

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

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.