

## Índice de Contenido

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen .....                                                                        | 1  |
| Introducción.....                                                                    | 2  |
| Capitulo 1 .....                                                                     | 3  |
| Antecedentes.....                                                                    | 3  |
| 1.1 Proteínas recombinantes .....                                                    | 3  |
| 1.2 Biorreactores para la producción de proteínas recombinantes. ....                | 3  |
| 1.3 Plantas como Biorreactores.....                                                  | 4  |
| 1.4 Transplastómica .....                                                            | 4  |
| 1.4 Proteínas recombinantes producidas en el cloroplasto. ....                       | 6  |
| 1.5 Microalgas como biorreactores de proteínas recombinantes .....                   | 7  |
| 1.6 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....                                           | 9  |
| 1.8 Gen <i>chlB</i> del cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> . ....                  | 13 |
| 1.9 Gen <i>rbcL</i> .....                                                            | 15 |
| 1.10 Gen <i>luxCt</i> .....                                                          | 16 |
| 1.11 Método de Transformación por Biobalística. ....                                 | 17 |
| Justificación .....                                                                  | 19 |
| Hipótesis .....                                                                      | 20 |
| Objetivos.....                                                                       | 20 |
| Capítulo 2 .....                                                                     | 21 |
| Materiales y Métodos .....                                                           | 21 |
| 2.1 Estrategia Experimental .....                                                    | 21 |
| 2.2 Cepa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> y Cultivo .....                         | 21 |
| 2.3 Cepa de <i>E. coli</i> .....                                                     | 22 |
| 2.4 Cálculo de la concentración celular en el cultivo de <i>C. reinhardtii</i> ..... | 22 |
| 2.5 Extracción de Ácidos Nucleicos .....                                             | 24 |
| 2.5.1.- Extracción de ADN genómico .....                                             | 24 |
| A) Protocolo original .....                                                          | 24 |
| B) Protocolo modificado .....                                                        | 25 |
| 2.5.2.- Extracción del plásmido.....                                                 | 26 |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.2.1.- Extracción mediante lisis alcalina .....                                                           | 26 |
| 2.5.2.2.- Extracción de plásmido mediante un estuche comercial.....                                          | 27 |
| 2.6 Plásmidos y Vectores .....                                                                               | 27 |
| 2.6.1.- Plásmidos utilizados para elaborar la construcción de expresión. ....                                | 27 |
| 2.6.2.- El Plásmido que confiere resistencia a espectinomicina ( <i>p667</i> ) .....                         | 27 |
| 2.6.3.- Plásmido de transformación para <i>C. reinhardtii</i> ( <i>p322</i> ) .....                          | 27 |
| 2.7 Elaboración del <i>ptBLL</i> ( <i>P+5'UTRchlB+luxCt+3'UTRrbcL</i> en el vector <i>p322</i> ) .....       | 28 |
| 2.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....                                                          | 35 |
| 2.8.1.- Oligonucleótidos: .....                                                                              | 35 |
| 2.8.2.- Análisis de la construcción <i>ptBLL</i> ( <i>P+5'UTRchlB+luxCt+3'UTRrbcL</i> en <i>p322</i> ). .... | 36 |
| 2.8.3.- Identificación de la presencia del <i>cBLL</i> en el vector <i>p322</i> .....                        | 36 |
| 2.8.4.- Identificación de la orientación del <i>cBLL</i> en <i>p322</i> .....                                | 36 |
| 2.8.5 Análisis de las colonias recuperadas del Bombardeo.....                                                | 38 |
| 2.8.5.1 Identificación del gen reportero <i>luxCt</i> .....                                                  | 38 |
| 2.8.5.2.- Identificación de la <i>cBLL</i> en el cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> . ....                 | 39 |
| 2.8.5.3.- Análisis para identificar homoplasma.....                                                          | 40 |
| 2.9 Transformación de <i>C. reinhardtii</i> por medio de Biobalística .....                                  | 40 |
| 2.9.1 Preparación de las células .....                                                                       | 40 |
| 2.9.2 Esterilización de las membranas .....                                                                  | 41 |
| 2.9.3 Protocolo de transformación por biobalística.....                                                      | 41 |
| Capítulo 3 .....                                                                                             | 46 |
| Resultados y Discusión.....                                                                                  | 46 |
| 3.1.- Elaboración de la <i>cBLL</i> ( <i>P+5'UTRchlB+luxCt+3'rbcL</i> ) en <i>pGEM-T-easy</i> . ....         | 46 |
| 3.2 Clonación de la <i>cBLL</i> en <i>p322</i> para obtener <i>ptBLL</i> .....                               | 48 |
| 3.3 Análisis de PCR .....                                                                                    | 50 |
| 3.4 Transformación de <i>C. reinhardtii</i> por medio de Biobalística. ....                                  | 52 |
| 3.4.1 Primer experimento de transformación de <i>C. reinhardtii</i> . ....                                   | 52 |
| 3.4.2 Segundo experimento de transformación de <i>C. reinhardtii</i> . ....                                  | 52 |
| 3.5.- Análisis de las clonas recuperadas.....                                                                | 54 |
| 3.5.1 Análisis del primer grupo de colonias recuperadas.....                                                 | 54 |
| 3.5.1.1 Detección de la presencia de <i>luxCt</i> en las colonias recuperadas .....                          | 55 |

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.1.2.- Detección de clonas transplastómicas de <i>C. reinhardtii</i> .                  | 57 |
| 3.5.1.3 Detección de homoplasma en la clona transplastómica 222 de <i>C. reinhardtii</i> . | 58 |
| 3.5.2 Análisis del segundo grupo de colonias recuperadas.                                  | 61 |
| 3.5.3 Análisis por PCR de las colonias provenientes de la clona 222.                       | 64 |
| 3.5.4 Análisis por PCR de colonias provenientes de la clona 254.                           | 67 |
| Capítulo 4                                                                                 | 70 |
| Conclusiones.                                                                              | 70 |
| Capítulo 5                                                                                 | 71 |
| Perspectivas                                                                               | 71 |
| <b>Referencias Bibliográficas</b>                                                          | 72 |
| Anexos                                                                                     | 77 |
| Anexo 1                                                                                    | 77 |
| Anexo 2                                                                                    | 79 |
| Anexo 3                                                                                    | 80 |
| Anexo 4                                                                                    | 82 |
| Anexo 5                                                                                    | 84 |
| Anexo 6                                                                                    | 85 |