

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE PLÁSMIDOS PARA
LA PRODUCCIÓN DE OLIGOPÉPTIDOS DE VARIADAS
SECUENCIAS EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”**

Presentada por:

Giuliana Paola Chavez Untiveros

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE PLÁSMIDOS PARA
LA PRODUCCIÓN DE OLIGOPÉPTIDOS DE VARIADAS
SECUENCIAS EN LA LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*)”**

Presentada por:

Giuliana Paola Chavez Untiveros

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Doris Zúñiga Dávila
PRESIDENTE

Mg. Sc. Rosa Espejo Joya
MIEMBRO

Ph.D. Gretty Villena Chávez
MIEMBRO

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara
ASESORA

DEDICATORIA

A Dios, por su protección, a mis padres Freddy y Ana por su gran amor, a mis hermanos, tíos y demás familiares, así como a las personas tan especiales que me han enseñado tanto a lo largo de este camino.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Ph.D. Ana Kitazono Sugahara, mi asesora, por su empeño, guía y por permitirme desarrollar este trabajo de investigación en el Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis del Departamento Académico de Química.

Al proyecto InnovatePerú N°157-PNICP-PIAP-2015: "Identificación, caracterización y aplicación cosmeceútica de proteínas de levadura y oligopéptidos de secuencia aleatoria con actividad fotoprotectora o antioxidante" y al Convenio N° 004-2016-MINEDU, por el financiamiento otorgado.

A mis padres y familia, por la comprensión y apoyo incondicional en todo el proceso, por ser mi modelo a seguir y mi principal motor. A mis tíos y primos por brindarme un segundo hogar. A Renzzo, mi compañero de aventuras, por sus enseñanzas y paciencia a lo largo de este camino.

Un agradecimiento a mis compañeros de laboratorio Luis y Raquel, por su ayuda, amistad y risas, que ayudaron sobrellevar muchos momentos de tensión. A Bélgica por su disposición para brindarnos todas las herramientas, y a la profesora Carmen Rodríguez por su entusiasmo y consejos.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1.	LEVADURAS.....	4
2.1.1.	Aplicaciones.....	4
2.1.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.1.3.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....	5
2.2.	PLÁSMIDOS.....	5
2.3.	CLONAJE.....	7
2.3.1.	Clonaje <i>in vivo</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.3.1.1.	Recombinación homóloga.....	9
2.4.	BIBLIOTECA DE PLÁSMIDOS.....	11
2.5.	TRANSFORMACIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	12
2.5.1.	Transformación por choque térmico.....	12
2.5.2.	Transformación por electroporación.....	13
2.6	Aminoácidos aromáticos con capacidad para absorber radiación UV	13
2.6.1.	Triptófano.....	14
2.6.2.	Tirosina.....	15
2.6.3.	Orange carotein protein (OCP).....	15
2.7	OLIGOPÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	16
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1.	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	18
3.2.	LUGAR DE EJECUCIÓN Y FINANCIAMIENTO.....	19
3.3.	MATERIALES.....	20
3.3.1.	Materiales de uso rutinario.....	20
3.3.2.	Medios de cultivo.....	20

3.3.3. Soluciones y reactivos.....	20
3.3.4. Reactivos de Biología molecular.....	21
3.3.5. Equipos.....	21
3.4. MÉTODOS.....	22
3.4.1 Linearización del plásmido de expresión.....	22
3.4.2 Diseño de oligonucleótidos.....	22
3.4.3 Amplificación del inserto a clonar.....	24
3.4.4 Clonación <i>in vivo</i>	28
3.4.5 Recuperación de ADN total de los transformantes y verificación por PCR analítico.....	28
3.4.6 Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación y purificación de plásmidos amplificados.....	29
3.4.7 Confirmación de la obtención de plásmidos recombinantes.....	30
3.4.8 Secuenciación de plásmidos.....	30
3.4.9 Construcción de la biblioteca para la expresión de oligopéptidos de secuencia semialeatoria.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE PCR.....	32
4.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
4.3. RECUPERACIÓN DE PLÁSMIDO RECOMBINANTE Y ANÁLISIS MEDIANTE PCR ANALÍTICO.....	36
4.4. TRANSFORMACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	37
4.5. VERIFICACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.....	38
4.6. DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS PURIFICADOS PARA LA COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE INSERTO.....	39
4.7. SECUENCIACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	39
4.7.1 Secuencia de los insertos WY.....	40
4.7.2 Comparación entre las secuencias de los insertos SA.....	40

V.	CONCLUSIONES.....	44
VI.	RECOMENDACIONES.....	45
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Métodos de clonaje comunes basados en el uso de <i>E. coli</i>	8
Tabla 2.	Valores de longitudes de onda óptima y de absorptividades molares de los aminoácidos aromáticos.....	14
Tabla 3.	Descripción de los principales péptidos de secuencia corta con actividad biológica.....	17
Tabla 4.	Principales características de los oligonucleótidos empleados en la amplificación de los insertos a clonar.....	23
Tabla 5.	Frecuencias relativas de los aminoácidos aleatorios codificados en las secuencias SA1, SA2, SA3, SA4, SA5.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Principales características del plásmido de expresión pEGH.....	6
Figura 2	Representación del mecanismo que permite clonaje por recombinación homóloga.....	10
Figura 3	Estructuras de los aminoácidos triptófano y tirosina.....	14
Figura 4	Estructura de la proteína OCP (Orange Carotenoid Protein) de <i>Synechocystis</i>	16
Figura 5	Diagrama de flujo de los procedimientos seguidos en el desarrollo de la parte experimental de la tesis.....	19
Figura 6	Sitio de clonaje múltiple del plásmido pEGH indicando los sitios de restricción únicos <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I y <i>Hind</i> III, y los codones CAT y CAC que permiten la inclusión de la etiqueta de polihistidina.....	22
Figura 7	Secuencias de los oligonucleótidos usados como plantillas y cebadores en la obtención de los fragmentos a ser clonados.....	24
Figura 8	Estrategia para la obtención de los fragmentos que fueron clonados en el vector pEGH, a partir de la plantilla principal, la plantilla complementaria, y los cebadores.....	25
Figura 9	Descripción detallada de la correspondencia de bases en la construcción y amplificación del fragmento WY.....	27
Figura 10	Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando las plantillas WYdir y EXTrv y dos diferentes temperaturas de hibridación: 66 y 68 °C.....	30
Figura 11	Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando las plantillas SAdir y EXTrv, y dos diferentes temperaturas de hibridación: 69 y 71°C.....	32

Figura 12	Análisis electroforético del plásmido pEGH digerido con la enzima <i>SalI</i> en gel de agarosa 0.8 por ciento, produciendo una banda del tamaño esperado (9309 pb).....	33
Figura 13	Transformantes de levadura obtenidos por clonaje del fragmento WY, y el respectivo control.....	34
Figura 14	Transformantes de levadura obtenidos por clonaje del fragmento SA y el respectivo control.....	35
Figura 15	Resultado de los ensayos de PCR para la identificación de los transformantes de levadura que incluyen el fragmento WY.....	35
Figura 16	Resultado de los ensayos de PCR para la identificación de los transformantes de levadura que incluyen los fragmentos SA.....	36
Figura 17	Resultados de los ensayos de PCR para la verificación de la presencia de insertos en los plásmidos SA amplificadas en <i>E. coli</i> y luego purificados.....	37
Figura 18	Análisis electroforético en gel 2 por ciento de 0.2 µg de los plásmidos purificados WY y SA digeridos con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i>	38
Figura 19	Confirmación de la correcta construcción de los plásmidos WY1, WY2 y WY3 por secuenciación de nucleótidos.....	39
Figura 20	Alineamiento de bases entre las secuencias codificantes de interés SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5, y de la secuencia de interés del oligo SAdir.....	40
Figura 21	Verificación de la identidad de secuencias de los 18 aminoácidos codificados por los fragmentos SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5.....	41
Figura 22	Aminoácidos semialeatorios codificados por los fragmentos SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5.....	42
Figura 23	Comparación de las secuencias codificadas por los fragmentos SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5.....	43

RESUMEN

Las bibliotecas de plásmidos son consideradas fuente de diversidad porque agrupan a fragmentos clonados con diferentes secuencias que se pueden emplear en ensayos de tamizaje. Para la presente investigación se construyó una biblioteca de plásmidos con insertos semialeatorios, que será empleada posteriormente para la identificación de oligopéptidos con actividad fotoprotectora. Las secuencias de los oligopéptidos incluirán a los aminoácidos triptófano (Trp o W) y tirosina (Tir o Y), los cuales poseen potencial actividad fotoprotectora, y a otros aminoácidos introducidos aleatoriamente. Esta construcción se realizó tomando ventaja de la capacidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de realizar el clonaje de fragmentos *in vivo* por recombinación homóloga. Se realizó una prueba preliminar para optimizar el protocolo de clonaje *in vivo* empleando el plásmido de expresión pEGH, y un fragmento único para la expresión de un oligopéptido compuesto únicamente de residuos de Trp y Tir (Fragmento WY). Una vez optimizado el protocolo de clonaje, se realizó la construcción de la biblioteca empleando los fragmentos semialeatorios que incluyen secuencias codificantes para aminoácidos aleatorios y para algunos residuos de Trp y Tir. Los plásmidos obtenidos de algunos transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* fueron luego recuperados y amplificados en *Escherichia coli* para proceder a su purificación. Estos plásmidos purificados fueron analizados para determinar las frecuencias con las que se logró obtener la inserción de los fragmentos. Según estos ensayos, las eficiencias de clonaje fueron de 86 por ciento para el fragmento WY y de 50 a 69 por ciento para los fragmentos semialeatorios. Estos resultados permitieron concluir que el clonaje *in vivo* en *S. cerevisiae* es un método eficiente para la construcción de bibliotecas de plásmidos.

Palabras clave: Clonaje *in vivo*, recombinación homóloga, oligopéptidos fotoprotectores.

SUMMARY

Plasmid libraries are considered a source of diversity since they include cloned fragments with different sequences that can be used in several types of screenings. For the present investigation, a plasmid library with semi-random inserts was constructed that will be later used to identify oligopeptides with photoprotective activity. The sequences of the oligopeptides will include the amino acids tryptophan (Trp or W) and tyrosine (Tyr or Y), which have potential photoprotective activity, and other random amino acids. The construction was carried out taking advantage of the ability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to perform the cloning of fragments *in vivo* via homologous recombination. A preliminary test was performed using the expression plasmid pEGH and a single fragment that allowed expression of an oligopeptide composed only of Trp and Tyr residues (WY fragment). Once the procedures were defined, the library was constructed using semi-random fragments that harbored coding sequences for random amino acids, and for a few Trp and Tyr residues. Several plasmids obtained from the transformation of *Saccharomyces cerevisiae* were then recovered and amplified in *Escherichia coli* for purification. These purified plasmids were analyzed to determine the frequencies with which the insertion of the fragments was achieved. According to these tests, the cloning efficiencies were 86 percent for the WY fragment, and 50 a 69 percent for the semi-random fragments. These results allowed us to conclude that *in vivo* cloning in *S. cerevisiae* is an efficient method for the construction of plasmid libraries.

Key words: *In vivo* cloning, homologous recombination, photoprotective oligopeptides.

I. INTRODUCCIÓN

Las bibliotecas permiten disponer de una colección de fragmentos de ADN previamente clonados en vectores como los plásmidos, a partir de los cuales se pueden identificar y aislar los fragmentos de interés (Lodish *et al.* 2000). Para la construcción de una biblioteca de plásmidos se requiere de fragmentos con secuencias variadas, el plásmido adecuado, y un método eficiente de clonaje. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* permite simplificar este proceso ya que brinda la posibilidad de realizar el llamado “clonaje *in vivo*” con alta eficiencia (Folch *et al.* 2004). Este alto nivel de eficiencia es posible gracias a la recombinación homóloga que realiza, la cual le permite insertar uno o más fragmentos en los plásmidos (Raymond *et al.* 1999). El clonaje *in vivo* que desarrolla *S. cerevisiae* no requiere necesariamente del empleo de enzimas de restricción, lo cual es recurrente en los métodos tradicionales de clonaje, que resultan más costosos y demandan más tiempo y esfuerzo (Zhang *et al.* 2012). Este procedimiento también prescinde de ensayos adicionales *in vitro*, es independiente de ligamiento y de fácil implementación (Kitazono, 2011), pudiéndose generar de forma fiable bibliotecas de más de 10^7 transformantes (Swers *et al.* 2004).

Una de las aplicaciones más importantes de las bibliotecas es que permiten disponer de insertos a partir de los cuales se pueden expresar oligopéptidos de diversas secuencias de aminoácidos. Esta capacidad permitiría identificar por medio de un tamizado genético a aquellos oligopéptidos que tengan propiedades funcionales particulares. (Van der Ven *et al.* 2002). Pese a su simpleza, los oligopéptidos pueden presentar importantes funciones biológicas; como las hormonas neurohipofisarias vasopresina y oxitocina, y los neuropéptidos que actúan sobre la corteza suprarrenal (Montenegro, 2004). Así también, los oligopéptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina ejercen una función antihipertensiva (Vermeirssen *et al.* 2004). Debido a los efectos reguladores de estas moléculas, son generalmente conocidas como péptidos bioactivos (Torruco *et al.* 2008).

En esta investigación, la biblioteca construida estuvo orientada a la posterior realización de tamizados para la identificación de oligopéptidos con actividad fotoprotectora frente a la exposición a radiación ultravioleta (UV). Según Cai *et al.* (2013), esta respuesta está ligada a la presencia de residuos fotosensibles como los aminoácidos aromáticos triptófano (Trp) y tirosina (Tir), los cuales tienen la capacidad de absorber la radiación UV y reemitirla a una longitud de onda más larga y menos energética. Este fenómeno se conoce como fluorescencia, el cual es más intenso en el Trp debido a que presenta en su estructura al cromóforo aromático indol, mientras que la Tir incluye al cromóforo aromático fenol (Igarashi *et al.* 2007; Fujisawa y Masuda 2017). De esta manera, se podría anticipar que los oligopéptidos que incluyan residuos de Trp y Tir presentan un efecto fotoprotector frente a la radiación UV. Asimismo, es posible que las presencias de otros aminoácidos en un oligopéptido potencien las funciones de Trp o Tir, que la suplan o que las inhiban. Por esta razón, se realizó la construcción de una biblioteca de plásmidos por medio del clonaje *in vivo* en *S. cerevisiae*, la cual permitirá la expresión de oligopéptidos que incluyen Trp y Tir y otros aminoácidos. La disponibilidad de esta biblioteca hará factible la posterior realización de tamizados genéticos para la evaluación, selección e identificación de oligopéptidos con características particulares, como, por ejemplo, aquellos que demuestren altos niveles de fotoprotección.

OBJETIVO GENERAL

Construir una biblioteca de plásmidos mediante clonaje *in vivo* en la levadura *S. cerevisiae* que permita la expresión de oligopéptidos que incluyan residuos de Trp y Tir, además de secuencias aleatorias de otros aminoácidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar y establecer el protocolo para el clonaje *in vivo* en *S. cerevisiae* empleando un fragmento de secuencia única, diseñado para la expresión de un oligopéptido que solo incluya nueve pares de los residuos Trp y Tir (denotado (Trp-Tir)₉).

- Construir una biblioteca de plásmidos con fragmentos semialeatorios (SA) que permitan la expresión de oligopéptidos que incluyan de cinco a seis residuos de Trp y Tir y doce aminoácidos aleatorios.
- Determinar las eficiencias de clonaje en la construcción del plásmido para la expresión del oligopéptido (Trp-Tir)₉ y de la biblioteca de secuencias semialeatorias.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LEVADURAS

2.1.1. Aplicaciones

Las levaduras han sido empleadas durante mucho tiempo en la elaboración de alimentos y en procesos de fermentación (Türker, 2014). Además de las aplicaciones tradicionales y ancestrales, las levaduras son utilizadas como organismos modelo de investigación y tienen también importantes aplicaciones biotecnológicas; como la producción de proteínas recombinantes, ensayos para la detección de fármacos, y la biorremediación ambiental (Paush *et al.* 2005; Johnson y Echavarri-Erasun, 2011). Gracias a la accesibilidad de su genoma para la manipulación genética y a las técnicas disponibles para la introducción de ADN exógeno, se han desarrollado técnicas para analizar y preparar proteínas de levaduras y de otros organismos construyendo bibliotecas de expresión (Schneiter, 2004). Otra aplicación importante es el sistema del doble híbrido, el cual permite la detección de interacciones proteína-proteína, definir a los aminoácidos fundamentales para dichas interacciones, y tamizar bibliotecas para detectar proteínas que interactúan con una proteína específica (Walhout *et al.* 2000). Frente a la diversidad y potencial de todas las especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido y sigue siendo la especie más utilizada en investigación, además de una importante herramienta biotecnológica (Türker, 2014).

2.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Esta especie ha sido ampliamente estudiada dada su importancia en el sector industrial, principalmente en el área de alimentos (Sherman, 2002). Su genoma fue el primero en ser completamente secuenciado a nivel de los eucariotas en 1996 (Engel *et al.* 2014), lo cual ha potenciado su uso como sistema modelo para la investigación de procesos celulares

(Paush *et al.* 2005). Destaca por la facilidad con que puede ser modificado genéticamente, gracias a su capacidad para reconocer extremos de ADN que son homólogos y ligarlos eficientemente por recombinación homóloga (Joska *et al.* 2014). Este proceso puede ser llevado a cabo incluso empleando oligonucleótidos sintéticos, los cuales permiten obtener proteínas de diversas formas y secuencias (Alberts *et al.* 2006; Sherman, 2002).

2.1.3. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

S. cerevisiae se considera un organismo modelo eficiente y fácilmente manipulable, siendo ideal para el estudio de procesos fisiológicos básicos y para el mejoramiento de diversos procesos y mecanismos biológicos (Paush *et al.* 2005). Su uso en el laboratorio ofrece muchas ventajas ya que es unicelular, de rápido crecimiento y fácil dispersamiento celular, no presenta patogenicidad, además de los bajos costos de los medios y procedimientos de cultivo requeridos (Joska *et al.* 2014).

Otras características ventajosas de esta levadura son que posee un considerable número de marcadores de selección genética, además de poder ser cultivada en estados haploide y diploide (Forsburg, 2001). Así, el estudio de los mecanismos de modificación genética de *S. cerevisiae* ha permitido el desarrollo y mejoramiento de la clonación de genes y de técnicas de ingeniería genética (Sherman, 2002).

2.2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN de doble cadena que constituyen una unidad de replicación independiente del cromosoma (Watson *et al.* 1988). Puede encontrarse más de una copia del mismo plásmido dentro de una célula, ya que autorregulan su número de copias a través de un represor (proteína o ARN) que impide que sigan replicándose (Betancor *et al.* 2008). Son considerados elementos móviles ya que son transferidos por los organismos que los poseen, los cuales pueden ser bacterias o levaduras, intercambiando así determinadas características genéticas, tanto inherentes como adquiridas (Watson *et al.* 1988). De esa manera, los plásmidos son considerados herramientas útiles en la clonación molecular, ya que incluyen genes para la resistencia a

antibióticos en bacterias y para otros marcadores de selección, permitiendo la expresión y posterior purificación de las proteínas recombinantes (Sambrook y Green, 2012)

En *E. coli*, el plásmido pBR332 fue el primero en ser construido en 1977 y posee genes que confieren resistencia a ampicilina y tetraciclina (Balbás *et al.* 1986). En el caso de las levaduras, las cuales pueden manipularse y crecer de manera similar a las bacterias, la mayoría de los plásmidos que se emplean son de tipo *shuttle*, los cuales pueden funcionar también en *E. coli* permitiéndose así una purificación más eficiente. (Betancor, 2008).

El plásmido pEGH, derivado del plásmido pEG(KG) (Mitchell, 1993), es un plásmido de expresión en *S. cerevisiae* que puede ser amplificado en *E. coli*. Incluye al promotor inducible *GAL* (Pierce y Wendland, 2009), que es reprimido en presencia de glucosa e inducido en presencia de galactosa, ya que regula la expresión de genes que codifican para enzimas responsables del metabolismo de galactosa (Figura 1) (Munberg, 1994).

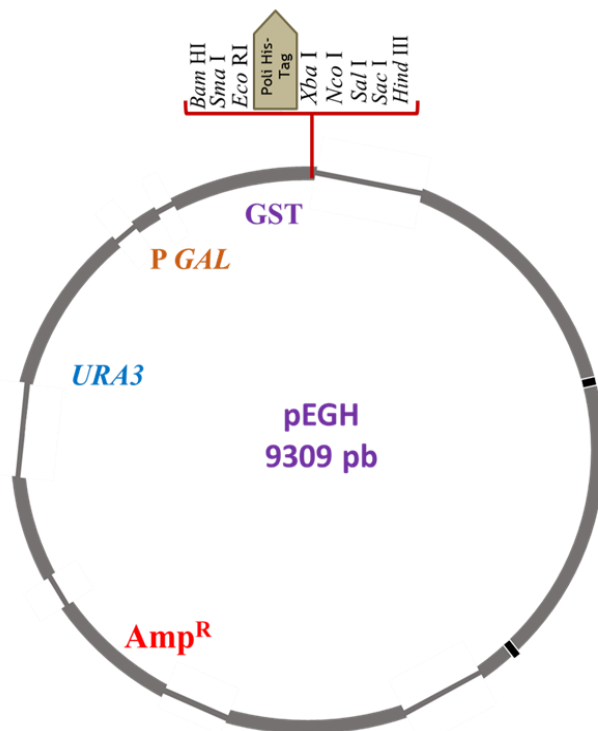


Figura 1: Principales características del plásmido de expresión pEGH. GST: Gen codificante para la glutatión-S-transferasa; PGAL: Promotor que regula la expresión de genes responsables del metabolismo de galactosa; URA3: Gen que codifica para la orotidina-5-fosfato descarboxilasa, y es marcador de selección de transformantes en medios sintéticos que carecen de uracilo; Amp^R: Gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina; Poli His-Tag: Etiqueta de polihistina para la purificación de proteínas.

FUENTE: BVTech Plasmid, 2009

pEGH es un plásmido que permite expresar y purificar altos niveles de proteínas estables gracias a que se fusionan a la proteína glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* (Smith *et al.* 1988). Para la purificación de las proteínas de interés, se utilizan resinas que incluyen glutatión, el cual se asocia con gran afinidad a GST. De otro lado, la

eliminación de la etiqueta GST se puede realizar empleando una secuencia de reconocimiento de proteasa de sitio específica localizada entre GST y la proteína diana (Harper y Speicher, 2011). La purificación de proteínas empleando el sistema de fusión a GST se ha utilizado en numerosas aplicaciones biológicas tales como estudios inmunológicos, producción de vacunas y estudios proteómicos (Yip *et al.* 2001). La expresión de proteínas a través del plásmido pEGH permite un método de purificación por afinidad adicional, debido a la presencia de una etiqueta de polihistidina (His6) mediante la cual se logra selectiva asociación con iones níquel conjugados a resinas (Rocha, 2005).

Para poder seleccionar las células de levadura que han sido transformadas, pEGH incluye al marcador primario *URA3* que permite la selección de protótrofos en medios sintéticos que carecen de uracilo. El gen *URA3* codifica para la enzima orotidina-5`-fosfato descarboxilasa, la cual es esencial para la biosíntesis de uracilo (Álvarez, 1995 y Pronk, 2002).

2.3. CLONAJE

Los métodos de clonaje comunes están basados en el uso de *E. coli* y se caracterizan por el empleo de diversas enzimas de restricción, numerosos pasos de purificación, ligamiento, y elevados costos (Zhang *et al.* 2012). Sin embargo, se han desarrollado otros métodos que no requieren el uso de estas enzimas. Entre estos, uno de los métodos comunes es el método Gateway, el cual desarrolla un clonaje *in vitro* por medio de una recombinación enzimáticamente asistida entre el plásmido y los insertos (Hartley *et al.* 2000).

Los métodos dependientes de ligamiento requieren de fragmentos amplificados y vectores previamente tratados con las enzimas de restricción respectivas (Jacobus y Gross, 2015), o de vectores pretratados con extremos cohesivos 3' de una sola base de timina para realizar el llamado clonaje T/A (Briones, 2008). En el método SLIC (Sequence and ligation independent cloning) (Li, 2007) los extremos de los fragmentos de PCR y del plásmido resultan en cadenas monocatenarias de ADN por tratamiento enzimático, para luego formar una cadena de doble hebra con un corte que luego será reparado *in vivo*. El método USER (Uracil-Specific Excision Reagent) (Geu-Flores *et al.* 2007) permite un

clonaje simultáneo de varios insertos, pero con limitaciones de secuencia y fidelidad (Villiers *et al.* 2010). Los métodos basados en reparación y recombinación son OEC (Overlap extension PCR cloning) (Bryksin y Matsumura, 2010) y CPEC (Circular Polymerase Extension Cloning) (Qan y Tian, 2009), en las que se prescinde de cebadores, y las regiones híbridas sirven de molde para la extensión, la cual es catalizada enzimáticamente.

La mayoría de los métodos mencionados resultan ineficaces para el clonaje de múltiples fragmentos de ADN o de un fragmento de ADN de gran tamaño (Iizasa y Nagano, 2006). Otro factor a considerar es que se pueden incorporar sustituciones de bases en los fragmentos amplificados debido a las tasas de error intrínsecas de las ADN polimerasas empleadas (Cline *et al.* 1996).

Tabla 1: Métodos de clonaje comunes basados en el uso de *E. coli*.

MÉTODOS	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Gateway (Hartley <i>et al.</i> 2000).	Recombinación <i>in vitro</i> asistida por enzimas.	Transferencia de fragmentos entre diferentes vectores	Sistema costoso, toma más tiempo en sus fases iniciales
SLIC (Li, 2007)	Recombinación homóloga <i>in vitro</i> e hibridación de una sola hebra.	Ensamblaje de ADN eficiente y en forma simultánea.	La eficiencia de clonaje en ausencia de RecA es bastante baja.
USER (Geu-Flores <i>et al.</i> 2007)	Similar a la recombinación homóloga independiente.	Reparación simultánea <i>in vivo</i> .	Baja fidelidad.
OEC (Bryksin y Matsumura, 2010)	Recombinación independiente de ligamiento con dos ciclos de amplificación.	Prescinde de ligasas y endonucleasas, es sencillo y de bajo costo.	Bajo rendimiento para insertos grandes.
CPEC (Quan y Tian, 2009),	Recombinación <i>in vitro</i> independiente de ligamiento que emplea una única polimerasa.	Permite clonaje de múltiples insertos con cualquier vector	Baja fidelidad y probables mutaciones derivadas de la polimerasa.

FUENTE: Edición propia, 2018

2.3.1. Clonaje *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae*

El clonaje *in vivo* es un mecanismo eficiente que se basa en el proceso de recombinación homóloga que lleva a cabo *S. cerevisiae* (Orr-Weaver *et al.* 1981). Este procedimiento permite el ensamblaje de uno o más fragmentos en un plásmido, haciendo posible el clonaje y la producción de la proteína de interés en la misma levadura (Joska *et al.* 2014). De esa manera, el clonaje *in vivo* está basado en la presencia de zonas de homología entre el plásmido y el inserto, lo cual sirve de punto de partida para la reparación recombinacional, regenerándose un plásmido circular recombinante luego de la transformación de *S. cerevisiae* (Ma *et al.* 1987).

Este tipo de clonaje es independiente de ligamiento *in vitro*, prácticamente carece de errores, implica bajos costos, y puede ser desarrollado en cualquier laboratorio que ya tenga implementadas las técnicas básicas de biología molecular (Kitazono, 2011). A diferencia de los métodos de recombinación sitio específicos, que son mediados por enzimas especializadas, la recombinación homóloga se da en cualquier lugar que presente homología entre los fragmentos (Barnes, 1994; Cheng *et al.* 1994), requiriéndose secuencias homólogas de al menos 30 pares de bases para una eficiente clonación (Hua *et al.* 1997).

2.3.1.1. Recombinación homóloga

Es una de las principales vías de reparación del ADN, y la vía preferida en *S. cerevisiae*, la cual permite corregir las rupturas de doble cadena en los eucariotas (Figura 2) (Aylon y Kupiec, 2004).

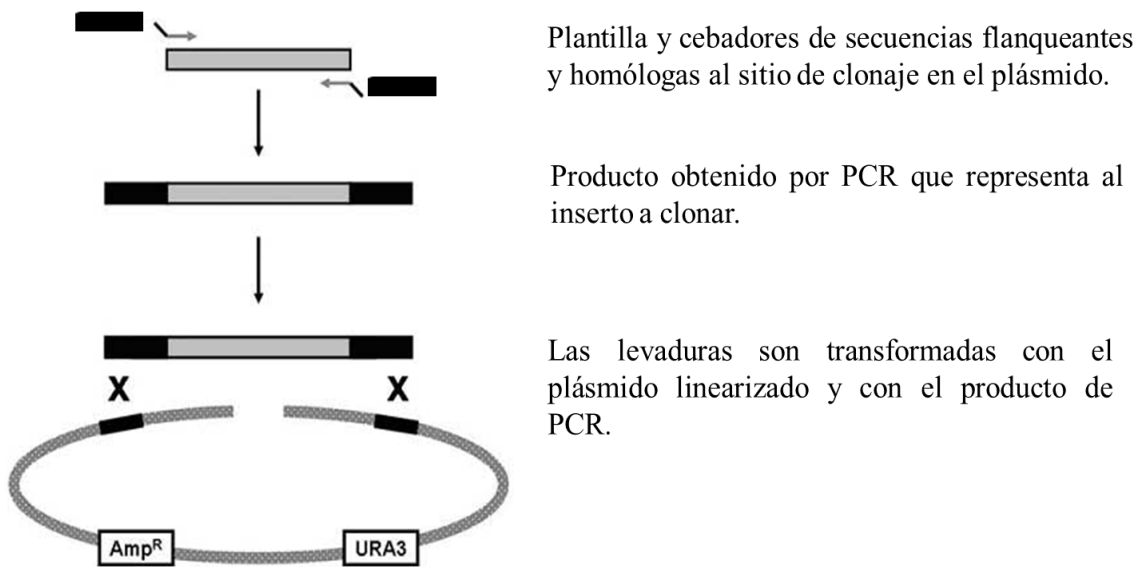


Figura 2: Representación del mecanismo que permite clonaje por recombinación homóloga.

FUENTE: Molecular Biology Research Highlights, 2009.

Este proceso requiere la participación de numerosas proteínas: El complejo MRX de reconocimiento de extremos de ADN, las nucleasas Sae2 y Exo1, la proteína de replicación A, la proteína Rad51 impulsadora de la recombinación entre zonas homólogas (Lisby et al. 2004), las proteínas Rad55 y Rad57 que estabilizan los filamentos de ADN, la ATPasa Rad54 dependiente de ADN que estimula el intercambio de hebras, y la helicasa Srs2 que contrarresta la acción de Rad51 (Eckert-Boulet *et al.* 2012).

Este es un procedimiento ampliamente usado en el laboratorio, a partir de cual se han desarrollado métodos como la disrupción dirigida de genes y el marcado de epítomos (De Antoni y Gallwitz, 2000; Guldener *et al.* 1996), además de su empleo para introducir o remover marcadores de selección de plásmidos (Ma *et al.* 1987).

Frente a las innovaciones de los métodos de clonaje ya mencionados, el sistema de clonaje *in vivo* en *S. cerevisiae* por recombinación homóloga es considerado el procedimiento más eficiente (Jacobus y Gross, 2015). De esa manera, el plásmido recombinante puede ser ensayado directamente en la levadura o, de ser necesario, puede ser recuperado y amplificado en otro sistema como *E. coli* (Eckert-Boulet *et al.* 2012).

2.4. BIBLIOTECA DE PLÁSMIDOS

Una biblioteca de plásmidos es una colección que incluye diferentes fragmentos de ADN insertados, en la cual se espera esté incluida la mayor diversidad de secuencias posible (Alberts, *et al.* 1994). En principio, cualquier método de clonaje puede ser utilizado para la construcción de este tipo de bibliotecas, pero el método seleccionado debe ser altamente eficiente. Para la construcción de una biblioteca mediante clonaje *in vivo*, tanto el plásmido como los fragmentos a insertar deben compartir secuencias de homología (Barnes, 1994), y una vez construida la biblioteca, se prosigue con la búsqueda e identificación de las secuencias codificantes de interés.

Las bibliotecas también son herramientas que permiten optimizar la expresión de proteínas y la diversidad de sus secuencias, por lo cual es importante verificar su tamaño y calidad. (Bidlingmaier y Liu, 2012). Parámetros como el tamaño medio de los insertos, el porcentaje de plásmidos con inserto, y el número de transformantes obtenidos, se pueden utilizar para estimar el tamaño de la biblioteca en términos de su cobertura (Eckert-Boulet *et al.* 2012). El uso de las bibliotecas de plásmido se ha extendido a estudios proteómicos comparativos de la expresión de proteínas heterólogas en levaduras, y otros dirigidos a la detección de interacciones de proteínas en los sistemas de doble híbrido de *S. cerevisiae* (Walhout *et al.* 2000). También se han realizado construcciones de bibliotecas combinatoriales, las cuales son una clase específica de bibliotecas en la que las propiedades de los dominios individuales de una determinada proteína se optimizan por separado y se combinan en una nueva molécula variante y altamente específica (Eckert-Boulet *et al.* 2012). Las bibliotecas combinatoriales en levaduras se han empleado para el análisis funcional entre dos tipos de citocromos humanos (Abécassis, 2000), así como en el análisis de sobreexpresión de insertos de bajo número de copias, o la complementación de fenotipos mutantes que carecen de marcadores de auxotrofia (Jauert *et al.* 2005). De esa manera, el sistema de clonaje de *S. cerevisiae* resulta un sistema de alta eficiencia que permite impulsar el tamaño y la complejidad en la construcción de bibliotecas recombinantes, y para el estudio de la ingeniería combinatorial de proteínas (Scalon *et al.* 2009).

2.5. TRANSFORMACIÓN DE *Escherichia coli*

E. coli es empleada durante los procedimientos de clonaje como medio de amplificación de los plásmidos (Janjua *et al.* 2014). Su transformación implica la estable inclusión de plásmidos que llevan genes que confieren resistencia a antibióticos como la ampicilina (gen *bla* que codifica para la beta lactamasa, también representado como Amp^r), lo que permite la selección de los transformantes (Adam, 1999). Para que estas células tengan la capacidad de captar ADN, tienen que hacerse previamente competentes (Dreiseikermann, 1994). La preparación de células competentes depende del método de transformación a emplear y también del nivel de eficiencia de transformación requerido (Janjua *et al.* 2014). De esa manera, uno de los criterios para la evaluación de la transformación es la probabilidad de que una molécula de ADN produzca una célula transformada capaz de proliferar en un medio selectivo, lo cual es expresado como número de colonias formadas por microgramo de ADN usado (eficiencia de transformación). Para el caso específico de un plásmido, el otro criterio a considerar es la probabilidad de que el plásmido permanezca de manera estable en la célula después de su incorporación (Hanahan, 1983).

A continuación, se describirán dos de los principales métodos de transformación de *E. coli*: Transformación por choque térmico y transformación por electroporación.

2.5.1. Transformación por choque térmico

La transformación por choque térmico se basa en someter a las células a cambios bruscos de temperatura con la finalidad de inducir a que las células de *E. coli* capten ADN, y evitar que éste sea digerido por las enzimas de restricción (Sambrook y Green, 2012). Por medio de este método se obtienen eficiencias de 10^5 a 10^7 transformantes por microgramo de ADN (Janjua *et al.* 2014). Para la obtención de las respectivas células competentes se emplean soluciones buffer ricas en Ca^{+2} y otros cationes bivalentes (Mg^{+2} , Ba^{+2} y Sr^{+2}), los cuales contrarrestan la repulsión electrostática entre el ADN y la membrana celular bacteriana (Ahmad, 2014). Luego de una corta incubación en hielo, la mezcla de células competentes y ADN se coloca en un baño a 42 °C, por lo general por 45 segundos. El incremento de temperatura aumenta la permeabilidad de las paredes celulares para facilitar la entrada del ADN e inactivar a las ADNasas (Singh *et al.* 2010 y Weston *et al.* 1981). Según Hanahan (1983), el ADN y las células de *E. coli* interactúan de forma

eficiente en un entorno de iones de calcio y bajas temperaturas (0 a 5 °C) y aunque el impulso de calor es importante, no es estrictamente necesario.

2.5.2. Transformación por electroporación

La electroporación está basada en la desorganización de la membrana celular por aplicación de pulsos eléctricos que varían en amplitud, longitud y duración (Janjua *et al.* 2014). Este método permite obtener altas eficiencias de transformación (10^9 a 10^{10} transformantes por microgramo de ADN), ya que el campo eléctrico al que se someten las células aumenta el potencial de sus membranas, y les brinda una permeabilidad transitoria a moléculas cargadas como el ADN (Dower *et al.* 1998).

Al emplear métodos de tratamiento químico, la preparación de células competentes se ve afectada por factores que hacen variar los niveles de competencia de un proceso a otro. (Dower *et al.* 1998). Por ello se considera que el método de electroporación es ventajoso sobre el método químico, ya que permite transformar un mayor número de cepas de *E. coli* y otras especies como *S. cerevisiae* (Hanahan, 1983).

2.6. AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS CON CAPACIDAD PARA ABSORBER RADIACION UV

Los aminoácidos fenilalanina, triptófano, y tirosina poseen cadenas laterales con anillos aromáticos y son ópticamente activos, siendo responsables de la absorción ultravioleta de la mayoría de proteínas (Hui, 2015). Estas estructuras están relacionadas con el fenómeno de fluorescencia, que es la propiedad mediante la cual un compuesto absorbe luz a una longitud de onda particular, para emitirla a otra diferente (So y Dong, 2002). En la fluorescencia están involucrados procesos de emisión de fotones que ocurren durante la relajación molecular de estados excitados electrónicos, generando la posterior emisión de una luz de longitud de onda más larga por un corto período (Lacowiks, 2006; So y Dong, 2002). Como se resume en la tabla 2 los residuos aromáticos triptófano (Trp) y tirosina (Tir) son además fluorocromos que, a diferencia de la fenilalanina, tienen una mayor absorción en el UV cercano (280 nm) y reemiten a una longitud de onda más larga (Fersht, 1980). Así, estas propiedades de absorción y emisión de luz pueden utilizarse para la cuantificación de proteínas purificadas en solución (Battaner, 2013)

Tabla 2: Valores de longitudes de onda óptima y de absorptividades molares de los aminoácidos aromáticos.

Aminoácido	Longitud de onda óptima(nm)	Absortividad molar $M^{-1} cm^{-1}$
Triptófano (Hui, 2015)	254	2760
	266	4777
	279	5579
Tirosina (Fersht, 1980)	254	341
	266	960
	275	1405
Fenilalanina (So y Dong, 2002)	254	140
	258	195
	266	92

FUENTE: Edición Propia, 2018.

2.6.1. Triptófano

El Trp tiene un máximo de absorbanza a 279 nm con una absorptividad molar de 5579 $M^{-1}cm^{-1}$ (Hui, 2015). Es el fluorocromo más importante, siendo responsable de la fluorescencia de cualquier mezcla compleja de proteínas gracias a que en su estructura posee al indol como fluoróforo, el cual absorbe a 275-295 nm y reemite a 330-340 (Figura 3) (Hui, 2015; Pattabhi y Gautham, 2002).

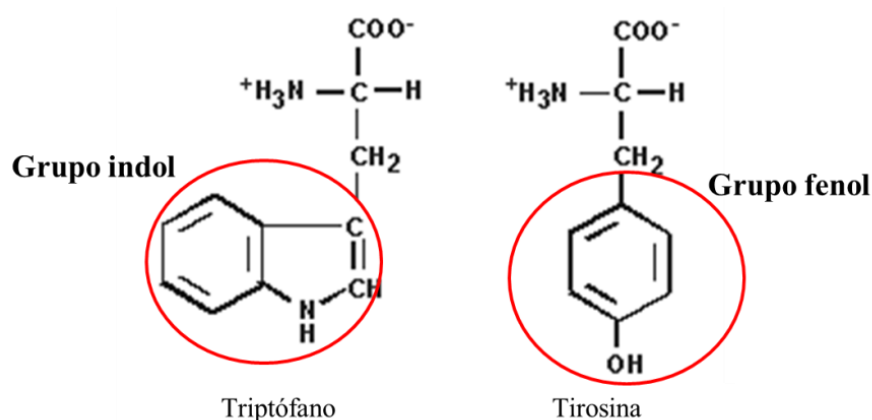


Figura 3: Estructuras de los aminoácidos triptófano y tirosina.

FUENTE: Biotek Resources, 2003.

La fluorescencia de este aminoácido es sensible a los cambios de polaridad de su entorno, es por ello que la medición de la fluorescencia es una herramienta que permite monitorear los cambios en las proteínas e inferir acerca de sus estructuras y dinámicas locales (Vivian and Callis, 2001).

2.6.2. Tirosina

Este aminoácido es considerado un fluorocromo muy simple, pero puede presentar propiedades espectrales complejas bajo ciertas circunstancias (Lacowiks, 2006). Tiene un máximo de absorbancia a 275 nm, una absorptividad molar de $1405 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y posee al fenol como fluoróforo (Figura 3) (Fujisawa y Masuda, 2017). La fluorescencia de la Tir ocurre débilmente a 350 nm, y puede confundirse con la fluorescencia del Trp, ya que por sus propiedades espectrales, su energía de resonancia puede ser transferida al Trp (Lacowiks, 2006).

2.6.3. Orange carotenin protein (OCP)

La proteína carotenoide soluble OCP (Orange Carotenoid Protein) es responsable de la alta tolerancia a la luz de la mayoría de cianobacterias, ya que se encarga de proteger a su aparato fotosintético de las especies reactivas de oxígeno (Maksimov *et al.* 2015). Experimentos de mutagénesis de sitio dirigido han demostrado el papel esencial de los residuos de Trp y Tir en la fotoactividad de OCP, ya que estos residuos interactúan con el grupo ceto del carotenoide para generar un efecto fotoprotector mediante la disipación, en forma de luz y calor, del exceso de energía absorbida (Figura 4) (Wilson *et al.* 2011). Así, la iluminación de OCP con una fuerte luz verde-azul induce cambios conformacionales en la estructura de la proteína, convirtiendo la forma naranja oscura inactiva, en la forma roja activa, siendo estos cambios esenciales para la inducción del mecanismo fotoprotector (Wilson *et al.* 2011).

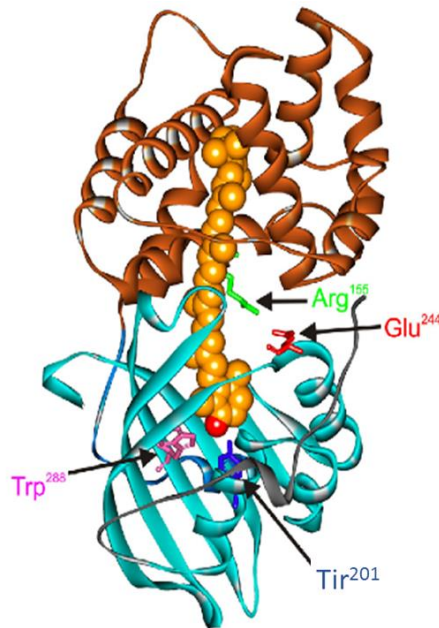


Figura 4: Estructura de la proteína OCP (Orange Carotenoid Protein) de *Synechocystis*. En el dominio C se encuentran los residuos Tir201 y Trp288.

FUENTE: Biochimica et Biophysica Acta, 2012.

2.7. OLIGOPÉPTIDOS BIOACTIVOS

Son secuencias cortas de aminoácidos biológicamente activos que pueden modular diversos procesos celulares (Danquah 2012). Se pueden obtener por medio de síntesis química, por hidrólisis de proteínas tanto de fuente vegetal como animal (Zamyatnin, 2004 y Van der Ven *et al.* 2002), y por medio de la tecnología de ADN recombinante (Espitia, 2012). Las principales respuestas fisiológicas de los péptidos bioactivos son antioxidantes, antimicrobianas, antihipertensivas, citomoduladoras e inmunomoduladores (Torruco *et al.* 2008).

Inicialmente se identificaron péptidos de secuencias cortas con potencial médico que tenían la función de ser mediadores biológicos. Este es el caso de la angiotensina, vasopresina, oxitocina, así como los moduladores de colágeno, elastina y síntesis de melanina (Reedy, 2012). En la actualidad, algunas de las aplicaciones de estos péptidos

se orientan a la industria del mejoramiento y conservación de alimentos, y a las áreas dermatológica y farmacéutica (Danquah, 2012).

Tabla 3: Descripción de los principales péptidos de secuencia corta con actividad biológica.

Principales péptidos con actividad antihipertensiva, antitrombótica y opioide			
Secuencia	Número de aminoácidos	Nombre	Actividad
Phe-Phe-Val-Ala-Pro	5	α -casokinina-5	Inhibición de la ECA
Ala-Val-Pro-Tyr-Gln-Arg	6	β -casokinina-7	Inhibición de la ECA
Ala-Leu-Phe-Met-His-Ile-Arg	7	β -lactorfina	Inhibición de la ECA
Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lis-Lis-Asn-Gln-Asp-Lys	11	Casoplatelina	Antitrombótica
Lis-Arg-Asp-Ser-Glu-Arg-Lys-Arg-Asp-Ser	10	Péptido inhibidor de trombina	Antitrombótica
Arg-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Glu	7	α -caseína exorfina	Agonista opioide
Try-Ile-Pro-Gln-Tyr-Val- Leu- Ser- Arg	9	Casoxina C	Antagonista opioide
Tyr-Val-Pro-Tyr-Pro-Pro-Phe	7	Casoxina D	Antagonista opioide

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

FUENTE: Bioactive milk peptides: a prospectus, 2000.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo tuvo como finalidad la construcción de una biblioteca de plásmidos empleando la técnica de clonaje *in vivo* en la levadura *S. cerevisiae*. El diseño de la biblioteca que se observa en la figura 5 se basó en la necesidad de sintetizar oligopéptidos que tengan secuencias semialeatorias; para poder, en un trabajo a ser realizado posteriormente, identificar a aquellos que presenten función fotoprotectora. Por ello, en el diseño de oligos se incluyeron secuencias para la expresión de aminoácidos de comprobada acción fotoprotectora, como es el caso del triptófano (Trp) y tirosina (Tir), y a secuencias de bases aleatorias para dar lugar a los fragmentos semialeatorios “SA”. Se realizó una prueba preliminar por medio del clonaje de un fragmento único con secuencias que codifiquen para nueve pares Trp-Tir en el plásmido pEGH (fragmento WY), esto permitió establecer y optimizar el protocolo. Luego del clonaje, el ADN total de algunos transformantes de levadura fue recuperado para amplificar y purificar los plásmidos a través de *E. coli*. Se realizaron ensayos de verificación para la presencia de los fragmentos WY y SA por PCR analítico, y finalmente por digestión con enzimas de restricción. Algunos de los plásmidos obtenidos fueron sometidos a análisis por secuenciación de nucleótidos para confirmar el adecuado clonaje de los fragmentos deseados (WY o SA).

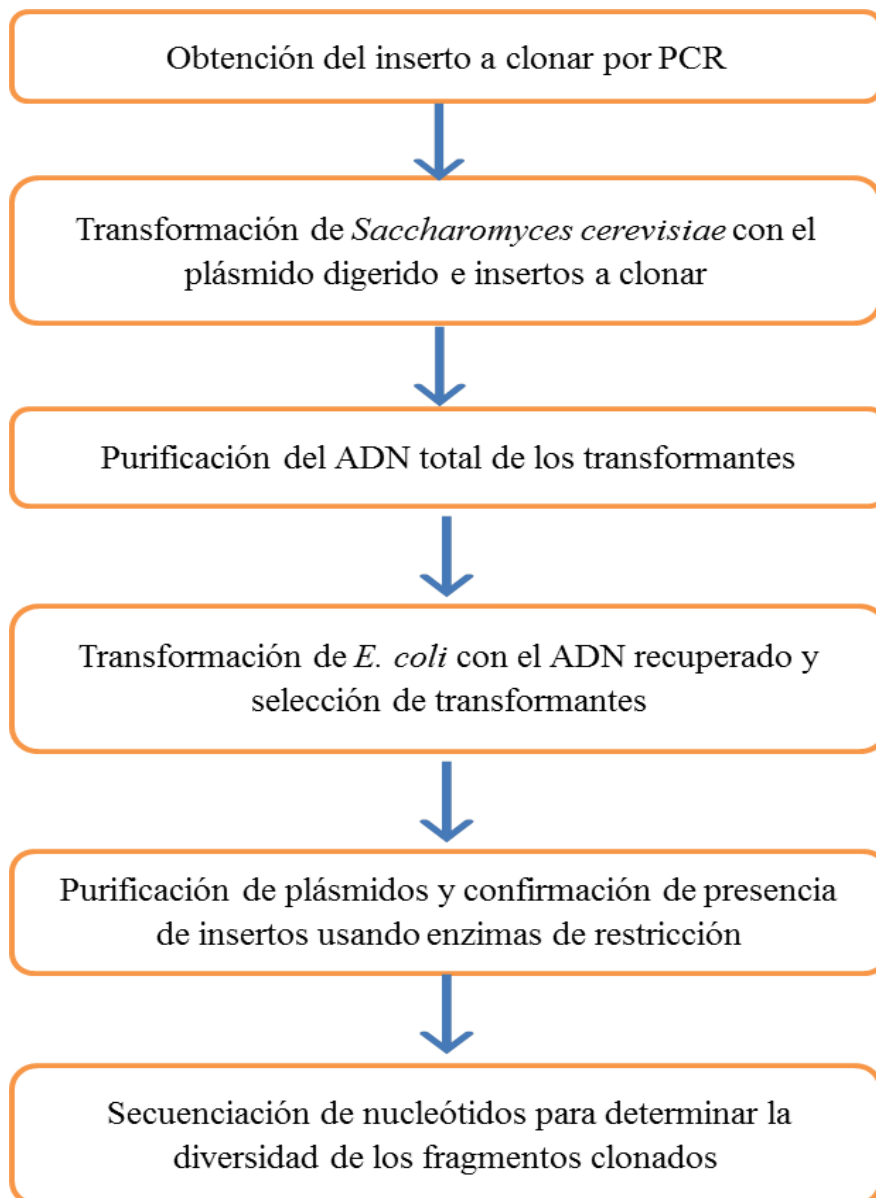


Figura 5: Diagrama de flujo de los procedimientos seguidos en el desarrollo de la parte experimental de la tesis.

FUENTE: Edición propia, 2018

3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN Y FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis del Departamento Académico de Química en la Universidad Nacional Agraria

La Molina y contó con el financiamiento de InnovatePerú (Contrato N° 157-PNICP-PIAP-2015)

3.3. MATERIALES

Plásmido de expresión: pEGH

3.3.1. Materiales de uso rutinario

- Filtros de esterilización Stericup
- Matraces
- Micropipetas
- Pipetas
- Tubos de ensayo estériles
- Tubos de microcentrifuga

3.3.2. Medios de cultivo

- Agar y caldo LB (Luria Bertani): Medio de enriquecimiento para *E. coli*.
- Agar y caldo LB-Ampicilina: Medios para la selección por resistencia a ampicilina.
- Agar y caldo –URA: Medio sintético y completo que carece de uracilo (-Ura) para la selección de transformantes de *S. cerevisiae*.
- Agar y caldo YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose): Medio para el mantenimiento y propagación de levaduras.

3.3.3. Soluciones y reactivos

- Acetato de potasio
- Alcohol al 70 y al 90 por ciento
- Alcohol isopropílico

- Fenol
- SDS/NaOH
- Solución de acetato de litio en buffer TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA)

3.3.4. Reactivos de Biología molecular

- Agarosa
- Bromuro de etidio
- Buffer de corrida electroforética TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA)
- Buffer de ruptura (1.2 por ciento SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA)
- Buffer TE
- Enzima ADN polimerasa termoestable de alta fidelidad
- Enzima ADN polimerasa termoestable Taq
- Kit de purificación de plásmidos
- Marcador de tamaño de ADN para corridas electroforéticas
- Mezcla de desoxiribonucleótidos (dNTPs)
- Oligonucleótidos

3.3.5. Equipos

- Balanza analítica
- Baño María con agitador rotatorio
- Bomba de vacío
- Cámara de electroforesis y fuente de poder
- Cámara de flujo laminar
- Congeladora de -20°C
- Electroporador
- Incubadora
- Mezclador de vórtice
- Refrigeradora
- Termociclador
- Transiluminador

3.4 MÉTODOS

3.4.1. Linearización del plásmido de expresión

Previo a la transformación de *S. cerevisiae*, 2.5 µg del plásmido de expresión pEGH fueron digeridos con la enzima de restricción *SalI* (secuencia de reconocimiento: g/tcgac) dentro del sitio de clonaje múltiple para generar el plásmido linearizado (Figura 6).

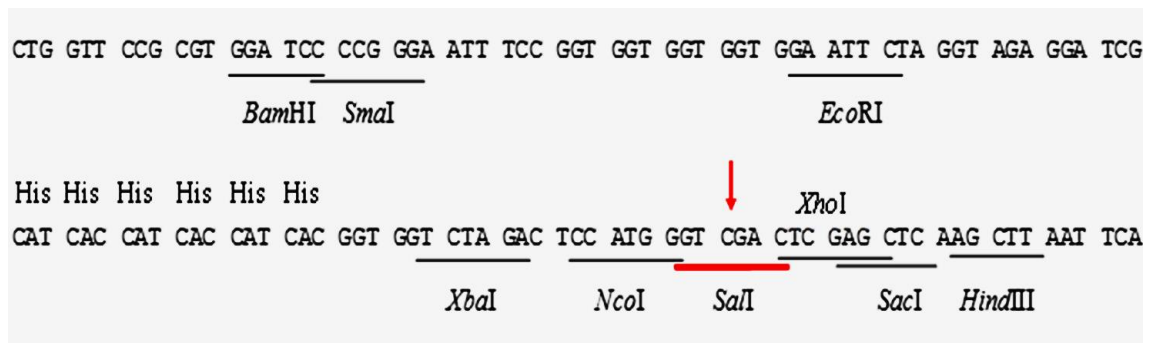


Figura 6: Sitio de clonaje múltiple del plásmido pEGH en el que se indica el sitio de corte *SalI* para la linearización, y los codones CAT y CAC que permiten la inclusión de la etiqueta de polihistidina.

FUENTE: Edición propia, 2018

3.4.2. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con la finalidad de ser amplificados por PCR para la obtención de los insertos a clonar. Primero, para la optimización y el establecimiento del protocolo se realizó el diseño de un oligonucleótido de secuencia única de 153-mer (plantilla WYdir), que codifica para un oligopéptido con nueve pares sucesivos de aminoácidos Trp y Tir ((Trp-Tir)₉). Luego se realizó el diseño para la construcción de la biblioteca en sí: un oligonucleótido semialeatorio de 150-mer (plantilla semialeatoria SAdir), con secuencias para la expresión de oligopéptidos que incluyan a los aminoácidos Trp y Tir, y a aminoácidos aleatorios. El otro oligonucleótido a emplear es la plantilla de extensión EXTrv, que en un extremo tiene secuencias complementarias tanto a la de la plantilla WYdir como a la de la plantilla semialeatoria SAdir. Los cebadores EG22rv y EG24dir se emplearon para la amplificación de los fragmentos (Tabla 4).

Tabla 4: Principales características de los oligonucleótidos empleados en la amplificación de los insertos a clonar.

Nombre	Número de bases	Oligopéptido Codificado	Finalidad
Plantilla WYdir	153	Oligopéptido de 18 aminoácidos triptófano y tirosina dispuestos de forma intercalada (Trp-Tir) ₉	Optimización del protocolo
Plantilla semialeatoria SAdir	150	Oligopéptido de 19 aminoácidos, que incluye a triptófano, tirosina, cisteína y a aminoácidos aleatorios	Construcción de la biblioteca semialeatoria
Plantilla complementaria de extensión EXTrv	56	-	Extensión de las plantillas WYdir y SAdir para la obtención del primer fragmento bicatenario
Cebador EG24dir	24	-	Amplificación de los fragmentos obtenidos a partir de los oligonucleotidos WYdir o SAdir y EXTrv
Cebador EG22rv	22	-	Amplificación de los fragmentos obtenidos a partir de los oligonucleotidos WYdir o SAdir y EXTrv

FUENTE: Edición propia, 2018

En la figura 7 se muestra a las plantillas WYdir y SAdir que poseen secuencias homólogas al plásmido pEGH de 51 y 45 pb en cada extremo (secuencias en azul en la figura 7a y 7b), además de las correspondientes secuencias de restricción (secuencias en rojo en la figura 7a y 7b) del sitio de clonaje múltiple de pEGH.

a) Plantilla WYdir

tcgcatcaccatcaccatcacggtggtggtctagactccatgggtcgacta (TGG TAT)₉TAA
tcgagctcaagcttaattcatcgtgactgactgacgatctgcctc

b) Plantilla semialeatoria SAdir

tcgcatcaccatcaccatcacggtggtggtctagactccatgggtcgac (N TAY) TKG TAY TAA
tcgagctcaagcttaattcatcgtgactgactgacgatctgcctc

c)

- Plantilla complementaria de extensión EXTrv

cagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagatcgtcagtcagtcacg

d) Cebadores

Cebador EG22rv

catcaccatcaccatcacgg

Cebador EG24dir

tcgcatcaccatcaccatcacggt

Figura 7: Secuencias de los oligonucleótidos usados como plantillas y cebadores en la obtención de los fragmentos a ser clonados. a) La plantilla WYdir: Las zonas azules representan a las secuencias homólogas al sitio del clonaje del plásmido y la verde a los 18 codones que codifican para los nueve pares Trp y Tir (Trp-Tir)₉. b) La plantilla SAdir: Las zonas azules representan a las secuencias homólogas al sitio de clonaje del plásmido y la verde a los 12 codones que codifican para aminoácidos aleatorios (N representa cualquier base: A,C,C, o G), cinco codones codificantes para Tir (Y representa la base T o C, para formar los codones TAT o TAC), y otro codón para Trp (si en la posición K se ubica la base G) o para cisteína (si en K se ubica la base T). c) En morado se indica la secuencia de la plantilla complementaria de extensión derivada de la secuencia del sitio de clonaje (56 bases) y secuencias complementarias y reversas (antiparalelas) a las secuencias de las plantillas WYdir y SAdir. d). En rojo se indica la secuencia del cebador reverso de 22-mer (EG22rv) y en azul la del cebador directo de 24-mer (EG24dir) que se emplearon en las segundas reacciones de amplificación.

FUENTE: Edición propia, 2018

3.4.3. Amplificación del inserto a clonar

Para la primera reacción de amplificación se emplearon los dos oligonucleótidos complementarios de mayor tamaño: Plantilla WYdir o plantilla semialeatoria SAdir, según sea el caso, y la plantilla complementaria de extensión EXTrv. Luego de la primera

reacción de extensión, que permite generar el fragmento de dos hebras, se añadieron los cebadores EG22rv y EG24dir para la segunda reacción de amplificación (Figuras 8 y 9).

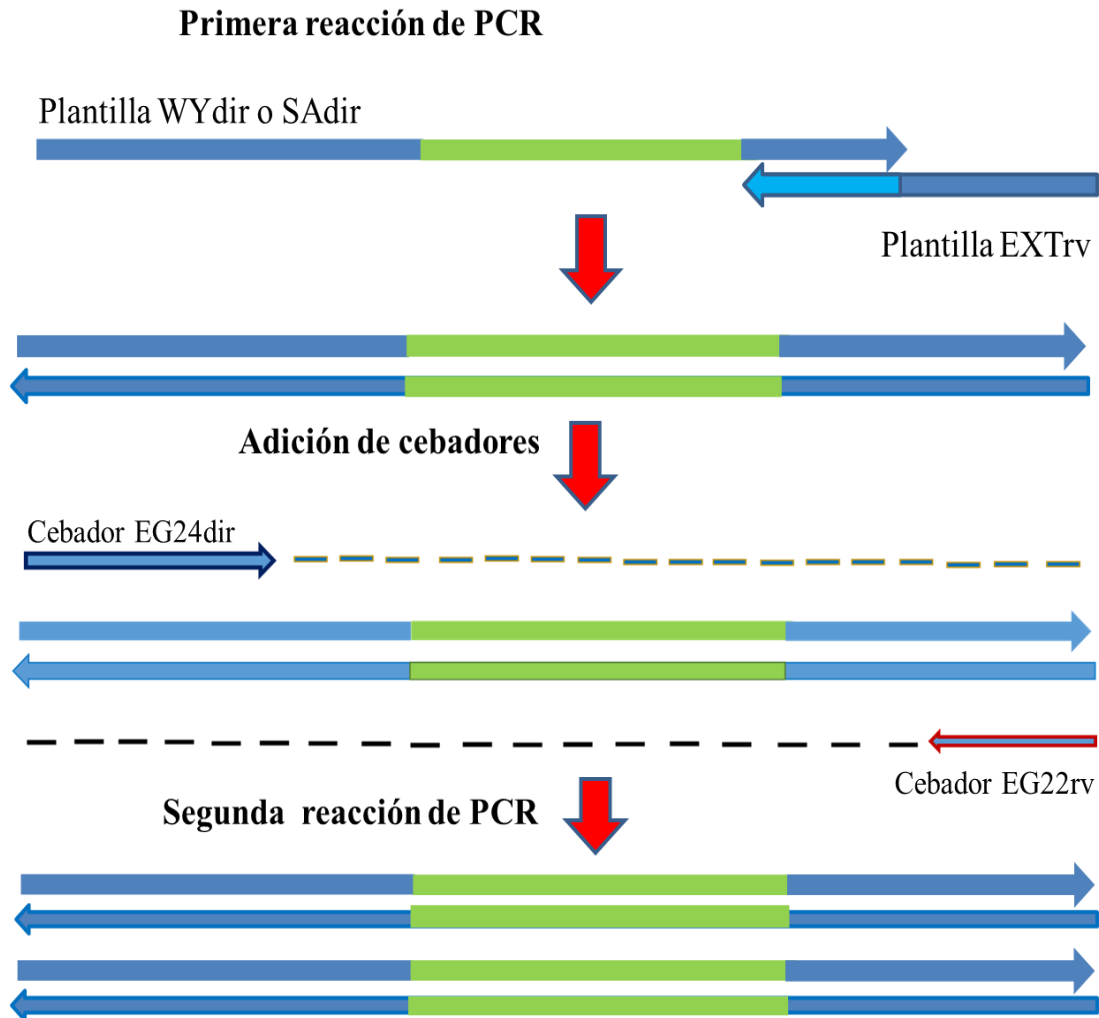


Figura 8: Estrategia para la obtención de los fragmentos que fueron clonados en el vector pEGH a partir de la plantilla principal, la plantilla complementaria, y los cebadores.

FUENTE: Edición propia, 2018

Para la amplificación de la plantilla WYdir, se emplearon: 0.5 μL de las plantillas WYdir y EXTrv a concentraciones 5 μM , 0.5 μL de los cebadores EG22rv y EG24dir de concentración 50 μM , 0.2 μL de la enzima Phusion DNA polymerase (Thermo F530), 5 μL del 5X buffer conteniendo Mg^{2+} , y 0.5 μL de 10 mM dNTPs; en un volumen final de

25 μL . El equipo empleado fue una termocicladora PTC-200 (DNA Engine) de MJ Research y las condiciones para el PCR fueron las siguientes:

Ciclo 1 (Sin incluir los cebadores):

Desnaturalización: 95°C x 30 segundos

Hibridación: 66 o 68°C x 30 segundos

Extensión: 72°C x 20 segundos

Ciclos 2-3 (Después de añadir los cebadores EG22rv y EG24dir):

Desnaturalización inicial: 95°C x 30 segundos

Hibridación: 66 o 68°C x 30 segundos

Extensión: 72°C x 20 segundos

Para la amplificación de la plantilla SAdir, en cada reacción de un volumen final de 50 μL , se emplearon: 1 μL de la plantilla SAdir, 1 μL de la plantilla complementaria EXTrv, 1 μL de cada cebador EG22rv y EG24dir a concentraciones 50 mM, 0.5 μL de la enzima Phusion DNA polymerase, 10 μL del 5X buffer conteniendo Mg^{2+} , y 1 μL de 10 mM dNTPs. El ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones:

Ciclo 1 (Sin incluir los cebadores):

Desnaturalización: 95°C x 30 segundos

Hibridación: 69 o 71°C x 30 segundos

Extensión: 72°C x 20 segundos

Ciclos 2-3 (Después de añadir los cebadores EG22rv y EG24dir):

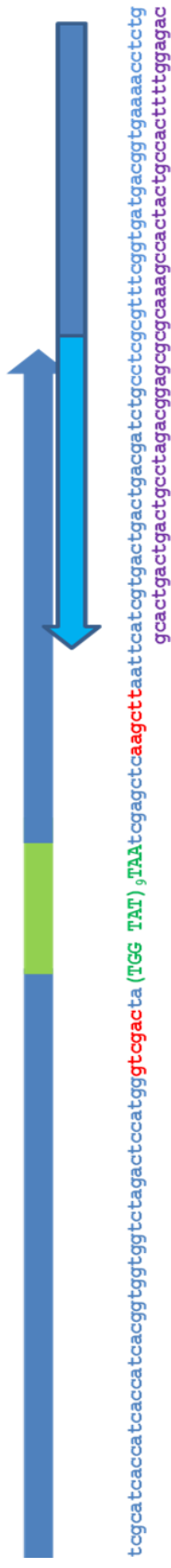
Desnaturalización inicial: 95°C x 30 segundos

Hibridación: 69 o 71°C x 30 segundos

Extensión: 72°C x 20 segundos

Para la verificación de la reacción de amplificación, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.2 por ciento y tinción con bromuro de etidio (Mathews, 2003).

Primera reacción de PCR



Segunda reacción de PCR

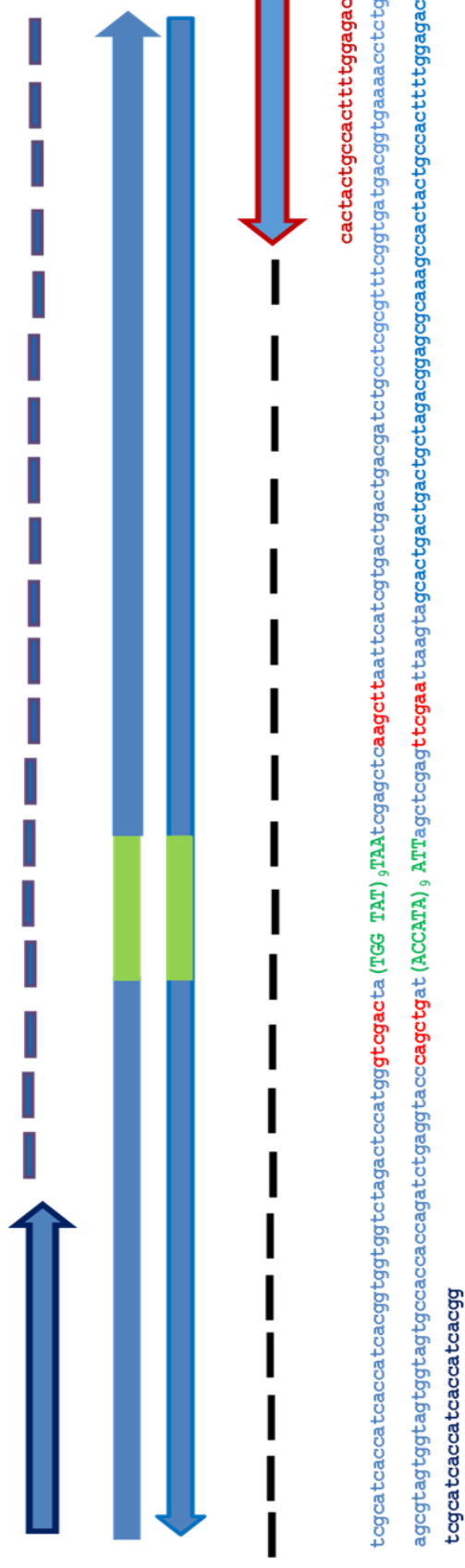


Figura 9: Descripción detallada de la correspondencia de bases en la construcción y amplificación del fragmento WY. Las plantillas y cebadores están indicados según el gráfico anterior.

FUENTE: Edición propia, 2018

3.4.4. Clonación *in vivo*

Este proceso fue realizado en la levadura *S. cerevisiae* al ser cotransformada con el plásmido y los fragmentos a clonar. Se emplearon 175 ng de plásmido pEGH linearizado con la enzima *SalI* y 20 ng del producto de la amplificación (fragmento a insertar). La transformación se llevó a cabo empleando tratamientos con acetato de litio y 42 °C (Sambrook y Green, 2012). Después de una incubación de dos horas en caldo YPD; las células se colectaron, se resuspendieron en agua, y se plaquearon en medio sintético completo que carece de uracilo (medio -Ura), con la finalidad de seleccionar los transformantes que expresen el marcador *URA3* presente en pEGH.

3.4.5. Recuperación del ADN total de los transformantes y verificación por PCR analítico

Algunos transformantes de levadura fueron seleccionados y aislados en agar -Ura, y luego de un día de crecimiento se inocularon en caldo -Ura para dejarlos crecer durante dos días (Morris *et al.* 1981). Luego se realizó la extracción del ADN total a partir de las suspensiones de células empleando un buffer de rotura (1.2 por ciento SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA). El SDS del buffer (laurilsulfato de sodio) es un detergente con la propiedad de solubilizar proteínas y alterar las interacciones lípido-lípido, proteína-proteína y proteína-lípido propias de la célula, esto es complementado con una ruptura mecánica empleando perlas de vidrio (Schneegurt *et al.* 2003). Luego se añadió una mezcla de fenol/cloroformo, se mezcló vigorosamente y se centrifugó. En este proceso el fenol actúa como desnaturizante de proteínas, y el cloroformo permite 1µL de la solución de ADN total obtenido y 0.5µL de los cebadores EG22rv y EG24dir ambos de concentración 50µM. Además, se empleó 0.2 µL de la enzima ADN la separación de la fase acuosa (donde queda el ADN), de la orgánica (donde quedan los lípidos), y la formación de una interfase en la que se ubican las proteínas desnaturizadas. El sobrenadante acuoso fue luego tratado con isopropanol y etanol para la precipitación y lavado de ácidos nucleicos.

Las muestras de ADN total recuperado fueron sometidas a ensayos de PCR analítico para la verificación preliminar de la presencia del inserto en el plásmido. Se empleó como

plantilla polimerasa termoestable Taq, 2.5 μL del 5X buffer conteniendo Mg^{2+} y 0.25 μL de la solución 10 mM dNTPs. El volumen final de cada reacción fue de 20 μL y el PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial: 95°C x 2 minutos

Ciclos 1-31

Desnaturalización: 95°C x 30 segundos

Hibridación: 62°C x 30 segundos

Extensión: 72°C x 60 segundos

3.4.6. Transformación de *E. coli* por electroporación y purificación de plásmidos amplificados

Las muestras de ADN total que incluían plásmidos con insertos (verificadas por PCR analítico), se emplearon para transformar la cepa TOP10 de *E. coli* (*F*- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)- Φ 80*lacZ* Δ *M15*- Δ *lacX74* *recA1* *araD139*- Δ (*araleu*) *galU* *galK* *rps7697* *L* (*StrR*) *endA1* *nupG*). El inóculo se dejó crecer durante toda la noche, y luego de procesos de centrifugación y enjuague, se resuspendió en suficiente agua fría para lograr una densidad de 2×10^{11} células/mL. De acuerdo al protocolo de electroporación (Eppendorf), se mezclaron 40 μL de la suspensión celular con 1 μL de la solución de ADN recuperado de levadura, transfiriendo la mezcla a una cubeta de electroporación para someterla a un pulso eléctrico de 2500V. Luego se añadió 1mL de caldo LB y se transfirió a tubos de microcentrifuga para la incubación a 37°C por una hora, finalmente se plaqueó en medio LB-Ampicilina.

Las colonias de *E. coli* aisladas fueron cultivadas en caldo LB-Ampicilina para la purificación de los plásmidos. El método de purificación, que está basado en cambios de pH para la eliminación del ADN genómico, incluyó la adición de la mezcla acetato de potasio 5M/fenol (7:3), y la precipitación del ADN plasmídico con alcohol etílico. Los sedimentos de ácidos nucleicos obtenidos fueron disueltos con 50 μL de buffer TE conteniendo ribonucleasa 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y finalmente llevados a incubación por 30 minutos a 37°C.

3.4.7. Confirmación de la obtención de plásmidos recombinantes

Los plásmidos purificados fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, ya que sus sitios de corte flanquean a los insertos y se encuentran dentro del sitio de clonaje múltiple de pEGH (Figura 10). Se emplearon 10 µL de la solución de plásmido obtenida, 0.5 µL de cada enzima de restricción, 2 µL del respectivo buffer de reacción 10X, 0.2 µL de BSA 10 mg/mL, y agua destilada estéril para un volumen final de 20 µL. La incubación se realizó en baño maría por dos horas a 37°C. El análisis de los tamaños de los productos de digestión se realizó por corrida de electroforesis en gel de agarosa al 2 por ciento.

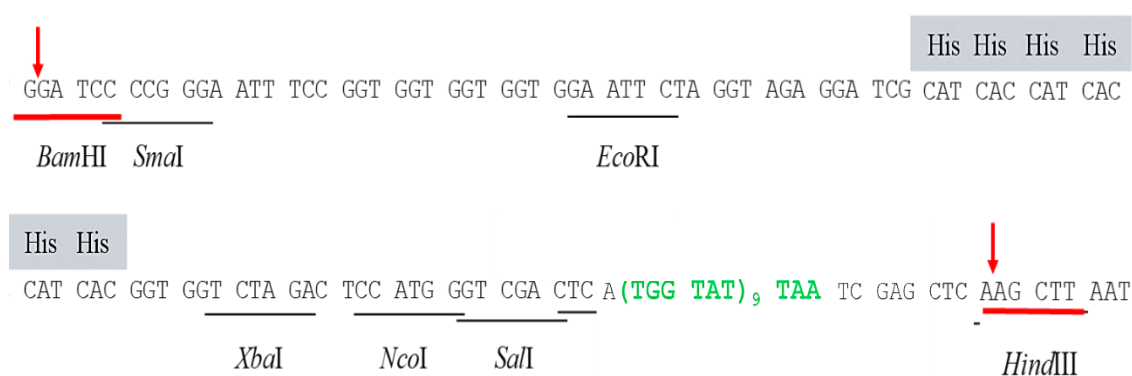


Figura 10: Sitio de clonaje múltiple del plásmido pEGH en el que se indican los sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, cuyas secuencias flanquean al fragmento WY indicado en verde.

FUENTE: Edición propia, 2018

3.4.8. Secuenciación de plásmidos

Las muestras seleccionadas para la secuenciación fueron purificadas empleando el kit Zyppy Plasmid Miniprep de ZYMO RESEARCH. El análisis de secuenciación fue llevado a cabo por Macrogen Inc., Seúl-Korea del Sur (www.macrogen.com).

3.4.9. Construcción de la biblioteca para la expresión de oligopéptidos de secuencia semialeatoria

Luego de establecer el protocolo de clonaje usando el fragmento WY, los procedimientos fueron realizados empleando la plantilla semialeatoria SAdir, la cual contiene secuencias

para la expresión de oligopéptidos con un total de 18 aminoácidos, de los cuales 12 son aleatorios y 6 están orientados a la expresión de Trp y Tir. Para la amplificación por PCR, se emplearon como plantillas principales a SAdir y a la plantilla complementaria EXTrv, y a los mismos cebadores EG22rv y EG24dir. Los procedimientos seguidos fueron los mismos descritos en la sección anterior.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE PCR

Uno de los factores determinantes para la especificidad del PCR es la temperatura que se emplea en la fase de hibridación (Higuchi *et al.* 1993). Así; a mayor temperatura de hibridación, más se dificulta la unión entre el cebador y la plantilla, haciendo a la reacción más específica (McPherson *et al.* 1991).

Para la optimización del protocolo se realizó la amplificación por PCR a partir de la plantilla WYdir, en la cual se probaron dos temperaturas de hibridación: 66 y 68°C (Figura 11). Se determinó que empleando una temperatura de hibridación de 66°C y solo dos ciclos de amplificación se obtenían altas cantidades del fragmento esperado de 185 pb, previniéndose la obtención de productos no específicos de mayor longitud.

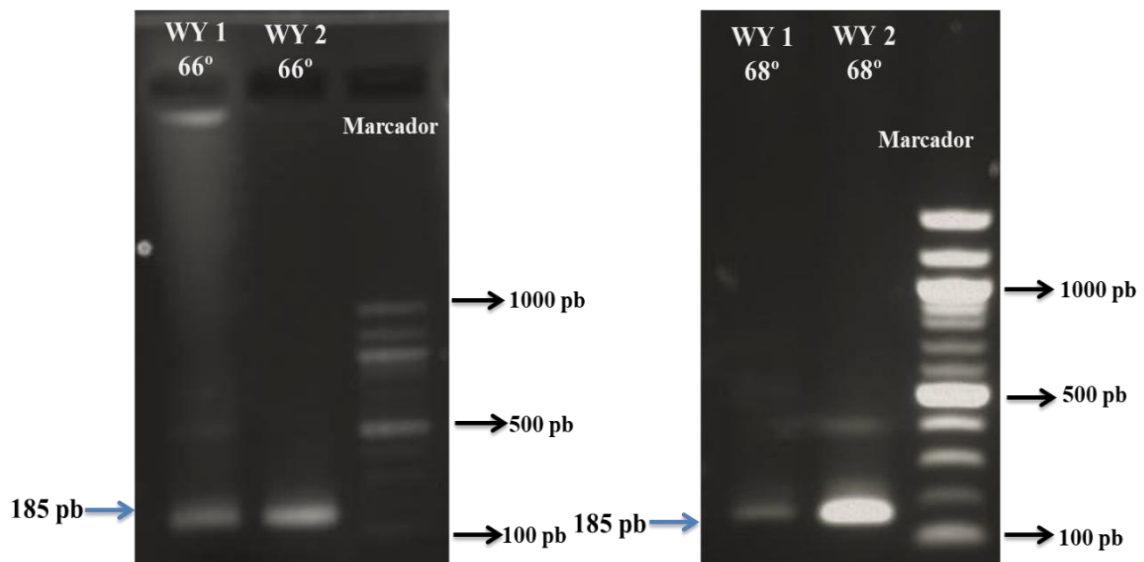


Figura 11: Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando las plantillas WYdir y EXTrv y dos diferentes temperaturas de hibridación: 66 y 68 °C. Alícuotas de 3.5 µL de cada producto fueron cargadas en geles de agarosa 1.2 por ciento. El tamaño del fragmento esperado fue de 185 pb.

FUENTE: Edición propia, 2018

Igualmente se realizó la optimización para la amplificación a partir de plantilla semialeatoria SAdir (Figura 12); empleándose la misma plantilla complementaria, cebadores, y los dos ciclos de amplificación previamente establecidos. Se probaron dos temperaturas de hibridación: 69 y 71°C, determinando que la temperatura más apropiada era 69°C. Se obtuvo como producto final al fragmento esperado de 182 pb.

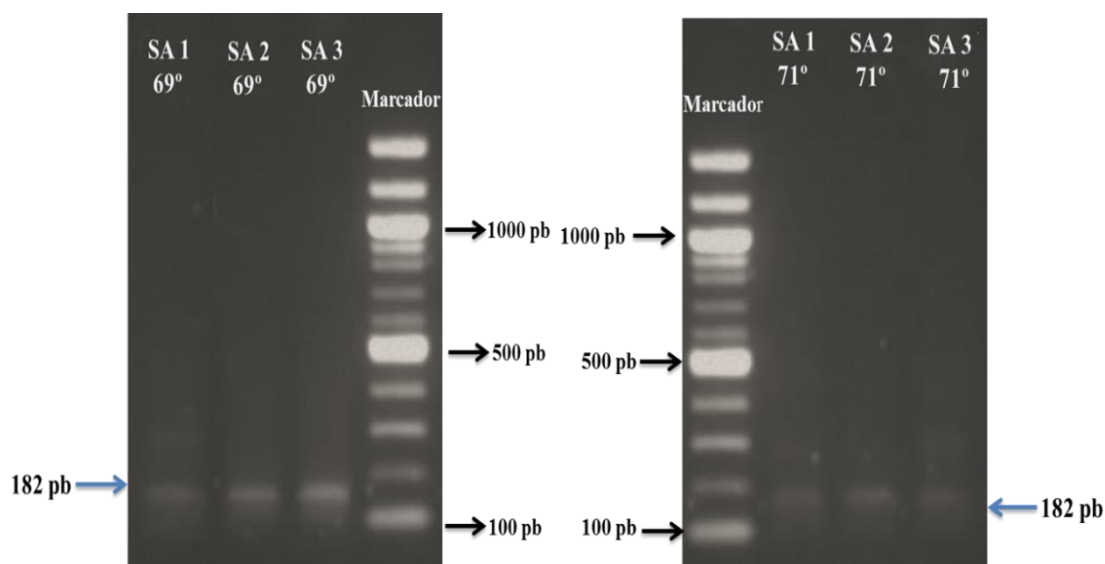


Figura 12: Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando las plantillas SAdir y EXTrv y dos diferentes temperaturas de hibridación: 69 y 71°C. Alícuotas de 3.5 µL de cada producto fueron cargadas en geles de agarosa 1.2 por ciento. El tamaño del fragmento esperado es de 182 pb.

FUENTE: Edición propia, 2018

4.2. TRANSFORMACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae*

Previo a la transformación, se realizó la digestión de 2.5 µg de plásmido pEGH con 5 µL de la enzima *SalI* (NEB) (Figura 13), luego se llevó a un volumen final de 100 µL y a incubación por tres horas a 37°C. Este procedimiento favoreció la selección de plásmidos con inserto en las placas –Ura, ya que a través de la digestión y linearización de pEGH se induce al sistema de reparación de ADN de *S. cerevisiae*, incrementando así la eficiencia de clonaje *in vivo* (Joska *et al.* 2014).

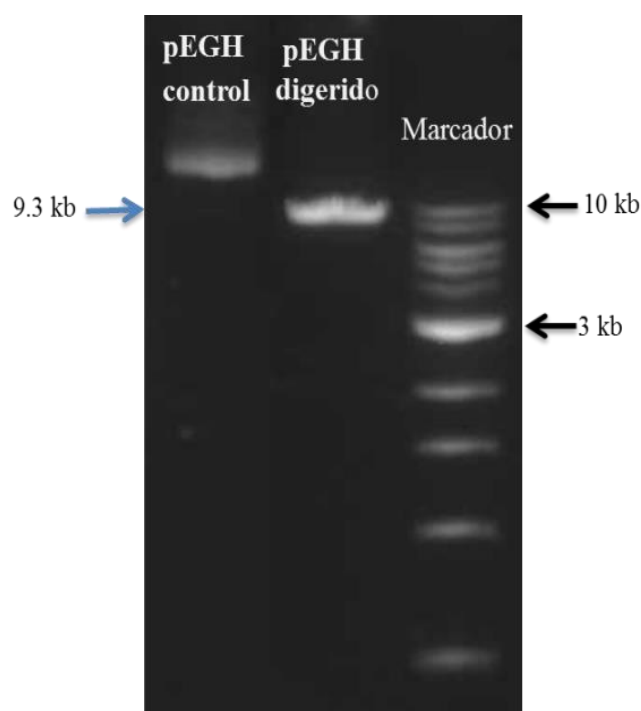


Figura 13: Análisis electroforético del plásmido pEGH digerido con la enzima *SaI* en gel de agarosa 0.8 por ciento produciendo una banda del tamaño esperado (9309 pb). El plásmido pEGH sin digerir fue también analizado como control.

FUENTE: Edición propia, 2018

También se realizaron ensayos transformando a *S.cerevisiae* solo con pEGH digerido, y con pEGH digerido más el fragmento WY o SA. Los resultados permitieron verificar la importancia de la presencia del fragmento junto al plásmido digerido en el proceso de clonaje, ya que se evidenció un aumento en el número de transformantes debido a la presencia de los fragmentos a clonar que permitieron la reparación de plásmidos vía recombinación homóloga (Jacobus y Gross, 2015)

Para la transformación con el fragmento WY se emplearon 175 ng de plásmido digerido y 20 ng del fragmento amplificado. (Figura 14). Para la transformación del fragmento SA se emplearon 175 ng de plásmido digerido y 13 ng de fragmento amplificado. (Figura 15).

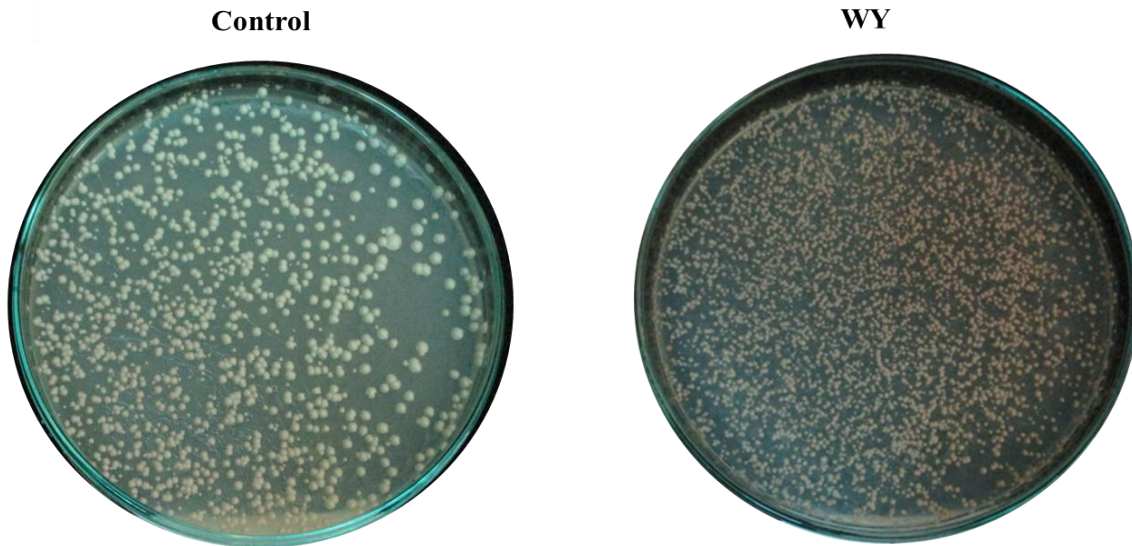


Figura 14: Transformantes de levadura obtenidos por clonaje del fragmento WY y el respectivo control. La placa “WY” incluyó en la transformación tanto el plásmido pEGH linearizado como el fragmento WY, y la placa control incluyó solo el plásmido linearizado. Se obtuvieron aproximadamente 422 colonias de levadura por μg de ADN en la placa control y un número evidentemente mayor de colonias en la placa WY.

FUENTE: Edición propia, 2018

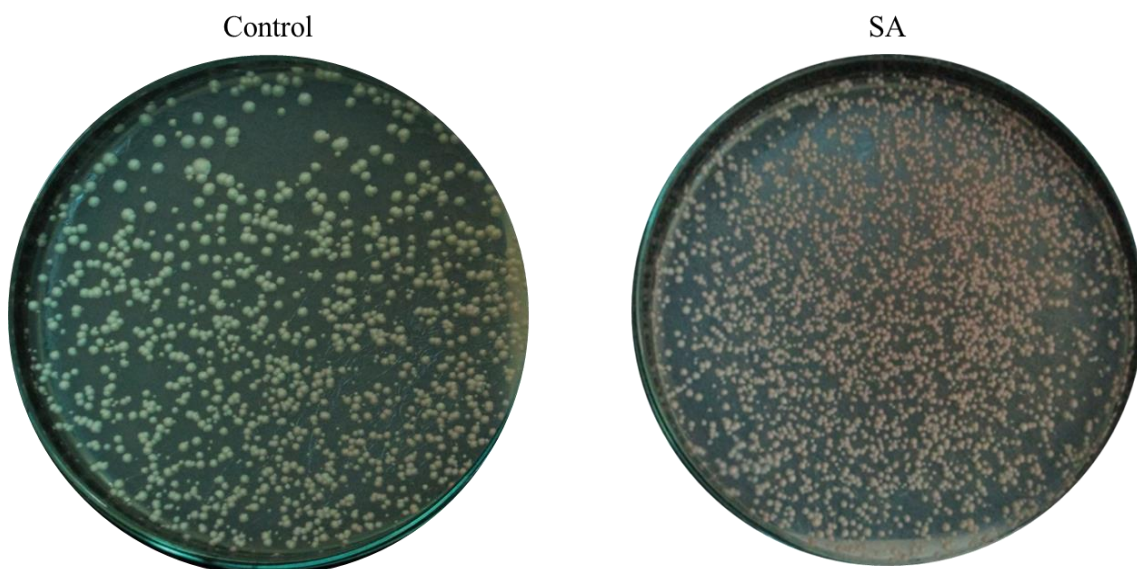


Figura 15: Transformantes de levadura obtenidos por clonaje del fragmento SA y el respectivo control. La placa “SA” incluyó en la transformación tanto el plásmido pEGH linearizado como el fragmento SA, y la placa control solo el plásmido linearizado. Se obtuvieron aproximadamente 399 colonias de levadura por μg de ADN en la placa control y un mayor número de colonias en la placa SA.

FUENTE: Edición propia, 2018

4.3. RECUPERACIÓN DE PLÁSMIDO RECOMBINANTE Y ANÁLISIS MEDIANTE PCR ANALÍTICO

Se realizó el aislamiento de 14 colonias de transformantes WY de levadura, que luego se cultivaron en caldo –Ura para la recuperación del ADN total y la verificación de la presencia de inserto por PCR analítico (tamaño esperado de 185 pb). De las 14 muestras analizadas; 12 tenían el inserto, obteniéndose un 86 por ciento de eficiencia de clonaje (Figura 16). El nivel de eficiencia logrado dependió de la naturaleza del fragmento WY, el cual es un fragmento de secuencia única que se amplificó eficientemente.

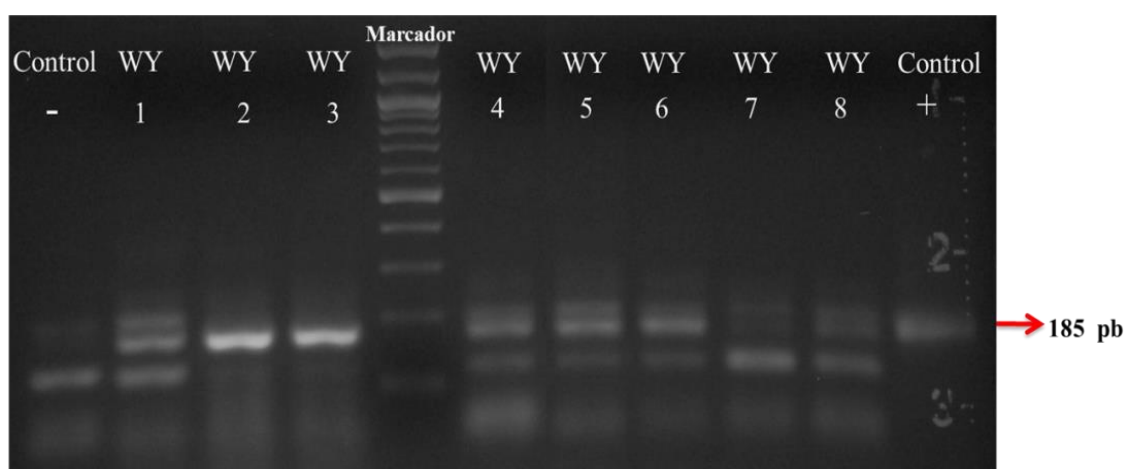


Figura 16: Resultado de los ensayos de PCR para la identificación de los transformantes de levadura que incluyen el fragmento WY. El análisis electroforético se realizó en gel de agarosa 1.2 por ciento con alícuotas de 2 μ L de los productos de PCR obtenidos. Estos se realizaron en 8 muestras de ADN total recuperado de los transformantes. Se usó como control positivo al fragmento WY amplificado por PCR, y como control negativo a la amplificación de solo cebadores. El fragmento esperado fue de 185 pb.

FUENTE: Edición propia, 2018

Para la determinación de los transformantes con fragmento SA, se aislaron y analizaron 32 muestras por PCR analítico, de las cuales 22 tenían el fragmento; resultando con una eficiencia de clonaje del 69 por ciento (Figura 17). Esta menor, pero todavía óptima

eficiencia de clonaje, probablemente se debe a la presencia de las bases aleatorias que dificultan todo el proceso, principalmente desde la síntesis de los oligonucleótidos. Sin embargo, las bases aleatorias de las secuencias de los fragmentos SA fueron importantes para la determinación de su variedad.

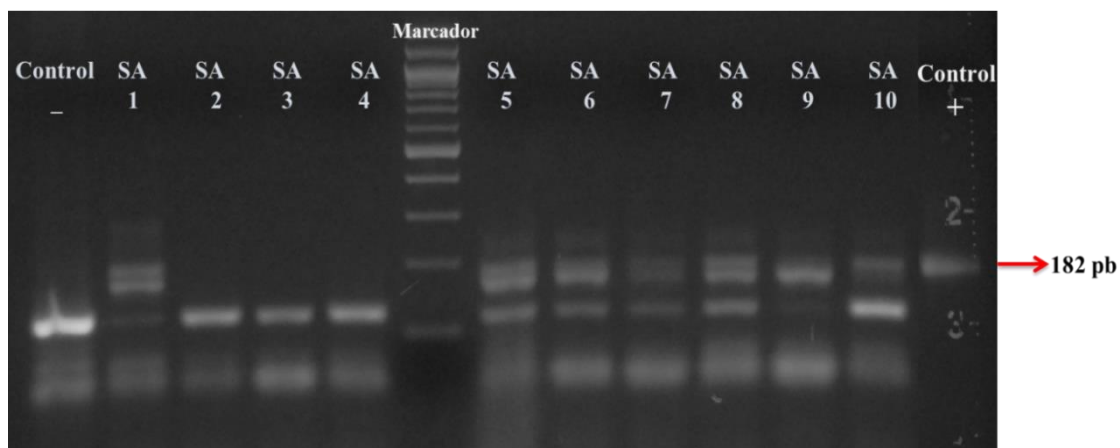


Figura 17: Resultado de los ensayos de PCR para la identificación de los transformantes de levadura que incluyen los fragmentos SA. El análisis electroforético se realizó en gel de agarosa 1.2 por ciento con alícuotas de 2 μ L de los productos de PCR obtenidos. Estos se realizaron en 10 muestras de ADN total recuperado de los transformantes. Se usó como control positivo al fragmento WY amplificado por PCR, y como control negativo a la amplificación de solo cebadores. El fragmento esperado fue de 182 pb.

FUENTE: Edición propia, 2018

4.4. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

La transformación de *E. coli* se realizó con la finalidad de recuperar y amplificar los plásmidos recombinantes provenientes de los transformantes de levadura (Sambrook y Green, 2012). Para la transformación se empleó la cepa de *E. coli* Top10, y las muestras de ADN total purificado que contienen el plásmido recombinante. Luego se realizó el aislamiento de clones en placas LB+Ampicilina.

4.5. VERIFICACIÓN-DE-LA-OBTENCIÓN-DE-PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Luego de la purificación de los plásmidos amplificados por *E.coli*, se seleccionaron 16 muestras positivas con el fragmento SA para el último ensayo de verificación por PCR analítico. Este ensayo ya no se realizó con las muestras purificadas de fragmento WY, ya que son de secuencia única. De las 16 muestras SA analizadas; 8 muestras tenían el inserto esperado de 182 pb, resultando en una eficiencia del 50 por ciento. El tamaño del fragmento amplificado sin inserto fue de 127 pb (Figura 18).

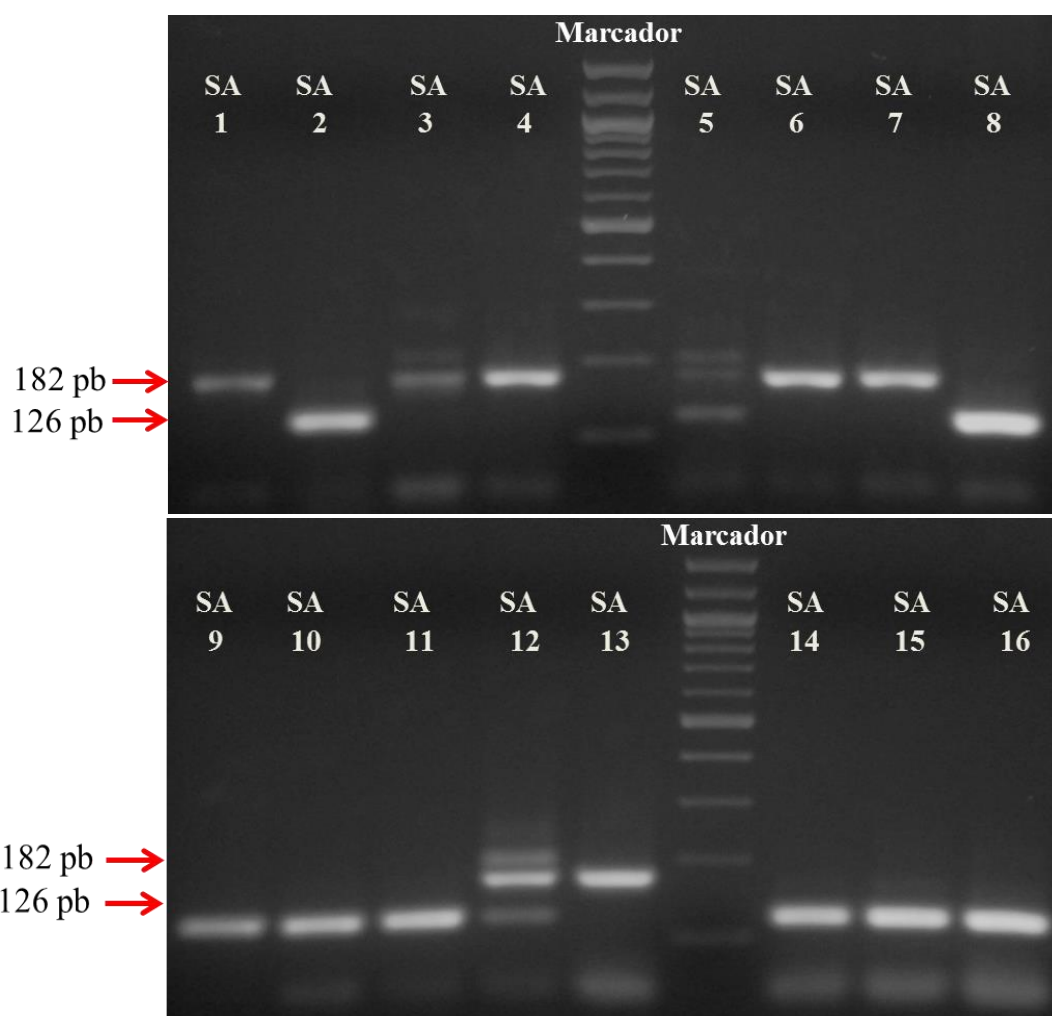


Figura 18: Resultados de los ensayos de PCR para la verificación de la presencia de insertos en los plásmidos SA amplificados en *E. coli* y luego purificados. Los plásmidos con insertos SA presentan productos de 182 pb y los que carecen de insertos, de 126 pb.

FUENTE: Edición propia, 2018

4.6.DIGESTIÓN-DE-PLÁSMIDOS-PURIFICADOS-PARA-LA COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE INSERTO

Se realizó la digestión de las muestras de plásmidos recombinantes verificados por PCR analítico. Se emplearon las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, las cuales, al ser enzimas de corte único y flanquear al fragmento clonado, permitieron obtener fragmentos WY de 164 pb, y de 161 pb para SA. El tamaño esperado para el fragmento sin inserto fue 106 pb. Todas las muestras WY y SA analizadas resultaron positivas para la presencia de inserto (Figura 19).

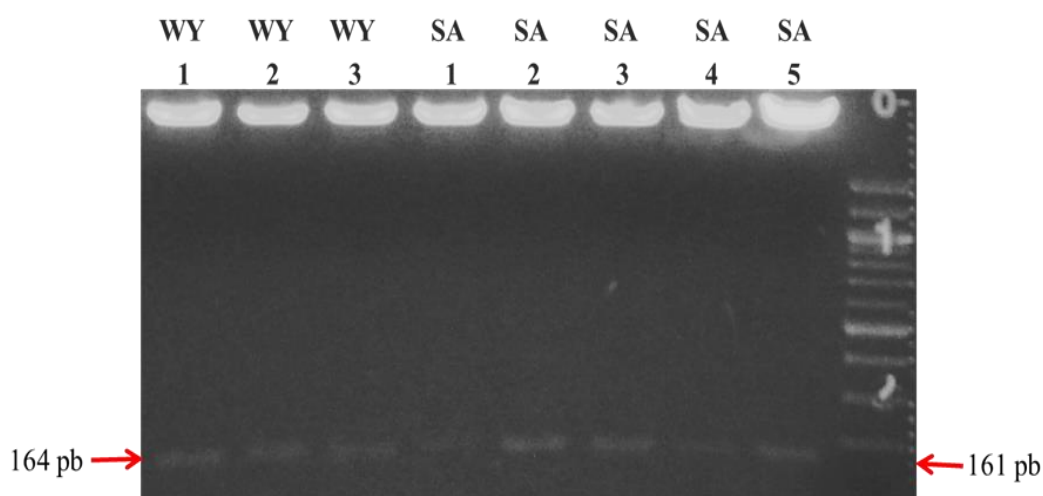


Figura 19: Análisis electroforético en gel 2 por ciento de los plásmidos purificados WY y SA digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Se usó como control positivo al fragmento WY amplificado por PCR, y como control negativo a la amplificación de solo cebadores. En el caso de las muestras WY, el fragmento esperado fue de 164 pb y para los plásmidos SA, de 161 pb. El fragmento esperado para los plásmidos sin inserto fue de 106 pb.

FUENTE: Edición propia, 2018

4.7. SECUENCIACIÓN DE PLÁSMIDOS

Este análisis se realizó con la finalidad de confirmar el correcto clonaje de los insertos, y verificar o confirmar las secuencias de los insertos. Las muestras que se secuenciaron fueron: WY1, WY2, y WY3 de secuencia única; y SA1, SA2, SA3, SA4, y SA5 de

secuencia semialeatoria. El cebador de secuenciación que se empleó fue GEX 5; el cual fue facilitado por la compañía que hizo el análisis, y que posee la secuencia GGCAAGCCACGTTTGGTG.

4.7.1 Secuencia de los insertos WY

En la figura 20, se muestra la evidencia de la correcta construcción de los plásmidos de secuencia única WY, la cual codifica para los nueve pares Trp - Tir.

4.7.2 Comparación entre las secuencias de los insertos SA

En la figura 21 se presentan las secuencias codificantes halladas para los plásmidos SA1, SA2, SA3, SA4, y SA5, lo que permitió destacar la diversidad entre las secuencias. Para una mejor observación, se incluye también la secuencia de la plantilla SAdir, la cual fue empleada para la amplificación de los insertos a clonar. En la imagen se han señalado las bases iniciales de los codones dirigidos a la expresión de los aminoácidos Trp y Tir para diferenciarlos de los codones aleatorios.

Secuenciación WY

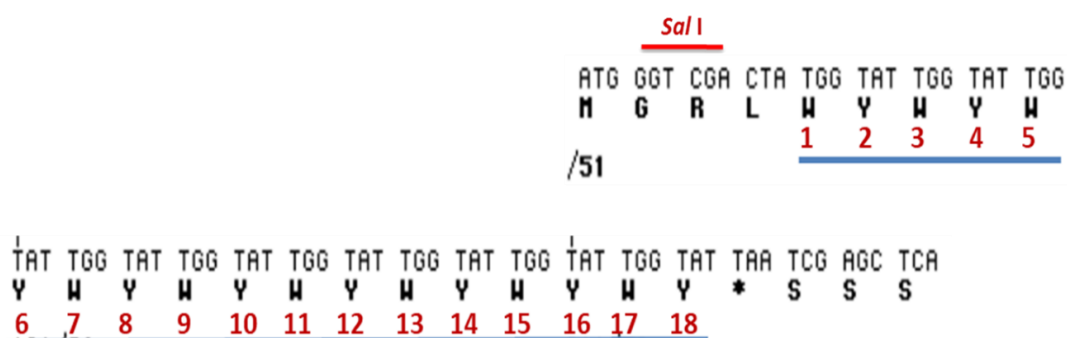


Figura 20: Confirmación de la correcta construcción de los plásmidos WY1, WY2 y WY3 por secuenciación de nucleótidos. Las secuencias obtenidas para los tres plásmidos fueron idénticas y correctas, y permitirían la expresión de los nueve pares Trp-Tir. El sitio de restricción *SalI* y el codón de terminación están indicados con líneas rojas.

FUENTE: Edición propia, 2018

Secuencias codificantes de
los insertos SA

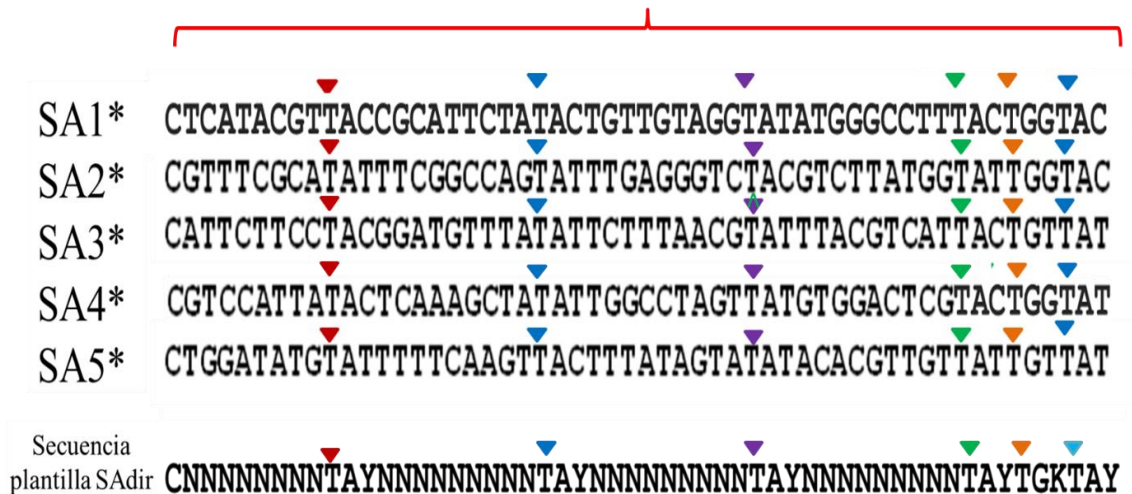


Figura 21: Comparación entre las secuencias codificantes de interés SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5, y de la secuencia de interés del oligo SAdir. Están señalados con distintos colores los codones codificantes para los aminoácidos semialeatorios.

FUENTE: Edición propia, 2018

En la figura 22 se muestran las secuencias de los oligopéptidos codificados por los fragmentos identificados en los respectivos plásmidos SA. Estos resultados confirmaron la exitosa construcción de la biblioteca de plásmidos.

Sal I 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
 SA 1 GGT CGA CTC ATA CGT TAC CGC ATT CTA TAC TGT TGT AGG TAT ATG GGC CTT TAC TGG TAC TAA
 Gli Arg Leu Ile Arg Tir Arg Ile Leu Tir Cis Cis Arg Tir Met Gli Leu Tir Trp Tir *

Sal I
 SA 2 GGT CGA CGT TTC GCA TAT TTC GGC CAG TAT TTG AGG GTC TAC GTC TTA TGG TAT TGG TAC TAA
 Gli Arg Arg Phe Ala Tir Phe Gli Gln Tir Leu Arg Val Tir Val Leu Trp Tir Trp Tir *

Sal I
 SA 3 GGT CGA CAT TCT TCC TAC GGA TGT TTA TAT TCT TTA ACG TAT TTA CGT CAT TAC TGT TAT TAA
 Gli Arg His Ser Ser Tir Gli Cis Leu Tir Ser Leu Thr Tir Leu Arg His Tir Cis Tir *

Sal I
 SA 4 GGT CGA CGT CCA TTA TAC TCA AAG CTA TAT TGG CCT AGT TAT GTG GAC TCG TAC TGG TAT TAA
 Gli Arg Arg Pro Leu Tir Ser Lis Leu Tir Trp Pro Ser Tir Val Asp Ser Tir Trp Tir *

Sal I
 SA 5 GGT CGA CTG GAT ATG TAT TTT TCA AGT TAC TTT ATA GTA TAT ACA CGT TGT TAT TGT TAT TAA
 Gli Arg Leu Asp Met Tir Phe Ser Ser Tir Phe Ile Val Tir Thr Arg Cis Tir Cis Tir *

Figura 22: Secuencias de los 18 aminoácidos codificados por los fragmentos SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5. Cada secuencia incluye a los cinco codones codificantes para Tir (numerados en color rojo), uno para Trp o Cis (en color verde), y a los 12 codones restantes que codifican para los aminoácidos aleatorios. Están indicados el sitio de restricción *SalI* y el codón de terminación.

FUENTE: Edición propia, 2018

En la figura 23 se muestran los diferentes aminoácidos codificados; los cuales incluyen a los aminoácidos aleatorios, y a las repeticiones de Tir en cada fragmento. Según la tabla 5, los aminoácidos con mayor frecuencia relativa fueron leucina y arginina, ya que pueden ser codificados por seis codones distintos. De estos aminoácidos aleatorios, Trp solo estuvo presente en el plásmido SA4, resultando con la frecuencia relativa más baja. Esta información permitirá realizar los posteriores ensayos de tamizaje y de esa manera comprobar si, con la diversidad lograda en los oligopéptidos, se ha disminuido, mantenido, o potenciado la actividad fotoprotectora inicial.

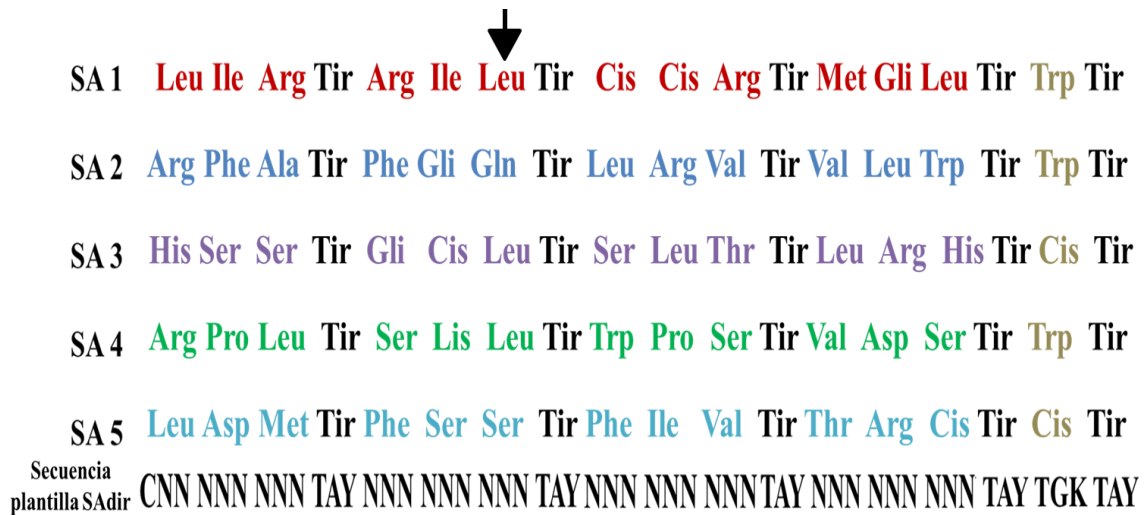


Figura 23: Comparación de las secuencias codificadas por los fragmentos SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5. En cada secuencia se observan los aminoácidos aleatorios (colores), las cinco repeticiones del aminoácido Tir (negro), y los aminoácidos Cis o Trp (crema). La flecha negra indica al aminoácido más frecuentemente incorporado.

FUENTE: Edición propia, 2018

Tabla 5: Frecuencias relativas del total de aminoácidos codificados por los insertos en los plásmidos SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5.

Aminoácido	Frecuencia relativa	Aminoácido	Frecuencia relativa	Aminoácido	Frecuencia relativa
Leucina (Leu)	0.18	Fenilalanina (Phe)	0.06	Prolina (Pro)	0.03
Isoleucina (Ile)	0.05	Alanina (Ala)	0.016	Serina (Ser)	0.13
Arginina (Arg)	0.13	Glutamina (Gln)	0.016	Treonina (Thr)	0.03
Cisteína (Cis)	0.06	Valina (Val)	0.06	Lisina (Lis)	0.016
Metionina (Met)	0.03	Triptófano (Trp)	0.03	Aspartato (Asp)	0.03
Glicina (Gli)	0.05	Histidina (His)	0.03		

FUENTE: Edición propia, 2018

V. CONCLUSIONES

- 1) Se logró la construcción de la biblioteca de plásmidos por clonaje *in vivo* en *S. cerevisiae*, la cual posee fragmentos semialeatorios para la expresión de oligopéptidos que incluyen residuos de Trp y Tir, y otros aminoácidos aleatorios.
- 2) Se logró optimizar y establecer el protocolo para el clonaje *in vivo* realizado por *S. cerevisiae*, para lo cual se empleó un fragmento diseñado para la expresión de un oligopéptido de secuencia única WY (Trp-Tir)₉.
- 3) Las eficiencias de clonaje fueron determinadas por medio del conteo de transformantes, ensayos de PCR analítico, y finalmente por digestión; dichas eficiencias resultaron en un 86 por ciento para el clonaje del fragmento WY, y de un 50 a 69 por ciento para el clonaje de los fragmentos SA.

VI. RECOMENDACIONES

- 1) Realizar estudios usando los plásmidos obtenidos con los insertos WY para comprobar la potencial actividad fotoprotectora que brindan los aminoácidos Trp y Tir.

- 2) Realizar los tamizados usando la biblioteca de plásmidos SA construida para identificar los oligopéptidos con función fotoprotectora y verificar si los aminoácidos aleatorios presentes potencian o disminuyen la función fotoprotectora de los residuos Trp y Tir.

- 3) Realizar ensayos que permitan confirmar la adecuada expresión de los oligopéptidos como proteínas de fusión con GST y His6, bajo el control del promotor *GAL*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abécassis, V; Pompon, D. 2000. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: Statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Research* 28(20): e88.
2. Adam, A; Gonzáles-Blasco, G; Rubio, M; Polaina, J. 1999. Transformation of *Escherichia coli* with DNA from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Lysates. *Applied and Environmental Microbiology* 5303-5306.
3. Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3 ed. New York, Garland Publishing. 432 p.
4. Alberts, B; Bray, D. 2006. *Introducción a la biología celular*. 2 ed. USA, Médica Panamericana. 842 p.
5. Álvarez, P. 1995. *Producción y liberación de proteínas heterólogas en mutantes de Saccharomyces cerevisiae afectados en la integridad celular*. Tesis Doctorado. Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. 88 p.
6. Aylon, Y; Kupiec, M. 2004. DSB repair: the yeast paradigm. *DNA Repair, Academy of Medical Sciences and Technology* 3: 797–815.
7. Barnes, W. 1994. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from λ -bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, USA 91: 2216–2220.

8. Battaner, E. 2013. *Biomoléculas: Una introducción estructural a la Bioquímica*. Universidad de Salamanca. 582 p.
9. Betancor, L; Gadea, M; Flores, K. 2008. *Genética Bacteriana*. Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR): Bacteriología y Virología Médica. 3 ed. Montevideo. 65-90.
10. Bidlingmaier, S; Liu, B. 2011. Construction of yeast surface-displayed cDNA libraries. *Methods Molecular Biology* 729: 199-210
11. Bryksin, AV; Matsumura, I. 2010. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* 48: 463–465.
12. Cai, S; Fujii, N; Saito, T; Fujii, N. 2013. Simultaneous ultraviolet B-induced photo-oxidation of tryptophan/ tyrosine and racemization of neighboring aspartyl residues in peptides. *Free Radical Biology and Medicine* 65: 1037-1046.
13. Cheng, S; Fockler, C; Barnes, W. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5695–5699.
14. Cline, J; Braman, J; Hogrefe, H. 1996. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 24(18), 3546–355.
15. De Antoni, A; Gallwitz, D. 2000. A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 246: 179–185.
16. Dower, W; Miller, J; Ragsdale, C.1988. High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16(13): 6127-6144.
17. Dreiseikelmann, B. 1994. Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiological Reviews* 58: 293-316.

18. Eckert-Boulet, N; Louise, M; Olsen, B; Lisby, M. 2012. Optimization of ordered plasmid assembly by gap repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 29: 323-334
19. Engel, S; Dietrich, F; Fisk, D; Binkley, G; Balakrishnan, R; Constanzo, M; Dwight, S; Hitz, B; Karra, K; Nash, R; Weng, S; Wong, E; Lloyd, P; Skrzypek, M; Miyasato, S; Simison, M.; Cherry, M. 2014. The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *Genes Genome Genetics* 4(3): 389–398.
20. Fersht, A. 1980. Estructura y mecanismo de las enzimas. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge. Editorial Reverté. 343:160.
21. Folch, M; Garay, A; Lledías, F; Covarrubias, R. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 46(1 - 2): 24-46.
22. Forsburg, S. 2001. The art and design of genetics screens: Yeast. *Nature Reviews* 2: 1-10.
23. Fujisawa, T; Masuda, S. 2017. Light-induced chromophore and protein responses and mechanical signal transduction of BLUF proteins. *Biophysical Reviews* 10(2).
24. Geu-Flores, F; Nour-Eldin, H; Nielsen, M; Halkier, B. 2007. USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Research* 35: e55
25. Jacobus, A; Gross, J. 2015. Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in *Escherichia coli*. *PLoS One* 10(3): e0119221.
26. Jauert, P; Jensen, L; Kirkpatrick, D. 2005. A novel yeast genomic DNA library on a geneticin-resistance vector. *Yeast* 22: 653-657.

27. Johnson, E; Echavarri-Erasun C. 2011. 5 ed. Yeast Biotechnology 3:21-44.
28. Janjua, S; Younis, S; Deeba, F. 2014. High Efficiency DNA Transformation Protocol for *Escherichia coli* using Combination of Physico-chemical Methods. International journal of Agriculture & Biology 16(1):132-138.
29. Hanahan, D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. Journal of Molecular Biology 166:557-580.
30. Harper, S; Speicher, DW. 2011. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. Methods in molecular biology 681:259-80.
31. Hartley, J; Temple, G; Brasch, M. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Research 10: 1788–1795.
32. Higuchi, R; Fockler, C; Dollinger, G; Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. Bio Technology 11: 1026-1030.
33. Hua, S; Qiu, M; Chan, E; Zhou, L; Lou, Y. 1997. Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast. Plasmid 38: 91–96.
34. Hui, Y; Xue, X; Xuesong, Z; Yan, W. 2015. Intrinsic Fluorescence Spectra of Tryptophan, Tyrosine and Phenylalanine. Atlantis Press 224-233.
35. Igarashi, N; Onoue, S; Tsuda, Y. 2007. Photoreactivity of Amino Acids: Tryptophan-induced Photochemical Events via Reactive Oxygen Species Generation. Analytical Sciences 23: 943-948.
36. Iizasa, E; Nagano, Y. 2006. Highly efficient yeast-based in vivo DNA cloning of multiple DNA fragments and the simultaneous construction of yeast/ *Escherichia coli* shuttle vectors. BioTechniques 40(1):79-83.

37. Kitazono, A. 2011. Optimized protocols and plasmid for in vivo cloning in yeast. Dept. of Biological Sciences, University of Alabama in Huntsville, USA. *Gene* 484: 86–89.
38. Lisby, M; Barlow, JH; Burgess, RC; Rothstein, R. 2004. Choreography of the DNA damage response; spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 118: 699–713.
39. Lodish, H; Berk, A; Zipursky, L; Matsudaira, P; Baltimore, D; Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4 ed. W. H. Freeman and Company. 1008 p.
40. Ma, H; Kunes, S; Schatz, P; Botstein, D. 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. Elsevier. *Gene* 58: 201-216.
41. Maksimov, E; Shirshin, E; Sluchanko, N; Zlenko, D; Parshina, E; Tsoraev, G; Klementiev, K; Budylin, G; Schmitt, F; Friedrich, T; Fadeev, V; Paschenko, V; Rubin, A. 2015. The Signaling State of Orange Carotenoid Protein. *Biophysical Journal* 109(3):595–607
42. Mathews, C; Van Holde, K; Kevin G. 2003. *Bioquímica*. 3ed. Madrid, Pearson. 1368 p.
43. McPherson, M; Quirke, P; Taylor, G. 1991. *PCR: A practical approach*. USA, Oxford University Press. 280 p.
44. Mitchell, D; Marshall, T; Deschenes, R. 1993. Vectors for the Inducible Overexpression of Glutathione S-Transferase Fusion Proteins in Yeast. Department of Biochemistry, University of Iowa, Iowa City, Iowa. *Yeast* 9:715-723.
45. Montenegro, R. 2004. *Biología Evolutiva Humana*. Facultad de Psicología de la Universidad Nacional de Córdoba 355:45.

46. Morris, D; Noti, J.;Osborne, F; Szalay, A. 1981. Plasmid vectors capable of transferring large DNA fragments to yeast. *US National Library of Medicine* 1(1):27-36.
47. Orr-Weaver T., Szostak J., Rothstein R. 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78: 6354–6358.
48. Pattabhi, V; Gautham, N. 2002. *Biophysics*. Kluwer Academic Publishers. 257 p.
49. Paush, M; Kirsh, D; Sanford, S. 2005. *Saccharomyces cerevisiae: Applications*. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp 1-7.
50. Pronk, J. 2002. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5): 2095–2100.
51. Quan, J; Tian J. 2009. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS One* 4(7): e6441
52. Raymond, CK; Pownder, TA; Sexson, SL. 1999. General method for plasmid construction using homologous recombination. *Biotechniques* 26: 134–138, 140–131.
53. Rocha, M. 2005. Utilidad de una etiqueta de Poli-Histidina para la purificación de la hormona del crecimiento bovino recombinante. Tesis Máster. Monterrey, México, Universidad Autónoma de Nuevo León. 63 p.
54. Sambrook, J;Green M.2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2028 p.

55. Scalon, T; Gray, E; Griswold, K. 2009. Quantifying and resolving multiple vector transformants in *S. cerevisiae* plasmid libraries. *BioMed Central Biotechnology* 9: 95 p.
56. Schneegurt, M; Dore, S; Kulpa, C. 2003. Direct Extraction of DNA from Soils for Studies in Microbial Ecology. *Current Issues in Molecular Biology* 5: 1-8.
57. Singh, M; Yadav, A; Ma, X; Amoah, E. 2010. Plasmid DNA Transformation in *Escherichia Coli*: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6(4): 561-568.
58. Schneider, R. 2004. Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast. *Yeast Genetics*. 85p.
59. So, P; Dong, C. 2002. Fluorescence Spectrophotometry. *Encyclopedia of Life Sciences*.
60. Swers, J; Kellog, B; Wittrup, D. 2004. Shuffled antibody libraries created by *in vivo* homologous recombination and yeast surface display. *US National Library of Medicine* 32(3): 36.
61. Torruco, J; Domínguez, M; Dávila, G; Martínez, A; Che, L; Betancur D. 2008. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural. *Rev. Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6 (2):158-168.
62. Van der Ven, C. (2002). Biochemical and functional characterization of casein and whey protein hydrolysates. A study on the correlations between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Tesis Doctorado. Nueva Zelanda, Wageningen University. 170 p.

63. Vermeirssen, V; Camp, JV; Verstraete, W. 2004. Biodisponibilidad de los Péptidos Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina I. *British Journal of Nutrition* 92(3):357-366.
64. Villiers, B; Stein, V; Hollfelder, F. 2010. USER friendly DNA recombination (USERec): a simple and flexible near homology-independent method for gene library construction. *Protein Engineering, Design and Selection* 23:1–8.
65. Walhout, A; Boulton, S; Vidal, M. 2000. Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast* 117: 88-94.
66. Watson, JD; Tooze, J; Kurtz, DT. 1988. ADN recombinante. *Introducción a la ingeniería genética*. Barcelona, Labor. 208 p.
67. Weston, A; Brown, M; Perkins, H; Saunders, J; Humphreys, G. 1981. Transformation of *Escherichia coli* with Plasmid Deoxyribonucleic Acid: Calcium-Induced Binding of Deoxyribonucleic Acid to Whole Cells and to Isolated Membrane Fractions. *Journal of Bacteriology* 145(2): 780-787.
68. Wilson, A; Punginelli, C; Couturier, M; Perreau, F; Kirilovsky, D. 2011. Essential role of two tyrosines and two tryptophans on the photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein. *US National Library of Medicine* 1807(3): 293-301.
69. Yip, Y; Smith, G; Ward, R. 2001. Comparison of phage pIII, pVIII and GST as carrier proteins for peptide immunisation in Balb/c mice. *Immunology Letters* 79:197–202.
70. Zamyatnin, A. 2004. Biochemical Problems of Regulation by Oligopeptides. *Biochemistry* 69(11): 1276-1282.
71. Zhang, Y; Werling, U; Edelman, W., 2012. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Research* 40, e55.