

# 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 nucleicos.....	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</i> / <i>luxCt</i> /3'UTR de <i>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</i> / <i>luxCt</i> en pGEM-T-Easy.	43
3.7.3. Clonación de la construcción P+5'UTR <i>psbD</i> / <i>luxCt</i> /3'UTR <i>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</i> / <i>luxCt</i> /3'UTR <i>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</i> / <i>luxCt</i> en pGEM-T-Easy .....	66
4.5. Clonación de la construcción P+5'UTR <i>psbD</i> / <i>luxCt</i> /3'UTR <i>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> .....	84
<b>APÉNDICES</b> .....	90