



TESINA DE GRADO

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

**Producción recombinante de la proteína
SrpA de *Aspergillus nidulans*,
en *Escherichia coli*, para la generación de
anticuerpos**

María Agustina González Cifuentes

Tutor: Dr. Manuel Sanguinetti

Co-Tutor: Dra. Ana Ramón

Montevideo, Uruguay

Diciembre 2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal docente integrado por el abajo firmante aprueba la Tesis de Investigación:

Título

.....
.....

Autor

.....
.....

Tutor

.....
.....

Carrera

.....
.....

Puntaje

.....
.....

Tribunal

.....
.....

Fecha

Dedicado a mi abuelo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Proteínas integrales de membrana	8
1.2. Direccionamiento co-traduccionaI de IMPs a la membrana del retículo endoplasmático	10
1.3. Composición de SRP	12
1.4. SRP54 y sus dominios	14
1.5. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo para el estudio de transportadores de membrana	16
1.6. SRP en <i>Aspergillus nidulans</i>	17
1.7. Aporte al estudio del rol del uso diferencial de codones en proteínas de membrana en <i>A. nidulans</i> , utilizando como modelo a UreA	20
1.8. Marco actual	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo general	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. <i>Aspergillus nidulans</i>	26
3.1.1. Genotipo y fenotipo de cepa empleada	26
3.1.2. Medios de cultivo	26
3.2. Técnicas empleadas con <i>A. nidulans</i>	29
3.2.1. Extracción de ARN	29
3.2.2. Generación de ADN copia (Retro-transcripción)	30
3.3. <i>Escherichia coli</i>	31

3.3.1. Genotipo de cepas empleadas	31
3.3.2. Medios de cultivo	32
3.4. Técnicas empleadas con <i>E. coli</i>	33
3.4.1. Preparación de células quimiocompetentes mediante el método de cloruro de calcio	33
3.4.2. Ligación	34
3.4.3. Transformación de células quimiocompetentes <i>E. coli</i>	35
3.4.4. Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina	36
3.4.5. Expresión proteica inducida por IPTG	38
3.4.6. Obtención de las fracciones solubles e insolubles por el método de lisis con lisozima	39
3.4.7. Obtención de las fracciones solubles e insolubles por el método de lisis por sonication	40
3.5. Vectores utilizados	41
3.5.1. Vector de propagación: pGEM-T Easy	41
3.5.2. Vector de expresión: pET-28a	43
3.6. PCR	44
3.6.1. PCR convencional	44
3.6.2. Fusion-PCR	44
3.6.3. Cebadores utilizados	47
3.7. Análisis electroforético de ácidos nucleicos (ADN y ARN)	48
3.8. Purificación de ADN	49
3.9. Digestión de ADN con enzimas de restricción	50
3.10. Análisis electroforético de proteínas (SDS-PAGE)	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1. Obtención y amplificación de la secuencia codificante de <i>srpA</i> de <i>A. nidulans</i>	53

4.2. Clonado de la secuencia codificante de <i>srpA</i> en el vector de propagación pGEM-T Easy y transformación de <i>E. coli</i> DH5 α para amplificación <i>in vivo</i>	59
4.3. Subclonado de la secuencia de interés en el vector de expresión pET-28a, transformación de <i>E. coli</i> DH5 α y verificación del recombinante por secuenciación	64
4.4. Transformación de <i>E. coli</i> BL21 con “pET28a- <i>his_srpA</i> ” y puesta a punto de la expresión proteica inducida por IPTG	68
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	75
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
7. ANEXO	82

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente:

A Ana y a Manu por abirme las puertas de su laboratorio. Por darme la gran oportunidad de aprender de ellos y con ellos, por su apoyo constante, su dedicación y por su confianza. Muchísimas gracias!

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo diario y sus consejos. Por estar siempre dispuestos a ayudar y por hacer las mañanas de laboratorio más lindas.

A los compañeros de la Sección Bioquímica por estar siempre dispuestos a dar una mano.

A mi familia, a mis amigas y a mis amigos por su apoyo permanente, su paciencia y oídos para escuchar cada “crisis” pre-parcial, pre-examen, tesis, etc. Y sobre todo por su cariño.

RESUMEN

Una de las líneas de investigación del grupo de laboratorio dentro del cual se desarrolló esta tesis estudia el efecto del uso diferencial de codones sobre la cinética de traducción y su relación con la estructura y funcionalidad del transportador de urea de *Aspergillus nidulans*, UreA.

Dentro de esta línea se generó un mutante de este transportador en el cual dos codones de uso poco frecuente (codones 24 y 25; 24/25) que codifican para aminoácidos presentes en el extremo N-terminal de UreA, se sustituyeron por dos codones de uso frecuente. El resultado fue una disminución en los niveles de UreA en la membrana celular y por ende un crecimiento deficiente sobre urea. Se comprobó que estos efectos no se debían a una mayor degradación del transportador ni tampoco a diferencias en los niveles de ARNm entre la cepa salvaje y el mutante, ni a alteraciones en la estructura secundaria. En base a estos resultados, la hipótesis del grupo es que la mutación sinónima de los codones 24/25 afecta etapas muy tempranas en la síntesis de UreA. Se plantea entonces la posibilidad de que la mutación en los codones 24/25 fuera la responsable de la pérdida de una pausa traduccional. Ésta sería necesaria para la correcta interacción de los complejos ribosoma-cadena polipeptídica naciente (RNC) con la partícula de reconocimiento de señal (SRP). SRP es responsable de reconocer y direccionar a la membrana del

RE la mayoría de las proteínas integrales de membrana (IMPs) y proteínas de la vía secretoria.

En este contexto, para determinar el posible rol de los codones 24/25 en la interacción de los RNC con SRP, se están desarrollando experimentos basados en ensayos de traducción *in vitro* de *A. nidulans*. Para realizar estos experimentos es necesaria la producción de anticuerpos que reconozcan a SrpA (proteína de *A. nidulans* homóloga a Srp54, subunidad más conservada del complejo SRP). Para cumplir con este fin y en el marco de la presente tesina de grado se llevó a cabo la producción en forma recombinante de SrpA en *Escherichia coli*.

ABREVIATURAS

AcNa	Acetato de Sodio
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	2-Deoxinucleótidos 5'trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
GTP	Guanosín trifosfato
IMPs	Proteínas integrales de membrana
MPM	Marcador de peso molecular
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
RE	Retículo endoplasmático
RNC	Complejo ribosoma-cadena polipeptídica naciente
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SR	Receptor de SRP
SRP	Partícula de reconocimiento de señal
SS	Secuencia señal
TE	Buffer Tris EDTA
TMS	Dominio o segmento transmembrana
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROTEÍNAS INTEGRALES DE MEMBRANA

Las membranas celulares son clave para el funcionamiento y supervivencia celular al definir la interface entre la célula y el ambiente, así como también al permitir la restricción de los diferentes procesos bioquímicos dentro de compartimentos. Uno de sus componentes primordiales son las proteínas integrales de membrana (IMPs). Las IMPs son extremadamente diversas y están implicadas en una amplia variedad de funciones esenciales, como por ejemplo en el transporte de diversas moléculas a través de las membranas celulares (proteínas de transporte), en la comunicación célula-célula, en la transducción de señales, mediando el tráfico intracelular y facilitando la biogénesis de orgánulos. Se ha reportado que las IMPs comprenden entre un 20-30% del proteoma eucariota. La mayoría de estas proteínas se encuentran integrando la membrana plásmica y la membrana de los orgánulos así como compartimentos que participan en la vía secretoria y en la vía endocítica. Estas proteínas están conformadas por un número variable de dominios hidrofóbicos que se insertan en la membrana llamados dominios o segmentos transmembrana (TMSs) (Vit y Petrak, 2016; Shao y Hegde, 2011).

La mayoría de las IMPs eucariotas son orientadas e insertadas co-traduccionalmente a la membrana del retículo endoplásmico (RE) por medio de una vía altamente conservada que puede dividirse en dos pasos (ver Figura 1). El primer paso implica el reconocimiento y direccionamiento de la IMP nascente a la membrana del RE por parte de la partícula de reconocimiento de señal (SRP) y su receptor en la membrana del RE (SR). El segundo, la translocación e inserción de la IMP a la membrana del RE por parte de un translocón. De esta forma se evita plegamientos prematuros e incorrectos de las proteínas nascentes y que los TMSs, de composición altamente hidrofóbica, queden expuestos al medio acuoso del citosol que resultaría en interacciones inapropiadas y agregación tóxica de péptidos hidrofóbicos (Elvekrog y Walter, 2015; Akopian et al., 2013; Nyathi et al., 2013; Shao y Hegde, 2011).

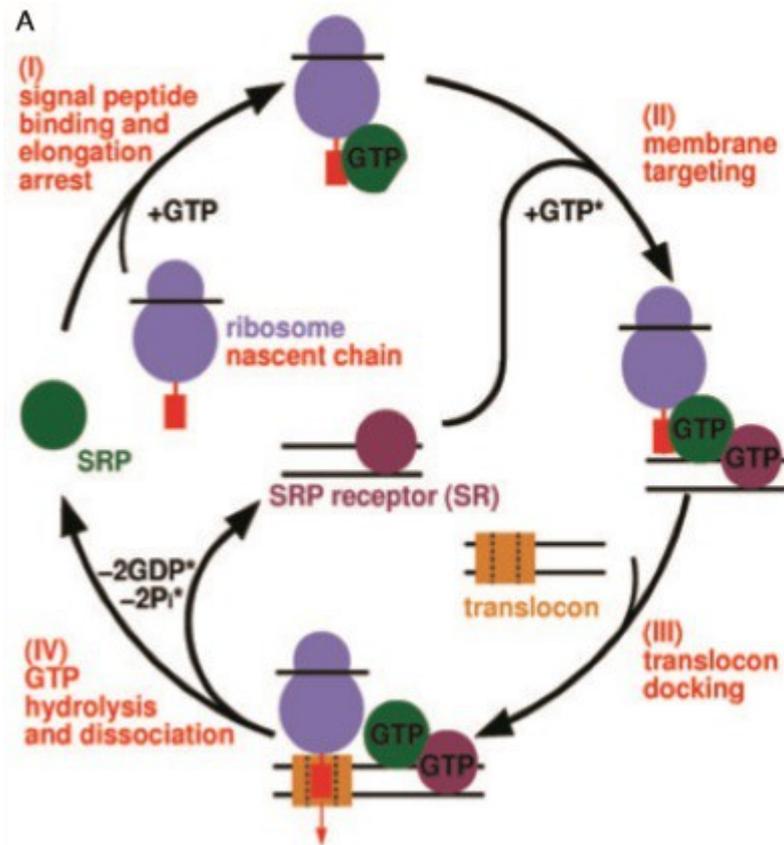


Figura 1. Esquema que resume el direccionamiento co-traduccional de IMPs a la membrana del retículo endoplasmático. Tomado de Wild et al. (2004).

1.2. DIRECCIONAMIENTO CO-TRADUCCIONAL DE IMPs A LA MEMBRANA DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El correcto funcionamiento de una proteína depende de su apropiada localización celular. El direccionamiento co-traduccional mediado por SRP, mecanismo conservado en todos los organismos (desde arqueas y bacterias hasta eucariotas), constituye para las IMPs un primer paso hacia su destino final. En eucariotas, este mecanismo se inicia cuando una secuencia señal (SS), ubicada en el extremo N-terminal de la cadena

polipeptídica naciente que se está traduciendo, emerge del ribosoma y es reconocida por SRP. La SS es una secuencia hidrofóbica altamente diversa, compuesta por un “core” entre 8-12 aminoácidos hidrofóbicos, que puede actuar como una secuencia escindible, o un segmento transmembrana de la IMP (Akopian et al., 2013; Cross et al., 2009).

Una vez reconocida la SS, el complejo ribosoma-cadena polipeptídica naciente (RNC) es direccionado por SRP a la membrana del RE mediado por la interacción con el receptor de SRP (SR) presente en ésta. A su vez, SRP establece una pausa traduccional que evita la agregación de los dominios hidrofóbicos en el citosol y es necesaria para el correcto direccionamiento y translocación del péptido naciente a la membrana del RE (se detalla más adelante) (Lakkaraju et al., 2008; Mason et al., 2000). En la membrana del RE, a través de una serie de pasos finamente regulados por una GTPasa que implican ciclos de unión e hidrólisis de GTP, el péptido naciente es transferido a un translocón. Éste media la translocación e integración del polipéptido en la bicapa lipídica del RE. A continuación, la síntesis de la proteína se retoma. Finalmente, SRP y su receptor se disocian para participar en otro ciclo de reconocimiento y direccionamiento (Hainzl y Sauer-Eriksson, 2015; Akopian et al., 2013; Nyathi et al., 2013; Grudnik et al. 2009).

Cabe destacar que se ha evidenciado que la pausa traduccional, mencionada anteriormente, es necesaria para el correcto direccionamiento y translocación del polipéptido nasiente a la membrana del RE, al brindar una ventana de tiempo necesaria para que el complejo SRP/RNC interaccione con SR y posteriormente con el translocón antes de que la cadena nasiente pierda la competencia de ser translocada. Se ha demostrado que el paso limitante es el encuentro de SR, ya que efectos deletéreos de la ausencia de pausa traduccional se corrigen al sobreexpresar SR (Lakkaraju et al., 2008; Mason et al., 2000; Siegel y Walter, 1985). A su vez, esta pausa traduccional es la que evita la agregación tóxica y los plegamientos prematuros que mencionamos previamente.

1.3. COMPOSICIÓN DE SRP

La función de SRP de reconocer y direccionar específicamente proteínas con SS, hacia la membrana del RE en el caso de eucariotas, o hacia la membrana plasmática en procariotas, está universalmente conservada y SRP ha sido identificada en todos los dominios de la vida. Sin embargo, la composición del complejo ribonucleoproteico varía ampliamente y aumenta su complejidad considerablemente en relación con la evolución biológica (Beckert et al., 2015; Nyathi et al., 2013; Pool, 2005; Keenan et al., 2001).

SRP de mamíferos se compone del ARN 7SL de 300 nucleótidos asociado a seis subunidades proteicas que se organizan en dos dominios, el dominio Alu y el dominio S. El dominio S está constituido por la región central del ARN 7SL junto a las subunidades SRP19, SRP54, SRP68 y SRP72 y está implicado en el reconocimiento y unión a la SS a través de la subunidad SRP54. El dominio Alu está conformado por las helices 3' y 5' terminales del componente ARN y un heterodímero de proteínas SRP9/SRP14 (Nyathi et al., 2013; Pool, 2005). El establecimiento de la pausa traduccional, mencionada previamente, en eucariotas cuando SRP se une a su sustrato está determinada por este dominio. Más específicamente, por la región C-terminal de SRP14 que impide la unión del factor de elongación EF2 (Lakkaraju et al., 2008; Mason et al., 2000).

En *Saccharomyces cerevisiae*, SRP está conformado, al igual que el SRP de mamíferos, por una única molécula de ARN y seis subunidades proteicas. Sin embargo presenta algunas diferencias en su composición con respecto a SRP de mamíferos. Las subunidades Srp21p y Sec65p, homólogas a SRP9 y SRP19 respectivamente, son más grandes que sus homólogos en mamíferos. El componente ARN con frecuencia posee elementos de inserción adicionales de función desconocida. El SRP de bacterias está conformado exclusivamente por un pequeño componente ARN, ARN 4.5S, que posee homología con el dominio más conservado

del ARN 7SL (hélice 8), asociado estrechamente a una única unidad proteica homóloga a SRP54, denominada Ffh (Nyathi et al., 2013; Pool, 2005).

A pesar de la composición mucho más simple del SRP bacteriano, se ha visto que el SRP y SR bacteriano (denominado FtsY) pueden sustituir a sus homólogos de mamíferos y llevar a cabo un eficiente direccionamiento co-traducciona l de proteínas de mamífero al ER (Powers y Walter, 1997). Esto demuestra que la proteína universalmente conservada SRP54 junto a la región de la hélice 8 de ARN, presentes en todos los SRP, conforman el “core” funcional esencial de SRP. Esta observación es congruente con la alta conservación evolutiva que presenta la vía SRP (Powers y Walter, 1997; Bernstein et al., 1993).

1.4. SRP54 Y SUS DOMINIOS

SRP54, el componente proteico clave para la función de SRP, se encuentra conservado en todos los SRPs. Está compuesto por dos dominios: el dominio NG, ubicado hacia el extremo N-terminal que comprende 4 manojos de hélices y un componente GTPasa, y el dominio M, compuesto por hélices- α ricas en metionina, situado hacia el extremo C-terminal. Ambos dominios se conectan a través de un “linker” altamente

conservado y flexible que le permiten a la proteína someterse a rearrreglos estructurales durante el ciclo de direccionamiento y permite la comunicación entre ambos dominios (Nyathi et al., 2013; Pool, 2005).

El dominio NG está implicado en la interacción de SRP con su receptor SR, localizado en la membrana del RE. De modo que, cuando el dominio M reconoce la SS, el dominio NG aumenta su tendencia a interactuar con SR, que también posee un dominio NG con actividad GTPasa. Estos dominios GTPasa regulan a través de una serie de eventos estrechamente regulados la translocación del polipéptido nascente al translocón (Grudnik et al. 2009).

El dominio M de SRP54 interviene en la unión de SRP54 al ARN de SRP y está implicado en el reconocimiento de la SS. En relación a estas funciones, el dominio M presenta un pequeño "core" hidrofóbico, formado por cuatro hélices anfipáticas, que determinan un surco altamente dinámico y conservado que permitiría acomodar las diferentes SS hidrofóbicas. Además, un extremo de este surco se encuentra muy cercano al ARN de SRP. Esta cercanía posibilitaría que al acomodarse la SS en el surco, se diera la interacción entre las cargas positivas del extremo N-terminal del péptido con las cargas negativas del esqueleto

fosfato del ARN de SRP. Esto resultaría en la estabilización de la unión al SS. El dominio M también presenta un motivo de unión al ARN de SRP que interacciona con dos “loops” (o bucles) altamente conservados de la hélice 8 del ARN. Uno de estos bucles es simétrico y ordenado, el otro bucle es asimétrico y desordenado. Cuando se da la formación del complejo con SRP54 este último bucle se convierte en un bucle altamente ordenado (Nyathi et al., 2013; Pool, 2005).

1.5. *Aspergillus nidulans* COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

A. nidulans es un hongo filamentoso perteneciente al género *Aspergillus*. Es ampliamente utilizado en el trabajo de laboratorio por el gran número de ventajas que presenta (Pontecorvo et al., 1953) y el vasto conocimiento que se tiene de esta especie a diferentes niveles. Es de fácil y segura manipulación, de rápido crecimiento (48 hrs), sus requerimientos nutricionales son simples y es capaz de metabolizar una gran cantidad de compuestos. Tiene un genoma haploide, con un tamaño aproximado de 3.1×10^7 pb, que se organiza en 8 cromosomas de estructura similar a la de eucariotas superiores. Se encuentra disponible la secuencia completa de su genoma (<http://www.aspergillusgenome.org/>) y existe una gran colección de cepas mutantes con marcadores auxotróficos.

A. nidulans es un excelente modelo para estudiar transportadores de membrana. Algunos de los aspectos que colaboran con ello, además de los mencionados anteriormente, son: que muchos mutantes de transportadores poseen un fenotipo visible lo cual permite el análisis de crecimiento en placa. Este tipo de ensayos también permite, en aquellos mutantes en los que la falta de transporte no posee un fenotipo detectable, el uso de análogos tóxicos que revelen fenotipos apreciables. Los ensayos de cinética de transporte pueden ser llevados a cabo de manera relativamente sencilla y los transportadores pueden ser caracterizados por la cinética hiperbólica de Michaelis-Menten (Diallinas 2013). Se puede realizar el seguimiento subcelular de un transportador salvaje o mutado, mediante la fusión del mismo a una proteína fluorescente mediante microscopía de fluorescencia (Tavoularis et al., 2001). Mutaciones al azar y mutagénesis sitio dirigida permiten realizar estudios de la relación estructura/función de transportadores (Sanguinetti et al., 2014; Kosti et al., 2010).

1.6. SRP EN *Aspergillus nidulans*

Si bien los componentes de la maquinaria de direccionamiento cotraduccional a la membrana del RE no han sido caracterizados en *A. nidulans*, sí se han podido identificar proteínas con homología de secuencia respecto a algunos componentes de SRP de *S. cerevisiae* en el

genoma de este organismo.

En concordancia con la conservación universal de SRP54, se pudo identificar en *A. nidulans* un ortólogo de SRP54, denominado SrpA. La proteína es codificada por el gen AN8246. Se ha encontrado también ortólogos de las proteínas SRP68 y SRP72 de *S. cerevisiae* (Rosenbland et al., 2004), sin embargo, hasta ahora no se habían identificado ortólogos a la proteína SRP19, ni proteínas homólogas a las subunidades SRP9/21 o SRP14.

Dentro del grupo de laboratorio recientemente se encontró en *A. nidulans* secuencias aminoacídicas homólogas a las proteínas SRP9/21 y SRP19, AN0068 y AN0643, respectivamente. Estos resultados se obtuvieron al realizar una exhaustiva búsqueda de cada subunidad de SRP, en la base de datos específica de hongos JGI_DOE (<http://jgi.doe.gov/>), a partir de dominios conservados en cada una de ellas. Por otro lado, no se evidenció con este criterio de búsqueda la secuencia homóloga de SRP14 en *A. nidulans*. Sin embargo, al realizar un “blast” en el NCBI para esta subunidad, surge como resultado una secuencia reportada como proteína SRP14 hipotética en *A. nidulans*, AN4580. Esta secuencia se alineó con las encontradas en otras especies de *Aspergillus*, que también fueron

resultado del grupo, y se encontró un “gap” de 14 aminoácidos en la secuencia de *A. nidulans* que se sitúa en la región que codifica para los primeros 24 aminoácidos del extremo N-terminal del dominio conservado de la familia de proteínas SRP14. Estos resultados hacen pensar en una posible pérdida de función en la subunidad SRP14 de *A. nidulans* (Veyga, M.; Ramón, A.; Sanguinetti, M.; Iriarte, A.; resultados no publicados).

En cuanto al componente ARN de tipo 7SL, fue identificado por métodos que se basan en homologías estructurales (Rosenblad et al. 2004). Dentro del grupo de laboratorio, se alineó la secuencia del ARN de SRP de *A. nidulans* con una estructura consenso de ARN de SRP de hongos presente en la base de datos de Rfam (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/rfam>). Como resultado se observó que la secuencia del 7SL de *A. nidulans* presenta una alta homología estructural con dicha estructura consenso, en cuatro regiones de la molécula de 7SL. Estas cuatro regiones son: la región Alu y las hélices 5, 6 y 8. Las tres hélices se corresponden con el dominio S del ARN (Veyga, M.; Ramón, A.; Sanguinetti, M.; Iriarte, A.; resultados no publicados). Específicamente la proteína SrpA se uniría, según los modelos corrientes, a la hélice 8 (Rosenbland et al., 2004).

1.7. APORTE AL ESTUDIO DEL ROL DEL USO DIFERENCIAL DE CODONES EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN *A. nidulans*, UTILIZANDO COMO MODELO A UreA

El grupo de investigación dentro del cual se desarrolló esta pasantía ha realizado importantes aportes al conocimiento de la relación estructura/función de proteínas de membrana, utilizando como modelo el transportador de urea de *A. nidulans*, UreA (Abreu et al., 2010; Sanguinetti et al., 2014). UreA es una proteína politópica de membrana responsable del transporte de urea de alta afinidad. El grupo aborda, además, el efecto del uso diferencial de codones sobre la cinética de traducción y su relación con la estructura y funcionalidad de UreA (Sanguinetti et al., 2014).

Dentro de esta última línea se generó un mutante de este transportador en el cual dos codones de uso poco frecuente (codones 24 y 25; 24/25) que codifican para aminoácidos presentes en el extremo N-terminal de UreA, se sustituyeron por dos codones de uso frecuente. Estos codones están conservados en las 8 especies de *Aspergillus* cuyo uso de codones es conocido (Iriarte et al., 2012). Según lo generalmente aceptado, los codones poco frecuentes o “raros” son los vinculados a ARNts escasos en las células de un determinado organismo y los codones frecuentes se encuentran vinculados a ARNts abundantes, con lo cual, los primeros

serían traducidos más lentamente que los segundos (Tuller et al., 2010).

El resultado fue una disminución en los niveles de UreA en la membrana celular y por ende un crecimiento deficiente sobre urea. Se comprobó que estos efectos no se debían a una mayor degradación del transportador ni tampoco a diferencias en los niveles de ARNm entre la cepa salvaje y el mutante, ni a alteraciones en la estructura secundaria. En base a estos resultados, la hipótesis del grupo es que la mutación sinónima de los codones 24/25 afecta etapas muy tempranas en la síntesis de UreA (Sanguinetti, 2014).

Dentro de estas primeras etapas de la síntesis ocurre la interacción de SRP con la cadena polipeptídica nascente en el ribosoma para el direccionamiento co-traducciona l de ésta hacia la membrana del (RE). Cabe destacar que el túnel ribosomal cubre 30 aminoácidos en una conformación extendida, por lo cual, cuando los codones 24/25 son traducidos el polipéptido nascente aún no ha emergido del ribosoma. Sin embargo, se ha demostrado que SRP puede interaccionar con un polipéptido destinado a la membrana del RE, cuando la secuencia señal aún está dentro del ribosoma (Berndt et al., 2009). La interacción no dependería exclusivamente de la unión de SRP a una SS expuesta, como

es aceptado en el modelo actual, sino que la SS dentro del ribosoma podría generar cambios en éste que serían reconocidos por SRP, como por ejemplo en el sitio de unión de SRP presente en el ribosoma.

Por otro lado, dada la posición de los codones 24/25, se plantea la hipótesis de que el cambio sinónimo fuera responsable de la pérdida de una pausa traduccional que podría estar afectando una etapa temprana en la síntesis de UreA. Ésta sería necesaria para la correcta interacción de los complejos ribosoma-cadena polipeptídica naciente (RNC) con SRP.

Cabe destacar que no se ha identificado secuencias señales en UreA, ni hasta el momento en ninguno de los transportadores de membrana de *A. nidulans* caracterizados (Diallinas, 2007).

1.8. MARCO ACTUAL

En este contexto el grupo de laboratorio al cual pertenezco están actualmente llevando a cabo experimentos que le permitan responder a algunas de las incógnitas que surgen de lo mencionado anteriormente. Para ello se están desarrollando múltiples ensayos. Por un lado, para determinar si existe una pausa traduccional vinculada a la existencia de

los codones 24/25 de tipo poco frecuentes se están produciendo extractos de traducción *in vitro* de *A. nidulans*.

Por otro lado, para verificar si SrpA tiene un rol en el direccionamiento de UreA a la membrana, el gen que codifica para éste (*srpA*) se puso bajo el control del promotor dependiente de doxiciclina "Tet-On". Los resultados muestran que cuando la cepa crece en un medio de cultivo que tiene doxiciclina ésta es viable. Sin embargo, la ausencia de doxiciclina en el medio vuelve a la cepa no viable, por lo que *srpA* es vital para *A. nidulans* (Veyga, M.; Sanguinetti, M.; Ramón, A.; resultados no publicados). A su vez, se ha observado que si *srpA* se sobreexpresa, se corrige (parcialmente) el fenotipo de crecimiento del mutante de *ureA* 24/25. Esto podría estar demostrando que SRP sí tiene un rol específico en el direccionamiento de UreA (Veyga, M.; Sanguinetti, M.; Ramón, A.; resultados no publicados).

Por último, para determinar el posible rol de los codones 24/25 en la interacción temprana de SRP con los RNC que estén traduciendo UreA (RNC-UreA), se están desarrollando ensayos basados en experimentos de traducción *in vitro* de *A. nidulans*. Se realizará la traducción de ARNm que codifican para los primeros 101 aminoácidos de UreA (versión salvaje

y mutante), que comprenden el N-terminal y el primer TMS, con un “tag” HA (péptido derivado de la glicoproteína “Human influenza hemmagglutinin”) en N-terminal. Para que dicho polipéptido quede unido al ribosoma, el ARNm fue diseñado de manera tal que no tuviera codón de terminación. Esto provocará que el ribosoma traduzca la cola poli-A en residuos de lisina, los que a través de su carga positiva interaccionarán con las cargas negativas del ribosoma, reteniendo el polipéptido. Luego, los RNCs traduciendo estos ARNm serán inmunoprecipitados utilizando anticuerpos anti-HA comerciales. Finalmente, se intentará realizar una cuantificación de la unión de SRP a RNCs que se encuentran traduciendo estos ARNm, mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos específicos para SrpA.

Estos experimentos implican que previamente se deberá llevar a cabo la producción recombinante de las proteínas SrpA y Rps9 de *A. nidulans*, para así poder obtener anticuerpos contra ellas. Rps9 forma parte de la subunidad menor del ribosoma y se utilizará como control interno.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Producción recombinante de la proteína SrpA de *Aspergillus nidulans*, en *Escherichia coli*, para la generación de anticuerpos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtención y amplificación de la secuencia codificante de *srpA* de *A. nidulans*.

2. Clonado de la secuencia codificante de *srpA* en el vector de propagación pGEM-T Easy y transformación de *E. coli* DH5 α para amplificación *in vivo*.

3. Subclonado de la secuencia de interés en el vector de expresión pET-28a, transformación de *E. coli* DH5 α y verificación del recombinante por secuenciación.

4. Transformación de *E. coli* BL21 con “pET28a-*his_srpA*” y puesta a punto de la expresión proteica inducida por IPTG.

Llevar a un litro con agua destilada, ajustar el pH a 6.8 y esterilizar mediante calor húmedo (autoclave) a 105°C por 15-20 minutos.

Estos medios pueden ser utilizados para cultivos líquidos o sólidos. En caso de requerir este último se debe añadir 1.3 % o 3 % de agar, esto último cuando las placas serán utilizadas para coleccionar esporas.

Solución de sales: 26 g de cloruro de potasio

 26 g de sulfato de magnesio heptahidratado

 76 g fosfato de potasio monobásico

 50 mL de solución de elementos traza

Llevar a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (autoclave) a 121°C por 20 minutos. Luego se agrega 2 mL de cloroformo como conservante. Se almacena a 4°C.

Solución de vitaminas: 50 mg de tiamina-HCl (o aneurina)

 10 mg de biotina

 100 mg ácido nicotínico

 200 mg pantotenato de calcio

 50 mg piridoxina-HCl

100 mg riboflavina

500 mg ácido p-aminobenzoico

Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se conserva a 4°C.

Solución de elementos traza:

40 mg borato de sodio decahidratado

400 mg sulfato de cobre pentahidratado

800 mg fosfato férrico dihidratado

800 mg sulfato de manganeso dihidratado

800 mg molibdato de sodio dihidratado

8 g sulfato de zinc heptahidratado

Suplementos nutricionales de *A. nidulans*:

Se preparan soluciones 100 veces concentradas en agua destilada con respecto a la concentración final de trabajo. Se esterilizan mediante calor húmedo (autoclave) a 121 °C por 20 minutos y se conservan a 4 °C. En el caso del ácido p-aminobenzoico (paba), se prepara la solución "stock" a 9.2 g/100 mL.

3.2. Técnicas empleadas con *A. nidulans*

3.2.1. Extracción de ARN

Se dejó crecer un cultivo de *A. nidulans* a 37°C “overnight” a 190 rpm en MM suplementado con paba y amonio. Una vez crecido, el cultivo se filtró por blutex y el micelio obtenido se lavó con MM. A continuación, se traspasó el micelio lavado a un nuevo MM suplementado con paba pero sin fuente de nitrógeno y se incubó en las mismas condiciones por 4 hrs. Luego de cumplido este tiempo, se filtró el cultivo de *A. nidulans*. El micelio obtenido se congeló con nitrógeno líquido y se molió rápidamente con mortero. Se resuspendió 100 mg en 750 µL de solución de extracción de ARN y se vortexeó. Luego se centrifugó a 15.800 g durante 5 minutos y el sobrenadante se traspasó a un eppendorf estéril. Se agregó 70 µL de acetato de sodio 2M pH 4, luego 700 µL de fenol y 140 µL de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se homogenizó con vortex. A continuación se realizó una centrifugación a 15.800 g a modo de separar la fase acuosa y el ARN se precipitó con dos volúmenes de etanol 100% mezclando suavemente por inversión. Se incubó a -20°C durante 30-60 minutos y se volvió a centrifugar a 15.800 g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el ARN precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 70%. Nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El ARN se dejó secar, y luego se resuspendió en 30 µL de agua estéril con DEPC y se incubó en baño de agua a 65°C

por 5 minutos. La concentración se determinó por medida de absorbancia a 260 nm en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), y se evaluó la calidad del ARN extraído al medir los coeficientes de absorbancia 260/280 y 260/230. Para analizar que el ARN no se hubiera degradado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Solución de extracción de ARN: 4 M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio pH 7, 0.5% sarcosyl, y 0.72% β -mercaptoetanol (se agregó en el momento a utilizar).

3.2.2. Generación de ADN copia (Retro-transcripción)

i. Tratamiento del ARN con ADNasa

Se tomó 8 μ L (588 ng) de ARN resuspendido en agua DEPC y se agregó 0.5 μ L ADNasa (Rnase-free, AMBION), 1X buffer de ADNasa, y H₂O mQ estéril c.s.p. 10 μ L. Se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego se adicionó 0.5 μ L más de enzima y se incubó por 30 minutos más a 37°C. Pasado este tiempo se inactivó la reacción añadiendo 2 μ L de EDTA 25 mM y se incubó a 55°C por 10 minutos.

ii. Transcripción reversa con enzima SuperScript III Invitrogen

Se mezcló la reacción anterior con 0.5 μL Oligo (dT)₁₈ (Thermo Fisher), 1,0 μL dNTPs mix 10mM y H₂O mQ estéril c.s.p. 15 μL . Esta mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y luego se incubó en hielo por 1 minuto. A continuación, se añadió 4 μL First Strand Buffer, 1 μL DTT 0.1M, 1 μL RNase OUT (Ribolock), 1 μL SuperScript III Enzyme. Se incubó a 55°C por 60 minutos y se inactivó la enzima a 70°C por 15 minutos.

3.3. Escherichia coli

3.3.1. Genotipo de cepas empleadas

Cepa	Genotipo
DH5 α * ¹	F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺), λ -
BL21(DE3)* ²	F ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm me131 (DE3)

*¹La designación Φ 80dlacZ Δ M15 permite la selección blanco/azul en X-gal e IPTG. Es decir, es parte del sistema α -complementación para selección de recombinantes.

*²La característica DE3 significa que la cepa contiene el lisogen λ DE3 que lleva el gen para la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5. La expresión de este gen requiere la inducción con IPTG. De esta

forma se puede expresar los genes que se encuentran bajo el promotor T7 en un plásmido.

ompT refiere a que la cepa es deficiente en la proteasa OmpT, lo que resulta en una disminución de la degradación de la proteína recombinante expresada en la cepa.

La designación me131 hace referencia a una mutación en el gen me, y se codifica una ARNasa E que carece de la habilidad de degradar el ARNm, aumentando así la estabilidad del ARNm.

3.3.2. Medios de cultivo

Medio LB

Se masan y mezclan 5 g extracto de levadura, 10 g triptona, y 10 g NaCl por litro de agua destilada. Se ajusta el pH a 7 y se esteriliza por medio de calor húmedo (autoclave) a 121°C durante 20 minutos.

El medio puede ser utilizado para cultivo líquido o sólido. En caso de requerir este último se debe agregar 1.5 % agar previo a la esterilización.

Para los medios selectivos se agregó luego de su esterilización, el antibiótico correspondiente. Cuando se utilizó ampicilina como marcador de selección se añadió a una concentración de 100 µg/mL. En el caso de kanamicina se agregó a una concentración de 30 µg/mL.

3.4. Técnicas empleadas con *E. coli*

3.4.1. Preparación de células quimiocompetentes mediante el método de cloruro de calcio

Previo a la preparación de las células se propagó la cepa de interés, DH5 α o BL21, en placa con medio LB agar dejando crecer “overnight” a 37°C.

La preparación de las células competentes se inició inoculando un matraz con 250 mL de LB estéril con 2,5 mL de un precultivo (dilución 1/100) de la cepa de interés crecido “overnight” a 37°C con agitación de 200 rpm. A continuación, se incubaron las células a 37°C con agitación constante a 200 rpm hasta llegar a una densidad óptica de 0.300 a 600 nm.

Fue importante, para obtener éxito en la preparación, trabajar desde este punto hasta el final con materiales previamente enfriados a 4°C. De esta forma, el cultivo crecido fue traspasado a un tubo de centrifuga previamente enfriado y se centrifugó a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el “pellet” celular fue lavado con 100 mL de CaCl₂ estéril 0.1 M en hielo en dos pasos: primero, se agrega 20 mL agitando suavemente hasta que las células esten bien dispersas y segundo, llevar hasta los 100 mL.

Luego, se centrifugó nuevamente a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el “pellet” fue resuspendido con 100 mL de

CaCl₂ estéril 0.1 M en hielo. Se incubó 30 minutos a 4° y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.

Por último, se resuspendió el "pellet" en 3 mL de CaCl₂ 0.1 M con 20% de glicerol y se alicuotó de a 50 µL en eppendorfs previamente enfriados. Las células se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Se evaluó la eficiencia de transformación, número de colonias transformantes por microgramo de ADN implicado en la transformación, utilizando un vector de concentración conocida.

3.4.2. Ligación

a. Ligación con kit pGEM-T Easy

Se siguió el protocolo descrito en el kit pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems.

i. Adición de nucleótidos desapareados de adenina a los extremos 3' de un producto de Fusion-PCR para su clonado en vector T.

Se mezcló 8 µL del producto de Fusion-PCR (ver sección 3.6) purificado, desoxiadenosina trifosfato (dATP) a una concentración final de 0,2 mM y Kapa Taq (5 unidades enzimáticas) en 1X Buffer Kapa Taq. La reacción se incubó durante 30 minutos a 70°C.

A continuación, se realizó la purificación directa de los productos del tratamiento con el kit GeneJET Gel Extraction de Thermo Scientific según instrucciones del fabricante. Por último, se midió la concentración de ADN y se evaluó la pureza por espectrofotometría con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

ii. Ligación al vector pGEM-T Easy.

Se mezclaron 1,5 µL de producto de Fusion-PCR tratado según el punto (i) con 0,5 µL de vector en 1X Rapid Ligation Buffer. Se utilizaron 1,5 unidades Weiss de la enzima T4 DNA Ligase. La mezcla se incubó “overnight” a 4°C.

b. Ligación de extremos cohesivos con ligasa

Se mezcló 50 ng de pET-28a digerido con 130 ng de la secuencia codificante de *srpA* (obtenida de la digestión de plásmidos “pGemT-*srpA*”) en Rapid Ligation Buffer 1X. La ligación fue catalizada por 2,0 µL de la enzima T4 DNA Ligase. La mezcla se incubó “overnight” a 4°C.

3.4.3. Transformación de células quimiocompetentes *E.coli*

En los pasos iniciales de la transformación la manipulación debe ser cuidadosa por el estado frágil en el que se encuentran las células competentes.

Primero se descongeló en hielo una alícuota de células competentes, DH5α o BL21. Se agregó 5 μL del producto de ligación y se incubó en hielo durante 30 minutos. Cumplido ese tiempo, se realizó el choque térmico al exponer durante 90 segundos a 42°C o por 2 minutos a 37°C. Se incubó en hielo por 2 minutos más y se procedió a la etapa de recuperación de la permeabilidad y expresión de la resistencia al antibiótico agregando 200 μL de LB estéril (4 volúmenes con respecto al volumen de la alícuota de células competentes). Se creció durante 1 hora a 37°C en agitación 200 rpm.

Luego se plaqueó 100 μL con rastrillo en placa con LB agar ampicilina, X-Gal e IPTG o LB agar kanamicina y se incubó “overnight” a 37°C.

En paralelo a la transformación se realizaron controles: de sensibilidad, se plaquearon células en medio LB con el antibiótico correspondiente, sin agregar ADN para determinar que no tengan por sí mismas resistencia a éste; y de viabilidad, plaqueando células en medio LB para verificar que las células competentes hayan resistido el proceso de transformación.

3.4.4. Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina

A partir de las colonias aisladas se realizaron precultivos de 3 mL en LB con el antibiótico correspondiente, crecidos “overnight” a 37°C con agitación a 200 rpm.

Al siguiente día, de modo de coleccionar las células, cada cultivo se traspasó a un tubo de eppendorf, se centrifugó durante 30 segundos a 14.000 rpm y se descartó el sobrenadante.

A continuación se realizó la lisis celular: se resuspendió con pipeta el "pellet" celular en 200 µL de Solución I y luego se mezcló por inversión suavemente con 200 µL de Solución II recién preparada. Es importante no dejar mucho tiempo en esta solución pues el NaOH puede afectar al ADN plasmídico. Se añadió 150 µL de Solución III fría, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por un tiempo de 5 minutos.

Luego de este tiempo, con el fin de separar los agregados insolubles de lípidos, proteínas y ADN cromosómico del ADN plasmídico se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 14.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se procedió a hidrolizar el ARN contaminante con ARNasa a una concentración final de 10 µg/mL por un tiempo de 15 minutos a 37°C.

La precipitación del ADN fue realizada con 2 volúmenes de etanol 96%, se mezcló con vortex y se incubó a -20°C por 15 minutos. Seguidamente se volvió a centrifugar por 15 minutos a 12.000 rpm y fue descartado el sobrenadante. El "pellet" fue lavado con 500 µL de etanol 70%, se dejó secar y fue resuspendido en 20 µL de TE 10-1 pH 8 o H₂O mQ estéril.

Soluciones

Solución I: TE 50 mM - 20 mM

Solución II: 0.2 N NaOH y 1% SDS

Solución III: 60 mL AcK 5M, 11.5 mL AcH glacial y 28.5 mL H₂O

3.4.5. Expresión proteica inducida por IPTG

La expresión proteica se realizó en paralelo tanto para la cepa BL21 transformada con el plásmido de expresión que lleva la secuencia de interés como para la cepa BL21 transformada con el plásmido de expresión sin la secuencia de interés (control negativo).

Primero se realizó un precultivo de 3 mL de medio LB kanamicina inoculado a partir de una colonia aislada que se dejó crecer “overnight” a 37°C con una agitación de 200 rpm.

Una vez crecido el precultivo, se inoculó 500 µL de éste en un matraz con 50 mL de medio LB kanamicina (dilución 1/100). El cultivo se incubó a 37°C con una agitación de 200 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica, a 600 nm, de 0.6. Se tomó una alícuota de 1 mL y se indujo la expresión proteica añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM. A continuación, el cultivo se siguió incubando en las mismas condiciones y se tomaron alícuotas de 1 mL de éste a intervalos de 1 hr (se tomaron dos alícuotas: una constituyó la fracción total y la otra alícuota se utilizó para procesar) durante un total de 4 hrs. Cada alícuota tomada fue centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos con el fin de coleccionar las células,

se descartó el sobrenadante y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

Una vez determinado el tiempo de inducción adecuado para obtener una buena expresión de la proteína en cuestión, se realizó una expresión a mayor escala: un matraz de 200 mL de LB kanamicina fue inoculado con 2.0 mL de precultivo.

3.4.6. Obtención de las fracciones solubles e insolubles por el método de lisis con lisozima

Una de las dos alícuotas tomadas cada 1 hr, tanto de la expresión proteica de BL21 con pET-28a sólo o con pET-28a recombinante con secuencia de interés, se procesó para obtener la fracción soluble y la fracción insoluble y poder identificar posteriormente en cuál de estas fracciones se encuentra la proteína recombinante de interés.

Primero se determinó la masa del "pellet" celular de las muestras y luego éstas fueron resuspendidas en 5 mL de buffer de lisis por gramo de células y se vortexó. A continuación, se agregó a cada muestra 0.2 mg/mL de lisozima y 1 mM PMSF. Seguidamente, las muestras se incubaron en el agitador a temperatura ambiente hasta observar las muestras traslúcidas respecto a la turbidez inicial. En caso de que la lisis

no ocurriera de esta manera se congeló y descongeló el lisado.

Luego, los lisados fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sobrenadante que constituye la fracción soluble de proteínas. Seguidamente, el precipitado se lavó con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.4 con el mismo volumen utilizado de buffer de lisis. Se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos y se resuspendió el "pellet", con un volumen igual al utilizado para la lisis, con el agente caotrópico urea a una concentración de 8 M. Esta constituyó la fracción de proteínas insolubles. Las fracciones fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE.

Buffer de Lisis: 20 mM pH 7.4 fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 2 % Triton X100, 20 µg/mL ADNasa.

3.4.7. Obtención de las fracciones solubles e insolubles por el método de lisis por sonificado

Para el fraccionamiento de las muestras se determinó la masa del "pellet" celular y se resuspendieron las células en 5 mL de buffer de lisis (con inhibidor de proteasas) por gramo de células.

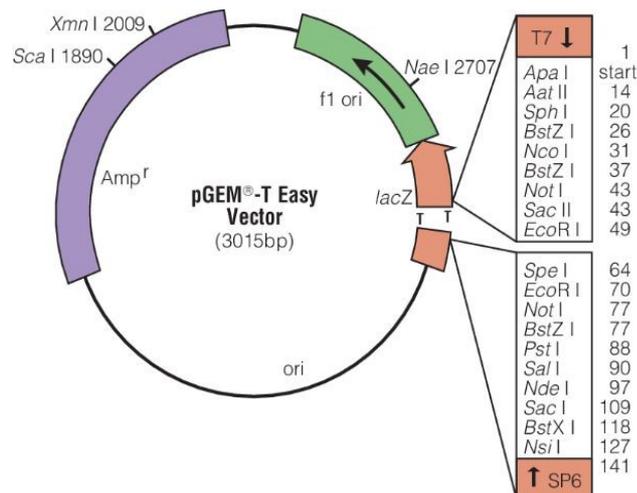
Luego, para romper las membranas celulares y liberar el contenido celular se empleó ultrasonido aplicado mediante un sonicador. Se realizaron tres rondas de sonicación con 5 minutos de descanso entre ellas. Los

parámetros utilizados fueron: 50% de amplitud, 40 pulsos por minuto, por 10 minutos. Para evitar la desnaturalización proteica, producto del calentamiento, la sonicación se realiza en frío.

Finalizado el sonicado, se centrifugaron las muestras a 20.400 g por 30 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante que constituye la fracción proteica soluble. A continuación, el "pellet" se lavó con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.4 con el mismo volumen agregado de buffer lisis. Se centrifugó a 20.400 g durante 20 minutos a 4°C y se resuspendió el "pellet" en el mismo volumen utilizado de buffer, en urea a una concentración de 2 M. Esta fracción constituyó la fracción de proteínas insoluble. Las fracciones fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE.

3.5. Vectores utilizados

3.5.1. Vector de propagación: pGEM-T Easy



El vector pGEM-T Easy, en su forma lineal, cuenta con la presencia de un

único nucleótido de timina desapareado en sus extremos 3' lo que conlleva un aumento en la eficiencia de ligación, al prevenir la recirculación de vector y al facilitar la ligación con productos de PCR que presenten en sus extremos 3' un único nucleótido de adenina desapareada, actuando como extremos cohesivos.

Los transformantes pueden seleccionarse utilizando un medio selectivo con ampicilina pues el vector posee el gen que codifica para la β -lactamasa que confiere resistencia a este antibiótico.

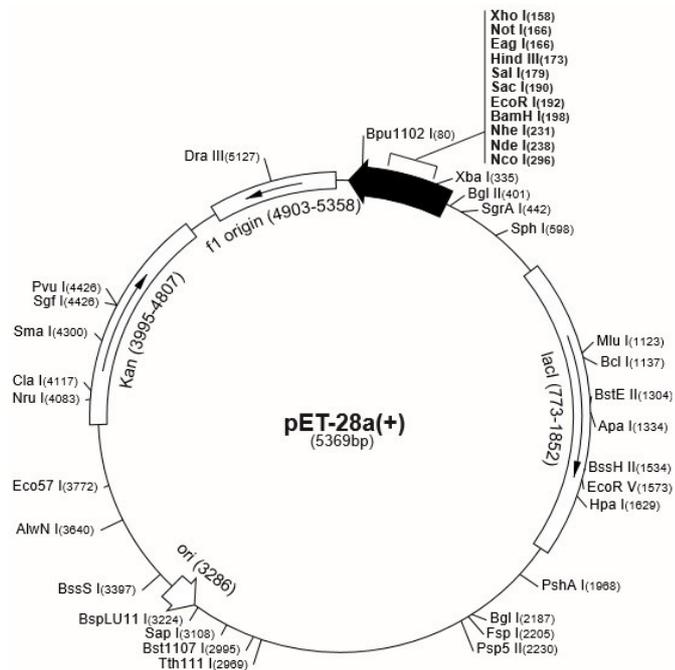
Los clones recombinantes pueden seleccionarse por el color que adquieren sus colonias en placa. El sitio de policlonado del vector pGEM-T Easy, se encuentra dentro de la región que codifica para la subunidad α de la enzima β -galactosidasa. La cepa *E. coli* utilizada junto a este vector, DH5 α , codifica para la subunidad ω de esta misma enzima. La enzima β -galactosidasa funcional, reconstituida a partir de las dos subunidades α y ω , hidroliza X-gal, un análogo de la galactosa, dando como resultado un producto que confiere a la colonia no recombinante una coloración azul. La interrupción de la región codificante de α por parte de nuestra secuencia de interés genera una subunidad α defectuosa, dando lugar a una beta-galactosidasa no funcional. Al no producirse la hidrólisis de X-gal, las colonias recombinantes adquieren un color blanco.

3.5.2. Vector de expresión: pET-28a

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His*Tag coding sequence	270-287
T7*Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> HI - <i>Xho</i> I)	158-203
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*HI at 198.



El vector pET-28a tiene el promotor de la ARN polimerasa T7. Este conduce a la expresión del gen recombinante cuando se utiliza, en nuestro caso, junto a la cepa BL21 y se induce la expresión por adición de IPTG (ver descripción de la cepa BL21).

A su vez, el vector permite expresar el gen de interés con un “tag” de histidinas, lo que facilita su purificación mediante el uso de columnas de agarosa Ni-NTA. La presencia de un sitio de corte para la trombina permite, en caso de requerirlo, la eliminación de dicho “tag”.

La selección de los transformantes con este vector se realizó usando un medio selectivo con kanamicina.

3.6. PCR

Para la amplificación por PCR se utilizó el Kit PCR KAPA HiFi (Kapa Biosystems) por la alta fidelidad de su ADN polimerasa. Esta polimerasa, a diferencia de la Kapa Taq, genera en sus productos extremos romos.

3.6.1. PCR convencional

El “mix” para la reacción, con volúmen final de 25 μ L, consistió en 100 ng de molde de ADN genómico, 0.3 μ M de cebador directo, 0.3 μ M de cebador reverso, 0.3 mM de dNTPs, 1X KAPA HiFi Buffer Fidelity que contiene 2 mM $MgCl_2$, 0.5 unidades enzimáticas de ADN polimerasa KAPA HiFi y H_2O mQ estéril c.s.p. 25 μ L.

El programa de amplificación implicó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos. A continuación, 25 ciclos de: desnaturalización de 20 segundos a 98°C, “annealing” de 15 segundos a 60- 65°C y extensión a 72°C por un tiempo dependiente de la longitud del fragmento a amplificar. Por último, una extensión final a 72°C por 5 minutos.

3.6.2. Fusion-PCR

En esta tesina, se recurrió al uso de la técnica de Fusion-PCR (Szewczyk et al., 2006) con el propósito de eliminar el único intrón de *srpA* y así obtener la secuencia codificante de ésta. En una primer ronda de PCR se

amplificaron por separado los dos exones de *srpA* desde ADN genómico de la cepa MVD 001 de *A. nidulans* utilizando cebadores híbridos que generan extremos solapantes. Posteriormente, se realizó una segunda ronda de PCR donde las regiones solapantes de los fragmentos amplificados anteriormente actuaron como cebadores internos y junto a cebadores denominados “nested” permitieron que éstos se ensamblaran para dar una molécula lineal, la secuencia que codifica para SrpA (ver Figura 2).

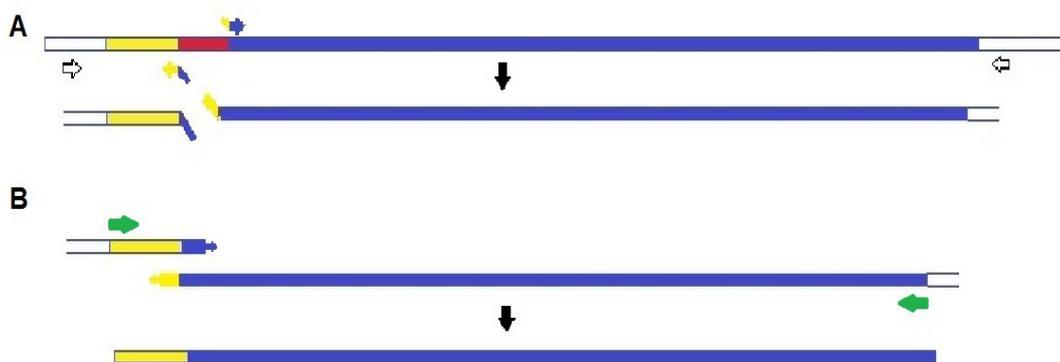


Figura 2. Esquema de Fusión-PCR.

A. Primer ronda de PCR

B. Segunda ronda de PCR

Exón 1 (en amarillo). Exón 2 (en azul). Intron que es eliminado (en rojo). Cebadores híbridos (flechas en dos colores). Cebadores “nested” (flechas verdes).

i. Primer ronda de PCR

La primer ronda para realizar Fusión-PCR consistió en una amplificación por PCR convencional de los fragmentos a fusionar en la segunda ronda, es decir, los exones de *srpA*. Se utilizaron los cebadores híbridos mencionados anteriormente. Los productos de esta PCR fueron purificados usando el kit GeneJET Gel Extraction de Thermo Scientific. Se

siguieron las instrucciones del fabricante.

Cebadores utilizados para amplificar exón 1

Cebador directo: SRP54OutFw

Cebador reverso: FusionRvSRP54 (cebador híbrido)

Cebadores utilizados para amplificar el exón 2

Cebador directo: ElimSRP54Fw (cebador híbrido)

Cebador reverso: SRP54OutRv

ii. Segunda ronda de PCR

El “mix” para la reacción, en un volúmen final de 25 μ L, consistió en 50 ng del exón 2, 50 ng del exón 1, 0.3 mM de dNTPs, 0.4 μ M de cebador “nested” directo, 0.4 μ M de cebador “nested” reverso, 1X KAPA HiFi Buffer Fidelity que contiene 2 mM $MgCl_2$, 0.5 unidades enzimáticas de ADN polimerasa KAPA HiFi y H_2O mQ estéril c.s.p. 25 μ L.

Cebadores “nested” para clonar *srpA* en pET28a de manera que:

-el “tag” de His quede en el extremo N-terminal de SrpA

Cebador “nested” directo: HisSrp54Nhef

Cebador “nested” reverso: HisSrp54Xhor

-el “tag” de His quede hacia el extremo C-terminal de SrpA

Cebador “nested” directo: SRP54HisNcof

Cebador “nested” reverso: SRP54HisXhor

El programa de fusión implicó primero una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C. Seguidamente, 10 ciclos de: 20 segundos a 98°C, 15 segundos a 65°C, y 2 minutos a 72°C. Luego, 15 ciclos de: 20 segundos a 98°C, 15 segundos a 65°C, y a 72°C durante 2 minutos (aumentando el tiempo de extensión 20 segundos por cada ciclo). Por último, una extensión final de 5 minutos a 72°.

3.6.3. Cebadores utilizados

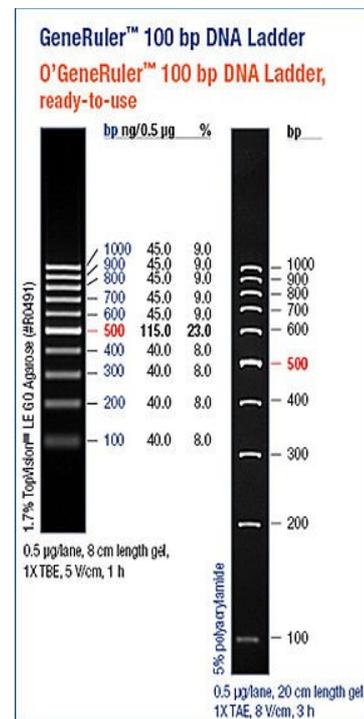
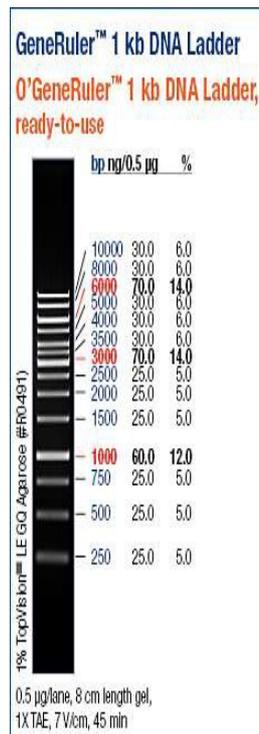
Para el diseño de cebadores se utilizó la herramienta informática <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>.

Cebador	Secuencia (5' - 3')
FureA2	GTTCTTCGGTTATCCAAATGG
Sp2ureA	GATGGCTTCCAGGAATGTGT
pET28_HisSRP54-Fw	ATGGTTCCTTCAGGATCTAGGGC
pET2_HisSRP54-Rv	CTACCGTCCCCGTCCCCT
EliminSRP54fw*	ACGAAAAGGCCTTCGAAGAGATGCTAAAGG
Srp54OUTFw	TTTTGTCCAATAAGACTTGCACT
Srp54OUTRv	TAAAACAAGGCCAAATGG
FusionRvSrp54*	CCTTTAGCATCTCTTCGAAGGCCTTTTCGTCCAGATTAGGTG AC
HisSRP54NheF	ATGGCTAGCATGGTTCTTCAGGATCTAGGG
HisSRP54Xhor	CGCACTCGAGCTACCGTCCCCGTCCCCTTC
SRP54HisNcof	ATACCATGGTTCTTCAGGATCTAGGG
SRP54HisXhor	CGCACTCGAGGCTGCCGCGCGGCACCAGCCGTCCCCGTC CCCTTC

*ver Anexo

3.7. Análisis electroforético de ácidos nucleicos (ADN y ARN)

Los ácidos nucleicos (ADN y ARN), obtenidos de la RT-PCR, PCR convencional, Fusion-PCR, extracción de ARN, ADN genómico y ADN plasmídico, y digestiones, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1-2 % en buffer TAE 1X con SYBR® Safe DNA 1X. Las muestras se cargaron con buffer de carga 1X. Para la corrida se aplicó un voltaje de 100 V, y se observó el resultado al exponer a luz UV. Como referencia del peso molecular se utilizó el marcado de peso molecular 1 Kb o 100 pb GeneRuler™ DNA Ladder (Thermo Scientific).



En algunas ocasiones para visualizar ADN se sustituyó el uso de SYBR® Safe DNA por 0.5 µg/mL de bromuro de etidio.

Buffers

Buffer TAE: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8).

Buffer de carga: 0.25% (w/v) xilencianol, 0.25% (w/v) azul de bromofenol y 30% (v/v) glicerol.

3.8. Purificación de ADN

a. Purificación con kit GeneJET Gel Extraction de Thermo Scientific

Para la purificación directa de la reacción de PCR, el tratamiento con polimerasa Taq, y para la extracción y purificación de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el kit GeneJET Gel Extraction de Thermo Scientific. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

b. Purificación con lana de vidrio

En la purificación con lana de vidrio se tiene un eppendorf con un fondo con lana de vidrio el cual es contenido dentro un eppendorf mayor. La banda de interés recortada se puso sobre la lana de vidrio y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. Para la precipitación, se le agregó al filtrado recolectado dos volúmenes de etanol al 100% y 0.3 M de AcNa pH 5.2 y se guardó por 15 minutos a -20°C. Nuevamente se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El "pellet" fue lavado con etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 10 µL de TE 10:1.

3.9. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones se realizaron utilizando 1 unidad enzimática de la enzima correspondiente por μg de ADN, 1x buffer correspondiente y H_2O mQ estéril c.s.p. 50 μL . Se incubó durante 2 hrs a 37°C.

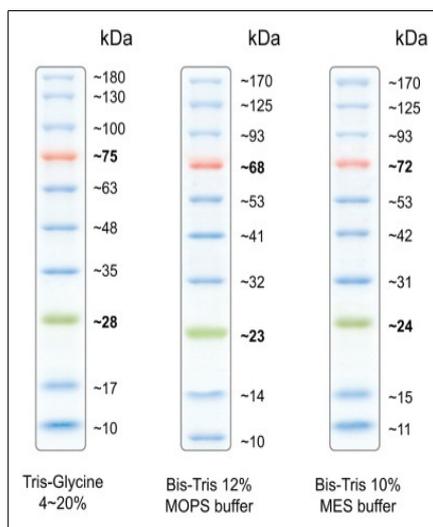
3.10 Análisis electroforético de proteínas (SDS-PAGE)

El gel de poliacrilamida se preparó al 15%.

Gel separador (receta para dos geles): 7.5 mL acrilamida-bis-acrilamida 30:1, 3.75 mL buffer Tris-HCl pH 8.8, 4.575 mL H_2O mQ estéril, 45 μL APS 10% y 7.5 μL TEMED.

Gel concentrador (receta para dos geles y medio): 975 μL acrilamida-bis-acrilamida 30:1, 1.875 mL buffer Tris-HCl pH 6.8, 3.75 mL H_2O mQ estéril, APS 75 μL 10% y 15 μL TEMED.

Las muestras previamente a ser sembradas se prepararon con buffer de carga 1X, y se incubaron a 100°C durante 5 minutos para realizar la desnaturalización proteica. Como referencia del peso molecular se utilizó 5 μL del marcador de peso molecular AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder.



La corrida electroforética se realizó a 80 V durante el pasaje de las muestras en el gel concentrador, y se aumentó a 120 V cuando las muestras ingresaron al gel separador. Una vez finalizada la electroforesis, para observar las bandas proteicas se tiñó el gel con Super Azul de Coomasie. Luego se procedió a decolorar utilizando solución decolorante.

Buffer de carga 4X SDS/SAMPLE BUFFER: 1.52 g de Tris-Base, 20 mL de glicerol, 2 g SDS, 2.0 mL β -mercaptoetanol, 1 mg azul de bromofenol, H₂O mQ estéril c.s.p. 50 mL.

Soluciones:

Super Azul de Coomasie: 0.2 % (2 g) Coomasie Blue R, 30 % (300 mL) de Etanol puro, 7% (70 mL) de ácido acético y H₂O mQ c.s.p. 1 litro.

Solución decolorante: 30 % (600 mL) etanol puro, 7% (140 mL) ácido

acético y H₂O mQ c.s.p. 2 litros.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención y amplificación de la secuencia codificante de *srpA* de *A. nidulans*

El primer objetivo a cumplir para producir la proteína recombinante SrpA en *Escherichia coli* fue obtener su secuencia codificante y amplificarla. Para lograr esto, se intentó en primera instancia amplificar la misma por RT-PCR.

Se realizó extracción de ARN de *A. nidulans* crecido en condiciones que, según los datos de RNAseq disponibles en www.aspergillusgenome.org, se obtenía el mayor nivel de expresión de *srpA* (ver Materiales y Métodos). La calidad del ARN extraído fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 3).

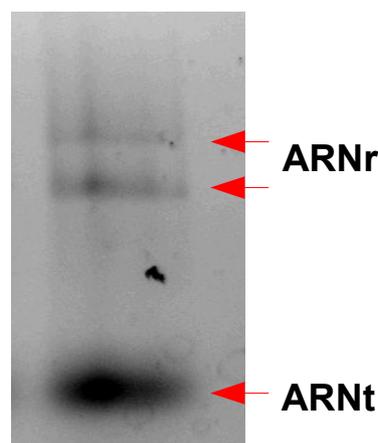


Figura 3. Análisis de la calidad del ARN extraído. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN extraído.

Como puede observarse en la Figura 3 se obtuvo: una banda de bajo

peso molecular que corresponde a los ARNts, y dos bandas de mayor tamaño que corresponden a los ARNrs. La concentración del ARN fue de 2250 ng/ μ L. La relación de absorbancia 260/280 fue de 1.98 y la de 260/230 fue de 1.83. Estos resultados implicarían que la calidad del ARN extraído es la adecuada para los siguientes ensayos realizados.

A continuación se realizó RT-PCR para amplificar la secuencia de interés y una región de *ureA*, el gen que codifica para el transportador de urea de *A. nidulans*. La RT-PCR de la región del gen *ureA* se realizó con el fin de verificar el estado del ADN copia y que no hubiera contaminación de ADN genómico (ver más adelante). Como control, además, previamente se verificaron los cebadores específicos para la secuencia de interés (*srpA*), amplificando ésta por PCR utilizando como molde ADN genómico de *A. nidulans*. Los productos de las RT-PCR y de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figuras 4, 5 y 6). El tamaño esperado para el producto de PCR es de 1662 pb que corresponde al tamaño de la secuencia genómica de *srpA*. El tamaño del producto que se espera obtener por RT-PCR para *ureA* es de 432 pb. En caso de que existiera contaminación con ADN genómico, los mismos cebadores utilizados amplificarían además, un fragmento de 526 pb. La diferencia de tamaño entre estos dos fragmentos se debe a la presencia de dos intrones en la secuencia genómica de *ureA* en la región amplificada (ver Anexo). Por último, el producto de la RT-PCR para *srpA* se espera que

tenga un tamaño de 1608 pb correspondiente al tamaño de la secuencia que codifica para SrpA.

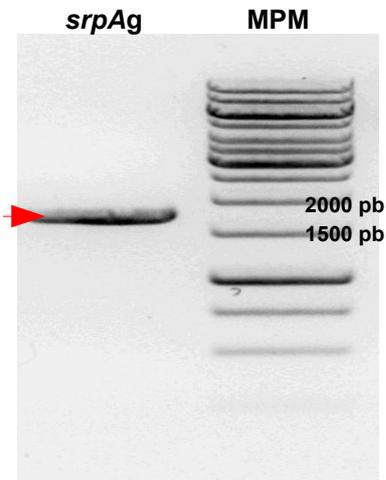


Figura 4. Análisis del producto de PCR para *srpA* sobre ADN genómico. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR. Carril 1: Producto de PCR (*srpAg*). Carril 2: MPM GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

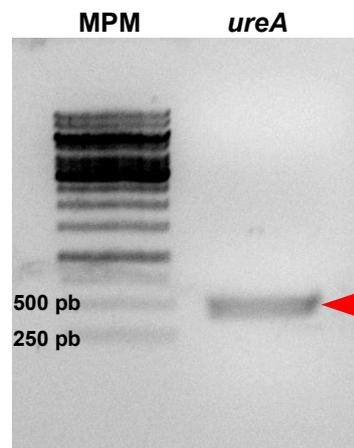


Figura 5. Análisis del producto de RT-PCR para *ureA*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de RT-PCR. Carril 1: MPM GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Carril 2: Producto de RT-PCR (*ureA*).

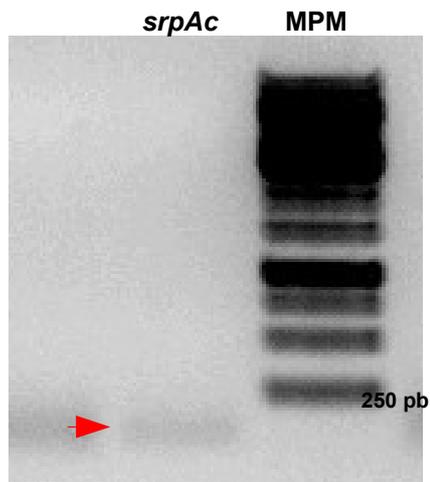


Figura 6. Análisis del reacción de RT-PCR para *srpA*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de RT-PCR. Carril 1: Producto de RT-PCR (*srpAc*). Carril 2: MPM GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Como puede observarse en las Figuras 4 y 5 se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado. Esto implicaría que la funcionalidad de los cebadores, así como la pureza del ADN copia es la adecuada. Sin embargo, en la Figura 6 se observa que no se obtiene el producto de RT-PCR esperado. Se visualiza una banda de bajo peso molecular que correspondería a dímeros de cebadores. A pesar de que se ensayó la reacción con distintas variables (*i.e.* cantidad de ADNc, temperatura de “annealing” y uso de DMSO) los resultados no fueron exitosos. Esto podría deberse a que, aunque se intentó maximizar los niveles de expresión de *srpA*, el nivel de expresión de este gen no es lo suficientemente alto como para que la RT-PCR sea exitosa.

Como segunda alternativa para lograr obtener y amplificar la secuencia codificante de nuestra proteína de interés se aplicó el método de Fusion-PCR (ver Materiales y Métodos) con la finalidad de eliminar el único intrón que tiene *srpA* (ver Anexo). De esta forma, primero se amplificó separadamente por PCR los dos exones de *srpA* desde ADN genómico de *A. nidulans* utilizando cebadores que generan extremos solapantes. En una siguiente amplificación por PCR, las regiones solapantes de los fragmentos actúan como cebadores internos que junto a cebadores denominados “nested” permiten la fusión de los fragmentos en una única molécula lineal.

Los cebadores “nested” se diseñaron de forma que adicionaran sitios de restricción específicos flanqueando la secuencia codificante, de modo que, más adelante, los extremos cohesivos generados por el corte de éstos permitieran el clonado en el vector de expresión pET-28a (ver Materiales y Métodos y Anexo). Para el diseño también se tomó en cuenta la posibilidad de que el “tag” de histidinas quedara en el extremo N-terminal o también en el extremo C-terminal de la proteína. Se realizó la Fusion-PCR de manera de obtener ambas configuraciones.

Los productos purificados de la Fusion-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 7). El tamaño esperado aproximado de los productos de la reacción corresponde al tamaño de la secuencia codificante de *srpA* (1608 pb).

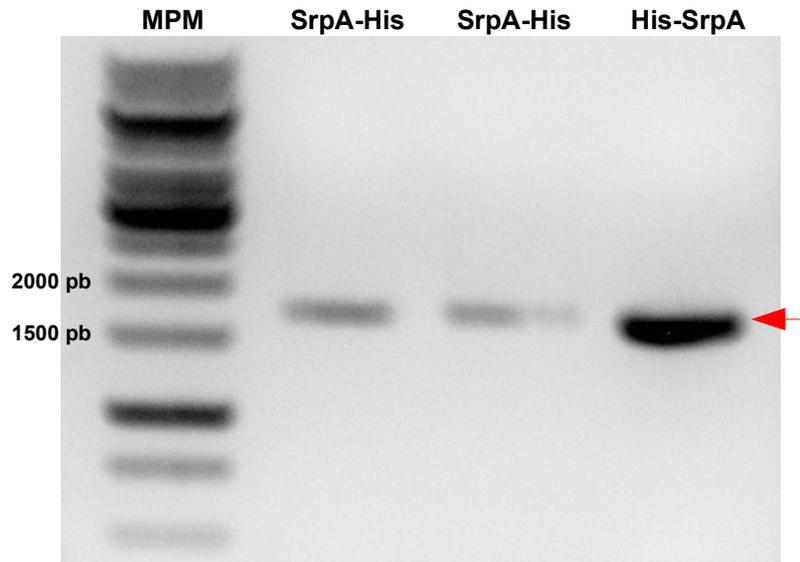


Figura 7. Análisis de los productos de Fusion-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de Fusion-PCR. Carril 1: MPM GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Carril 2 y 3: Producto de Fusion-PCR diseñado para clonar *srpA* en pET-28a de manera que posea un “tag” de His hacia extremo C-terminal (SrpA-His). Carril 4: Idem que lo anterior pero para que el “tag” de His se encuentre hacia extremo N-terminal (His-SrpA).

Como se observa en la Figura 7 se obtienen los fragmentos de tamaño esperado. De esta forma se pudo continuar con el clonado de la secuencia de interés en el vector de propagación pGEM-T Easy. Para realizar los siguientes ensayos, se eligió trabajar con la secuencia que permite producir SrpA con el “tag” de histidinas en el extremo N-terminal.

4.2. Clonado de la secuencia codificante de *srpA* en el vector de propagación pGEM-T Easy y transformación de *E. coli* DH5 α para amplificación *in vivo*

Para realizar la amplificación *in vivo* de la secuencia codificante de *srpA* primero se clonó dicha secuencia en el vector de propagación pGEM-T Easy. Dado que la secuencia que codifica para SrpA fue obtenida por PCR utilizando la enzima Kapa HiFi que genera extremos romos, previamente fue necesario realizar un tratamiento para adicionar adeninas desapareadas en los extremos 3', para luego proceder a la ligación en el plásmido. Una vez realizada la ligación se procedió a la transformación de las células competentes DH5 α con el producto de ligación. A continuación se extrajo el ADN plasmídico de los recombinantes seleccionados por α -complementación (ver Materiales y Métodos).

Para evaluar las minipreparaciones de ADN plasmídico y tener una primera confirmación rápida de la presencia del inserto de interés en los clones seleccionados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 8).

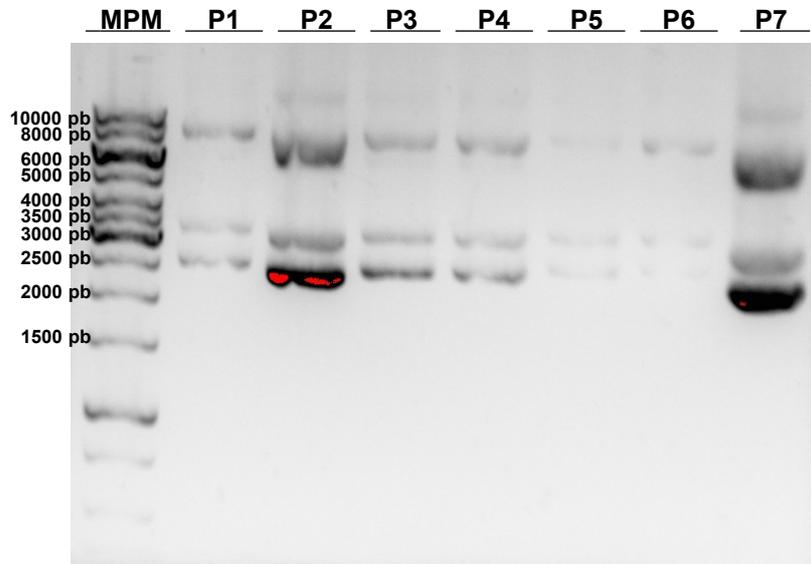


Figura 8. Minipreparaciones de ADN plasmídico. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN plasmídico extraído. Carril 1: MPM GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Carriles 2-8: Minipreparaciones de ADN plasmídico de distintos clones seleccionados (P1, P2, P3, P4, P5, P6 y P7, respectivamente).

Como se observa en la Figura 8, comparando la migración electroforética de los ADN plasmídicos de los distintos clones seleccionados pareciera ser que el ADN plasmídico migrado en el carril 8 (P7) posee un peso molecular menor que el resto de los ADN plasmídicos. Por lo cual aparentemente se tiene dos tamaños de plásmido diferentes. A su vez, para el plásmido P7, el fragmento de tamaño intermedio (conformación lineal) parece tener un tamaño aproximado de 3 Kb que se correspondería al tamaño del vector pGEM-T Easy en su estado lineal (3015 pb). Siendo así se podría deducir que el plásmido P7 es pGEM-T sin el inserto de interés y el resto de los plásmidos (P1 – P7) es pGEM-T

con el inserto. Vale destacar que en el grupo de laboratorio hemos observado que el colorante utilizado para poder visualizar el ADN (SYBR® Safe DNA) altera la migración de los plásmidos, por lo cual se optó seguir adelante con los ensayos y confiar en los resultados de las digestiones enzimáticas posteriores.

Siguiendo con el análisis y verificación de los presuntos recombinantes, se realizó digestiones enzimáticas del ADN plasmídico con *EcoRI* y *NcoI*, de forma separada, de los plásmidos candidatos P1, P5, P6 y P2. Los primeros tres se eligieron porque parecieran migrar menos en la Figura 8 y P2 se eligió, además, por su alta concentración.

El vector pGEM-T Easy tiene en su sitio de policlonado dos sitios de restricción para *EcoRI* y un sitio de corte para *NcoI* (ver Materiales y Métodos). Por otro lado, la secuencia codificante de *srpA* presenta un sitio de corte para *NcoI* en una posición aproximada a los 1218 pb y no presenta sitio de restricción para *EcoRI* (ver Anexo). El tamaño de los fragmentos que se esperaba obtener al digerir con estas enzimas, de tener el plásmido el inserto de interés, se resume en Tabla 1. El resultado se observó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figuras 9 y 10).

Tabla 1. Tamaño esperado de los fragmentos producto de las digestiones enzimáticas.
Expresado en pb.

Digestión con <i>EcoRI</i>	Digestión con <i>NcoI</i>
1633	1242
3009	3400

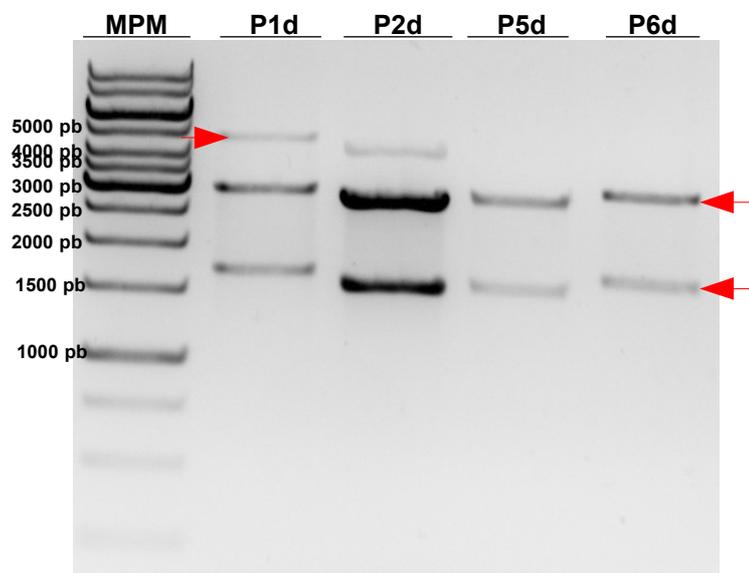


Figura 9. Análisis de la digestión de los plásmidos candidatos a tener el inserto de interés con *EcoRI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión del ADN plasmídico. Carril 1: MPM 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Carriles 2-4: Minipreparaciones de ADN plasmídico de clones P1, P2, P5 y P6 digeridas (Pxd) con *EcoRI*, respectivamente.

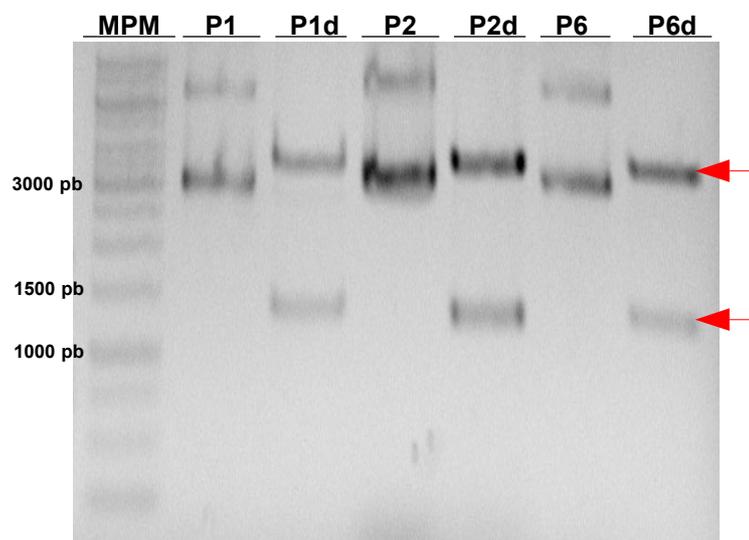


Figura 10. Análisis de la digestión de los plásmidos candidatos a tener el inserto de interés con la enzima *NcoI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestiones del ADN plasmídico. Carril 1: MPM 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Carriles 2, 4 y 6: Minipreparaciones de ADN plasmídico de los clones P1, P2 y P6. Carriles 3, 5 y 7: Digestión con *NcoI* de las minipreparaciones mencionadas anteriormente (Pxd).

Como puede observarse en las figuras anteriores, se obtuvieron los fragmentos de tamaño esperado para ambas digestiones. Por otro lado, en la Figura 9 (carriles 2 y 3) se observa una tercera banda con un tamaño aproximado de 4642 pb que correspondería a una digestión parcial del plásmido con inserto (llevando a la linearización del plásmido). Estos resultados confirmarían que se logró el clonado de la secuencia codificante de *srpA* en el vector de propagación pGEM-T Easy y se realizó su amplificación *in vivo*. A este plásmido resultante se lo denominó “pGemT-*srpA*”.

4.3. Subclonado de la secuencia de interés en el vector de expresión pET-28a, transformación de *E.coli* DH5α y verificación del recombinante por secuenciación

Para la expresión heteróloga de SrpA, la secuencia codificante se debió subclonar en un vector de expresión apropiado, en nuestro caso el plásmido pET-28a (ver Materiales y Métodos). La incorporación de la secuencia de interés a este vector se logró a través de la hibridación entre extremos cohesivos generados en ambos. Para cumplir con este objetivo primero se realizó la digestión enzimática con *NheI* y *XhoI* de uno de los plásmidos “pGemT-srpA” que tenían el inserto de interés así como también del vector pET-28a. Como puede verse en el mapa del sitio de policlonado de pET28-a (Figura 11) utilizando estas enzimas se obtiene la configuración que sitúa al “tag” de His hacia el extremo N-terminal de la proteína de interés. A su vez, de esta forma se conserva el sitio de corte para la trombina en caso que se desee remover el “tag” de His luego de la purificación.

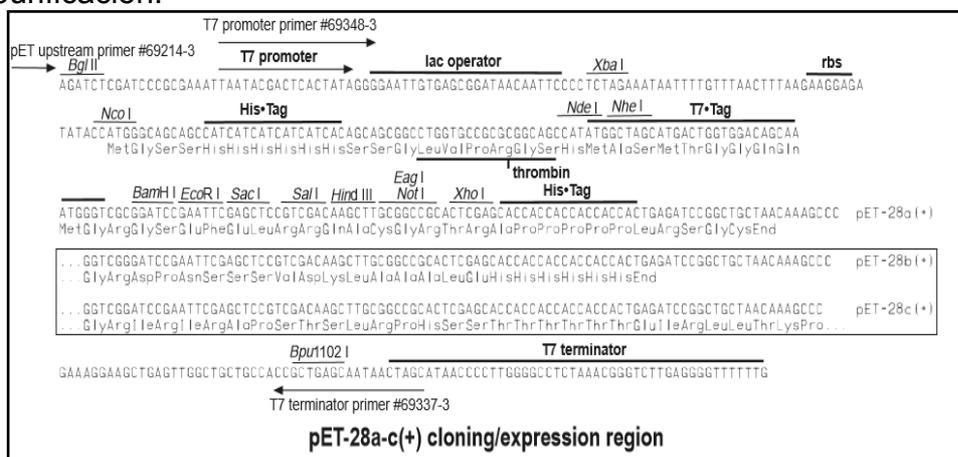


Figura 11. Mapa del sitio de policlonado del vector de expresión pET-28a.

El inserto de interés posee un sitio de corte para *NheI* y otro para *XhoI*. Éstos fueron adicionados en los cebadores “nested” utilizados en la Fusion-PCR. Por lo cual, estos sitios se encuentran inmediatamente antes e inmediatamente después de la secuencia codificante de *srpA*, respectivamente (ver Materiales y Métodos y Anexo). Por otro lado, el vector de expresión tiene en su sitio de policlonado un sitio de corte para *NheI* y otro para *XhoI*.

Una vez digeridos y purificados, se realizó su ligación. A continuación, se transformaron células competentes DH5 α de *E. coli* con el producto de dicha reacción y se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de los clones seleccionados.

Para verificar la presencia del inserto en los clones elegidos se realizó una digestión enzimática de uno de los candidatos a tener el inserto de interés, con las enzimas *NheI* y *XhoI*. Como resultado de la digestión, en caso de tener el plásmido ligado a la secuencia de interés, esperamos obtener dos fragmentos: uno correspondiente al plásmido linealizado, 5369 pb y otro correspondiente a la secuencia que codifica para *SrpA*, 1608 pb. El resultado de las digestiones se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 12). No se cargó en el gel el control de ADN plasmídico sin digerir que hubiese sido de ayuda para verificar la digestión.

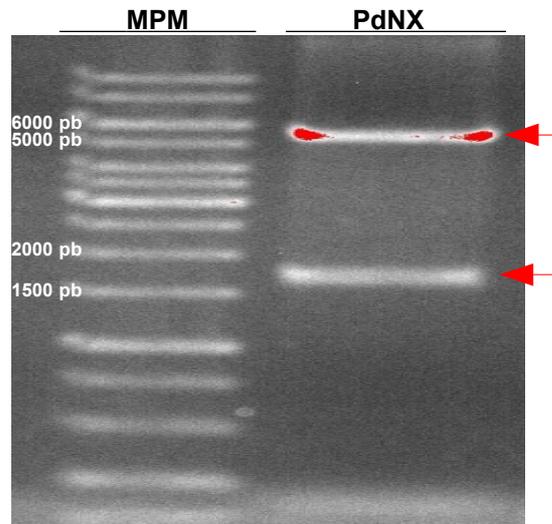


Figura 12. Análisis de la digestión de un plásmido candidato a tener el inserto de interés con *NheI* y *XhoI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión del ADN plasmídico. Carril 1: MPM 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Carril 2: Minipreparación del plásmido candidato digerido con *NheI* y *XhoI* (PdNX).

Como se observa en la figura anterior el tamaño de los fragmentos obtenidos es el esperado. Estos resultados implicarían que se logró el clonado de la secuencia que codifica para SrpA en el vector de expresión pET-28a, y llamamos a este plásmido “pET28a-*his_srpA*”.

Por último, para verificar que el marco de lectura del plásmido y de la secuencia codificante de *srpA* se encuentren en fase y que no existan mutaciones, se envió a secuenciar el recombinante elegido a la empresa Macrogen, Korea.

Los resultados confirmaron que el marco de lectura del plásmido se mantuvo en fase con el de la secuencia codificante de *srpA*. A su vez, no

se detectaron mutaciones en la secuencia. Este resultado era el esperado, ya que en la reacción de Fusion-PCR se había utilizado una ADN polimerasa de alta fidelidad, Kapa HiFi DNA con una tasa de error de 1 error cada 3.6×10^6 nucleótidos incorporados.

4.4. Transformación de *E.coli* BL21 con “pET28a-*his_srpA*” y puesta a punto de la expresión proteica inducida por IPTG

Con el objetivo de producir la proteína SrpA previamente se debió transformar la cepa BL21 de *E. coli* (descrita en Materiales y Métodos) con “pET28a-*his_srpA*”. En paralelo, también se transformó BL21 con el plásmido de expresión pET-28a sin inserto. Esto último es utilizado como control negativo en la expresión proteica. Realizada la selección de los transformantes por su resistencia a la kanamicina, se procedió a inducir la expresión proteica con IPTG. Se tomaron alícuotas del cultivo a intervalos de 1hr durante un total de 4 hrs y se procesaron las muestras por el método de lisis con lisozima. La inducción y el procesamiento se realizó para ambos transformantes. Se evaluó la expresión mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 13). El peso molecular estimado para His-SrpA es de 54 kDa.

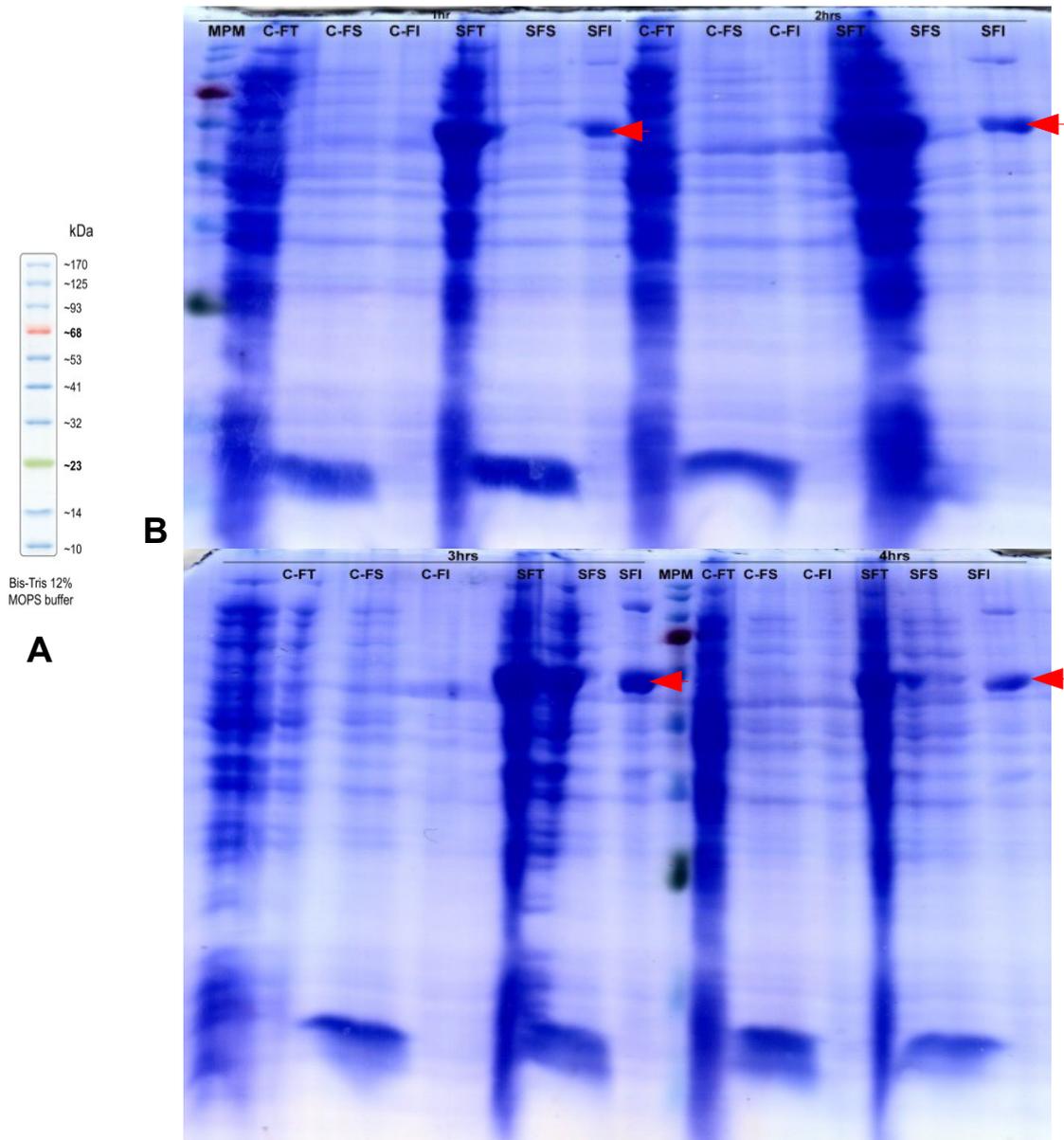


Figura 13. Análisis de la expresión proteica inducida con IPTG. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones totales, solubles e insolubles obtenidas de la expresión. Electroforesis SDS-PAGE.

A. MPM AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder.

B. Gel 1, Carril 1: MPM AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder. Carriles 2-4: Control negativo a 1hr de la inducción. Fracción total, soluble e insoluble, respectivamente. Carriles 5-7: Expresión del transformante de interés a 1hr de la inducción. Fracción total, soluble e insoluble, respectivamente. Carriles 8-10: idem a carriles 2-4 (gel 1) a 2hrs de la inducción. Carriles 11-13: idem a carriles 5-7 (gel 1) a 2hrs de la inducción.

Gel 2, Carriles 1-3: idem a carriles 2-4 (gel 1) a 3hrs de la inducción. Carriles 4-6: idem a carriles 5-7 (gel 1) a 3hrs de la inducción. Carril 7: MPM AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder. Carriles 8-10: idem a carriles 2-4 (gel 1) a 4hrs de la inducción. Carriles 11-13: idem a carriles 5-7 (gel 1) a 4hrs de la inducción.

FT (fracción total). FS (fracción soluble). FI (fracción insoluble). C- (control negativo). S (expresión del transformante de interés). Con la flecha se marca His-SrpA en FI.

Analizando la Figura 13, podemos decir que se logró la expresión heteróloga de His-SrpA a todos los tiempos ensayados de inducción. Esto puede verse concretamente en los carriles donde se cargaron las fracciones totales de la expresión del transformante de interés y recordando que el peso molecular estimado para His-SrpA es de 54 kDa. (carriles "SFT" a 1, 2, 3 y 4 hrs). También podemos deducir que la proteína se encontró en la fracción insoluble (carriles "SFI" a 1, 2, 3 y 4 hrs) y que el tiempo de máxima de inducción fue a las 3 hrs (carril "SFI" 3 hrs). Como era de esperarse, SrpA no se observa en el control negativo (carriles "C-FT"). Por otro lado, en la fracciones solubles del control negativo (carriles "C-FS") se destaca una banda de alrededor de 14 kDa que se corresponde con el peso molecular de la lisozima (utilizada para el procesamiento de las muestras).

Una vez determinado el tiempo de inducción adecuado para obtener una buena expresión de la proteína en cuestión, se realizó una expresión a mayor escala. También se evaluó las condiciones de solubilización de las proteínas insolubles con diferentes concentraciones de urea. El resultado de estos ensayos se analizó por electroforesis SDS-PAGE (Figura 14).

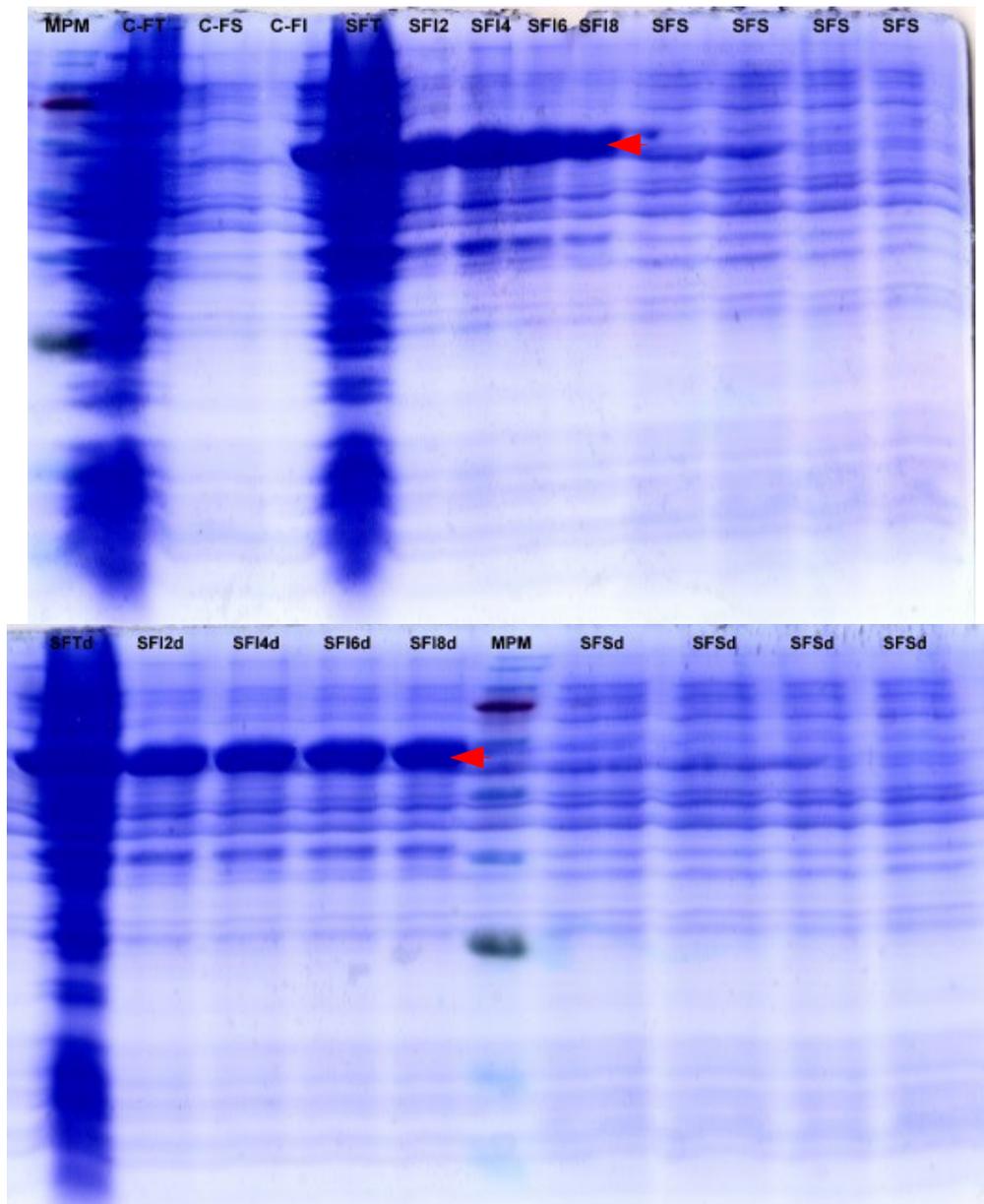


Figura 14. Análisis de la expresión proteica a 3hrs de la inducción con IPTG, a gran escala. Electroforesis SDS-PAGE.

Gel 1, Carril 1: MPM AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder. Carriles 2-4: Control negativo de la inducción. Fracción total, soluble e insoluble, respectivamente. Carril 5: Fracción total de la expresión del transformante de interés. Carriles 6-9: Fracción insoluble de la expresión del transformante de interés tratado con 2, 4, 6 y 8 M de urea, respectivamente. Carriles 10-13: Fracción soluble de la expresión del transformante de interés.

Gel 2, Carril 1: Fracción total de la expresión del transformante de interés de un duplicado. Carriles 2-5: idem a carriles 6-9 (gel 1) de un duplicado. Carril 6: MPM AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder. Carriles 7-10: idem a carriles 10-13 (gel 1) de un duplicado.

FT (fracción total). FS (fracción soluble). FI (fracción insoluble). C- (control negativo). S (expresión del transformante de interés). d (duplicado). 2, 4, 6 y 8 (concentraciones de urea expresada en M). Con la flecha se marca His-SrpA en FI.

llegan a los mismos resultados que los obtenidos en el ensayo de expresión anterior. Es decir, se obtuvo la expresión heteróloga de His-SrpA (carriles "SFT") y que la proteína de interés se encuentra en la fracción insoluble (carriles "SFI"). His-SrpA no se observa en el control negativo (carril "C-FT"). Se observa además que para todas las concentraciones de urea ensayadas se solubiliza el contenido proteico de la fracción insoluble (carriles "SFI" a concentraciones de urea 2, 4, 6 y 8 M). En esta figura no se observa la banda correspondiente a la lisozima debido a que en el procesamiento de las muestras se utilizó en menor cantidad.

En los resultados de expresión presentados anteriormente llama la atención la cantidad elevada de contenido proteico en la fracción insoluble. Esto se podría deber a que el procesamiento de las muestras no fue 100% exitoso. Creemos que el lisado celular con lisozima no haya sido del todo efectivo, y que células sin lisar formen parte de la fracción insoluble.

Si bien realizamos con éxito la expresión heteróloga de SrpA, teniendo en cuenta que nuestro objetivo es purificarla para producir los anticuerpos de interés, creemos que esta alta cantidad de proteínas en la fracción podría afectar el rendimiento en la purificación. En consecuencia, como segunda alternativa se probó realizar la lisis celular de las muestras por el método

de lisis por sonicado. El resultado de este procesamiento se analizó por electroforesis SDS-PAGE (Figura 15).

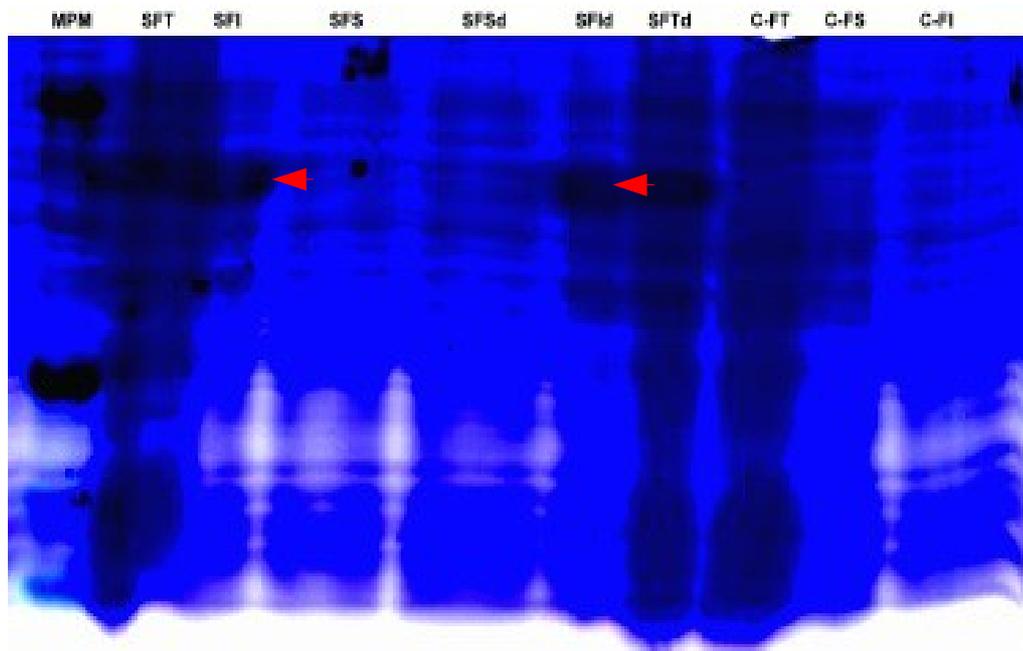


Figura 15. Análisis de la expresión proteica a 3hrs de la inducción con IPTG y lisis celular por sonicado. Electroforesis SDS-PAGE. Carril 1: MPM AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder. Carriles 2-4: Expresión del transformante de interés. Fracción total, insoluble y soluble, respectivamente. Carriles 5-7: Expresión del transformante de interés de un duplicado. Fracción soluble, insoluble y total, respectivamente. Carriles de 8-10: Control negativo de la inducción. Fracción total, soluble e insoluble, respectivamente. FT (fracción total). FS (fracción soluble). FI (fracción insoluble). C- (control negativo). S (expresión del transformante de interés). d (duplicado). Con la flecha se marca His-SrpA en FI.

Como puede observarse en la figura anterior se obtuvo la expresión recombinante de His-SrpA y ésta se encuentra en la fracción insoluble en concordancia con los resultados anteriores (carriles “SFT” y carriles “SFI”). En el control negativo no se observa la proteína en cuestión (carriles “C-FT”). Sin embargo, a pesar de haberse aplicado otro método de lisis celular se obtuvo de igual forma altos niveles de contenido

proteico en la fracción insoluble (carriles "SFI"). Por lo cual, previ6 a la purificaci6n de SrpA se deben ajustar las condiciones para un procesamiento adecuado de las muestras que permiti6 reducir estos niveles.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De acuerdo a los objetivos planteados, el primero de éstos a cumplir era obtener y amplificar la secuencia codificante de *srpA* de *A. nidulans*. Este paso es necesario para expresar la proteína recombinante de interés en un organismo con las características de *E. coli*. Para cumplir con dicho objetivo en primera instancia se intentó amplificar la secuencia codificante mediante RT-PCR, pero no se tuvo éxito. Esto pudo deberse a que el nivel de expresión de *srpA* no es lo suficientemente alto como para que la reacción sea exitosa. Sin embargo, la obtención y amplificación de la secuencia codificante si se logró aplicando la técnica de Fusion-PCR. Para la amplificación *in vivo* de la secuencia de interés se logró el clonado de ésta en el vector de propagación pGEM-T Easy y la transformación de *E. coli* DH5 α . También se logró el subclonado de la secuencia en un vector apropiado para la expresión heteróloga de la proteína en cuestión, pET28a. Se logró verificar por secuenciación que el marco de lectura del plásmido y de la secuencia de interés en el plásmido recombinante obtenido se encontraran en fase y no se detectaron mutaciones en dicha secuencia. Por último, se logró la transformación de una cepa *E. coli* apropiada para expresión proteica, BL21, con el inserto de interés “pET28a-*his_srpA*” y se logró poner a punto la expresión proteica inducida por IPTG. De este modo se logró cumplir con el objetivo general de la presente tesina, producir la proteína SrpA de *A. nidulans* en *Escherichia*

coli para la producción de anticuerpos. Estos anticuerpos serán utilizados en ensayos que permitan determinar el posible rol de los codones 24/25 en la interacción temprana de SRP con los RNC que estén traduciendo UreA (RNC-UreA).

Como perspectivas a corto plazo se plantea que previó a la producción de anticuerpos debemos realizar la purificación de la proteína recombinante SrpA. Para ello en primera instancia se deben optimizar las condiciones de procesamiento adecuado de las muestras de expresión que nos permitan obtener una fracción insoluble con menores niveles proteícos de modo que no se vea afectado el rendimiento de la purificación. Una vez realizada la purificación, la banda purificada de SrpA será analizada por espectrometría de masas para verificar que hayamos obtenido la proteína de interés.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-Abreu, C.; Sanguinetti, M.; Amilis, S. Y Ramón A. 2010. UreA, the major urea/H⁺ symporter in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 47: 1023-1033.

-Akopian, D.; Shen, K.; Zhang, X. y Shan. S. 2013. Signal Recognition Particle: An essential protein targeting machine. Annu Rev Biochem 82: 693–721.

-Beckert, B.; Kedrov, A.; Sohmen, D.; Kempf, G.; Wild, K.; Sinning, I.; Stahlberg, H.; Wilson, D.N. y Beckmann, R. 2015. Translational arrest by a prokaryotic signal recognition particle is mediated by RNA interactions. Nature structural & molecular biology 22: 767-773.

-Berndt, U.; Oellerer, S.; Zhang, Y.; Johnson, A.E. y Rospert, S. 2009. A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. PNAS 106: 1398–1403.

-Bernstein, H.D.; Zopf, D.; Freymann, D.M.; y Walter P. 1993. Functional substitution of the signal recognition particle 54-kDa subunit by its *Escherichia coli* homolog. Proc Natl Acad Sci U S A 90:5229–34.

-Cross, B.C.S.; Sinning, I.; Luirink, J. y High S. 2009. Delivering proteins for export from the cytosol. Nat Rev Moll Cell Biol 10: 255-264.

-Diallinas, G. 2007. *Aspergillus* transporters. Aspergilli; Genomics, Medical

Aspects, Biotechnology, and Research methods. Goldman, G.H. y Osmani S.A, CRC Press: 301-320.

-Diallinas, G. 2013. Allopurinol and xanthine use different translocation mechanisms and trajectories in the fungal UapA transporter. *Biochimie* 95 (9): 1755-1764.

-Elvekrog M.M. y Walter, P. 2015. Dynamics of co-translational protein targeting. *Current Opinion in Chemical Biology* 29: 79–86.

-Grudnik, P.; Bange, G. Y Sinning, I. 2009. Protein targeting by the signal recognition particle. *Biol Chem* 390: 775-782.

-Hainzl, T. y Sauer-Eriksson, A. 2015. Signal-sequence induced conformational changes in the signal recognition particle. *Nature Communications* 6: 7163. DOI: 10.1038/ncomms8163.

-Iriarte, A.; Sanguinetti, M.; Fernández-Calero, T.; Naya, H.; Ramón, A. y Musto, H. 2012. Translational selection on codon usage in the genus *Aspergillus*. *Gene* 506(1): 98-105.

-Keenan, R.J.; Freymann, D.M.; Stroud, R.M. Y Walter, P. 2001. The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70: 755-775.

-Kosti, V.; Papageorgiou, I. y Diallinas, G. 2010. Dynamic elements at both cytoplasmically and extracellularly facing sides of the UapA transporter selectively control the accessibility of substrates to their translocation

pathway. *J Mol Biol* 397(5): 1132-43.

-Lakkaraju, A.K.K.; Mary, C.; Scherrer, A.; Johnson, A.E. y Strub, K. 2008. SRP maintains nascent chains translocation-competent by slowing translation rates to match limiting numbers of targeting sites. *Cell* 133: 440-451.

-Mason, N.; Ciufu, L.F. y Brown, J.D. 2000. Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *EMBO Journal* 19: 4164–4174.

-Nyathi, Y.; Wilkinson, B.M. y Pool M.R. 2013. Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophys. Acta* 1833: 2392-2402.

-Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; Macdonald K.D. y Bufton A.W. et al. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5: 141-238.

-Pool M.R. 2005. Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals. *Molecular Membrane Biology* 22: 3-15.

-Powers, T. y Walter P. 1997. Co-translational protein targeting catalyzed by the *Escherichia coli* signal recognition particle and its receptor. *EMBO J* 16:4880–6.

-Rosenblad, M.A.; Zwieb, C. y Samuelsson, T. 2004. Identification and

comparative analysis of components from the signal recognition particle in protozoa and fungi. BMC Genomics 5: 5.

-Sanguinetti, M. 2014. Tesis de doctorado PEDECIBA Biología. “Estudio a nivel traduccional, post-traduccional y funcional del transportador de urea *UreA* de *Aspergillus nidulans*”.

-Sanguinetti, M.; Amillis, S.; Pantano, S.; Scazzocchio, C. y Ramón, A. 2014. Modelling and mutational analysis of *Aspergillus nidulans* *UreA*, a member of the subfamily of urea/H⁺ transporters in fungi and plants. Open Biol 4: 140070.

-Shao, S. y Hegde, R.S. 2011. Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum. Annu Rev Cell Dev Biol 27: 25-56.

-Siegel, V. y Walter, P. 1985. Elongation arrest is not a prerequisite for secretory protein translocation across the microsomal membrane. J Cell Biol 100: 1913-1921.

-Tavoularis, S.; Scazzocchio, C. y Sophianopoulou V. 2001. Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 33(2): 115-125.

-Tuller, T.; Carmi, A.; Vestsigian, K.; Navon, S.; Dorfan, Y.; Zaborske, J.; Pan, T.; Dahan, O.; Furman, I. y Pilpel Y. 2010. An Evolutionarily Conserved Mechanism for Controlling the Efficiency of Protein Translation.

Cell 141(2): 344-354.

-Vit, O. y Petrak J. 2016. Integral membrane proteins in proteomics. How to break open the black box?. J Proteomics pii: S1874-3919(16)30361-X. doi: 10.1016/j.jprot.2016.08.006.

-Wild, K.; Rosendal, K.R. y Sinning, I. 2004. A structural step into the SRP cycle. Mol Microbiol 53(2): 357-63.

7. ANEXO

Secuencia genómica del gen *ureA*

AGTAGTCTCGCCAATCTTGTCTCAGTGTGCTTTGCCCGCAAATCTCGTTCTAGACTGGTATCTTGC
CTCGCTACCGGCGGGAATACGAAGTATAGGTAAGGGTCTGCATGGTTCACCTCAACAGCCGCCTAT
CGACTTAATCCCGTCATGGATGTCAAGGAAACGCTTGGAATGGGGCTGGATTGTAATTAGAAATAT
ATGCCTTGAATCTCATTGACACTAGTTAACTCACGAAACCTGGAGCAGTCGAAGATAGTATCACA
CCCCACGCTCCAAGCCTCTGGGGTCAGCTTGTCTGGGTCCATGTGGTTCGATGCACCGATGACAAG
GGAGATCAGATAAGGAATCCAGATCTCGAAGCCACGGGCAAACGCGGTATTCGCTACCCGGGTCTT
GGTTTGTGGGAATGTTAACGATCTGTAGCCTCTAGTAATCATTCAAGTAACCTGTGGGGCTCTTCGC
GTATGGCATATTCGGCGTATTCTATGGGCTCTTGTAGTCTGGGCCCTTGAGGTATATCCTCTCTAA
CTGCCCCGAGAAGTGGCGAAAACCTCATTGCAAGAACTTTTTGTACCATTGTATGCTTACCTGGGC
ACTGTGGGCAGGCCTTCTTGGGAGTCCAACCCCTCTACGGTCTACTTGGGATTAGGACGATATTC
TCCCTACTTCGTAGACTAACTCCAGTGAAGCATTGGGGGGAGAGGTTTCGATGTGTGGATTATA
ATACTCTTGGGCGAAGAGACTGTTGCTATTGGTCTAGCAGAAAAGACAGGACGAGTTCAAAAACGGC
TTGAGGTTGATAAGTGTGAATATATTCCTGTGCCAGAGGAGCCGTAGTAACCTGATAGGCATT
TCCAGGGAGACAGCTGCACGTAGTCGGACAGTTCGGAGCTCTGGACATGTGGGGGAGCACAGAATC
GAAAAGATTAGTGGGAGTATCGAGTAAAACGTTATCTGCAGTCAAGTTATCAGTTCTCGAGAATGA
CCATGGCCCTTCTCTCAATGCGTGCTTCGGCCATGGCCGGCCGTCGCCAGTCAACTGTGGGC
CCGCTTATCAGCTGGCTTTCCCGTCCAATGGGATCACGTCAAGCTTTCCTGATAAGCCTACAATTT
TCCAATGGGATGATTTGCTTCTTCATCCACCACGATAACGAAACATCCTGCCAGTAAGTTAACT
CGCTGCTCCAGGCCATTCTTTTCAGAGACCTGAGTACGAAAGTGAAGGAATGATGGAGAAACCAAG
AGCTATGCCAAGCTCAATCCTTTATTACGAAACATGGTTCGTCCTTATCATGCCTTCCACGAGCTGG
GACAGCTCTCCTTGTATCAGCCTCGTTCTTATTTATCATTGCATCGCCAATAATTACTTGTCTATC
GCGAGCTTCATCGATACTGCTTGAAGGTTGACGCAGCGGGATCGGAGATTTAAGTCTTATATCAG
CCCCTCAGTCCCTGCTCTGAGTTGTGCGCCATCACAACTTAAAGATCTGGAAACTGCAGACACCAG
ACTGCCTGAAATTGTACTACGAAGTAGAGCAGTTGTTTTCTGTTGAGGTTGCTAGTTCTCCACTGG
TTCTTCGGTTATCCAAAATGGTTGCGGTTATAGCTGCCCCCGATGAAGCCGGGGTAGAGACCGTTA
CGTTCACTGCTCCCTCACCCAAGGGTTTTGGGTACGGGATCATCATCGGGCTCGGGTTCGCCTTTG
CCCTGGTCATGATCTTCATCACCTGGTCCCTAAAGAG**GTAAGTTTTGTTCAGACATTGGTTTTCGAGC**
AGGACTAACGGTCTAGGTATCAACATGAGATTATCACGTCTGAGATGTTCTCCACAGCTGGACGGA
GTGTCAAGTCTGGCCTGGTGGCCTCTGCTGTCTGAGCAGTTGGACCTGGGCAGCTACTCTGCTGC
AATCTTCGGCCGTGGCCTACCAGTACGGCACCTCGGGCCGTTCTTCTATGCATCGG**GTTGGTCTT**
CACCCCGGTATGACACGAAGGATATACTGACAGTTTGACGGCGCCACCGTTCAGATCATCTTGTTT
GCAACGCTCGCCATTGAACTCAAGAGACGCGCGCTAACGCAC**ACACATTCCTGGAAGCCATC**CGT
GCCCGTTACGGTACCGTCTGACATCTCGTCTTCATCGTTTTCTGCCTGATGACCAACATCCTCGTT
ACGGCCATGCTGCTCACTGGCGGCGCAGCGGTGCTCAACTCTATGACTGGCGTCCCAGTTGTTGCA
GCCTGCTTCTCTCCCAATCGGTGTGGTTCTGTACACCCTTTTCGGAGGCATTAAAGCAACATTC
ATCACCGACTATATGCACACTGTTGTCAATTGTGCTGATCATCTTCATCTTCGCTTTCTCTGCCTAC
GCCAGCAACGACCGTCTTGGCTCCCCCGCAAAGTCTATGACCTCCTCGTCCAAGCTGCTCTGCGC

AATCCGGTTTCAGGGAACGCTGAAGGTAGCTACCTCACCATGCGCTCCAAAAGATGGCGGTATCTTC
TGGGTCATCAACCTCGTCCGTAACCTTCGGCACTGTCTTCCTGGACAACGGCTACTACAACAAGGCC
ATCGCCGCGCACCCAGTCCACGCTTTCCTGGATATGTCATCGGCGGTCTCTGCTGGTTCGCTATT
CCCTGGCTCTGCGCGACAACGATGGGTCTCTCTGCACTTGCCTAGAGGGAACGCGCCGCATTGCC
TCCGTTGACGTAACAGCCGGCCTCGTCCTTCCCTTTGCATCTGTGAACTCCTCGGATATAGTGGC
GCAGTATGCACAACCCTTATGATCTTTATGGCCGTGACCTCTGCCTTCTCGGCCAGCTCATCGCC
GTGTCCTCGATCCTCACCTACGATATCTACCAAGCCTACATCAACCCTGCCGCAAAGGGCAAACGC
CTCGTCTGGGTCTCGCACCTCTCCTGCGTAGTCTTCGCAATCGCGATGGCTGCCTTTGCGACAGGT
CTTCACTACGCTGGTATCGGTATGGGCTATCTCTACCTTCTCATGGGCGTCATCATCTCCTCAGCC
GTGTTCCCGGGCGCCATGACCCTCGTCTGGAAGGGCAGAAGTGGATCGCGGCAGCCGCTCTCCA
GTTTTGGGCCTCGCAATGTCCCTGGTTGCGTGGCTTGTACAACAAAGACAGAGTATGGCGTCTTC
ACCGTCGAAACCACAGGAGCAAACCTACCCCATGCTAGCGGGCAACGTCGCCGCCCTTCTCAGCCCT
GTCGTCTTCTCGCCAGTCTTGACATACCTCTTCGGCCCTCAGAATTACGACTACGAATCCATGCGC
GCCATCCGCAAAGTCGATGACTCGGATGTGCGCCGGCGGCGCACGTCGACCTCGAGCTCATTTCC
GGCGCTTCCAATACAAACTCGTCCCCTTACAGCAACAGCAAGAGGAAGAGAAATAAGAAAACCTC
AACAAAGCCGCATTTATTTCCCGCTGTCTCACAGTTGGCATGGTAATTTGTTTCTTGATCCTCTGG
CCTATACCCATGTATGGCAGCGGGTACGTCTTACAGCAAGAAGTTCTTACAGGCTGGGTTGTTGTG
GGCATCATCTGGCTCTTTGGGACTGCGTTCCGGGTGATTCTATTCCCGCTCTGGGAGGGTAGGAGC
AGTATCAAAAGGGTTGGTAAGCTTATGCTGCTCGATGCGATGGGAAGGCAGTGAAAAGCAGTGCT
CTGGTAGGCCAGGGAGACGAAGAGAGTGAAGAGTCTGGGTCTGGTGCTGTTACACCGAGCGAGAAG
ATTGTTGCAAAATGAGTGTGTTTCATATATCTTGCCTTGTGTGTGTTACAGCTAGCTAGATTCATTT
ATGTTTTGCGTTTTGATTCAATTATACCCCACTCGTTACACATGTACCAAGTTTTTATACCAGGGTG
GCGACCAGCGTTCATGATAAGATAGCTTATATAGAATATGGCTATTTTCAATTAAGCATTATAATTCA
TTCTTACGGACCCTAGCTGAAGCAGTTATGTCGTCCAAGCCGTCATTAACCTTTATAGAGCGAAATA
TAGAATTACAAACTGGAAAGACAAGAGCAATGTTCCCTCCAGAGATCAACCCCAACAGACCATAGA
ACAGTAACTTAGGTATCGTCATCAATCTGAGAGTAAACTCCAGTCTTTCGAGGACCTGACGAACAC
TGCCTCAGAGGCATTTGCCATGAGCGCATCACTTATACGCATACGGCTGTGGTGGCGGTGATGTAG
CCCCGACGCTACGGGAGGATACTGCATTTGCTGCTGCGGGGTTTGTGCTGCTGATACCCCCCAA
AGTATGCCTGCGGCGGAGGTTGTGGTCCGTAGCCTGCATTTGGGGGCGGCCGAGTGTCTGGGTAA
TATCGGGGCGATCACTATTCTTGTAGTTTATGAACAATATAAGCATGTACTGAGAAGCAGTGGAT
CAGATGAAAAAAGGAGAGCATAAGGCAAGGGAAGGATATACCGCAAGTCTGGGTAAATCGGCATG
TGTAGCATGTAACCTCCTTGTACTTGTGCATTGCTAATGGGATCACGGGCTGTATGGGATATGTCA
GTTCCCTTTTCTTCGGTACAATACTGCCTTTAGCAAAGGCAGGATAGTGCCATACAATGAAGCAGAT
CGTGAAGAATGGCCTGTATACATGCGTTAGCCCCAGGCGTAGTTAGTTAACTCAGGACAACATACC
ATCGTGTACACACCGTCCATTCCAATGGTTGCCTGTACGGAGTTTAGTGCCAGATCCATTGGTAA
CTGTTGAACAGCAGCCACGCCGTGTCTTGTCTCAGAAAATCGGGACTA

Referencias:

Con fondo amarillo y subrayado: cebadores

En letra roja: intrones

Secuencia genómica de *srpA*

Sec genómica AN8246 AspGDB

>AN8246|srpA COORDS:ChrII_A_nidulans_FGSC_A4:1263977-1265638C (1662 nucleotides)

TGTGAATCCCATTTTGTCCAATAAGACTTGCACTACCAGGGACCGTCACAATGGTTCTTCAGGATC
TAGGGCGGCGAATCAACGCCCGCTCAATGACTTGACTCGSTCACCTAATCTGGACGAAAAGGTAC
GCCCCGCCTACGTATACGACAACCTGAAAGATGCTGATTTTAGGAGTAAAGGCCCTTCGAAGAGATGC
TAAAGGAGATCTGCGCCGCCCTTCTCTCTGCCGACGTCAACGTTTCGTCTTGTTCAGTCACTCCGCA
AGTCTATTAAAGCCAGCGTCAACTTCGCCTCCCTCCCTGCAGCCGTGAACAAGAAACGAGTGATTC
AAAAGGCCGTCTTCGATGAGCTCGTAGCCTTGGTCAACCCACATGCAGAGCCATTTGCCCCTAAGA
AAGGCCGATCAAATGTCATCATGTTTCGTTCGGTCTGCAGGGTGCAGGTAAAACGACAACCTGTACCA
AGCTTGCCCCGACACTATCAAATGCGCGGGTTCAAGACGGCCCTCGTTTGTGCAGACACTTTTCGAG
CTGGTGCTTTTCGATCAACTGAAGCAGAACGCGACAAAAGCTAAGATTCCGTACTACGGTAGCTTAA
CACAAACCGACCCGGCTGTTCGTAGCAGCAGAGGGTGTAGCCAAATTCAGAAGGAGCGATTTGAGA
TTATTATTGTTGATACTAGTGGTTCGTCACAAGCAGGAAGAACAGCTGTTTACGGAATGACCCAAA
TCCAGACGGCGGTGACGCCTGACCAGACTATCTTGTGCTTGATGGAACAATTGGACAAGCCGCGG
AGGTGCAATCCTCGGCCTTTAAAGCCACTGCAGATTTTGGAGCTATCATAATCACAAAGACCGATG
GTCATGCAGCAGGTGGAGGTGCTATCTCTGCAGTCGCAGCCACTCATAACCCTATTATCTTTCTTG
GAACTGGTGAGCATATGATGGATTTGGAGCGTTTCGAACCCAAAGCATTTATCCAGAAGCTTCTTG
GTATGGGTGACATGGCGGGCTTAGTCGAGCACGTTTCAGGCCGTAACGAAGGACTCAGCCGCTGCCA
AGGAAACCTACAAGCATATCGCTGAAGGTATTTATACCCTCCGCGACTTCCGCGAAAACATTACAT
CAATCATGAAGATGGGCCCGCTGTCAAAGCTTTCCGGTATGATCCCTGGCTTGTCAAATCTTACCG
CCGGCCTTGACGATGAGGACGGCTCCATGAAACTGCGCCGCATGATCTATATATTTGACAGCATGT
CAGCCGTCGAATTGGACAGCGACGGCAAGATCTTTGACACACAGCCGAGCCGAATGGTTTCGTATTG
CCCATGGTAGCGGCACTTCAGTGCAGCAAGTTGAGGATCTCCTGTCACAACACCGCATGATGGCCG
GGATGGCGAAGCGTGTTCGGTGGCCAGAAGAAGCAAATGCAACGAGCACAGAATATGCTCAAGGGTG
GCAACAAGGATCAACAGCTTGCTGCTATGCAGAAGCGGATGGCCTCGATGGGTGGAGCTGGTGGCA
TGGGCGGCATGCCCCGAATGGGCGATATGGCGAAGATGATGCAGATGCTGCAGGGCCAAGGCGGCG
GCGGCGGCGGCGGCGGTGGTGGTGGTGGGCTGCCAGGTCTTGGTGGGATGGACTTGCAGTCGATGA
TGAGCCAGATGAGCGGGTTGATGGGCGGTATGGGAGGTGGTGGAAAGGGGACGGGGACGGTAGTCCA
TTTTGGCCTTGTTTTTACTGATAATGATTTAATTCCTTCCGTGATC

Referencias:

En letra negra: secuencia codificante

En letra roja: intrón

Con fondo celeste: codón stop

Con fondo verde: codón de inicio

En letra naranja: parte de las secuencias de los 5' y 3' UTRs

En letra naranja subrayado: cebadores

Srp54OUTFw

5' TTTTGTCCAATAAGACTTGCACT 3'

Srp54OUTRv

5' TAAAAACAAGGCCAAAATGG 3'

Con Fondo de colores: cebadores híbridos Fusion-PCR de la siguiente forma:

EliminSRP54fw

5' ACGAAAAGGCCTTCGAAGAGATGCTAAAGG 3'

Subrayado: corresponde al exón 1

Sin subrayar: corresponde al exón 2

FusionRvSrp54

5' CCTTAGCATCTCTTCGAAGGCCTTTTCGT CCAGATTAGGTGAC 3'

Subrayado: corresponde al exón 2

Sin subrayar: corresponde al exón 1

Con fondo celeste: sitio de corte para NcoI

Secuencia de interés producto de Fusion-PCR

para la configuración con “tag” de histidinas en extremo N-terminal:

ATGGCTAGCATGGTTCTTCAGGATCTAGGGCGGCGAATCAACGCCCGCTCAATGACTTGACTCGG
TCACCTAATCTGGACGAAAAGGCCTTCGAAGAGATGCTAAAGGAGATCTGCGCCGCCCTTCTCTCT
GCCGACGTCAACGTTTCGTCTTGTTTCAGTCACTCCGCAAGTCTATTAAAGCCAGCGTCAACTTCGCC
TCCCTCCCTGCAGCCGTGAACAAGAAACGAGTGATTCAAAGGCCGTCTTCGATGAGCTCGTAGCC
TTGGTCAACCCACATGCAGAGCCATTTTCGCCCTAAGAAAGGCCGATCAAATGTCATCATGTTTCGTC
GGTCTGCAGGGTGCAGGTAAAACGACAACCTGTACCAAGCTTGCCCGACACTATCAAATGCGCGGG
TTCAAGACGGCCCTCGTTTTGTGCAGACACTTTTTCGAGCTGGTGCTTTTCGATCAACTGAAGCAGAAC
GCGACAAAAGCTAAGATTCCGTACTACGGTAGCTTAACACAAAACCGACCCGGCTGTCGTAGCAGCA
GAGGGTGTAGCCAAATTCAAGAAGGAGCGATTTGAGATTATTATTGTTGATACTAGTGGTCGTCAC
AAGCAGGAAGAAGCAGCTGTTTACGGAAATGACCCAAATCCAGACGGCGGTGACGCCTGACCAGACT
ATTCTTGTGCTTGATGGAACAATTGGACAAGCCGCGGAGGTGCAATCCTCGGCCCTTAAAGCCACT
GCAGATTTTGGAGCTATCATAATCACAAGACCCGATGGTTCATGCAGCAGGTGGAGGTGCTATCTCT
GCAGTCGCAGCCACTCATAACCCCTATTATCTTTCTTGGAACTGGTGAGCATATGATGGATTTGGAG
CGTTTTCGAACCCAAAGCATTATCCAGAAGCTTCTTGGTATGGGTGACATGGCGGGCTTAGTCGAG
CACGTTTCAGGCCGTAACGAAGGACTCAGCCGCTGCCAAGGAAACCTACAAGCATATCGCTGAAGGT
ATTTATACCCCTCCGCGACTTCCGCGAAAACATTACATCAATCATGAAGATGGGCCCCGCTGTCAAAG
CTTTCCGGTATGATCCCTGGCTTGTCAAATCTTACCGCCGGCCTTGACGATGAGGACGGTCCCATG
AAACTGCGCCGATGATCTATATATTTGACAGCATGTCAGCCGTCGAATTGGACAGCGACGGCAAG
ATCTTTGACACACAGCCGAGCCGAATGGTTCGTATTGCCATGGTAGCGGCACCTTCAGTGCAGCGAA
GTTGAGGATCTCCTGTCACAACACCGCATGATGGCCGGGATGGCGAAGCGTGTGCGTGGCCAGAAG
AAGCAAATGCAACGAGCACAGAATATGCTCAAGGGTGGCAACAAGGATCAACAGCTTGTGCTATG
CAGAAGCGGATGGCCCTCGATGGGTGGAGCTGGTGGCATGGGCGGCATGCCCGGAATGGGCGATATG
GCGAAGATGATGCAGATGCTGCAGGGCCAAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CTGCCAGGTCTTGGTGGGATGGACTTGCAGTCGATGATGAGCCAGATGAGCGGGTTGATGGGCGGT
ATGGGAGGTGGTGGAAAGGGGACGGGGACGGTAGCTCGAGTGGC

Referencias:

En negrita secuencia codificante de *srpA*

Con fondo celeste: sitio de corte para NcoI

En letra azul y subrayado: sitio de corte para *NheI*

En letra rosada y subrayado: sitio de corte para *XhoI*

Subrayado: cebadores “nested”, de la siguiente forma:

HisSRP54NheF

5' ATGGCTAGCATGGTTCTTCAGGATCTAGGG 3'

HisSRP54XhoI

5' CGCACTCGAGCTACCGTCCCCGTCCCCTTC 3'

para la configuración con “tag” de histidinas en extremo C-terminal:

ATACCATGGTTCTTCAGGATCTAGGGCGGGCGAATCAACGCCCGCTCAATGACTTGACTCGGTAC
CTAATCTGGACGAAAAGGCCTTCGAAGAGATGCTAAAGGAGATCTGCGCCGCCCTTCTCTCTGCCG
ACGTCAACGTTTCGTCTTGTTTCAGTCACTCCGCAAGTCTATTAAAGCCAGCGTCAACTTCGCCCTCCC
TCCCTGCAGCCGTGAACAAGAAACGAGTGATTCAAAGGCCGTCTTCGATGAGCTCGTAGCCTTGG
TCAACCCACATGCAGAGCCATTTTCGCCCTAAGAAAGGCCGATCAAATGTCATCATGTTTCGTCCGGTC
TGCAGGGTGCAGGTAAAACGACAACCTGTACCAAGCTTGCCCGACACTATCAAATGCGCGGGTTCA
AGACGGCCCTCGTTTTGTGCAGACACTTTTTTCGAGCTGGTGCTTTTCGATCAACTGAAGCAGAACGCGA
CAAAGCTAAGATTCCGTACTACGGTAGCTTAACACAAACCGACCCGGCTGTCGTAGCAGCAGAGG
GTGTAGCCAAATTCAAGAAGGAGCGATTTGAGATTATTATTGTTGATACTAGTGGTTCGTACACAAGC
AGGAAGAACAGCTGTTTTACGGAAATGACCCAAATCCAGACGGCGGTGACGCCTGACCAGACTATTC
TTGTGCTTGATGGAACAATTGGACAAGCCGCGGAGGTGCAATCCTTCGGCCTTTAAAGCCACTGCAG
ATTTTGGAGCTATCATAATCACAAAGACCGATGGTTCATGCAGCAGGTGGAGGTGCTATCTCTGCAG
TCGCAGCCACTCATAACCCCTATTATCTTTCTTGAACTGGTGAGCATATGATGGATTTGGAGCGTT
TCGAACCCAAAGCATTATCCAGAAGCTTCTTGGTATGGGTGACATGGCGGGCTTAGTCGAGCAGC
TTCAGGCCGTAACGAAGGACTCAGCCGCTGCCAAGGAAACCTACAAGCATATCGCTGAAGTATTT
ATACCCTCCGCGACTTCCGCGAAAACATTACATCAATCATGAAGATGGGCCCGCTGTCAAAGCTTT
CCGGTATGATCCCTGGCTTGTCAAATCTTACCGCCGGCTTGACGATGAGGACGGCTCCATGAAAC
TGCGCCGATGATCTATATATTTGACAGCATGTCAGCCGTGCAATTGGACAGCAGCGGCAAGATCT
TTGACACACAGCCGAGCCGAATGGTTTCGTATTGCCCATGGTAGCGGCACCTCAGTGCAGCAAGTTG
AGGATCTCCTGTACAAACCCGCATGATGGCCGGGATGGCGAAGCGTGTCCGGTGGCCAGAAGAAGC
AAATGCAACGAGCACAGAATATGCTCAAGGGTGGCAACAAGGATCAACAGCTTGCTGCTATGCAGA
AGCGGATGGCCTCGATGGGTGGAGCTGGTGGCATGGGCGGCATGCCCCGGAATGGGCGATATGGCGA

AGATGATGCAGATGCTGCAGGGCCAAGGCCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGTGGTGGTGGTGGGCTGC
CAGGTCTTGGTGGGATGGACTTGCAGTCGATGATGAGCCAGATGAGCGGGTTGATGGGCGGTATGG
GAGGTGGTGGAAGGGGACGGGGACGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCTCGAGTGCG

Referencias:

En negrita secuencia codificante de *srpA* sin codón de terminación

Con fondo celeste: sitio de corte para *NcoI*

En letra rosada y subrayado: sitio de corte para *XhoI*

Subrayado: cebadores “nested”, de la siguiente forma:

SRP54HisNcof

5' ATACCATGGTTCTTCAGGATCTAGGG 3'

SRP54HisXhor

5'

CGCACTCGAGGCTGCCGCGCGGCACCAGCCGTCCCCGTCCCCTTC

3'

Ligación de la secuencia de interés al vector pET-28a

Configuración con “tag” de histidinas en extremo N-terminal

Ligación:

CCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCTCTAGAAATAA
TTTTGTTTAACTTTAAGAGGAGATATAACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCAGCAGC
GGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGTTCTTCAGGATCTAGGGCGGGCAATCAAC
GCCGCCGTCAATGACTTGACTCGGTCACCTAATCTGGACGAAAAGGCCTTCGAAGAGATGCTAAAG
GAGATCTGCGCCGCCCTTCTCTCTGCCGACGTCAACGTTCTGTTTTCAGTCACTCCGCAAGTCT
ATTAAGCCAGCGTCAACTTCGCCTCCCTCCCTGCAGCCGTGAACAAGAAACGAGTGATTCAAAG
GCCGTCTTCGATGAGCTCGTAGCCTTGGTCAACCCACATGCAGAGCCATTTGCCCTAAGAAAGGC

CGATCAAATGTCATCATGTTTCGTCCGGTCTGCAGGGTGCAGGTAAAAACGACAACCTGTACCAAGCTT
GCCCCGACACTATCAAATGCGCGGGTTCAAGACGGCCCTCGTTTGTGCAGACACTTTTCGAGCTGGT
GCTTTTCGATCAACTGAAGCAGAACGCGACAAAAGCTAAGATTCCGTAACGCTAGCTTAACACAA
ACCGACCCGGCTGTTCGTAGCAGCAGAGGGTGTAGCCAAAATCAAGAAGGAGCGATTTGAGATTATT
ATTGTTGATACTAGTGGTCGTCACAAGCAGGAAGAAGCAGCTGTTTACGGAAATGACCCAAATCCAG
ACGGCGGTGACGCCTGACCAGACTATTCTTGTGCTTGATGGAACAATTGGACAAGCCGCGGAGGTG
CAATCCTCGGCCTTTAAAGCCACTGCAGATTTTGGAGCTATCATAATCACAAAGACCGATGGTCAT
GCAGCAGGTGGAGGTGCTATCTCTGCAGTCGCAGCCACTCATAACCCTATTATCTTTCTTGGAACT
GGTGAGCATATGATGGATTTGGAGCGTTTCGAACCCAAAAGCATTTATCCAGAAGCTTCTTGGTATG
GGTGACATGGCGGGCTTAGTCGAGCACGTTTCAGCCGTAACGAAGGACTCAGCCGCTGCCAAGGAA
ACCTACAAGCATATCGCTGAAGGTATTTATACCCTCCGCGACTTCCGCGAAAACATTACATCAATC
ATGAAGATGGGCCCCGCTGTCAAAGCTTTCCGGTATGATCCCTGGCTTGTCAAAATCTTACCGCCGGC
CTTGACGATGAGGACGGCTCCATGAAACTGCGCCGCATGATCTATATATTTGACAGCATGTCAGCC
GTCGAATTGGACAGCGACGGCAAGATCTTTGACACACAGCCGAGCCGAATGGTTTCGTATTGCCCAT
GGTAGCGCACTTCAGTGCAGCAAGTTGAGGATCTCCTGTCACAACACCCGCATGATGGCCGGGATG
GCGAAGCGTGTCGGTGGCCAGAAGAAGCAAATGCAACGAGCACAGAATATGCTCAAGGGTGGCAAC
AAGGATCAACAGCTTGCTGCTATGCAGAAGCGGATGGCCCTCGATGGGTGGAGCTGGTGGCATGGGC
GGCATGCCCGGAATGGGCGATATGGCGAAGATGATGCAGATGCTGCAGGGCCAAGGCGGCGGCGGC
GGCGGCGGCGGTGGTGGTGGTGGGCTGCCAGGTCTTGGTGGGATGGACTTGCAGTCGATGATGAGC
CAGATGAGCGGGTTGATGGGCGGTATGGGAGGTGGTGGAAAGGGGACGGGGACGGTAGCTCGAG

Referencias:

Con fondo naranja: Promotor T7

Con fondo celeste: operador *lac*.

Con fondo rojo: Ribosome Binding Site (RBS).

Con fondo azul: His-Tag (6xHis).

Con fondo gris: Sitio de corte de Trombina.

Con fondo verde: codón de inicio de *srpA*

Con fondo amarillo: codón de terminación

En letra azul y subrayado: sitio de corte para *NheI*

En letra rosada y subrayado: sitio de corte para *XhoI*