

## ÍNDICE

PÁG.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ABREVIATURAS.....	xvi
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1	
ANTECEDENTES	
1.1. Generalidades de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	4
1.1.1. Características físicas .....	6
1.1.2. Núcleo .....	7
1.1.3. Mitocondria.....	7
1.1.4. Genoma del Cloroplasto.....	7
1.2. Transformación genética de plástidos. ....	10
1.2.1. Métodos de transformación de plástidos.....	11
1.2.2. Co-transformación.....	13
1.3. Proteínas recombinantes y biorreactores más comunes. ....	13
1.4. Plantas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes. ....	16
1.5. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes. ....	18
1.6. Genes reporteros y proteínas recombinantes en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	19
1.6.1. Optimización del uso del codón para la expresión de proteínas recombinantes en el cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	20
1.7. Promotores, regiones 5' y 3' no traducibles (UTR) en la expresión de genes heterólogos en el cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	21
1.8. El gen <i>psbD</i> , su promotor y su región 5' no traducible. ....	23

## CAPÍTULO 2.

### JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Justificación .....	27
2.2. Hipótesis .....	27
2.3. Objetivos.....	28
2.3.1. Objetivo general.....	28
2.3.2. Objetivos específicos. ....	28

## CAPÍTULO 3.

### MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estrategia Experimental.....	29
3.2. Material biológico.....	30
3.2.1. Cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	30
3.2.2. Cultivo de <i>E. coli</i> cepa DH10B. ....	30
3.3. Extracción de ácidos nucléicos.....	30
3.3.1. Extracción de ADN genómico. ....	30
3.3.2. Extracción y purificación del ADN plasmídico. ....	32
3.4. Vectores de clonación y/o transformación .....	33
3.4.1. Vector pGEM-T-Easy .....	33
3.4.2. Vector p322 .....	34
3.4.3. Vector p667 .....	35
3.4.4. Plásmido que contiene al gen reportero <i>luxCt</i> .....	35
3.4.5. Plásmido que contiene la región 3' no traducible del gen <i>rbcL</i> . ....	35
3.5. Oligonucleótidos.....	36
3.6. Clonación de la región P+5'UTR del gen <i>psbD</i> en el vector comercial pGEM-T-Easy.....	36

3.6.1. Amplificación de la región del promotor y 5' UTR (P+5'UTR) del gen <i>psbD</i> por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	36
3.6.2. Purificación de los productos amplificados por PCR. ....	37
3.6.3. Ligación....	37
3.6.4. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> cepa DH10B por choque térmico. ....	38
3.6.5. Digestión del plásmido que contiene la región P+5'UTR con la enzima de restricción Eco RI. ....	39
3.6.6. Secuenciación del fragmento P+ 5' UTR del gen <i>psbD</i> . ....	39
3.7. Elaboración de la construcción P+5' UTR de <i>psbD/luxCt/3'UTR de rbcL</i> .....	39
3.7.1. Clonación de la secuencia del gen reportero <i>luxCt</i> en el extremo 3' del fragmento P+5'UTR del gen <i>psbD</i> en pGEM-T-Easy.....	40
3.7.2. Clonación del fragmento 3'UTR del gen <i>rbcL</i> en el extremo 3' del gen reportero <i>luxCt</i> , en el plásmido que contenía P+5'UTR <i>psbD / luxCt</i> en pGEM-T-Easy.....	43
3.7.3. Clonación de la construcción P+5'UTR <i>psbD/luxCt/3'UTR rbcL</i> en el vector de transformación p322.....	45
3.8. Transformación por biobalística.....	51
3.9. Análisis de las líneas celulares obtenidas de los experimentos por biobalística.....	54

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	56
4.2. Extracción de ADN. ....	56
4.3. Clonación y secuenciación de la región P+5'UTR del gen <i>psbD</i> . ....	57
4.3.1. Amplificación de la región P+5' UTR del gen <i>psbD</i> . ....	57
4.3.2 Clonación de la región P+5' UTR del gen <i>psbD</i> en el vector pGEM-T-Easy ..	58
4.3.3. Secuenciación de la región P+5' UTR del gen <i>psbD</i> .....	59
4.4. Elaboración de la construcción P+5'UTR <i>psbD/luxCt/3'UTR rbcL</i> .....	62

4.4.1. Clonación de la secuencia del gen reportero <i>luxCt</i> en el extremo 3' del fragmento P+5'UTR del gen <i>psbD</i> en el vector pGEM-T-Easy .....	62
4.4.2. Clonación del fragmento 3'UTR del gen <i>rbcL</i> en el extremo 3' del gen reportero <i>luxCt</i> , en el plásmido que contenía P+5'UTR <i>psbD / luxCt</i> en pGEM-T-Easy .....	66
4.5. Clonación de la construcción P+5'UTR <i>psbD/luxCt/3'UTR rbcL</i> en el vector de transformación p322.....	68
4.5.1. Análisis del plásmido pTDL mediante la técnica de PCR.....	72
4.6. Transformación de <i>C. reinhardtii</i> por biobalística.....	73
4.7. Análisis mediante PCR de las líneas celulares obtenidas del experimento de biobalística.....	78
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	
Conclusiones .....	82
Perspectivas .....	82
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	
APÉNDICES.....	84
.....	90