OH libre en el extremo 3' que sirve como iniciador para la polimerasa de la célula **D**, y se realiza la síntesis del nuevo genoma geminiviral **E**, el cual puede ser empaquetado en las cápsides víricas **F**, o comenzar el ciclo de la replicación **A** (Figuras basadas en Jeske et al., 2001; Poogin, 2013).

I.5 Vectores geminivirales como sistema de expresión génica en microalgas

Bajo el principio de la replicación por círculo rodante que realizan los geminivirus, en el 2017 Bañuelos-Hernández y colaboradores diseñaron por primera vez un vector de expresión con elementos geminivirales para la sobreexpresión de proteínas recombinantes (sistema Algevir) en la microalga marina *Schizochytrium sp.*, una especie con la capacidad de crecer de forma heterótrofa en el agua marina (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2017).

El diseño consiste en un vector geminiviral inducible que conduce a la replicación mediada por la proteína Rep y el origen de replicación del virus *Ageratum Yellow Vein Virus* (AYVV). Los elementos del vector se encuentran organizados en un orden preciso, en el que el cassette de expresión (con el gen de interés) queda flanqueado en sus extremos 5' y 3' por una copia del origen de replicación viral, de tal manera que al expresarse la proteína Rep (situado corriente abajo del cassette de expresión), reconozca los orígenes de replicación, corte una de las cadenas, y promueva la subsecuente escisión del ADN del vector, que se circularizará en forma de episoma. Una vez concluido este proceso, la multiplicación del vector viral se llevará a cabo por el mecanismo RCR, conduciendo de este modo a la sobreexpresión de la proteína recombinante (Figura 5). El rendimiento obtenido con el sistema Algevir fue de 1.25 mg/g de biomasa fresca (6 mg/L de cultivo), que se alcanzó al tercer día después de la transformación (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2017).

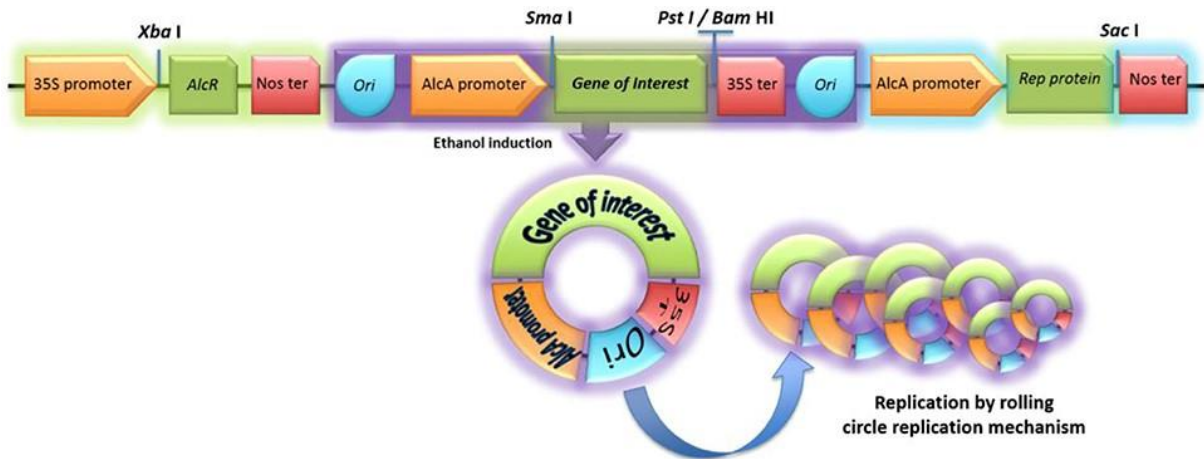


Figura 5. Sistema Algevir (Bañuelos-Hernández et al., 2017).

Debe hacerse notar que en el sistema Algevir los únicos elementos geminivirales utilizados en el diseño del vector son la proteína Rep y el origen de replicación de AYVV, dejando a un lado elementos *cis*-reguladores importantes, como los promotores, que podrían potenciar aún más la expresión del gen de interés.

1.5.1 Estudio de la actividad funcional de los promotores geminivirales

En el 2105, Avalos-Calleros realizó un estudio del uso de promotores geminivirales para la expresión transitoria del gen reportero GUS en protoplastos de *Nicotiana tabacum*. Se analizó la actividad de los promotores de los genes que codifican a las proteínas Rep y CP de dos variantes funcionalmente diferentes del Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV), el aislado San Luis Potosí, y el de Sinaloa, así como los homólogos del begomovirus ToChLPV.

El estudio mostró que los promotores de la proteína CP de las variantes de TYLCV-Sin y TYLCV-SLP, y el promotor de la proteína Rep de TYLCV-Sin, exhibían una actividad de 2.8, 2 y 6 veces mayor, respectivamente, que el promotor 35S, que es el más utilizado en la biotecnología de plantas. Un resultado interesante del mismo estudio, fue que promotor *Rep* de ToChLPV mostró tener una actividad aun mayor que la del promotor homólogo de TYLCV-Sin, de 9 a 10 veces mayor que la del promotor 35S (Avalos-Calleros, 2015).

Con base en los datos arrojados por el estudio referido, los elevados rendimientos de proteína recombinante que se obtienen al utilizar un sistema de expresión viral con elementos de un geminivirus, y las ventajas que ofrece utilizar a *Chlamydomonas reinhardtii* como sistema de expresión, decidimos analizar funcionalmente a los promotores begomovirales antes mencionados en la microalga *C. reinhardtii*, a fin de determinar la factibilidad de sobreexpresar proteínas de interés farmacéutico con un vector que incluya más elementos virales en su diseño.

II. HIPÓTESIS

Los promotores de los genes que codifican a las proteínas Rep y CP de begomovirus, tienen una mayor capacidad funcional para la expresión de proteínas recombinantes en *Chlamydomonas reinhardtii* que otros promotores convencionales, y harán factible la obtención de mayores rendimientos en la producción de proteínas de interés farmacéutico.

III. OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la actividad funcional de los promotores begomovirales *Rep* y *CP* de TYLCV-SLP y TYLCV-Sin, el promotor *Rep* de ToChLPV, y el promotor 35S de CaMV, con respecto a la actividad del promotor Hsp70A/RbcS2 en el sistema modelo *Chlamydomonas reinhardtii*, mediante ensayos de expresión transitoria.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar un vector de expresión con el promotor Hsp70A/RbcS2 de *Chlamydomonas*, fusionado al gen reportero *uidA* (GUS).
- Comparar la actividad funcional de los promotores begomovirales y el 35S de CaMV respecto a la del promotor Hsp70/RbcS2, en *Chlamydomonas*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Cepas

Tipo silvestre *Chlamydomonas reinhardtii* CC-137 mt⁽⁺⁾. Las microalgas se crecieron en medio TAP en fotoperiodos de 14 h luz/10 h oscuridad a 25±2 °C. Se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 para la transfección del material genético. Se crecieron en medio SOC a 28°C en ausencia de luz. Se usó la cepa de *Escherichia coli* TOP10 en medio LB a 36°C.

IV.2 Plásmidos

Los plásmidos utilizados fueron pChlamy_1 (Invitrogen™-Thermo Fisher Scientific), el vector de clonación pCrGFP (Chlamycollection) y pBI121.

IV.3 Enzimas de modificación

Fueron utilizadas las endonucleasas de restricción *Bam*HI, *Bgl*II, *Not*I, *Pst*I y *Xba*I (New England BioLabs™), así como la Ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific).

IV.4 Clonación de promotores begomovirales en vector de expresión pBI121

Cada uno de los promotores fue clonado individualmente por Avalos-Calleros en la región 5' del gen GUS ya integrado en el vector. Los promotores de origen begomoviral a evaluar fueron los siguientes:

- Rep de ToChLPV
- Cp de TYLCV-SLP
- Rep de TYLCV-SLP
- Cp de TYLCV-Sinaloa
- Rep de TYLCV-Sinaloa

La metodología general empleada en el estudio para la determinación de la actividad funcional de los promotores se detalla en la Fig. 6.

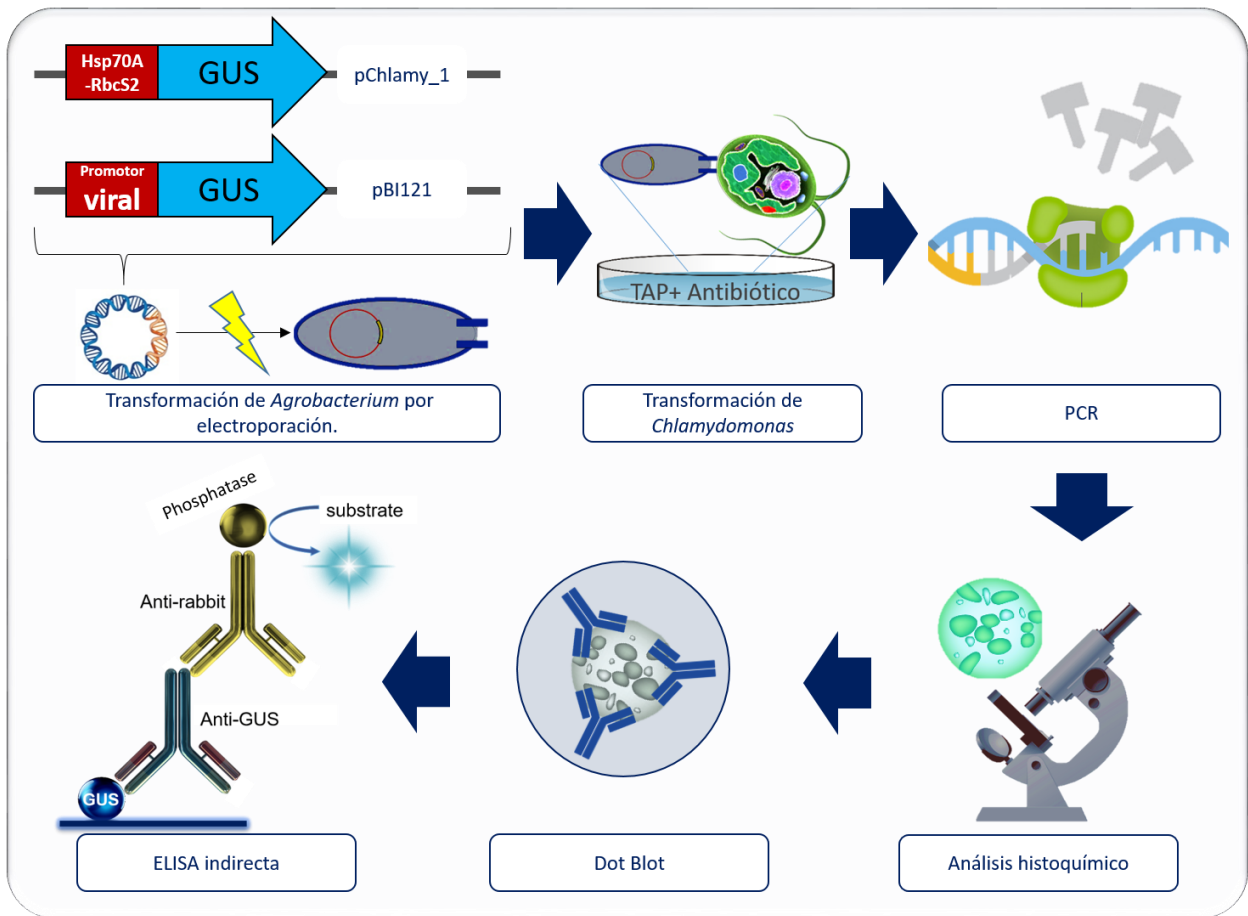


Figura 6 Metodología general para el ensayo de actividad funcional de los promotores virales en *Chlamydomonas*.

IV.5 Clonación de los genes reporteros GFP y GUS en el vector de expresión pChlamy_1

Los genes reporteros se obtuvieron por PCR y digestión con enzimas de restricción. El gen GUS se obtuvo del vector de expresión pBI121 y el gen GFP del vector de clonación pCrGFP, como se muestra en la Figura 7. La clonación de los genes en el vector de expresión pChlamy_1 requirió oligonucleótidos específicos con sitios de restricción únicos en sus extremos 5' correspondientes, como se indican en las Tablas 1 y 2. Se comprobó la inserción de los genes en el vector (Figura 15 y 16) por digestión de la enzima de restricción *Bam*HI (Tabla 3) y secuenciación.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para obtención de genes reporteros por PCR

NOMBRE	SECUENCIA	Enzimas
<i>FW-GFP(ch-ca)</i>	cccGAGCTCAGATCTatgaccatgattacgcca	<i>Sac I-Bgl II</i>
<i>RV-GFP(ch-ca)</i>	aaaGCGGCCGCgaattcgtactcggtagcccgct	<i>Not I</i>
<i>FW-GUS(ch-ca)</i>	CCTctagAGGATCCCCGGGTG	-
<i>RV-GUS(ch-ca)</i>	tacCTGCAGtagTCATTGTTTGCCTCCCTGT	<i>Pst I-STOP</i>

Tabla 2. Condiciones de PCR para obtención de GFP y GUS.

	GFP	GUS	
<i>Desnaturalización inicial</i>	98°C/60 s	98°C/60 s	
<i>Desnaturalización</i>	98°C/10 s	98°C/10 s	} 35 ciclos
<i>Alineamiento (gradiente)</i>	65°C/30 s	68°C/30 s	
	68°C/30 s		
	70°C/30 s		
	72°C/30 s		
	75°C/30 s		
<i>Extensión</i>	72°C/30 s	72°C/54 s	
<i>Extensión final</i>	72°C/2 m	72°C/2 m	
<i>Almacenamiento</i>	4°C	4°C	

*Las condiciones se obtuvieron al usar Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase de New England BioLabs[®] Inc, gel de agarosa al 1% en buffer TAE al 1X.

Tabla 3. Condiciones de digestión y ligación para GFP y GUS.

<i>Digestión inserto (GFP/GUS)</i>	<i>Digestión vector pChlamy_1</i>	<i>Ligación (inserto/pChlamy_1)</i>	<i>Digestión con BamHI</i>
2 µL de ADN	1 µL de vector	2 µL de vector cortado	5 µL de ligación
0.2 µL de <i>Not I</i> ; <i>Xba I</i> *	0.5 µL de <i>Not I</i> ; <i>Xba I</i> *	5 µL de inserto	2 µL de buffer 3.1
0.2 µL de <i>Bgl II</i> ; <i>Pst I</i> *	0.5 µL de <i>Bgl II</i> ; <i>Pst I</i> *	1 µL de dH ₂ O	1 µL de <i>BamHI</i>
1 µL de Buffer 3.1	2 µL de buffer 3.1	1 µL de buffer Ligasa	7 µL de dH ₂ O
11.6 µL de dH ₂ O	16 µL de dH ₂ O	1 µL de Ligasa T4	
= 15 µL de reacción	= 20 µL de reacción	= 10 µL de reacción	=15 µL de reacción
4h a 37°C	4h a 37°C	Toda la noche a 25°C	4h a 37°C

*enzimas correspondientes a cada gen reportero (ver Tabla 1). Gel de agarosa 1% con TAE 1X. Concentraciones: *Not I* y *Bgl II*, 10,000U/mL; *Xba I* y *Pst I*, 20,000U/mL.

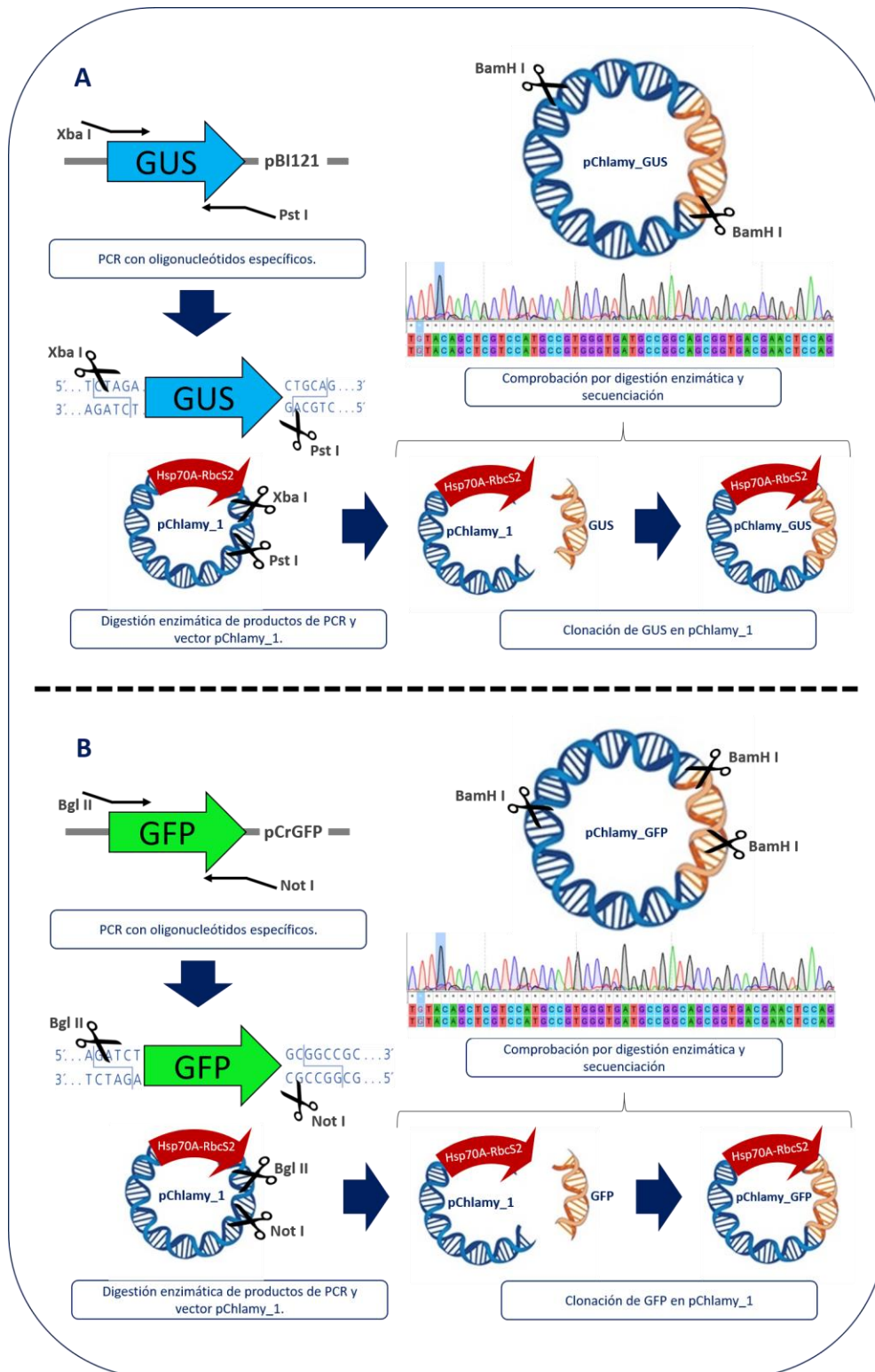


Figura 7. Metodología para la generación del vector de expresión con el promotor Hsp70A-RbcS2 de Chlamydomonas que dirige los genes reporteros A) GUS, B) GFP.

IV.6 Transformación nuclear de *Chlamydomonas* mediada por *Agrobacterium*

Una vez realizada la clonación de los genes reporteros en los vectores de expresión pChlamy_1 y pBI121, se introdujeron por electroporación en *Agrobacterium* como se indica en el Anexo IX.7. Las células transformadas se seleccionaron para introducir los vectores en *Chlamydomonas* (Figura 8). Las transformantes que se obtuvieron del vector pChlamy_1 se crecieron en higromicina (iC, INC.) en concentraciones de 5, 10 y 15 mg/mL y concentraciones de kanamicina (IBI SCIENTIFIC) de 15, 25 y 50 mg/mL las transformadas con pBI121. Para eliminar *Agrobacterium* del medio, a partir de los lavados se utilizó el antibiótico cefotaxima (Gold Biotechnology) en concentraciones de 500 mg/mL, como se indica en el anexo IX.8.

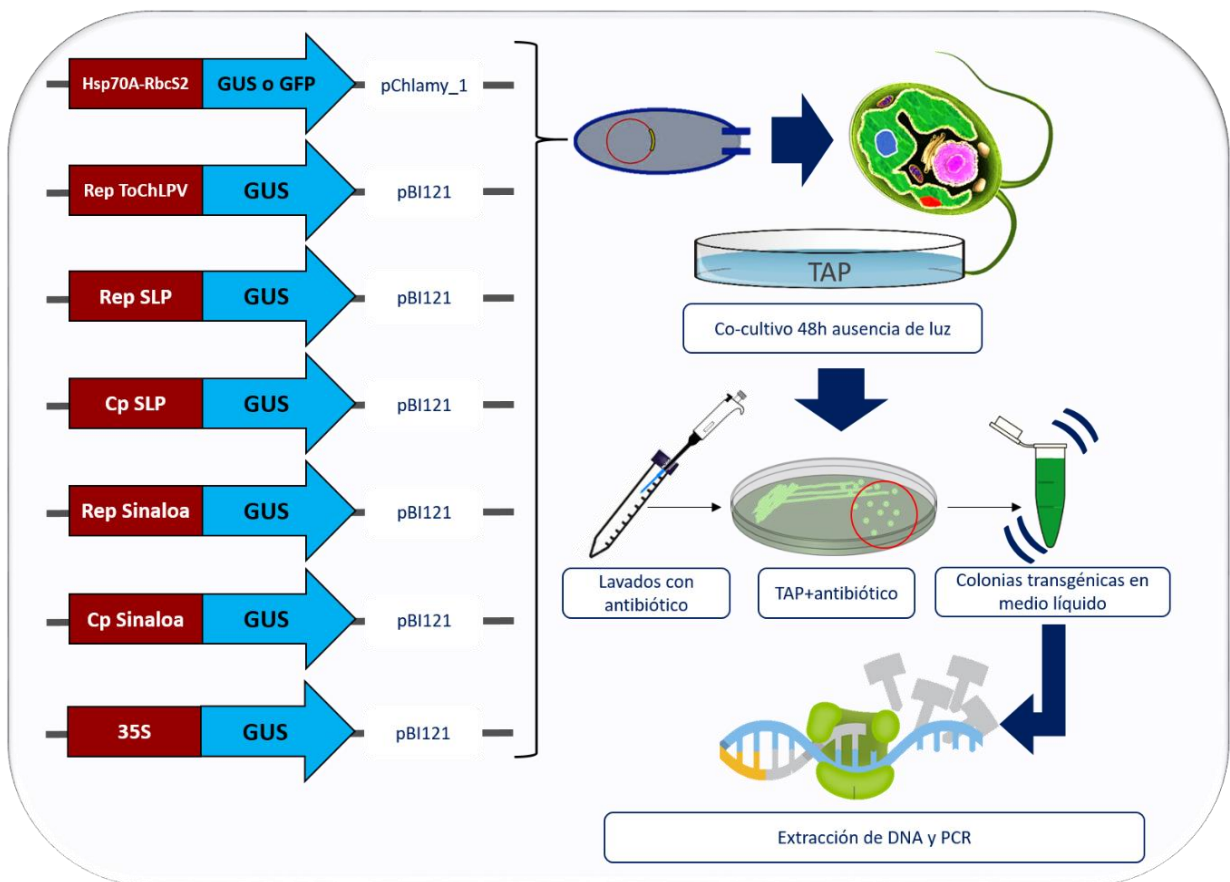


Figura 8 Metodología empleada para la transformación de *Chlamydomonas* mediada por *Agrobacterium*.

IV.7 Confirmación de líneas transgénicas por PCR

El ADN genómico de la microalga se extrajo por el método de CTAB modificado, eligiendo colonias al azar entre las que crecieron bajo selección de antibiótico, como se indica en el anexo IX.9. La confirmación por PCR incluyó oligonucleótidos específicos para la amplificación de aproximadamente 1Kb de cada gen reportero, además se realizó la amplificación del gen endógeno 18S (118 pb) como control de la técnica. Las secuencias de los oligonucleótidos y condiciones de PCR se describen en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la confirmación de genes reporteros en líneas transgénicas de *Chlamydomonas*.

NOMBRE	SECUENCIA	Pb
<i>GFP-Fw</i>	GACCACATGAAGCAGCACGA	20
<i>GFP-Rv</i>	AGGCCAAAATCAACGGAGGA	20
<i>GUS-Fw</i>	GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG	21
<i>GUS-Rv</i>	GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA	21
<i>18S-Fw</i>	GGGGCATTTCGTATTCCGTTG	20
<i>18S-Rv</i>	AGCCCCCAACTTTCGTTCTT	20

Tabla 5. Condiciones de PCR para confirmación de inserción de genes reporteros en *Chlamydomonas*.

	<i>GFP</i> *	<i>GUS</i> *	<i>18S</i> [†]	
<i>Desnaturalización inicial</i>	94°C/30 s	94°C/30 s	94°C/30 s	} 30 ciclos
<i>Desnaturalización</i>	94°C/30 s	94°C/30 s	94°C/30 s	
<i>Alineamiento</i>	70°C/30 s	60°C/30 s	59°C/30 s	
<i>Extensión</i>	72°C/60 s	72°C/90 s	72°C/30 s	
<i>Extensión final</i>	72°C/5 m	72°C/5 m	72°C/5 m	
<i>Almacenamiento</i>	4°C	4°C	4°C	

*Gel de agarosa al 1% en buffer TAE al 1X.

[†]Gel de agarosa al 2% en buffer TBE al 1X.

IV.8 Detección de la expresión de GFP por microscopía confocal

Para detectar la expresión de la proteína verde fluorescente dirigida por el promotor Hsp70A/RbcS2, las colonias PCR-positivas se observaron al microscopio confocal Leica SP2 utilizando el objetivo de inmersión 100X/1.4 (Figura 9). La actividad de GFP se detectó con una excitación de 488 nm (láser de argón) y un filtro de emisión de alta calidad de paso de banda HQ515/30, centrado en 515 nm con un ancho de banda de 30 nm. La autofluorescencia dada por la clorofila de *Chlamydomonas* se detectó a través de diodo rojo a 637 nm.

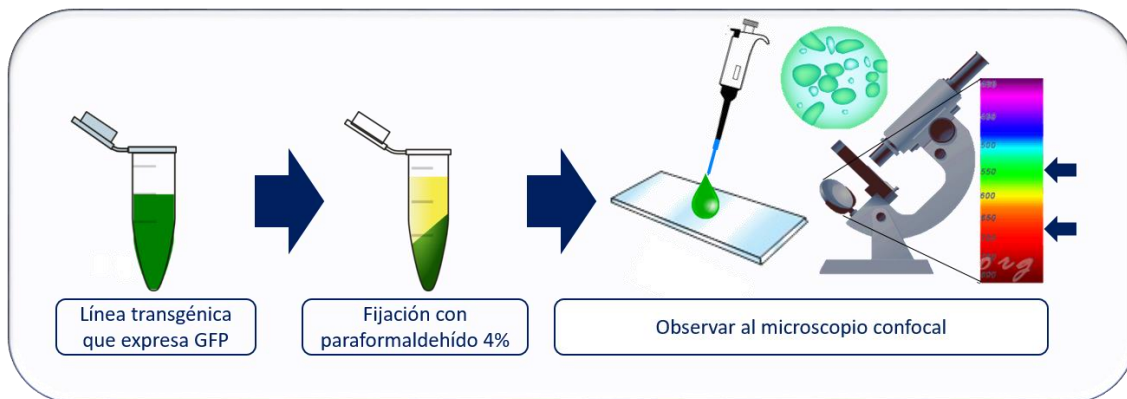


Figura 9. Metodología empleada para la detección de GFP por microscopía confocal.

IV.9 Ensayo de actividad de GUS dirigida por promotores virales

Para demostrar la expresión de GUS en *Chlamydomonas*, tanto las colonias que crecieron bajo selección de antibiótico, como las de tipo silvestre, se colectaron y resuspendieron en solución con X-Gluc (Gold Biotechnology, EE.UU.), manteniéndose a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Posteriormente, las células se analizaron al microscopio óptico (Leica DM5500 B) utilizando el objetivo de inmersión 100X. Se analizaron en el software Leica Microsystems (Schweiz) AG y se compararon con las de tipo silvestre, como se explica en la Figura 10.



Figura 10. Metodología para ensayo histoquímico de *Chlamydomonas*.

IV.10 Extracción de proteína soluble total y cuantificación por Bradford

Se colectó la biomasa microalgal en microtubos de 1.5 mL por centrifugación. Posteriormente, se añadió el buffer de extracción como se explica en el anexo IX.10, se extrajo la proteína soluble total por sonicación (ultrasonic processor, SONICS) y se realizó la cuantificación utilizando el reactivo Bradford (BIO-RAD, EE.UU.). Cada una de las muestras, así como la curva estándar se realizó por triplicado en placas de 96 pozos, (Thermo Fisher Scientific) como se muestra en la Figura 11.



Figura 11. Metodología general para la extracción de proteína soluble total y cuantificación por Bradford.

IV.11 Curva estándar para la cuantificación de la proteína GUS en *Chlamydomonas* por inmunoensayos

Para determinar la curva estándar se colocó en una caja de 96 pozos la proteína GUS purificada (Donada por la Dr. Ruth Soria, UASLP) en concentraciones decrecientes, desde 250 ng hasta 3.9 ng diluida en buffer de carbonatos (Figura 12). Se utilizó albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich) como proteína de bloqueo en una concentración de 500 µg/mL. La detección se realizó con anticuerpos policlonales (primario) contra la proteína beta- glucoronidasa (Thermo Scientific No. A-5790) en diluciones de 1:1500, 1:3000 y 1:6000 y anticuerpos monoclonales (secundario) anti-conejo con fosfatasa alcalina conjugada (Sigma A-2306) en diluciones de 1:1000 y 1:3000. Con dichas concentraciones se realizaron 6 combinaciones posibles, 1:1500-1:1000, 1:1500-1:3000, 1:3000-1:1000, 1:3000-1:3000, 1:6000-1:1000 y 1:6000-1:3000 para determinar la curva estándar con mejor regresión lineal (Figura 21). Los anticuerpos fueron diluidos en buffer de bloqueo TBS 1X. Los lavados se realizaron con TBS-T. El revelado se llevó a cabo mediante la adición del sustrato paranitrofenilfosfato y se realizó la lectura a una longitud de onda de 405 nm (Anexo IX.13).

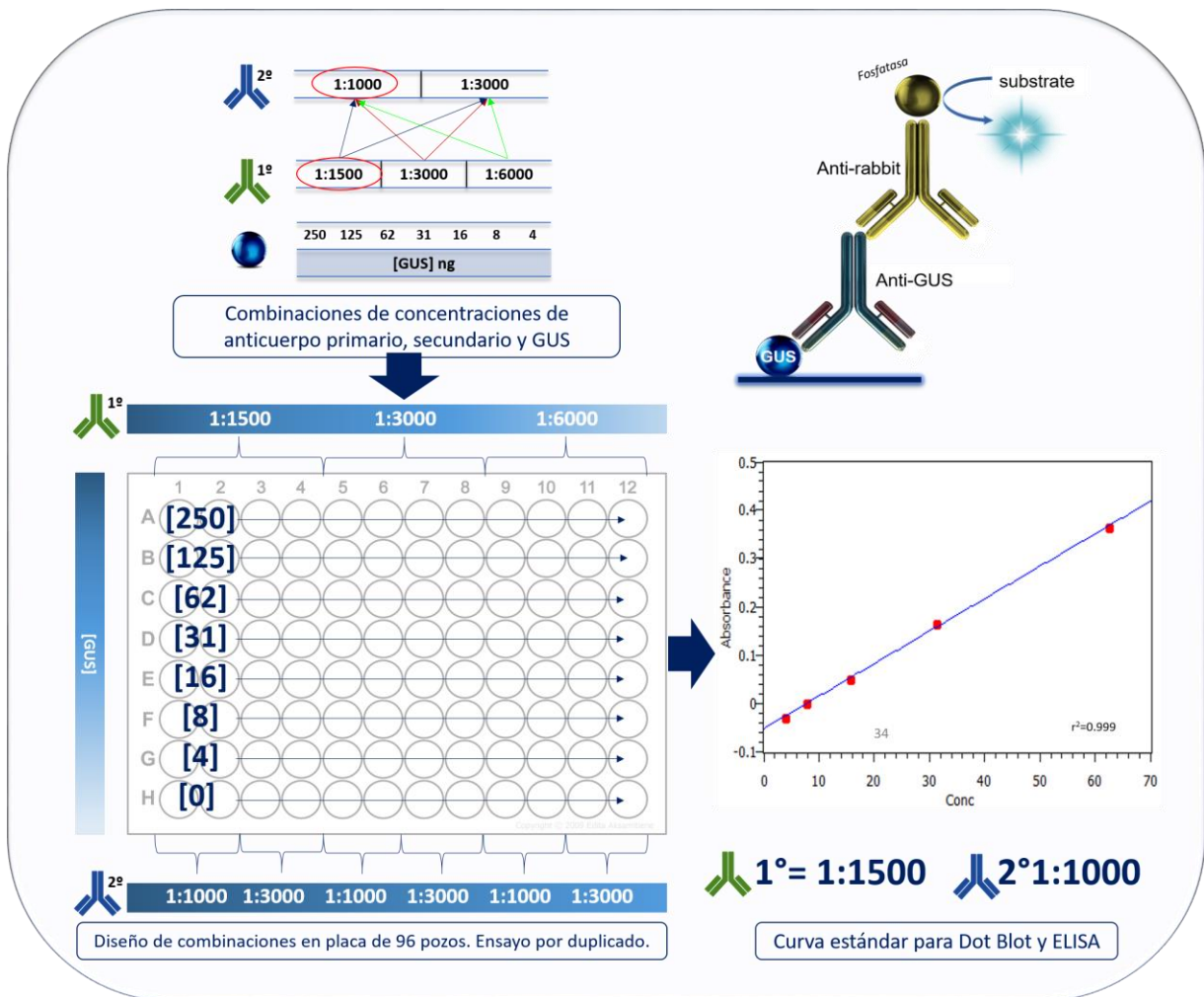


Figura 12. Metodología empleada en la estandarización de la curva estándar para la cuantificación de GUS en líneas transgénicas de *Chlamydomonas*.

IV.12 Detección de la proteína GUS en líneas transgénicas de *Chlamydomonas* por Dot Blot

Las colonias positivas por PCR y por el ensayo histoquímico, se sometieron a inmunoensayo Dot Blot. Se colocaron las extracciones de proteína soluble total de *Chlamydomonas* (líneas transgénicas y tipo silvestre) en membrana de nitrocelulosa (Amersham™ Ptorran™ Premium 0.45 µm NC). Tras utilizar las concentraciones de anticuerpos establecidas por la curva estándar, se realizó la reacción de revelado específica de la interacción del paranitrofenilfosfato y la fosfatasa alcalina. Se toma el tiempo de reacción hasta detectar la señal. La Figura 13 muestra la metodología empleada en este ensayo.

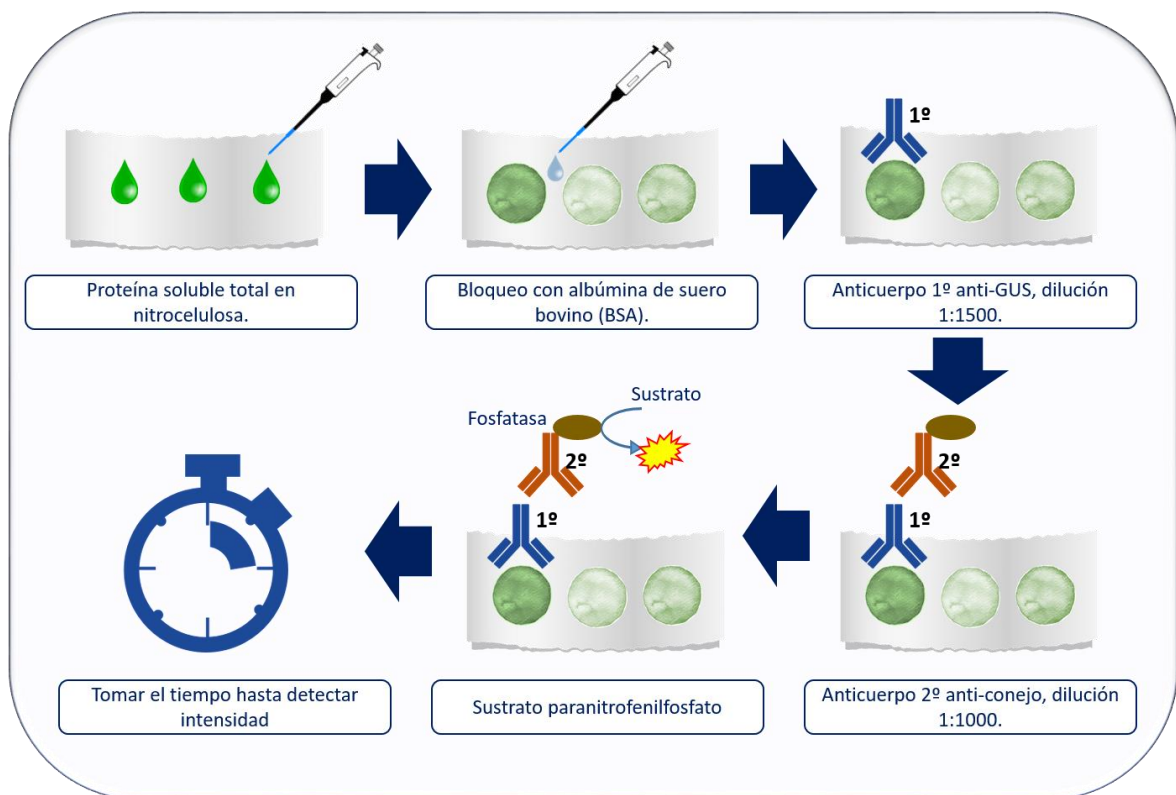


Figura 13. Metodología realizada en el inmunoensayo Dot Blot.

IV.13 Cuantificación de proteína GUS en líneas transgénicas de *Chlamydomonas* por ELISA indirecta

Posterior a la detección por Dot Blot, se realizó la cuantificación de proteína recombinante por ELISA indirecta. La estandarización de la cantidad de proteína soluble total se realizó en placa de 96 pozos en concentraciones de 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por triplicado (Figura 14). Tras la adición del antígeno, se bloqueó con 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA. Una vez realizado el bloqueo, se utilizaron los anticuerpos y sustrato en las concentraciones previamente establecidas.

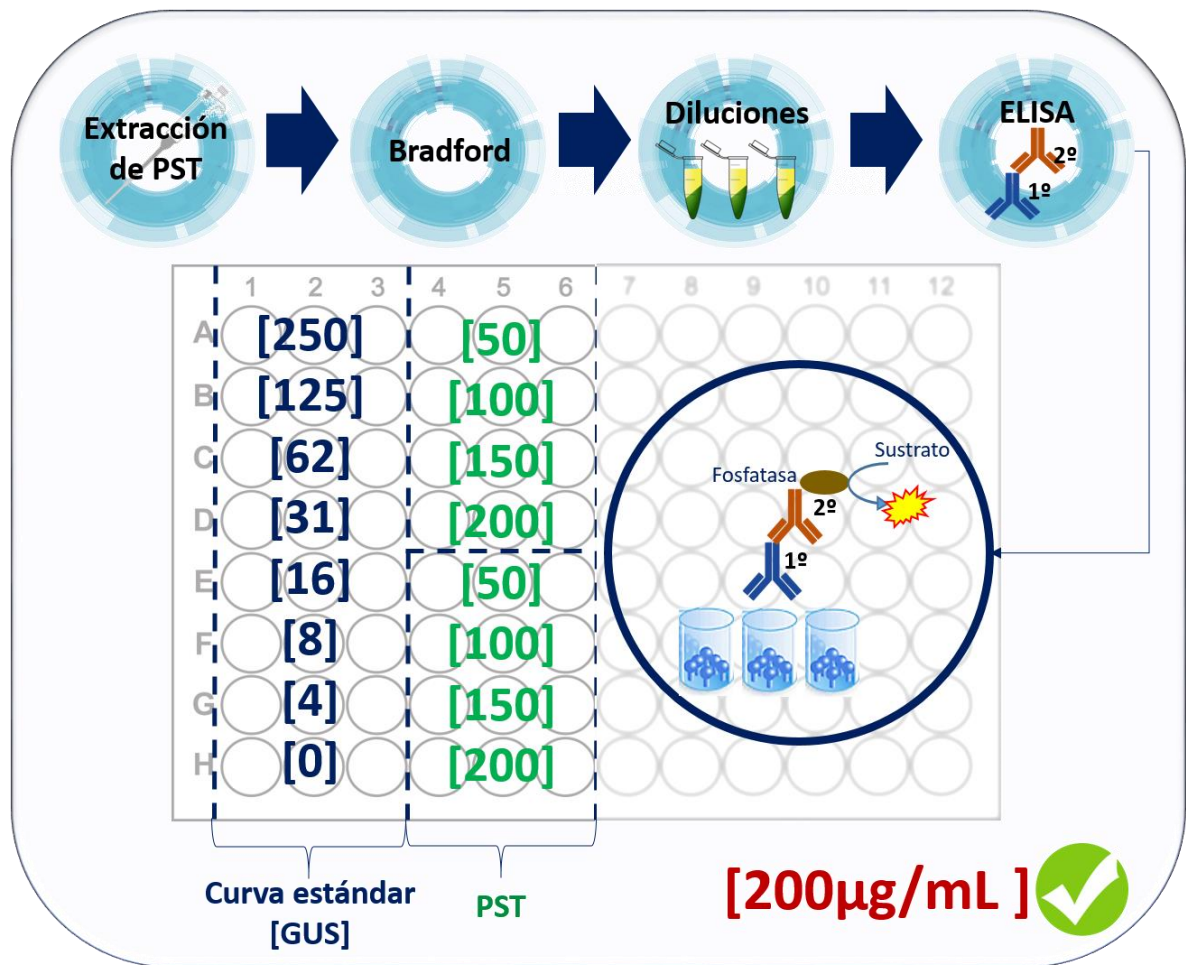


Figura 14. Metodología general empleada en el ensayo de ELISA para la cuantificación de GUS.

V. RESULTADOS

V.1 Clonación de los genes reporteros GFP y GUS bajo la expresión del promotor Hsp70A/RbcS2 del vector de expresión pChlamy_1

Para comparar el nivel de expresión de los genes reporteros dirigidos por los promotores begomovirales examinados, se clonaron los genes reporteros GUS y GFP en la región 3' del promotor de *Chlamydomonas* Hsp70A/RbcS2, el cual está comercialmente disponible en el vector de expresión pChlamy_1. Se obtuvo el gen GFP del vector de clonación pCrGFP por PCR con gradiente de temperatura, para obtener un amplicón de 1,050 pb. La amplificación se presentó en las cinco temperaturas utilizadas (Figura 15B). Tras la clonación, las colonias PCR-positivas se digirieron con la enzima *Bam*HI, para obtener como resultado tres bandas, 2,842 pb, 1,741 pb y 721 pb (Figura 15D). De un total de 8 colonias seleccionadas y digeridas con *Bam*HI, solo las colonias b y c (Figura 15D) mostraron el patrón de restricción esperado.

El gen *GUS* se obtuvo del vector de expresión pBI121 por PCR, obteniendo un amplicón de 1,812 pb (Figura 16B). Para el vector con GUS, el patrón de bandas esperado al ser digerido con la endonucleasa *Bam*HI fue de 3,327 pb y 2,790 pb (Figura 16D). De dos colonias utilizadas en el ensayo, solo la identificada como "b" fue la que presentó el patrón de banda esperado. Ambos vectores fueron secuenciados para confirmar la clonación y se alinearon las secuencias. La construcción de estos vectores hizo factible la transformación de *E. coli*, *A. tumefaciens* y *C. reinhardtii*, así como la subsecuente realización de ensayos histoquímicos, inmunoensayos y microscopía confocal.

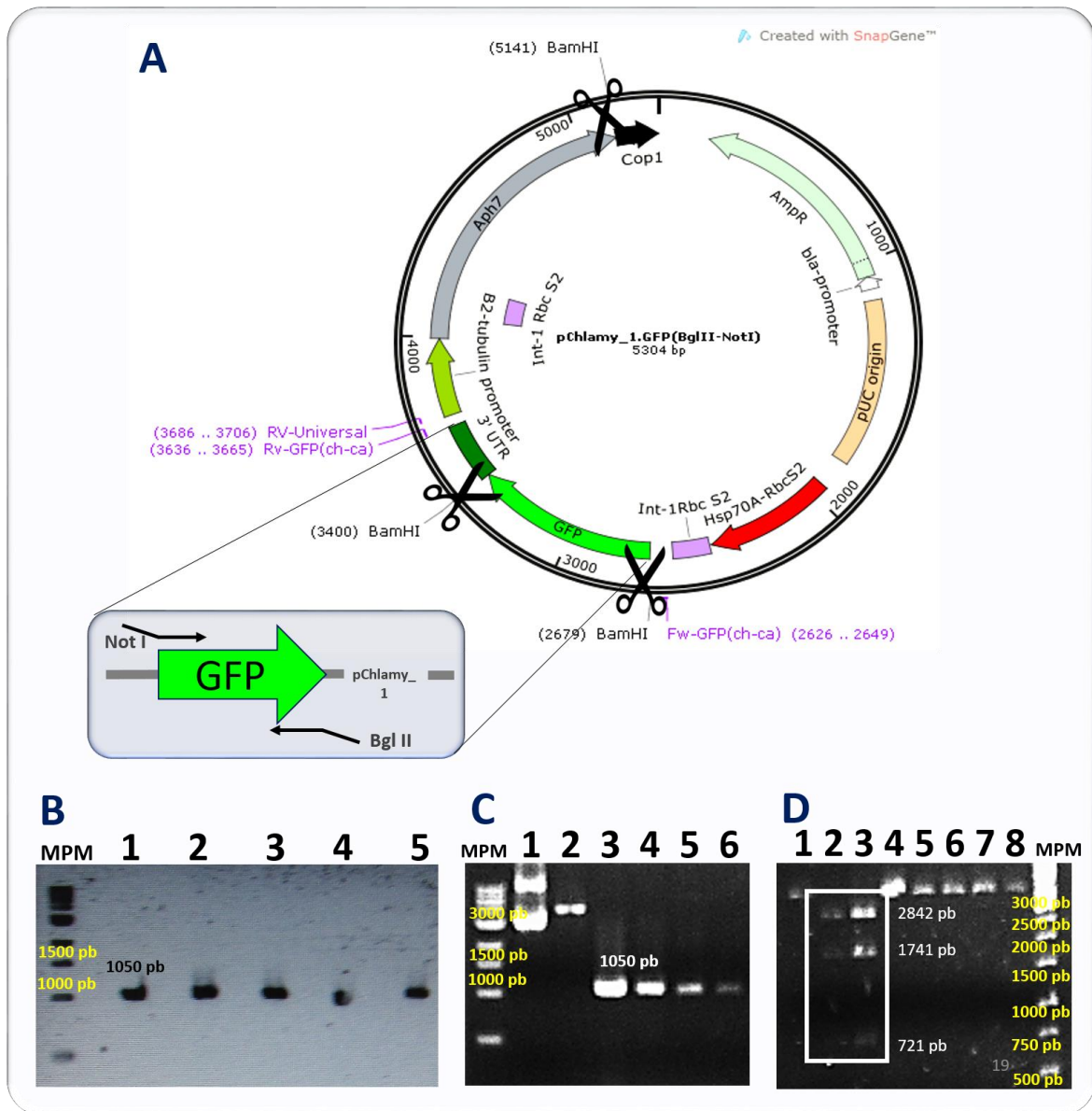


Figura 15. Clonación del gen reportero GFP en el vector de expresión pChlamy_1.

A, Mapa del vector de expresión pChlamy_1 con el gen reportero GFP en la región 3' del promotor Hsp70A/RbcS2. Sitios de restricción de *Bam*HI. (SnapGene). **B**, PCR con gradiente de temperatura para obtener GFP de pCrGFP con oligonucleótidos con sitios únicos *Not*I y *Bgl*II: **1**, 65°C, **2**, 68°C, **3**, 70°C, **4**, 72°C y **5**, 75°C. **C**, Digestiones enzimáticas para clonación de GFP en pChlamy_1: **1**, Vector pChlamy_1 sin digerir, **2**, Vector pChlamy_1 digerido con *Not*I y *Bgl*II, **3**, Producto de PCR a 65°C, **4**, Producto de PCR a 75°C, **5**, Digestión de producto de PCR a 65°C con *Not*I y *Bgl*II, **6**, Digestión de producto de PCR a 75°C con *Not*I y *Bgl*II. **D**, Comprobación de inserción por digestión enzimática con *Bam*HI: **1-8** Colonias que crecieron bajo selección de antibiótico. **2 y 3** patrón de bandeado esperado.

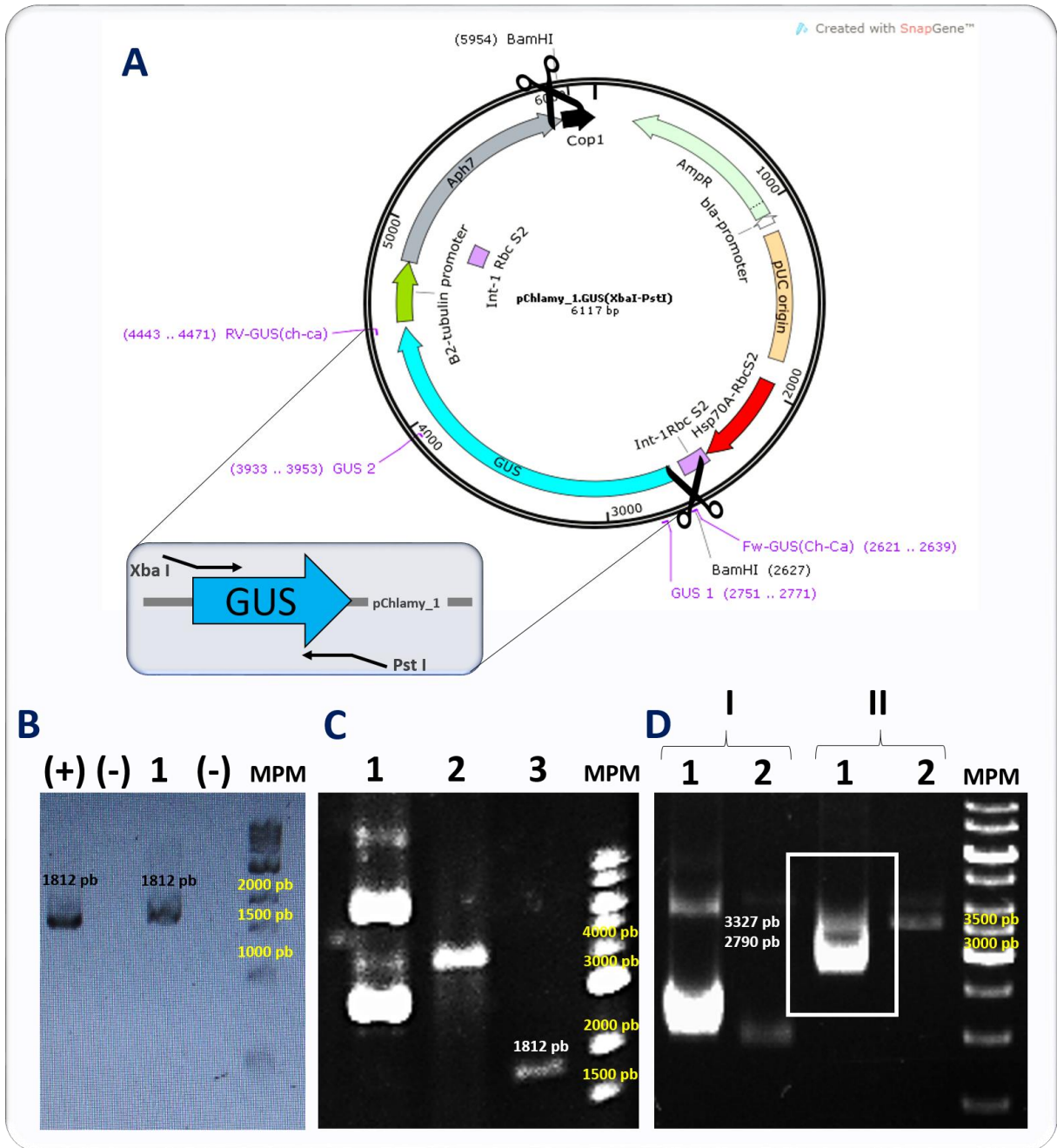


Figura 16. Clonación del gen reportero GUS en el vector de expresión pChlamy_1.

A, Mapa del vector de expresión pChlamy_1 con el gen reportero GUS en la región 3' del promotor Hsp70A/RbcS2. Sitios de restricción de *Bam*HI. (SnapGene) **B**, PCR para obtener GUS de pBI121 con oligonucleótidos con sitios únicos *Xba*I y *Pst*I. **1**, GUS digerido. **C**, Digestiones enzimáticas para clonación de GUS en pChlamy_1: **1**, Vector pChlamy_1 sin digerir, **2**, Vector pChlamy_1 digerido con *Xba*I y *Pst*I, **3**, Digestión de producto de PCR de GUS con *Xba*I y *Pst*I. **D**, Comprobación de inserción por digestión enzimática con *Bam*HI: **I**, y **II**, Colonias que crecieron bajo selección de antibiótico, **1**, digestión con *Bam*HI, **2**, vector sin digerir.

V.2 Obtención de líneas transgénicas de *Chlamydomonas*



Figura 17. Líneas transgénicas de *Chlamydomonas reinhardtii*.

La obtención de líneas transgénicas se realizó por triplicado (a, b y c) en medio TAP sólido con antibiótico. **Vector 1**, Rep ToChLPV. **Vector 2**, CP TYLCV-Sin. **Vector 3**, Rep

TYLCV-Sin. **Vector 4**, Rep TYLCV-SLP. **Vector 5**, CaMV-35S. **Vector 6**, CP TYLCV-SLP.

V.3 Amplificación por PCR de los genes GUS y GFP en líneas transgénicas de *Chlamydomonas*

Posterior a la transformación de *Chlamydomonas* mediada por *Agrobacterium*, las líneas transgénicas fueron verificadas por PCR. Dos productos fueron amplificados, uno correspondiente a la región interna de 1Kb de GFP y otro correspondiente a 1.2 Kb del gen GUS (Tabla X). La amplificación se presentó en todas las líneas transgénicas. Estos fragmentos corresponden a las secuencias que fueron integradas en el genoma de *Chlamydomonas* (Figura 18). Una vez confirmada la integración al genoma de los transgenes, las diferentes líneas transgénicas se crecieron en medio TAP con antibiótico para llevar a cabo el ensayo histoquímico y extracción de proteína soluble total.

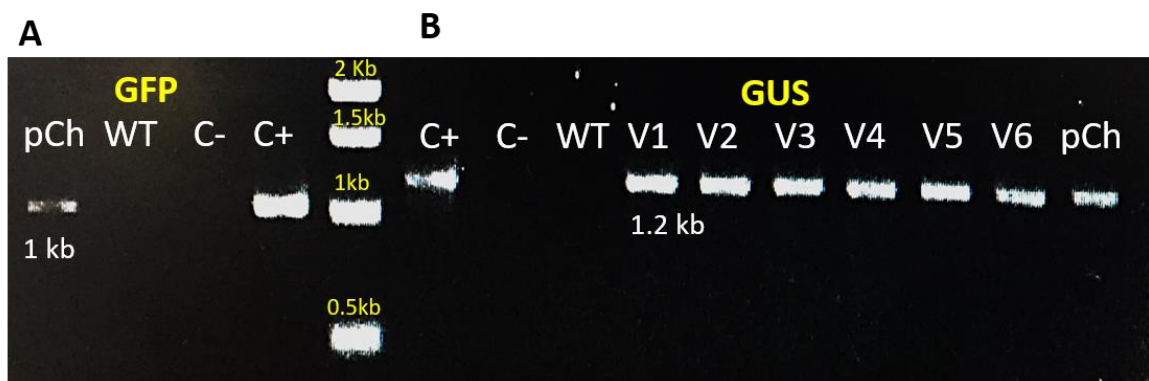


Figura 18. PCR de GFP y GUS de líneas transgénicas de *Chlamydomonas*.

A, PCR de gen GFP (1 Kb). **pCh**, promotor del vector pChlamy_1, Hsp70A/RbcS2. **WT**, Wild type. **C-**, Control negativo. **C+**, control positivo (vector pCrGFP). **B**, PCR de gen GUS bajo diferentes promotores virales (1.2 Kb). **C+**, control positivo (vector pBI121). **C-**, Control negativo. **WT**, Wild type. **P1**, Rep ToChLPV. **P2**, CP TYLCV-Sin. **P3**, Rep TYLCV-Sin. **P4**, Rep TYLCV-SLP. **P5**, CaMV-35S. **P6**, CP TYLCV-SLP. **pCh**, promotor del vector pChlamy_1, Hsp70A/Rbc S2.

V.4 Detección de la expresión de GFP por microscopía confocal

Para detectar la expresión de la proteína verde fluorescente dirigida por el promotor Hsp70A/RbcS2, las colonias PCR-positivas se sometieron a microscopía confocal. Al observar al microscopio se obtuvieron dos emisiones, el representado en color rojo (Figura 19A) que corresponde a la clorofila y el indicado en color verde correspondiente a la GFP (Figura 19B), la superposición de imágenes confirma la expresión de la proteína GFP en la microalga (Figura 19C).

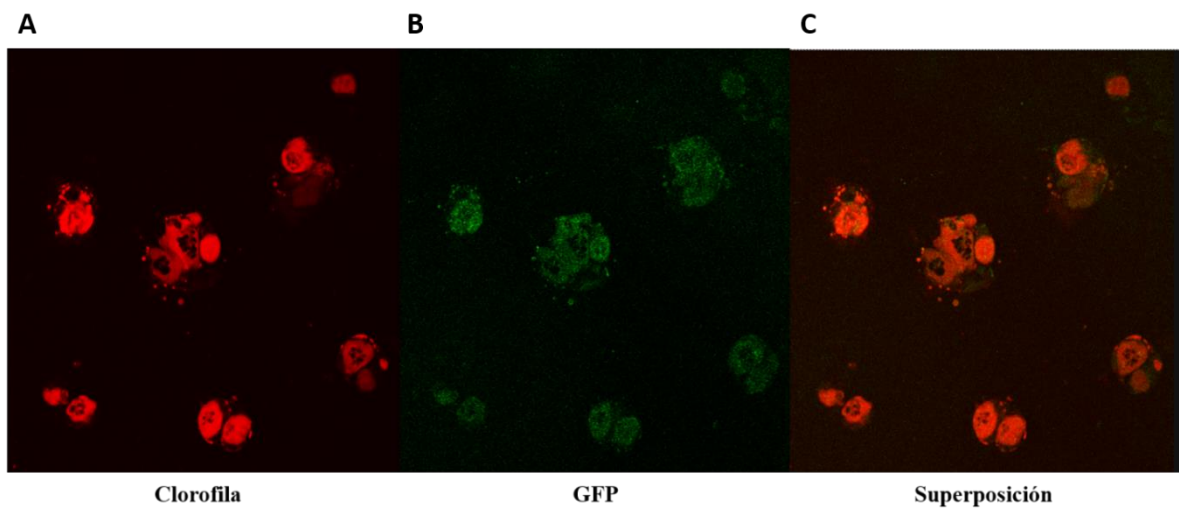


Figura 19. Microscopía confocal para la detección de GFP bajo la expresión del promotor Hsp70A/RbcS2.

Microscopía confocal de líneas transgénicas de *Chlamydomonas* que expresan la proteína verde fluorescente. **A**, Detección de la autofluorescencia de la clorofila a $\lambda 637$ nm. **B**, Detección de la expresión de la GFP bajo el promotor Hsp70A/RbcS2 a $\lambda 488$ nm. **C**, Superposición de la clorofila (A) y GFP (B).

V.5 Ensayo histoquímico de GUS en líneas transgénicas de *Chlamydomonas*

Para comprobar que las células fueron transformadas y detectar la actividad proteica, se realizó la localización histoquímica de la enzima β -Glucuronidasa (GUS) por la adición del sustrato X-Gluc (Gold Biotechnology, G1281C1). En presencia de este sustrato la enzima produce un precipitado de color azul intenso, fácilmente detectable con el microscopio óptico. Las líneas transgénicas se analizaron al microscopio óptico utilizando el objetivo de inmersión 100X. Se observó coloración azul principalmente en las vacuolas y el retículo endoplásmico. En la figura 20 se muestran los resultados del ensayo histoquímico, que comprueba la expresión de GUS en todas las transformantes. Este ensayo demuestra que los promotores de begomovirus, agentes infecciosos exclusivos de plantas superiores, son funcionales en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Tomando en cuenta la morfología de esta microalga (ver Figura 1), consideramos que la actividad se presenta principalmente en la vacuola y el retículo endoplásmico.

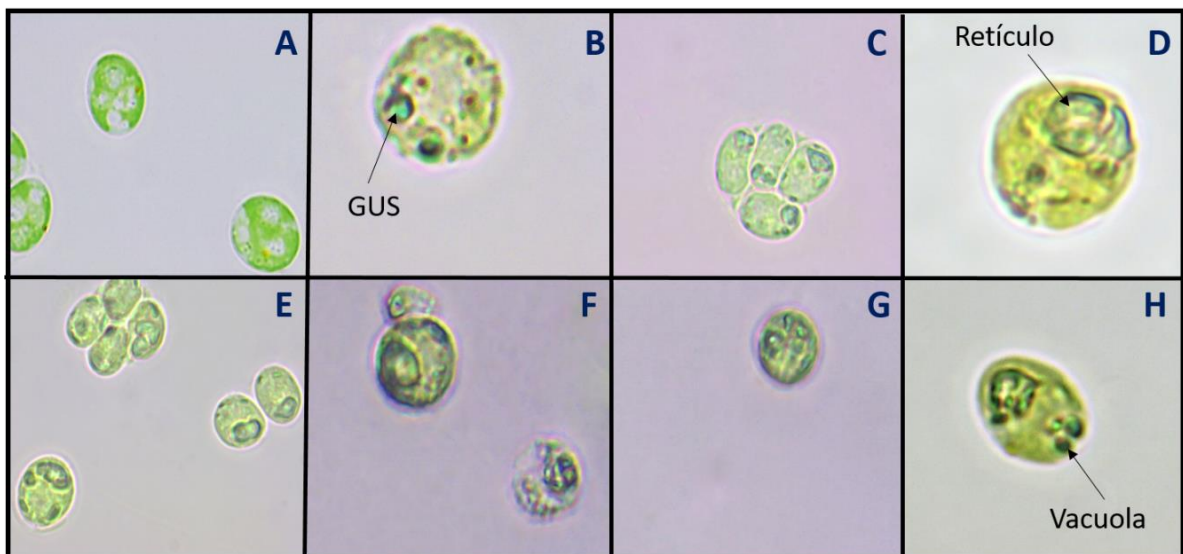


Figura 20. Localización histoquímica de GUS en líneas transgénicas de *Chlamydomonas*.

Fotografías de líneas transgénicas que expresan GUS bajo diferentes promotores. Objetivo de inmersión 100X. **A**, Tipo silvestre. **B**, Rep ToChLPV. **C**, CP TYLCV Sin. **D**, Rep TYLCV Sin. **E**, Rep TYLCV SLP. **F**, CaMV 35S. **G**, CP TYLCV SLP. **H**, Hsp70A/Rbc S2.

V.6 Curva estándar para la cuantificación de la proteína GUS

La cuantificación de la proteína recombinante en líneas transgénicas se determinó por los inmunoensayos Dot Blot y ELISA. Estos incluyeron el diseño de la curva estándar para determinar la concentración óptima de anticuerpos contra diferentes concentraciones de proteína GUS purificada. En ella, se interpolan las lecturas arrojadas por la reacción entre la interacción de la enzima fosfatasa alcalina (conjugada en el anticuerpo secundario) y el sustrato paranitrofenilfosfato. Para ello, se realizaron combinaciones con diferentes diluciones de anticuerpo primario y secundario.

La Figura 21, muestra las diferentes curvas obtenidas con las respectivas diluciones de anticuerpo. Con base en las ecuaciones de la recta y la regresión lineal, se estableció a la dilución 1:1500-1:1000 como la más apropiada para realizar los inmunoensayos Dot Blot y ELISA.

Tras haber establecido la curva estándar, se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de proteína soluble total para unificar la cantidad a colocar en la placa de 96 pozos, tal y como se explica en la figura 14. Esto, con el objetivo de cuantificar la concentración de proteína GUS producida en las líneas transgénicas de *Chlamydomonas*.

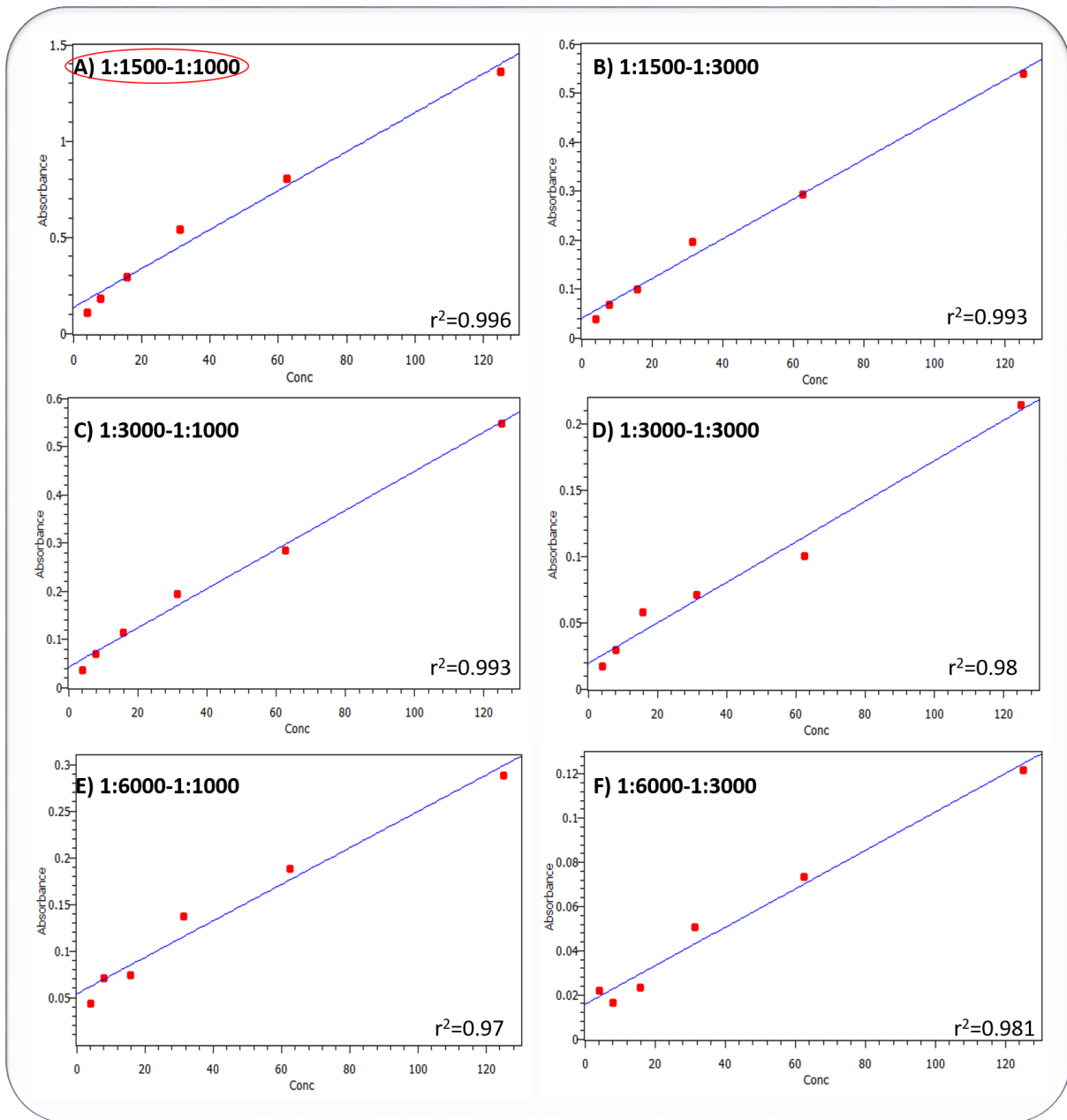


Figura 21. Curvas estándar para la cuantificación de GUS.

Estandarización de la concentración óptima de anticuerpos para la cuantificación de GUS en líneas transgénicas. Las diluciones en negritas en la parte superior izquierda de cada curva corresponden a la cantidad de anticuerpo primario y secundario (respectivamente) utilizado en el ensayo **A**, 1:1,500-1:1,000. **B**, 1:1,500-1:3,000. **C**, 1:3,000-1:1,000. **D**, 1:3,000-1:3,000. **E**, 1:6,000-1:1,000. **F**, 1:6,000-1:3,000.

V.7 Detección de la proteína recombinante por inmunoensayo Dot Blot

Una vez comprobada la actividad de GUS por ensayo histoquímico, se realizó como prueba cualitativa preliminar la detección de la proteína recombinante en las líneas transgénicas por Dot Blot. Se seleccionaron las colonias positivas a las pruebas anteriores y se sometieron al inmunoensayo con las condiciones establecidas por la curva estándar. Como resultado, el ensayo presentó señal en todas las extracciones de proteína soluble total. Tras haber obtenido señal en todas las muestras (triplicado de cada línea), se eligió al azar una colonia de cada línea transgénica, la cual corresponde a cada promotor a evaluar.

La Figura 22, muestra el Dot Blot con las siete líneas transgénicas con una mayor intensidad, que se utilizarán en el ensayo cuantitativo de ELISA indirecta.

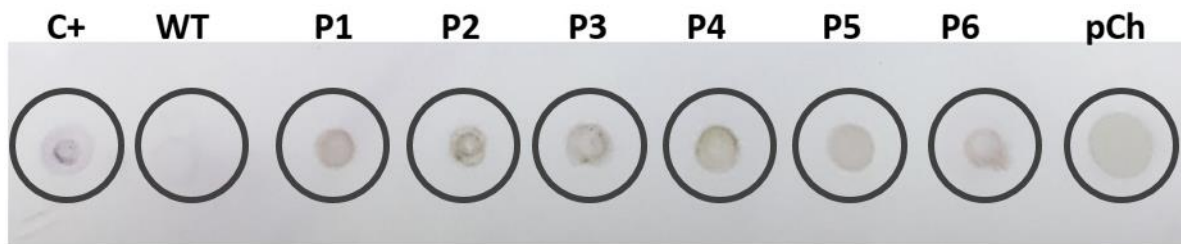


Figura 22. Dot Blot de proteína soluble total de líneas transgénicas de *Chlamydomonas*.

Proteína GUS detectada en diferentes líneas transgénicas por inmunoensayo Dot Blot. Cada línea expresa la proteína recombinante bajo los diferentes promotores (P1 a pCh) a evaluar. **C+**, Proteína GUS purificada. **WT**, Tipo silvestre (Wild type). Promotores: **P1**, Rep ToChLPV. **P2**, CP TYLCV-Sin. **P3**, Rep TYLCV-Sin. **P4**, Rep TYLCV-SLP. **P5**, CaMV 35S. **P6**, CP TYLCV-SLP. **pCh**, Hsp70A/Rbc S2.

VI. DISCUSIÓN

La expresión de proteínas recombinantes de interés farmacéutico en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* es un campo biotecnológico con mucho futuro (Franklin & Mayfield, 2004). Diversos estudios han mostrado que las líneas transformadas con genes foráneos localizados en el cloroplasto (líneas transplastómicas) generan mayores rendimientos de proteínas recombinantes que las líneas transformadas por vía nuclear. (Scranton *et al.*, 2015; Rosales-Mendoza, 2016). Los primeros estudios que se realizaron para expresar transgenes a nivel nuclear, dieron como resultado bajos rendimientos en comparación con las plantas superiores, o inclusive en comparación con los niveles de expresión en el cloroplasto de la microalga. La baja eficiencia en la expresión de transgenes nucleares se atribuye en parte al alto contenido de G+C del genoma de *Chlamydomonas*, lo cual favorece el proceso de silenciamiento de los genes exóticos. Por otra parte, se tiene un conocimiento limitado de promotores nucleares que puedan tener una elevada actividad transcripcional en esa microalga (Merchant *et al.*, 2007). No obstante, esos problemas, *Chlamydomonas* es un excelente sistema para la producción de proteínas terapéuticas, puesto que es reconocida como segura para el consumo humano, y la expresión de los transgenes a nivel nuclear favorece el adecuado plegamiento de la proteína y las diversas modificaciones postraduccionales que dan como resultado proteínas funcionales. Adicionalmente, los costos de producción y purificación de los productos son comparativamente muy bajos, puesto que su escalamiento es rápido, fácil y no requiere ningún tratamiento de purificación (Ma *et al.*, 2003; Mayfield *et al.*, 2003).

Como bien se sabe, algunos promotores virales, como el prom35S de CaMV (el más utilizado en la biotecnología vegetal), tienen una actividad transcripcional más elevada que los promotores de sus hospederos; sin embargo, el prom35S de CaMV no parece ser muy activo en *Chlamydomonas*, siendo superado por varios promotores de la microalga, o por elementos híbridos como el promotor Hsp70A/RbcS2. Puesto que ni aún el uso de este último promotor ha resuelto el

problema de los bajos rendimientos alcanzados con transgenes nucleares, decidimos explorar el potencial de algunos promotores geminivirales para ser utilizados en *Chlamydomonas reinhardtii*.

Avalos-Calleros en el 2015 demostró mediante ensayos de expresión transitoria en protoplastos de *Nicotiana tabacum* que los promotores *CP* y *Rep* de los begomovirus TYLCV-Sin, TYLCV-SLP, y ToChLPV, tienen actividad superior al promotor 35S de CaMV. Con base en ese trabajo, diseñamos los vectores con los promotores geminivirales fusionados a genes reporteros y demostramos por evidencia histoquímica que todos son funcionales en *Chlamydomonas* y, con base en el análisis microscópico, que la proteína recombinante se acumula en las vacuolas y el retículo endoplásmico.

Además, demostramos que la producción de la proteína GUS, bajo la expresión de los promotores *Rep* de ToChLPV, TYLCV-Sin, TYLCV-SLP y los promotores *CP* de los últimos dos geminivirus, es aparentemente igual o mayor que la del promotor endógeno Hsp70A/RbcS2, de acuerdo a lo observado en el análisis de Dot Blot. Esos resultados son preliminares, y deben ser corroborados en experimentos adicionales y utilizando técnicas cuantitativas más elaboradas. No obstante, los resultados obtenidos hasta el momento son significativos y prometedores, pues sugieren que algunos de los promotores que examinamos podrían ser utilizados como elementos importantes en sistemas convencionales de expresión nuclear de genes heterólogos, o mejor aún, en un sistema de expresión basado en elementos geminivirales, capaz de generar episomas auto-replicativos dentro de *Chlamydomonas*.

En resumen, en este trabajo se demostró por primera vez que promotores derivados de geminivirus son funcionales en *Chlamydomonas reinhardtii*, lo que abre nuevas posibilidades para el desarrollo de sistemas de expresión viral para la obtención de altos rendimientos de proteína recombinante en esa microalga.

VII. CONCLUSIONES

- Es posible transformar *Chlamydomonas reinhardtii* mediante *Agrobacterium tumefaciens*, con construcciones que contienen promotores geminivirales.
- La evidencia de los ensayos histoquímicos y de Dot Blot demostraron la funcionalidad de los promotores virales, Rep ToChLPV, Rep TYLCV-SLP, Cp TYLCV-SLP, Rep TYLCV-Sin, Cp TYLCV-Sin y 35S CaMV, en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Los ensayos de Dot Blot sugieren que todos los promotores virales son más fuertes que el endógeno de la microalga, siendo los promotores Rep del ToChLPV y CP de TYLCV-Sin los más potentes.
- El comportamiento de los promotores de geminivirus en la microalga es parecido al observado en protoplastos de *Nicotiana benthamiana*.

VIII. PERSPECTIVAS

- Clonar y analizar la expresión del gen reportero GFP bajo la dirección de los promotores geminivirales y compararlo con el promotor de la microalga Hsp70A/RbcS2.
- Seleccionar el promotor viral que exprese el gen reportero a mayores niveles, y utilizarlo para sobreexpresar una proteína antigénica.
- Determinar la funcionalidad y eficiencia replicativa del par cognado “proteína Rep/origen de replicación geminiviral”, en *Chlamydomonas*.
- Establecer la funcionalidad de la proteína Rep del vector, y la capacidad de auto escindir del genoma de la microalga para replicarse como episoma viral.
- Desarrollar un vector con elementos geminivirales capaz de sobreexpresar el gen de interés (GDI) en *C. reinhardtii* por escisión y multiplicación de un episoma con el GDI dirigido por un promotor potente.

IX. REFERENCIAS

Avalos-Calleros A (2015) Análisis Funcional de los Promotores Rep y CP de un Mutante Natural del Virus del Rizado Foliar Amarillo del Tomate (TYLCV) y un Begomovirus Co-infectante. Tesis de maestría, División de Biología Molecular IPICYT. México. 46-48.

Ascencio-Ibáñez JT, Díaz-Plaza R, Méndez-Lozano J, Monsalve-Fonnegra ZI, Argüello-Astorga G, and Rivera-Bustamante RF (1999) First report of Tomato Yellow Leaf Curl geminivirus in Yucatán, México. *Plant Dis* 83:1178.

Bañuelos-Hernández B, Monreal-Escalante E, González-Ortega O, Angulo C and Rosales-Mendoza S (2017) Algevir: An expression system for microalgae based on viral vectors. *Front. Microbiol.* 8:1110

Bennoun P, Atteia A, Rerre Y and Delosme M (1995) Etiolated cells of *Chlamydomonas reinhardtii*: choice material for characterization of mitochondrial membrane polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 22:10202-6.

Borkhsenius ON, Mason CB and Moroney JV (1998) The intracellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends Biochem Sci* 25(5):225-7.

Briddon RW, Patil BL, Bagewadi B, Nawaz-ul-Rehman MS and Fauquet CM (2010) Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolution Biol* 2010, 10:97.

Brown, J.K.; Zerbini, F.M.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Ramos-Sobrinho, R.; Silva, J.C.; Fiallo-Olivé E.; Briddon, R.W.; Hernández-Zepeda, C.; Idris, et al. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 1593–1619. PMID: 25894478 DOI: 10.1007/s00705-015-2398-y
Castillo AG, Collinet D, Deret S, Kashoggi A and Bejarano ER (2003) Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). *Virology*, 312(2): 381–394.

Chen M, Liu X, Wang Z, Song J, Qi Q and Wang PG (2005) Modification of plant N-glycans processing: The future of producing therapeutic protein by transgenic plants. *Medl Res Rev.* 25: 343-360.

Daniell H, Chebolu S, Kumar S, Singleton M and Falconer R (2005) Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine.* 23:1779-1783.

Dent RM, Han M and Niyogi KK (2001) Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trend Plant Sci* 6(8): 364-371.

Desbiez C, Davidt C, Metfouchit A, Laufs J and Gronenborn B (1995) Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(12) 5640-5644.

Díaz-Santos E, Vega M, Vila M, Vigarra J, and León R (2013) Efficiency of Different Heterologous Promoters in the Unicellular Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant* 150: 589-615

Diener DR, Curry AM, Johnson KA, Williams BD, Lefebvre PA, Kindle KL and Rosenbaum JL (1990) Rescate de un mutante de flagelos paralizados de *Chlamydomonas* por transformación. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 5739 5743.

Dressen I, Charpin El-Hamri G and Fussenegger M (2010) Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J Bact* 145:273-280.

Eichler-Stahlberg A, Weisheit W, Ruecker O and Heitzer M (2009) Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 229(4):873-83.

Franklin SE and Mayfield SP (2004) Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas*. *Curr Opin Plant Biol* 7(2):159-65

Grossman AR (2000) *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: genetics to

genomics. *Curr Opin Plant Biol* 3(2): 132-7.

Harris EH (1989) The *Chlamydomonas* Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego, CA, Academic Press. 3:136-178

Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:363-406.

Hippler M, Drepper F, Haehnel W and Rochaix J-D (1998) The N-terminal domain of PsaF: precise recognition site for binding and fast electron transfer from cytochrome c6 and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7339-7344.

Jeske H, Lütgemeier M and Preiß W (2001) DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *The EMBO J* 20 (21): 6158-6167.

Kindle KL, Schnell RA, Fernández E and Lefebvre PA (1989) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J Cell Biol* 109: 2589-2601.

Kreimer G (2009) The green algal eyespot apparatus a primordial visual system and more? *Curr Genet* 55(1):19-43.

Laufs J, Schumacher S, Geisler N, Jupina I and Gronenborn B (1995) Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Letters* 377(2):258-265.

León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A and Fernández E (2004) Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol* 22(1):45-52.

Luque A, Sanz-Burgos AP, Ramirez-Parra E, Castellano MM, and Gutierrez C (2002) Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology*, 302(1):83–94.

Ma JKC, Drake PMW and Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4:794-805.

Manuell A, Beligni M, Elder J, Siefker D, Tran M, Webber A, McDonald T and Mayfield S (2007) Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotech J* 5: 402-412.

Mayfield SP, Franklin SE and Lerner RA (2003) Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 438-442.

Melgarejo TA, Kon T, Rojas MR, Paz-Carrasco L, Zerbini M and Gilbertson RL (2013) Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *J of Virology* 87(10): 5397–5413.

Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Maréchal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernández E, Fukuzawa H, González-Ballester D, González-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riaño-Pachón DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martínez D, Ngau WC, Ollilar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS and Grossman AR (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of

key animal and plant functions. *Science* 318(5848):245-250.

Palmer KE and Rybicki EP (1998) The molecular biology of mastreviruses. *Adv Virus Res* 50:183-233.

Preiss W and Jeske H (2003) Multitasking in replication is common among geminiviruses. *J of Virology*, 77(5):2972 – 2980.

Pooggin MM (2013) How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Intern J of Mol Sci* 14(8):15233-15259.

Rodríguez-Negrete E, Lozano-Duran R, Piedra-Aguilera A, Cruzado L, Bejarano ER and Castillo AG (2013) Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytol* 199(2): 464–475.

Rosales-Mendoza S (2016) “Genetic engineering approaches for algae,” in *Algae-Based Biopharmaceuticals* (Springer), 15–40.

Ruecker O, Zillner K, Groebner-Ferreira R, and Heitzer M (2008) *Gussia-luciferase* as a sensitive reporter gene for monitoring promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genom* 280: 153–162.

Schroda M, Blöcker D and Beck CF (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J* 21(2):121–131.

Scranton MA, Ostrand JT, Fields FJ, and Mayfield SP (2015) *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products production. *Plant J* 82: 523–531.

Smart EJ & Selman BR (1993) Complementation of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant defective in the nuclear gene encoding the chloroplast coupling factor 1 (CF1) γ -subunit (atpC). *J. Bioenerg Biomem* 25: 275-284.

Specht E, Miyake-Stoner S, and Mayfield S (2010) Micro-algae come of age as a

platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett* 32: 1373–1383.

Strasburger E, Noll F, Schenck H and Schimper AFW (1994) *Tratado de Botánica* (8ª edición castellana). Ediciones Omega. Barcelona. 654-657.

Tran M, Zhon B, Petterson P, González M and Mayfield S (2009) Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnol and bioengin* 104(4): 663-673.

Varsani A, Navas-Castillo J, Moriones E, Hernandez-Zepeda C, Idris A, Brown JK, Zerbini FM and Martin DP (2014) Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch of Virol* 159(8):2193–2203.

Wang X, Brandsma M, Tremblay M, Maxwell D, Jevnikar A, Huner N and Ma S (2008) A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnology* 8:87.

Yang Z, Li Y, Chen F, Li D, Zhang Z, Liu Y, Zheng D, Wang Y and Shen G (2006) Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Chinese Sci Bull* 51(14):1703-1709.

Zerbini FM, Briddon RW, Idris A, Martin DP, Moriones E, Navas-Castillo et al. ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology*. 2017 Mar 13; 98(2):131–3.

Zhang J, Wang Y-Q, Hou H-W and Qian Y-J (2012) Characterization of the replication-associated protein (Rep) promoter of an alpha-satellite associated with Tobacco curly shoot virus. *African J of Biotech*, 11(15):3522-3530.

X. ANEXOS

X.1 Medios de cultivo

1. Medio LB-miller, 1 L:

- Original.
 - Extracto de levadura 5 g
 - Triptona 10 g
 - NaCl 10 g
 - Agar bacteriológico 15 g
- Modificado para antibiótico-Lenox.
 - Extracto de levadura 5 g
 - Triptona 10 g
 - NaCl 5 g
 - Agar bacteriológico 15 g

2. Medio SOC, 1 L:

- Triptona 20 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 0.5 g
- KCl 20 mM 10 mL (stock 250mM)
- Glucosa 20 mM 20 mL (stock 1M)
- MgCl 20 mM 5 mL (stock 2M)

3. Medio Tap pH=7, 1 L:

- Tris Base 2.42 g
- Sales TAP 25 mL
- Buffer de fosfatos, pH=7 0.375 mL
- Solución de metales 1 mL
- H₂O desionizada ~970 mL
- Agar bacteriológico 20 g

Ajustar pH con ácido acético glacial y KOH

-Sales TAP, 1 L:

- NH_4Cl 15 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g
- H_2O desionizada aforar

-Buffer de fosfatos pH=7, 1 L:

- K_2HPO_4 288 g
- KH_2PO_4 144 g

-Solución de Metales, 1 L:

- EDTA 63.69 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.06 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57 g
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.10 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.99 g

-Calentar la solución de EDTA hasta disolver, añadir 85 mL de KOH al 20% (p/v)

-Mezclar todas las soluciones y aforar a 1L con agua destilada.

-Inicialmente la mezcla tendrá un color verde, esperar a que vire a un color púrpura (aproximadamente 15 días). Si se forma un precipitado café, filtrar la solución. Si el precipitado no aparece, ajustar el pH de la solución a 7.0 con KOH al 20% (p/v) o HCl 1 N.

-Almacenar a 4°C en ausencia de luz.

X.2 Preparación de células *E. coli* TOP 10 calcio competentes

- En un tubo con 3 mL de medio LB sin antibiótico, inocular una asada de la cepa TOP 10 (criopreservada a -80°C) e incubar toda la noche a 37°C, agitando a 200 rpm (pre-inóculo).
- Inocular 500 µL del pre-inóculo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, que contenga 50 mL de medio LB sin antibiótico.
- Incubar durante 90 a 100 min a 37°C con agitación constante a 200 rpm.
- Colocar el medio en botellas sorvall de 250 mL, previamente enfriadas, y centrifugar durante 10 min a 8,000 rpm a 4°C, decantar rápidamente el sobrenadante y colocar las botellas en un baño de hielo.
- Agregar a cada botella (con 50 mL de medio LB) 7.7 mL de solución I fría, resuspender las células agitando con el vórtex de 5 a 10 seg, colocar en hielo y repetir hasta resuspender totalmente.
- Centrifugar durante 10 min a 8,000 rpm y descartar rápidamente el sobrenadante y regresar al baño de hielo.
- Agregar a cada botella 1.27 mL de solución I fría, resuspender las células agitando con el vórtex de 5 a 10 seg, colocar en hielo y repetir hasta resuspender.
- Alicuotar de 35 a 50 µL de células en tubos de 1.5 mL fríos y colocar en nitrógeno líquido y almacenar a -80°C

Solución I:

- Cloruro de calcio, CaCl₂ 0.1 M
- Glicerol 15%

Todos los materiales y soluciones a utilizar deberán enfriarse con anticipación

X.3 Transformación química de bacterias *E. coli* TOP 10

- Descongelar las células calcio competentes durante 5 a 10 min en hielo.
- Adicionar a las células 5 µL de la ligación y mezclar brevemente.
- Reposar en hielo durante 20 min.
- Transferir rápidamente los tubos a 42°C e incubar durante 90 seg.

- Transferir rápidamente al hielo y reposar durante 10 min.
- Agregar 250 μL de medio LB sin antibiótico.
- Incubar a 37°C durante 45 min en agitación constante a 600 rpm.
- Preparar las cajas Petri de LB con antibiótico, 40 μL de IPTG y 15 μL de X-GAL, distribuir en toda la caja Petri hasta que se seque.
- Inocular los 290 μL de las células en la placa y distribuir perfectamente hasta que se seque.
- Incubar a 37°C durante toda la noche (aproximadamente 18 h).

X.4 Miniprep

- Inocular una colonia de *E. coli* transformada en 3 mL de medio LB con el antibiótico adecuado durante 18-24h a 37°C.
- Centrifugar en tubo de 1.5 mL a 8,000 rpm durante 3 min y desechar el sobrenadante (primero centrifugar 1.5 mL de muestra y finalmente los 1.5 mL restantes).
- Dejar escurrir sobre servitoallas.
- Resuspender la pastilla en 100 μL de solución I y mezclar con vórtex.
- Agregar 200 μL de la solución II (preparada al momento de usar) mezclar por inversión suavemente hasta quede traslucida. Incubar por 3 min.
- Agregar 150 μL de la solución III, mezclar 10 veces por inversión.
- Reposar en hielo 10 min.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 15min y transferir el sobrenadante a tubos nuevos.
- Agregar 7 μL de RNasa (2 mg/mL) e incubar durante 20 min a 37°C.
- Agregar 900 μL de etanol absoluto y 45 mL de acetato de sodio al 3 M.
- Mezclar por inversión 10 veces y reposar en hielo durante 10 min.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y eliminar el sobrenadante.
- Lavar con 500 μL de etanol al 70% y centrifugar a 13,000 rpm por 3 min.
- Secar invirtiendo los tubos en servitoallas.
- Resuspender la pastilla en 50 μL de agua.

X.5 Maxiprep

- Inocular una colonia o preinóculo de *E. coli* transformada en 200 mL de LB con el antibiótico adecuado durante toda la noche a 37°C.
- Colectar las células por centrifugación a 8,000 rpm por 10 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 5 mL de solución I.
- Adicionar 10 mL de solución II y mezclar por inversión 10 veces.
- Dejar reposar en hielo por 10 min.
- Transferir el sobrenadante a tubos sorvall estériles de 40 mL.
- Adicionar 18 mL de isopropanol (0.8 mL aproximadamente).
- Reposar 20 min en hielo.
- Centrifugar a 10,000 rpm por 20 min y eliminar el sobrenadante.
- Lavar la pastilla con 5 mL de etanol al 70%.
- Centrifugar a 10,000 rpm por 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y secar en servitoallas.
- Resuspender en 500 µL de agua destilada estéril (transferir a tubos de 1.5 mL)
- Adicionar 1 vol de fenol:cloroformo y mezclar en vórtex
- Centrifugar a 13,000 rpm por 3 min.
- Transferir la parte superior acuosa a tubos nuevos y agregar 10 µL de RNasa (2mg/mL) e incubar a 37°C por 30 min.
- Adicionar 1/10 vol de acetato de sodio al 3 M y 2 vol de etanol absoluto.
- Colocar en hielo por 15 min.
- Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min.
- Lavar la pastilla con 500 µL de etanol al 70%.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 3 min, eliminar el sobrenadante y secar en servitoalla.
- Resuspender de 300 a 500 µL de agua destilada estéril.

Soluciones para miniprep y maxiprep:

1. Solución I, 150 mL:

- Glucosa 50 mM 1.35g
- Tris 25 mM pH8 3.75mL (stock 1M)
- EDTA 10 mM pH8 3mL (stock 0.5M)

Esterilizar en autoclave

2. Solución II, 10 mL:

- NaOH 0.2 M 400µL (stock 5M)
- SDS 1% 500µL (stock 20%)

Preparar al momento

3. Solución III, 100 mL:

- Acetato de potasio 3 M 29.5g
- Ácido acético glacial 11.5mL

Esterilizar en autoclave

X.6 Preparación de células electro competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

1. Pre-inóculo:

- Inocular una asada del glicerol en criopreservación de la cepa GV3101 en 5 mL de medio SOC con Rifampicina (15 µg/mL) y Gentamicina (40 µg/mL) e incubar a 28°C por 36 a 48h en agitación constante, 200 rpm.
- Estriar una asada del cultivo anterior en una placa de medio SOC con las mismas concentraciones de antibiótico. Cubrir con aluminio e incubar a 28°C de 1 a 3 días.
- Inocular una colonia de la placa en 5 mL de medio SOC con antibiótico e incubar toda la noche a 28°C en agitación constante, 200 rpm.

2. Inóculo:

- Inocular una dilución 1:50 del pre-inóculo en 200 mL de medio SOC sin antibiótico e incubar a 28°C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (O.D._{600nm}) entre 0.5 a 1.0 (aproximadamente de 7 a 8 h).
- Al alcanzar la O.D. deseada, colocar en hielo por 15 min.
- Transferir a tubos sorvall estériles fríos. Mantener siempre en frío los tubos, incluso al transferir y/o resuspender.
- Centrifugar a 5,000 rpm por 15 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.
- Lavar la pastilla con 20 mL de glicerol al 10% frío y centrifugar a 5,000 rpm por 10 min a 4°C.
- Repetir el paso anterior dos veces más.
- Descartar el sobrenadante y agregar 800 µL de glicerol al 10% frío.
- Resuspender con cuidado la pastilla y hacer alícuotas de 80 µL en tubos de 1.5mL fríos.
- Almacenar a -80°C hasta el momento de utilizar o utilizar inmediatamente.

1. Medio SOC, 1L:

- | | |
|---|---------------------|
| • Triptona | 20 g |
| • Extracto de levadura | 5 g |
| • NaCl | 0.5 g |
| • KCl 20mM | 10 mL (stock 250mM) |
| • Glucosa, C ₆ H ₁₂ O ₆ 20mM | 20 mL (stock 1M) * |
| • Cloruro de magnesio, MgCl 20mM | 5 mL (stock 2M) ** |

*Esterilizar con filtros de 0.22 micras y almacenar a 4°C.

**Esterilizar en autoclave

todos los materiales a utilizar deberán enfriarse con anticipación

X.7 Transformación de *A. tumefaciens* GV3101 por electroporación

Es necesario tener preparado el material a usar:

- Configura el electroporador Bio-Rad antes de sacar las células con las siguientes condiciones:
 - Voltaje 2500 V
 - Capacitancia 25 μ F
 - Resistencia 400 Ω
 - Celda 2 mM
 - Celdas previamente frías (Dejar un par de horas a -20C)
 - Un tubo con 1 mL de medio SOC (para recuperar las células) y una alícuota
 - Hielo
 - DNA para electroporar previamente cuantificado.
-
- Sacar un tubo con células electro-competentes del ultracongelador y colocar el hielo. (no más de 2 min)
 - Agregar al tubo 1-5 μ L (0.2 a 5 μ g) de ADN y transferir la mezcla (células /ADN) a una celda fría. Colocar en hielo
 - Limpiar la celda con papel Kimwipe y colocarla correctamente dentro de la cámara de la celda.
 - Presionar el botón de pulso y esperar a que se escuche un ligero ruido (click).
 - Inmediatamente después agregar 500 μ L de medio SOC a la celda.
 - Usando una pipeta Pasteur, transferir el contenido de la celda en un tubo con medio SOC de 1 ml. (puede ser en un tubo falcon de 15 o un eppendorf de 5 mL)
 - Incubar el tubo a 28 °C de 2 a 4 h en agitación constante (150-200 rpm).
 - Concentrar las células a 3,000 rpm por 3 min.
 - Resuspender la pastilla en 500 μ L de medio SOC.

- Sembrar 50 o 100 μL en placas con el antibiótico de selección (Kn 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rf 4050 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Dejar incubando por 36 a 48 h a 28 C protegidas de la luz.
- Sembrar una colonia en un tubo de 5 mL de medio SOC con el antibiótico de selección, dejar incubando 24 a 36 h.
- Almacenar en glicerol a -70 °C y estriar en placa.

X.8 Transformación nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

- Inocular una colonia de *C. reinhardtii* sin transformar en 10 mL de medio TAP sin antibiótico, hasta obtener una O.D._{750nm} de 0.5.
- Centrifugar a 2,500 rpm e inocular 200 μL en una caja Petri y dejar crecer por dos días.
- Inocular una colonia de *A. tumefaciens* con el plásmido a transferir en 10 mL de medio LB con antibiótico, adicionar acetosiringona al 100 μM . Proteger de la luz e incubar por dos días (O.D._{600nm}=0.5) a 28°C.
- Centrifugar a 2,500 rpm y concentrar en 200 μL de medio TAP. Agregar 100 μM de acetosiringona.
- En la misma placa donde se crecieron las microalgas, realizar el co-cultivo colocando los 200 μL de *Agrobacterium* y esparcir por toda la caja hasta homogeneizar.
- Incubar el co-cultivo por 2 días en ausencia de luz a 25°C.
- Posterior al periodo de incubación, añadir a la caja de 1 a 2 mL de medio TAP con Cefotaxima 500 mg/mL y levantar toda la capa de co-cultivo con el asa de vidrio.
- Transferir a tubos nuevos estériles de 1.5 mL y centrifugar a 2,500 rpm por 3 min.
- Descartar el sobrenadante blanco y dejar el precipitado de color verde.
- Colocar 1 mL de medio TAP con Cefotaxima 500 mg/mL y homogeneizar por inversión.
- Centrifugar a 2,500 rpm por 3 min.

- Repetir los dos pasos anteriores hasta obtener un color verde homogéneo y haber eliminado la mayor cantidad de *Agrobacterium* posible.
- Concentrar las microalgas en 200 μ L por centrifugación a 2,500 rpm por 3 min y transferir a cajas Petri con medio TAP con antibiótico de selección y Cefotaxima 500 mg/mL.
- Incubar en fotoperiodos de 14 h luz/10 h oscuridad a 25°C hasta que aparezcan colonias (aproximadamente 15 días)

X.9 Extracción de ADN total de *Chlamydomonas reinhardtii* por el método de Jeffrey Dodge-CTAB (modificado)

- Precaentar de 5 a 10 mL de CTAB a 65°C en baño maría y adicionar 0.1% de PVP.
- En tubo de 1.5 mL centrifugar 2 mL de cultivo de *Chlamydomonas* y agregar de 500 a 1000 μ L de CTAB precalentado, aplicar vórtex por 50 seg e incubar a 65°C por 30 min. Agitar con vórtex la muestra cada 4 min.
- Colocar la muestra en hielo y centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 min y transferir el sobrenadante.
- Agregar 1 μ L de RNasa y mezclar por inversión, incubar por 20 min a 37°C.
- Agregar de 500 a 600 μ L de solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y agitar por inversión.
- Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 10 min. Tomar el sobrenadante.
- Agregar un volumen igual (500 μ L) de isopropanol frío (-20°C) y mezclar por inversión.
- Incubar la mezcla a -20°C durante 20-45 min o toda la noche.
- Centrifugar a 15,000 rpm a 4°C por 10 min y eliminar el sobrenadante cuidadosamente.
- Agregar 1 mL de buffer de lavado frío (-20°C) y mezclar bien por inversión.
- Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 5 min, eliminar el sobrenadante y dejar la pastilla.
- Agregar 1 mL de etanol al 70% frío (-20°C) y mezclar por inversión.

- Centrifugar a 13,000 rpm a 4°C por 5 min y eliminar el sobrenadante y dejar la pastilla.
- Secar el ADN a 40°C por 10 min.
- Resuspender la pastilla en 50 µL de agua destilada estéril.

Buffer CTAB:

- Tris-HCl, pH 8 100 mM
- EDTA 20 mM
- NaCl 1.4 M
- CTAB 2%
- Metabisulfito de sodio, Na₂S₂O₅ 0.1%

Ajustar el pH con HCl 1N

- Mercaptoetanol, C₂H₆OS 0.2%

Añadir 0.1% de PVP solo a la cantidad a utilizar

Buffer de lavado, 100 mL:

- Acetato de amonio, C₂H₇NO₂ 0.07780 g
- Etanol absoluto, C₂H₅OH 79.16 mL

X.10 Extracción de proteína soluble total de *C. reinhardtii*

- Recolectar la biomasa microalgal a 10,000 rpm por 3 min (aproximadamente 2 mL de un cultivo con una O.D. de 1.7).
- Pesar la biomasa y agregar tres veces el volumen de Buffer de extracción con inhibidor de proteasa (1 µL por 1 mL de buffer de extracción).
- Mezclar por vórtex.
- Mantener las muestras todo el tiempo en hielo para la sonicación.
- Sonicar a una amplitud del 30% por un lapso de 15 seg, dejar reposar la muestra (en el hielo) por 15 seg (repetir la sonicación y el reposo por tres veces). Tiempo estimado, 1 min 15 seg.

- Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C.
- Tomar el sobrenadante (corresponde a la fracción soluble).
- Cuantificar por Bradford o almacenar a -80 °C.

Buffer de extracción de proteína soluble total.

- | | |
|-------------------------------|---------------|
| - Buffer de fosfatos de sodio | 50 mM, pH 7.0 |
| - DTT | 10 mM |

X.11 Cuantificación de proteína soluble total por método de Bradford

- En una placa de 96 pozos, realizar la curva de calibración por triplicado con la albúmina de suero bovino (BSA).
- Realizar por diluciones seriadas la curva estándar de BSA, en concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 y 7.8 µg/mL.
- En el último pozo de la curva solo cargar agua (blanco).
- Cargar en cada pozo de la placa 10 µL de concentración de la curva y de cada muestra de proteína soluble total (por triplicado), más 190 µL de reactivo Bradford 1X. Obtener un volumen total de 200 µL en cada pozo.
- Dejar reposar la reacción por cinco min. No exceder el tiempo.
- Realizar la lectura a λ 595 nm (lector de placas de ELISA).

X.12 Determinación de proteína recombinante por Dot Blot

- Una vez que se realizó el protocolo de extracción de proteína soluble total por sonicación, colocar 5 µL de cada una de las muestras, el control positivo (proteína purificada) y del tipo silvestre en un trozo de nitrocelulosa.
- Dejar secar por 15 min.
- Añadir la cantidad necesaria para cubrir el trozo de nitrocelulosa con buffer de bloqueo (BSA al 10% en TBS).
- Incubar en agitación constante por 60 min.
- Realizar tres lavados con buffer TBS-T por 5 min en agitación constante.

- Añadir el anticuerpo primario, dilución 1:1500, de manera que quede cubierta toda la membrana de nitrocelulosa. Durante 60 min a 37 °C en agitación constante.
- Realizar tres lavados con buffer TBS-T por 5 min en agitación constante.
- Añadir el anticuerpo secundario, dilución 1:1000, de manera que quede cubierta toda la membrana de nitrocelulosa. Durante 60 min a 37 °C en agitación constante.
- Realizar tres lavados con buffer TBS-T por 5 min en agitación constante.
- Para revelar la membrana, se cubrió con solución con sustrato paranitrofenilfosfato.
- Dejar la reacción hasta notar alguna señal en las muestras. El tiempo puede variar, desde 15 min hasta 1 h.