

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción	2
CAPÍTULO 1	4
ANTECEDENTES.....	4
1.1 Proteínas recombinantes	4
1.2 Sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes.....	4
1.2.1 Transplastómica.....	9
1.3 Microalgas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes.....	11
1.3.2 Fisiología de <i>C. reinhardtii</i>	13
1.3.3 El cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i>	15
1.4 Promotores y regiones no traducibles 5' y 3' en la expresión de genes heterólogos en el cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	18
1.4.1 El gen <i>tufA</i> del cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> y sus secuencias reguladoras.	21
1.4.2 El gen <i>rbcL</i> del cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> y sus secuencias reguladoras.	24
1.5 Genes reporteros en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	25
1.5.1 El gen reportero luxCt.....	26
1.6 Justificación	28
1.7 Hipótesis	28
1.8 Objetivos.....	29
1.8.1 Objetivo general	29
1.8.2 Objetivos específicos.....	29
CAPÍTULO 2	30

MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1 Caracterización <i>in silico</i> de la región promotora y 5' UTR del gen <i>tufA</i>	30
2.1.1 Análisis PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements)	30
2.1.2 Análisis mediante el programa BPROM.....	32
2.2 Material biológico.....	33
2.2.1 Cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	33
2.2.2 Cultivo de <i>E. coli</i> cepa DH10B.....	34
2.2.3 Transformación de bacterias.....	34
2.3 Extracción de ácidos nucleicos.....	35
2.3.1 Extracción y purificación del ADN plasmídico.....	35
2.3.2. Extracción de ADN genómico.....	36
2.4 Vectores de clonación y transformación.....	38
2.4.1 Vector pGEM-T-Easy	38
2.4.2 Vector P322.....	39
2.4.3 El gen reportero luxCt.....	40
2.4.4 Región del promotor más 5' UTR del gen <i>tufA</i>	40
2.4.5 Región 3' UTR del gen <i>rbcL</i>	40
2.5 Oligonucleótidos.....	41
2.6 Elaboración de la construcción génica tLrA (P+5'UTR <i>tufA</i> / luxCt /3'UTR <i>rbcL</i>).	41
2.6.1 Clonación del gen reportero luxCt en el plásmido que contiene al P+5'UTR del gen <i>tufA</i> en pGEM-T-Easy.....	42
2.6.2 Clonación del 3'UTR del gen <i>rbcL</i> en el plásmido que contiene P+5'UTR <i>tufA</i> /luxCt en el vector pGEM-T-Easy.....	45
2.6.3 Análisis de la integridad de la construcción génica tLrA (P+5'UTR <i>tufA</i> /luxCt /3'UTR <i>rbcL</i>).....	48

2.7 Identificación de clonas transplastómicas y homoplásMICAS de <i>C. reinhardtii</i> por medio de la técnica de PCR	50
2.7.1 Análisis por PCR para identificar clonas transplastómicas de <i>C. reinhardtii</i>	51
2.7.2 Análisis por PCR para identificar clonas homoplásMICAS de <i>C. reinhardtii</i>	55
CAPITULO 3	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
3.1 Caracterización <i>in silico</i> de la región promotora y el 5' UTR del gen <i>tufA</i>	58
3.1.1 Análisis PLACE	58
3.1.2 Análisis BPROM	59
3.2.1 Clonación del gen reportero luxCt en el plásmido que contiene al P+5'UTR del gen <i>tufA</i> en pGEM-T-Easy.....	62
3.2.2 Clonación del 3'UTR del gen <i>rbcL</i> en el plásmido que contiene P+5'UTR <i>tufA/luxCt</i> en el vector pGEM-T-Easy.....	65
3.2.3 Análisis de la integridad de la construcción génica tLrA (P+5'UTR <i>tufA/luxCt/3'UTR rbcL</i>).....	68
3.3 Identificación de clonas transplastómicas y homoplásMICAS de <i>C. reinhardtii</i> por medio de la técnica de PCR	72
3.3.1 Identificación de clonas transplastómicas de <i>C. reinhardtii</i> mediante PCR.72	
3.3.2 Análisis por PCR para identificar clonas homoplásMICAS de <i>C. reinhardtii</i> .76	
CAPITULO 4	80
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	80
4.1 Conclusiones	80
4.2 Perspectivas	80
LITERATURA CITADA.....	82
ANEXOS	88