

Facultad de Ciencias – UDELAR  
Licenciatura en Bioquímica  
Tesina de grado  
Agosto 2013

Puesta a punto de un sistema de  
transcripción *in vitro* para evaluar  
mutantes sinónimos del gen *ureA* de  
*Aspergillus nidulans*

Lucia Colella Ortiz  
Tutora: Dra. Ana Ramón  
Co-tutor: Lic. Manuel Sanguinetti  
Sección Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias, UdelaR

## Resumen

Los mecanismos moleculares que determinan la estructura que adopta una proteína en la célula aún no se comprenden completamente. Entre éstos, se ha propuesto que la modulación de la velocidad local de traducción de una proteína, y en particular ciertas pausas relativas durante la biosíntesis, podría favorecer el plegamiento parcial del polipéptido naciente afectando la estructura terciaria final de la proteína.

En un determinado organismo existen codones de uso más frecuente que otros. Aquellos codones que se usan más frecuentemente presentan una alta concentración de sus correspondientes tRNAs y están vinculados a genes de alta expresión, presentando una alta velocidad de traducción. Por otra parte, aquellos codones de utilización menos frecuente presentan una baja concentración de sus correspondientes tRNAs y están vinculados a genes de baja expresión.

En el marco del estudio de los mecanismos que actúan en el establecimiento de la conformación nativa de las proteínas de membrana, se busca elucidar si el uso diferencial de codones tiene algún efecto en la cinética local de traducción, y de ser así, si ésta afecta el establecimiento de la estructura y función de las proteínas de membrana. En el presente trabajo, utilizando como modelo el gen que codifica para el transportador de urea, *ureA*, del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, se intentará realizar la puesta a punto de un sistema de transcripción *in vitro* con la finalidad de generar transcritos de *ureA* que portan mutaciones sinónimas de codones seleccionados. Los mismos se utilizarán posteriormente como molde en ensayos de traducción *in vitro* para evaluar los efectos de estas mutaciones.

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Ampi	Ampicilina
BrEt	Bromuro de Etidio
dNTPs	2-Desoxinucleótidos 5'trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
Kb	Kilobases
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
TE	Buffer Tris EDTA
UV	Ultravioleta
RF-cloning	Restriction Free cloning

# 1. Introducción

El plegamiento de las proteínas en estructuras tridimensionales, altamente variadas, está gobernada principalmente por la composición aminoacídica de la misma [1]. Sin embargo, hoy en día se conoce que éste no sería el único determinante de la estructura terciaria de las proteínas, sino que también influirían otros factores como por ejemplo la velocidad de traducción.

Las secuencias de ADN codificadoras de proteínas pueden poseer mutaciones silenciosas o sinónimas en codones específicos. Éstas consisten en un cambio de un nucleótido por otro en la secuencia, pero este cambio no altera el aminoácido codificado. De esta manera no se afecta la secuencia de la proteína resultante [2]. Debido a que el código genético es “redundante”, un aminoácido puede estar codificado por más de un codón [5]. Cuando la degeneración del código genético fue descubierta, no se tardó en estudiar el rol y las consecuencias que traían estas mutaciones sinónimas a la proteína resultante. A pesar de la universalidad del código genético y que la maquinaria encargada de la traducción es conservada en casi todas las especies, se observó que la frecuencia en el uso de codones varía mucho entre distintos organismos [6]. A pesar de que se pensaba que estos cambios no causaban ningún efecto sobre la función que cumple la proteína dentro de la célula, estos codones sinónimos no son usados con la misma frecuencia dentro o entre distintos genomas [3]. En diversas publicaciones se ha demostrado que el uso diferencial de codones es crucial para determinar los niveles de expresión de un gen y la función celular, dado que son afectados diversos procesos, como el procesamiento del ARN para la traducción de la proteína así como también el plegamiento de las mismas [2, 4, 5], afectando tanto la funcionalidad como la localización subcelular de éstas. El uso preferencial de algunos codones con respecto a otros es característico de cada genoma, y se mantiene por el balance entre la selección, mutación y la deriva génica [4].

Se ha descrito que el uso diferencial de codones sinónimos, en organismos tan diversos como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, así como también en *Drosophila melanogaster*, está relacionado con los niveles de expresión del gen dentro de un organismo [3]. En todos los organismos se encuentran distintas especies de tRNA que codifican para un mismo aminoácido, y la velocidad con que los ribosomas descifran el codón depende de la concentración celular del tRNA que lo reconoce [2,3]. Existen codones de uso más frecuente que otros en un determinado organismo. Aquellos codones que se usan más frecuentemente se conocen como **codones rápidos** u **óptimos**, presentan una alta concentración de sus correspondientes tRNAs y están asociados a genes de alta expresión, presentando una alta velocidad de traducción. Por otra parte, aquellos codones que se usan con menor frecuencia, conocidos como **codones lentos** o **raros**, presentan una baja concentración de sus correspondientes tRNAs y están asociados a genes de baja expresión. Apoyando esto, genes que son expresados a niveles similares tienden a usar el mismo grupo de codones [3]. Los genes con alto nivel de expresión, como los genes ribosomales o factores de elongación de la traducción [7], tienden a usar un conjunto de codones que generalmente coinciden con los tRNA más abundantes en la célula [5]. En genes con bajo nivel de expresión este conjunto de codones “óptimos” aparecen con baja frecuencia, y aparentemente el uso de codones en este tipo de genes estaría más influenciado por mutaciones al azar [8]. Se cree que el uso preferencial de un codón sobre otro y las poblaciones de tRNA presentes en la célula que reconocen estos codones han evolucionado no solo para optimizar la expresión génica, sino también para regularla [2,3].

Este fenómeno del uso diferencial de los codones sinónimos sería crítico para regular la expresión génica y la función celular a través de efectos sobre distintos procesos, como el procesamiento del ARN y el plegamiento de proteínas [2]; Se ha encontrado que repetidos de codones rápidos o lentos en muchos casos están relacionados a determinadas estructuras proteicas. También se demostró que en algunas especies como la bacteria gram negativa *Thermus thermophilus*, el uso de un tipo de codones en particular puede incrementar la expresión de un gen en más de 1000 veces [2]. En los últimos tiempos, se ha vuelto evidente que el uso de un grupo específico de codones puede ser una estrategia para optimizar la eficiencia de la síntesis de determinadas proteínas [3]. Dentro de un mismo gen existen zonas con diferentes patrones de uso de codones, y esto parece ser importante para el control de la velocidad del ribosoma y la eficiencia de la traducción. [3].

Numerosos estudios indican que la velocidad de traducción, a lo largo de algunos transcritos puede ser crítica para la formación de la estructura nativa de la proteína [3]. Se han identificado pausas durante la traducción de determinadas proteínas y en muchos casos estas pausas parecen estar causadas por una estructura secundaria particular del mRNA. Esta estructura podría ser necesaria para el correcto plegamiento del polipéptido nascente [3]. Estas observaciones apoyan la teoría de un plegamiento co-traducciona de proteínas y remarca la importancia de la secuencia del mRNA y el uso diferencial de codones para la estructura proteica. Por esto, las mutaciones sinónimas pueden traer consecuencias en el proceso de plegamiento de una proteína nascente, y cambiar, por ejemplo, el sustrato específico de una enzima [3].

En estudios recientes se han descrito casos en que dos proteínas con una secuencia aminoacídica muy similar pero diferente secuencia genómica tienen diferentes roles en la célula [9]. Este es el caso de la  $\alpha$  y  $\beta$ -actina, proteínas del citoesqueleto de mamíferos, cuyas secuencias aminoacídicas tienen un 98% de homología. Mientras que la  $\alpha$ -actina le proporciona estabilidad morfológica y soporte a la célula, la  $\beta$ -actina está relacionada al movimiento migratorio de la célula (su rápida polimerización “empuja” a la célula adelante). Lo que diferencia a estas dos proteínas es su estabilidad. La  $\alpha$ -actina es menos estable, y se cree que esto se debe al uso diferencial de codones entre estas isoformas. La región amino terminal del gen que codifica a la  $\alpha$ -actina contiene una mayor frecuencia de codones lentos, que disminuyen la velocidad de traducción. La misma región del gen que codifica para la  $\beta$ -actina utiliza codones rápidos para codificar los mismos aminoácidos. Este uso diferencial de codones parece ser lo que determina estructuras diferentes, provocando que una lisina (Lys) que se encuentra en ambas proteínas, en la  $\beta$ -actina se encuentra en el interior de la proteína plegada y en la  $\alpha$ -actina se encuentra expuesta al medio. Esta diferencia en la ubicación de la Lys entre ambas isoformas, hace que la Lys de la  $\alpha$ -actina se encuentre más expuesta a la ubiquitinación, marcando a la  $\alpha$ -actina para su degradación por el proteosoma. Se cree que la diferencia en la utilización de codones es lo que lleva a que la  $\beta$ -actina sea traducida de forma más rápida que la  $\alpha$ -actina, lo que resulta en un rápido plegamiento y procesamiento co-traducciona, que influye en la exposición diferencial de la Lys en ambas isoformas [9].

Mediante estrategias de mutagenesis dirigida, ha sido posible sustituir codones rápidos por lentos y viceversa, pudiendo así en teoría afectar en muchos casos la cinética de plegamiento y con ello la estructura, funcionalidad y localización de las proteínas. Para varias proteínas tanto procariontas como eucariotas (ej. cloranfenicol acetil transferasa de *Escherichia coli* [6], la antranilato sintasa /indolglicerol-fosfato sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* [10] y la proteína de unión a ácidos grasos de *Echinococcus granulosus* [11], entre otras), se pudo demostrar que la introducción de mutaciones sinónimas puede

causar una disminución en la actividad específica de la proteína, pudiendo ésta considerarse como indicativo de su correcto plegado. A partir de esto se puede concluir que al menos una fracción del polipéptido mutante tiene una estructura aberrante.

Las proteínas de membrana eucariotas constituyen un caso particular, donde el plegamiento va acompañado de la inserción co-traduccional en la membrana del retículo endoplásmico, previo a su entrada en la vía secretoria para alcanzar su destino final en la membrana. Poco se conoce de la relación entre la aparición de mutaciones sinónimas en proteínas de membrana y las consecuencias que traen sobre la síntesis de las mismas. Esto supone además una posible relación entre el plegamiento y funcionamiento proteico y la génesis de enfermedades y afecciones. Algunos estudios que han aportado a tal propósito en forma preliminar son los que refieren a la fibrosis quística, enfermedad causada por una deficiencia en el canal de iones cloruro ubicado en la membrana apical de células epiteliales (también conocido como Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator o CFTR). Se descubrió que en pacientes que portan un fenotipo característico de la enfermedad, se encuentran mutaciones sinónimas en el gen *CFTR*, aunque todavía no se han podido establecer claros vínculos entre estas mutaciones y la virulencia de la enfermedad [12, 13 y 14]. Cabe destacar que en otro estudio bioinformático realizado sobre esta proteína (en la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias), tomando las secuencias génicas de las CFTRs de 10 mamíferos placentados, se encontró que éstas presentaban una conservación respecto a agrupamientos enriquecidos en codones raros y óptimos también, concluyéndose entonces que éstos podrían tener una implicancia funcional, ya que se propone que al verse afectada la velocidad de traducción no se realizaría una adecuada inserción de la proteína en la membrana y un correcto plegamiento de sus motivos, siendo ambos eventos imprescindibles para el adecuado funcionamiento del CFTR [Pizzo, Iriarte y Marín, sin publicar].

Es interesante también lo que ocurre con el receptor de membrana MDR1 (Multidrug Resistance Receptor 1) humano, una glicoproteína P que participa en el transporte de distintas drogas. Un alelo natural del gen MDR1, caracterizado por una mutación sinónima (en este caso la sustitución de un codón rápido por uno sinónimo lento), afectaría el tiempo en el que se pliega la proteína de manera cotraducciona y la inserción de la glicoproteína p en la membrana. Se vio que este cambio altera la especificidad de la glicoproteína por sus sustratos, así como también la sensibilidad frente a compuestos inhibidores. Se ha vinculado este alelo con la resistencia a distintas drogas, siendo especialmente importantes las drogas empleadas en el tratamiento contra el cáncer [10].

Nuestro trabajo apunta a aportar al conocimiento de los diferentes mecanismos que actúan en el establecimiento de la conformación nativa de las proteínas de membrana. En particular se busca estudiar la importancia de la cinética local de traducción, determinada por el uso de codones. Para eso, en el presente trabajo se intentará realizar la puesta a punto de un sistema de transcripción *in vitro* con la intención de generar transcritos de *ureA* (gen que codifica para el transportador de urea, UreA, en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*), que portan mutaciones sinónimas de codones seleccionados. Los mismos se utilizarán como molde en posteriores ensayos de traducción *in vitro*.

## 1.1- Presentación del modelo utilizado

El género *Aspergillus* está constituido por más de 200 miembros [5]. *A. nidulans* es un hongo filamentoso homotático y saprofita perteneciente a este grupo. Fue adoptado como modelo hace más de 50 años, y es utilizado para estudios en el área de la genética y la biología celular y molecular [16]. Numerosos trabajos con *A. nidulans* han dado lugar a importantes avances en la comprensión de, por ejemplo, la regulación metabólica, funciones del citoesqueleto, mitosis y ciclo celular [16]. Es un organismo excelente para el trabajo en laboratorio, por su fácil y segura manipulación. Crece rápidamente, sus requerimientos nutricionales son simples y es capaz de metabolizar gran cantidad de compuestos [17]. Es especialmente adecuado para realizar ensayos de crecimiento en placas de Petri, que permiten detectar con gran sensibilidad fenotipos intermedios de crecimiento, inferiores al del tipo salvaje, característicos, por ejemplo, de mutantes de transportadores. La posibilidad de transformar protoplastos con alta eficiencia permite clonar genes por complementación, sobre-exresar genes, expresar proteínas mutantes y genes heterólogos. Por otra parte, este hongo presenta una alta tasa de recombinación homóloga lo que permite realizar reemplazos génicos e inactivar genes.

El genoma de *A. nidulans* comprende 31 Mb y está organizado en 8 cromosomas con una estructura similar a la de los eucariotas superiores [16,17].

El primer estudio sobre el uso de codones en *A. nidulans* fue publicado en 1991 por Lloyd y Sharp [18] analizando la secuencia de 45 genes en relación a la tasa de expresión de los mismos. Sus resultados revelaron que, al igual que en otros organismos, los genes con un alto nivel de expresión presentan un uso de un grupo de aproximadamente 19-20 codones "óptimos" [5]. A partir del conocimiento de la secuencia completa del genoma de *A. nidulans* y de otras especies del género, recientemente se realizó un estudio más completo del uso de codones en este grupo [8]. A partir de éste, se encontró un alto número de codones que poseen C en la tercera posición, de modo que para cada aminoácido que presenta un codón que termina con la base C, este es el codón más frecuente. Para los aminoácidos con codones que terminan con purinas, el codón que termina con la base G es el que se usa más frecuentemente. A su vez, el grupo de codones usados con más frecuencia parece estar relacionado con el nivel de expresión del gen [8].

El nitrógeno es uno de los elementos fundamentales que los organismos vivos, como los hongos, deben obtener del ambiente que los rodea. *A. nidulans* obtiene sus nutrientes a partir de desechos orgánicos, por lo que es un microorganismo saprofita. Las fuentes de nitrógeno más comúnmente encontradas en la naturaleza son el amonio, los iones nitrito y nitrato, como también compuestos orgánicos nitrogenados como los aminoácidos y nucleótidos. También es capaz de utilizar todas las purinas (adenina, guanina, hipoxantina, xantina, ácido úrico) y sus metabolitos (urea) como fuente de nitrógeno. La urea es un metabolito que deriva de la vía de degradación de las purinas, y que puede ser utilizado por *A. nidulans* como fuente de nitrógeno. Asimismo, la urea puede ser transportada desde el exterior de la célula a través de dos sistemas de captación distintos, uno de baja afinidad y otro de alta afinidad [17]

UreA es una permeasa específica de urea, que fue identificada como miembro de la familia de los simportadores de sodio, con la particularidad de que el mecanismo de transporte involucra el cotransporte de H<sup>+</sup> en lugar de Na<sup>+</sup> [19]. Este transportador está implicado en el transporte de alta afinidad de urea en la célula, así como también permite

la entrada del análogo tóxico de este compuesto, 2-tiourea.

Un estudio realizado en nuestro laboratorio [Sanguinetti, et al; sin publicar] del uso de codones en el gen *ureA* y sus ortólogos en otras especies de *Aspergillus* permitió identificar, entre otros codones conservados, un par de codones poco frecuentes (codones 24-25 en *A. nidulans*), ubicados según predicciones bioinformáticas ((TMHMM, [www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)) en el extremo N-terminal, que codifican aminoácidos que se disponen hacia el exterior de la membrana y que se predicen justo antes de la primera hélice transmembrana. El cambio de este par de codones lentos por codones sinónimos rápidos, provoca un defecto en el crecimiento a 37°C. Dicho mutante 24-25 denominado *ureA24-25*, tiene un crecimiento normal a 25°C, mientras que a temperaturas mayores como 37°C tiene un defecto en el crecimiento cuando se utiliza urea como fuente de nitrógeno y una mayor resistencia a la 2-tiourea. Nuestra hipótesis es que este par de codones lentos podría determinar una pausa importante para el correcto plegamiento del transportador, su direccionamiento al retículo endoplasmático o el tráfico hacia la membrana, y por lo tanto la funcionalidad del mismo. El cambio de estos codones podría estar causando la eliminación de una pausa traduccional, por lo que podría influir en todos los procesos nombrados anteriormente. También, se ha visto que no hay diferencia en los niveles de transcritos y según predicciones bioinformáticas (<http://mfold.rna.albany.edu>) tampoco en la estructura general del transcripto.

Para poner en evidencia la existencia de esta pausa, en este trabajo se llevó a cabo la puesta a punto de un ensayo de transcripción *in vitro* que permite generar transcritos que serán utilizados luego como molde para llevar posteriormente a cabo un ensayo de traducción *in vitro*.

## 1.2- Transcripción *in vitro*

### **1.2.1- Transcripción en eucariotas**

La transcripción del ADN es el primer proceso de la expresión génica, mediante el cual se transfiere la información contenida en un segmento de ADN de doble cadena en una cadena de ARN con una secuencia de bases complementaria a una de las cadenas del ADN. La transcripción es un proceso selectivo, en el cual solo son transcritos genes o grupos de genes determinados, dependiendo de las necesidades de la célula en diferentes momentos. Secuencias reguladoras indican el principio y el fin de los segmentos de ADN que han de ser transcritos y designan que cadena del DNA se utiliza como molde [20,21].

El proceso de transcripción se lleva a cabo mediante una enzima llamada **ARN polimerasa dependiente de ADN**, que es la encargada de sintetizar ARN mensajero que mantiene la información contenida en la secuencia de ADN. Esta enzima requiere, ADN para su actividad, siendo aun más activa con un molde de ADN bicatenario, y los cuatro ribonucleósidos 5'-trifosfato (ATP, GTP, UTP y CTP) como precursores de las unidades nucleótidas del ARN [20]. La ARN polimerasa elonga una cadena de ARN por adición de ribonucleótidos al extremo 3'-hidroxilo de la cadena de ARN y sintetiza el ARN en dirección 5'-3'.

El proceso de transcripción puede dividirse en diferentes etapas: iniciación, elongación y terminación [21]. El inicio de la síntesis de RNA se produce cuando la ARN polimerasa junto con factores de iniciación se une a secuencias específicas del DNA denominadas **promotores**, las cuales dirigen la transcripción del segmento adyacente del DNA. La elección del promotor determina que segmento del ADN se transcribe y es un paso fundamental sobre el que se impone regulación. Una vez formado, el complejo polimerasa-promotor sufre una serie de cambios estructurales necesarios para que se continúe con la iniciación. En primera instancia, la polimerasa se une al promotor y forma sucesivamente un complejo cerrado, en el cual el DNA se encuentra intacto, y un complejo abierto, en el ADN se desenrolla alrededor del punto donde se iniciara la transcripción, formando una “burbuja” de transcripción de ADN monocatenario [21].

Una vez que la ARN polimerasa sintetizó un segmento corto de ARN, de alrededor de 10 nucleótidos, se entra en la fase de elongación. Para que ocurra esta transición se necesita que la polimerasa sufra cambios conformacionales adicionales que conducen a su adherencia más firme al molde. Durante esta etapa la actividad de la polimerasa esta muy potenciada por proteínas denominadas factores de elongación. En la fase de elongación la enzima cumple múltiples tareas, además de catalizar la síntesis del ARN. Desenrolla el ADN por delante y lo renaturaliza por detrás a medida que se mueve a lo largo del molde, disocia del molde la cadena de ARN en crecimiento conforme avanza y cumple funciones de revisión. Durante la elongación, solo 8 o 9 nucleótidos del extremo en crecimiento de la nueva cadena de ARN se aparea temporalmente con el ADN molde para formar una doble hélice híbrida ARN-ADN. El ARN en ese duplex híbrido se separa poco después de su formación y se restablece el duplex de ADN [20,21].

Después que la polimerasa transcribió el gen por completo, tiene que detenerse y liberar el producto de ARN. Este paso se denomina terminación. Las secuencias denominadas terminadores desencadenan la disociación de la ARN polimerasa del ADN y la liberación de la cadena de ARN que produjo. Estas secuencias son ricas en guanina y citosina, situadas en el extremo 3' de los genes, seguida de secuencias ricas en timina, formando secuencias **palindrómicas**, que cuando se transcriben el ARN recién sintetizado adopta una estructura en “horquilla” que desestabiliza el complejo ARN-ADN. Esto es lo que determina la separación de la ARN polimerasa y desaparece la burbuja de transcripción [21].

### **1.2.2- Características del kit de traducción *in vitro* utilizado en el presente trabajo**

La técnica de transcripción *in vitro* se ha convertido en una herramienta muy utilizada para investigaciones en el área de la biología molecular, así como en la bioquímica en general [22].

La transcripción es un proceso que se da en todos los organismos, tanto procariotas como eucariotas, en el cual la ARN polimerasa dirige la producción de ARN utilizando ADN como molde. La transcripción *in vitro* se asemeja a lo que sucede en una célula *in vivo*, ya que utiliza los mismos componentes esenciales de este proceso. El kit de transcripción *in vitro* de Promega (“*T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System*”), empleado en el presente trabajo, se caracteriza por utilizar para este propósito una enzima ARN polimerasa dependiente de ADN proveniente de un bacteriófago. Las enzimas fágicas SP6, T3 y T4 RNA polimerasa son las más empleadas para la producción de ARN sintético, el cual luego puede ser utilizado para una gran variedad de aplicaciones, como por ejemplo en la técnica de traducción *in vitro*, síntesis del tRNA, rRNA y otros pequeños RNAs funcionales, genomas de virus de ARN y ribozimas, y para la producción de

sustratos para el estudio de empalme de ARN, de la estructura secundaria del ARN, etc. El kit “T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System” se diferencia de otros kits de transcripción *in vitro* convencionales principalmente en que puede utilizarse especialmente para la síntesis de ARN de gran tamaño (de alrededor de 27Kb) y en que produce miligramos de éstos en un corto periodo de tiempo (tan solo 30 minutos, en lugar de las 2 a 4 horas requeridas por otros sistemas).

Para poder llevar a cabo la reacción de transcripción *in vitro* los componentes que se deben utilizar, y que el kit provee son: “T7 Express” (mezcla de enzimas que incluyen: ARN Polimerasa T7, Inhibidor de ribonucleasas recombinante (RNasin) y Pirofosfatasa recombinante, el buffer “RiboMAX™ Express T7 2X”, DNAsa (RQ1) libre de RNAsa (para eliminar la plantilla utilizada después de terminada la transcripción), molde para el control positivo pGEM Express, Acetato de sodio 3M y agua libre de nucleasas. El ADN molde que se utiliza para la transcripción *in vitro* debe codificar para el promotor reconocido por la enzima utilizada en la reacción, el sitio de reconocimiento ribosomal, así como la cola poli-T común en todos los transcritos. Todos estos componentes son fundamentales para el uso correcto del sistema de transcripción *in vitro*.

### **1.2.3- ¿Cuáles son las fallas más comunes en las reacciones de la técnica de transcripción *in vitro*?**

Las fallas en las reacciones de transcripción *in vitro* resultan en el fracaso en la generación de transcrito o la obtención de transcritos más largos o más cortos de lo esperado [23]. Las causas más comunes de estos problemas son:

**Fracaso total en la obtención de transcritos:** muchos factores pueden causar errores en el proceso de transcripción *in vitro* que hacen que esta técnica falle, como por ejemplo:

- Molde de mala calidad: Mientras que el ADN preparado utilizando la técnica estándar de minipreparaciones es generalmente de buena calidad, la presencia de contaminantes como por ejemplo, etanol o sales pueden llevar a la inhibición la reacción. La precipitación con etanol del molde es generalmente suficiente para resolver este problema.
- Linealización incorrecta del plásmido: La plantilla de ADN utilizada debe ser previamente linealizada antes de realizarse la técnica de transcripción *in vitro* para producir transcritos de ARN de longitud definida. La secuencia o mapa de restricción del molde debe ser verificada.
- Contaminación con RNasa: las RNasa pueden ser arrastradas del procedimiento de purificación de plásmido o inadvertidamente introducido por el investigador. Se sugiere utilizar un inhibidor de RNasa en todas las reacciones de transcripción *in vitro*.

**Transcripciones incompletas:** Un gran número de factores puede llevar a la producción de transcritos de tamaño más corto que lo esperado. Estos incluyen:

- Plásmido linealizado de forma incorrecta: La secuencia o mapa de restricción del molde debe ser verificada.
- Concentración de nucleótidos limitante: La concentración de nucleótidos no debe ser  $< 12\mu\text{M}$  y puede elevarse a 20-50  $\mu\text{M}$ .
- Terminación prematura en moldes ricos en G/C: La reducción de la temperatura de reacción puede incrementar la proporción de transcritos de correcto tamaño.

**Transcriptos más largos de lo esperado:** Hay varias razones por las que un transcripto obtenido *in vitro* puede ser más largo de lo esperado, como por ejemplo:

- Plásmido linealizado de forma incorrecta: La secuencia o mapa de restricción del molde debe ser verificada.
- Linealización incompleta del plásmido utilizado como plantilla: La correcta linealización del molde debe ser verificado en un gel de agarosa para verificar que la digestión ha ocurrido completamente. Muchas veces es aconsejable la purificación por gel del plásmido linealizado.
- Plantilla con extremos romos en 3': La plantilla debe tener extremos romos en 5'.

En este trabajo se llevo a cabo la puesta a punto de un sistema de transcripción *in vitro*, con la finalidad de obtener transcriptos de *ureA* que porten mutaciones sinónimas. Estos transcriptos, a futuro, se utilizarán como molde para llevar a cabo los estudios de la cinética de traducción del gen portador de mutaciones sinónimas.

## 2. Objetivos del presente trabajo

### 2.1- Objetivo general

Con miras a evaluar la cinética local de traducción de mensajeros de *ureA* que portan mutaciones sinónimas mediante un sistema de traducción *in vitro*, se llevará a cabo la puesta a punto de un sistema de transcripción *in vitro* para generar transcriptos molde para esos ensayos.

### 2.2- Objetivos específicos

1- Obtención de construcciones génicas para la eliminación de intrones del gen *ureA* en sus versiones salvaje y *ureA24-25*, utilizando para este propósito la técnica de Fusion-PCR [24]. Estas construcciones serán utilizadas como molde en ensayos de transcripción *in vitro*.

2 – Clonado de estas construcciones mediante la técnica de RF-cloning [25]. Los plásmidos resultantes serán utilizados como molde para PCR con cebadores con las secuencias necesarias para la transcripción *in vitro* y para la generación de cepas portadoras de *ureA* salvaje y *ureA24-25* sin intrones.

3- Puesta a punto del ensayo de transcripción *in vitro* de los genes mencionados con el fin de obtener el ARN mensajero molde para posteriores ensayos de traducción *in vitro*.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1- Manipulación de *Aspergillus nidulans*

##### 3.1.1- Cepas utilizadas y generadas en el presente trabajo

Cepa	Genotipo
MVD 10A	<i>ureA::gfp::AFpyrG riboB2 pyrG89 pyroA4 Δnku::argB</i>
MVD 2425	<i>yA2 ureA2425::gfp::AFpyrG pyrG89 pyroA4 riboB2 ΔnkuA::argB</i>

##### - Descripción de los genotipos y fenotipos

- *yA2* es una mutación de pérdida de función del gen que codifica la lacasa conidial que ocasiona la producción de conidias amarillas.
- *riboB2* y *pyroA4* son alelos responsables de las auxotrofías para la riboflavina (vitamina B2) y piridoxina respectivamente.
- *ΔureA::riboB* la secuencia genómica del gen *ureA* fue deletada por sustitución por el gen *riboB*, el cual suplementa la auxotrofia para la riboflavina (Vitamina B2).
- *pyrG89* es un alelo del gen que codifica para la orotidina 5'fosfato carboxilasa, que provoca la auxotrofia para la uridina y el uracilo.
- *nkuA* gen que codifica para la helicasa de tipo II dependiente de ATP
- *ΔnkuA::argB* indica la sustitución del gen *nkuA* por el gen *argB* el cual codifica para la enzima ornitina carbamil transferasa. El gen *nkuA* es esencial para la recombinación no homóloga, ya que repara las roturas en la doble hebra de ADN. La delección de este gen lleva a un aumento de la tasa de recombinación homóloga facilitando de esta manera la integración al *locus* deseado.
- *AFpyrG* es el gen que codifica para la orotidina 5'-fosfato carboxilasa en *Aspergillus fumigatus*, enzima necesaria para la síntesis de uridina y uracilo.

##### 3.1.2- Medios y condiciones de cultivo

##### - Medios de cultivo

###### Medio mínimo (MM):

20 ml de solución de sales  
10 g de glucosa (dextrosa)

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza con autoclave de 15-20 minutos a 0.8 atmósferas de presión. Este medio debe complementarse con una fuente de nitrógeno

### Medio completo (MC):

20 ml de solución de sales  
10 ml de solución de vitaminas  
10 ml de solución de casaminoácidos  
10 g de glucosa (dextrosa)  
2 g de peptona  
1 g de extracto de levadura

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza por autoclave 15-20 minutos a 0.8 atmósferas de presión.

Dependiendo de las auxotrofías de las cepas a cultivar y del medio utilizado, es necesario agregar a los suplementos nutricionales requeridos para el crecimiento de los mismos.

### Solución de sales:

26 g cloruro de potasio  
26 g magnesio heptahidratado  
76 g fosfato de potasio monobásico  
50 ml solución de elementos traza

Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza por autoclave y luego se agregan 2 ml de cloroformo como conservante.

### Solución de Vitaminas:

50 mg tiamina-HCl (o aneurina)  
10 mg biotina  
100 mg ácido nicotínico  
200 mg pantotenato de calcio  
50 mg pridoxina-HCl  
100 mg riboflavina  
500 mg ácido p-aminobenzoico

Se lleva a un litro con agua destilada y se esteriliza mediante filtración.

### Solución de elementos traza:

40 mg borato de sodio decahidratado  
400 mg sulfato de cobre pentahidratado  
800 mg fosfato ferrico dihidratado  
800 mg sulfato de manganeso dihidratado  
800 mg molibdato de sodio dihidratado  
8 g sulfato de zinc heptahidratado

Se lleva a un litro con agua destilada.

### Solución de casaminoácidos:

150 g caseína hidrolizada

Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza por autoclave de 15-20 minutos a 0.8 atmósferas de presión y se guarda a 4 °C.

### Suplementos nutricionales de *A. nidulans*:

Estas soluciones se preparan 100 veces concentradas (100x) en agua destilada con respecto a la concentración final de trabajo, a no ser que se especifiquen otras condiciones. Se esterilizan por autoclave durante 15-20 minutos a 0.8 atmósferas de presión. y se conservan a 4 °C.

### **- Condiciones de cultivo**

Los cultivos en medio líquido se realizan inoculando el medio con una suspensión de esporas de dos placas que son resuspendidas en 20 ml de 0.1% Tween 80. Se incuba a 25 °C con agitación durante 11-12 horas para la preparación de protoplastos y 20 horas para la extracción de ADN.

Los cultivos en medio sólido en placa de Petri se realizan mediante una inoculación puntual de conidias. Luego se incuba durante 48 horas a 37 °C. Para lograr una placa con crecimiento confluyente se requieren incubar durante 3 a 4 días a 37 °C.

### **3.1.3- Técnicas empleadas en *A. nidulans***

#### **- Extracción de ADN de *A. nidulans***

- Se inocula 400 ml de MM con una suspensión en 15 ml de Tween 80 (0.01%) de esporas de 2 placas de conidias crecidas en MC 3%. Se incuba con agitación por 20 horas a 25-30 °C.
- El micelio obtenido se filtra por blutex, se congela con nitrógeno líquido y se muele con mortero hasta obtener un polvo blanco.
- Se agrega 800 µl de solución de extracción por cada 200 mg de micelio, se homogeneiza bien y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente.
- El ADN se extrae primero con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y luego con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifuga a 2500 g por 10 minutos a temperatura ambiente.
- El sobrenadante final se precipita con dos volúmenes de etanol 95% en presencia de 0.3 M de AcNa y centrifugando 10 minutos a 11600 g.
- El precipitado se lava con EtOH 70%, se seca y se resuspende en 50 µl de buffer Tris-EDTA 10-1.
- Se incuba 30 minutos a 37 °C con RNAsa 10 µg/ml final.
- El ADN se cuantifica por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular de 1 Kb. o por determinación de absorbancia en Nanodrop

#### Soluciones

Solución de extracción: 0.2M TrisHCl (pH 7.5), 1% SDS, 1 mM EDTA.

Buffer Tris-EDTA (TE) 10-1: 10 mM TrisHCl, 1mM EDTA (pH 8)

## 3.2- Puesta a punto de la técnica de transcripción *in vitro*

### **3.2.1- Obtención del molde de ADN para la transcripción: eliminación de intrones de *ureA***

#### **3.2.1a- Amplificación por PCR de regiones exónicas del gen *ureA* en la fusión génica *ureA::gfp::AFpyrG* y en la versión mutante *ureA24-25::gfp::AFpyrG***

Se utilizó como molde 100 ng de ADN genómico de la cepa MVD10A o del mutante MVD2425. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo además:

- 1X Buffer HiFidelity (con Mg<sup>2+</sup>)
- 0.3 mM dNTPs
- 0.3 µM Primers
- 0.5 U Enzima Kapa HiFi (Kapa Biosystems)
- H<sub>2</sub>O mQ c.s.p 25 µL

#### Secuencias de los primers empleados

- Fragmento 1:
  - Ure5-F 5' GAAACCTGGAGCAGTCGAAG 3'
  - UreA cod5'-Rv 5' ATCACCTGGTCCCTAAAGAG 3'
- Fragmento 2:
  - UreA cod5'-Fw 5' GTATCAACATGAGATTATC 3'
  - UreA cod3'-Rv 5' GTTCTTCTATGCATCGGG 3'
- Fragmento 3:
  - UreA cod3'-Fw 5' CGCCACCGTTCAGATCATCTT 3'
  - Ure3-R 5' TCCTTGTCTCAGAAATCGGG 3'

#### Programas de amplificación utilizados:

- Fragmento 1: Una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de: desnaturalización a 98 °C por 20 segundos, hibridación a 61 °C por 15 segundos, elongación a 72 °C por 1.30 minutos y una etapa final de extensión a 72 °C por 5 minutos.
- Fragmento 2: Una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de: desnaturalización a 98 °C por 20 segundos, hibridación a 61 °C por 15 segundos, elongación a 72 °C por 15 segundos y una etapa final de extensión a 72 °C por 5 minutos.
- Fragmento 3: Una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de: desnaturalización a 98 °C por 20 segundos, hibridación a 61 °C por 15 segundos, elongación a 72 °C por 5.30 minutos y una etapa final de extensión a 72 °C por 5 minutos.

### **3.2.1b- Purificación de los fragmentos obtenidos por PCR**

Para la purificación de los fragmentos de ADN obtenidos por los distintos procedimientos descritos en los puntos anteriores, se utilizó el kit de purificación "*Gene Jet Gel Extraction Kit*" de la empresa Fermentas.

### 3.2.1c- Fusión de las regiones exónicas mediante Fusion-PCR

Se utilizan 50 ng de los fragmentos 1, 2 y 3 obtenidos según se describen en las secciones 3.2.1a y b, en una reacción de 25 µl de volumen final conteniendo:

- 1X Buffer HiFidelity (con Mg<sup>2+</sup>)
- 0.3 mM dNTPs
- 0.3 µM Nested Primers (RF-Ure5N y RF-Ure3N)
- 0.5 U Enzima Kapa HiFi (Kapa Biosystems)
- H<sub>2</sub>O mQ c.s.p 25 µL

Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, seguida de 10 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 20 segundos, hibridación a 65 °C por 15 segundos, elongación a 72 °C por 7 minutos, luego 15 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 20 segundos, hibridación a 65 °C por 15 segundos, elongación a 72 °C por 7 minutos ( aumentando 20 segundos en cada ciclo) y una etapa final de extensión de 5 minutos a 72 °C.

Las secuencias de los primers RF-Ure5N y RF-Ure3N son:

- RF-Ure5N  
5' ACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGCACCGATGACAAGGGAGAT 3'
- RF-Ure3N  
5' GAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCACCAATGGATCTGGCACTAAAC 3'  
(Subrayado corresponde a la secuencia del primer que hibrido con el plásmido pBluescript KS, Fermentas)

### 3.2.2- Clonado de las fusiones generadas en 3.2.1c mediante el método de RF-Cloning

#### 3.2.2a- RF-Cloning PCR

Se utilizan 100 ng de las construcciones generada por Fusion-PCR (previamente purificada) como molde para una reacción de 25 µl de volumen final conteniendo además: 20 ng del plásmido pBluescript II KS

- 0.3 mM dNTPs
- 1X Buffer HiFidelity (con Mg<sup>2+</sup>)
- 0.5 U Enzima Kapa HiFi (Kapa Biosystems)
- H<sub>2</sub>O mQ c.s.p 25 µL

Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 20 segundos, hibridación a 65 °C por 15 segundos, elongación a 72 °C por 10.30 minutos y una etapa final de extensión de 10 minutos a 72 °C.

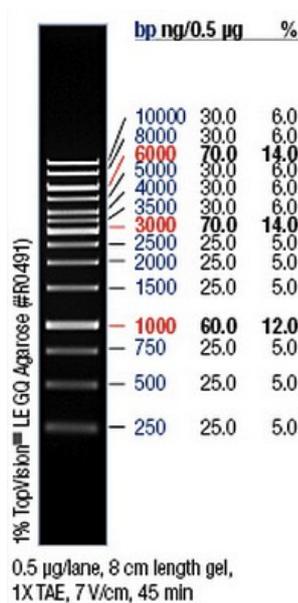
#### 3.2.2b- Digestión con *DpnI*

Después de la clonación mediante la reacción de RF, se trata el producto obtenido con *DpnI* para eliminar el plásmido parental. Se le agrega 1 µl de *DpnI* (20 U/µl) por cada 10 µl de muestra. Luego se incuba a 37 °C durante 2 horas.

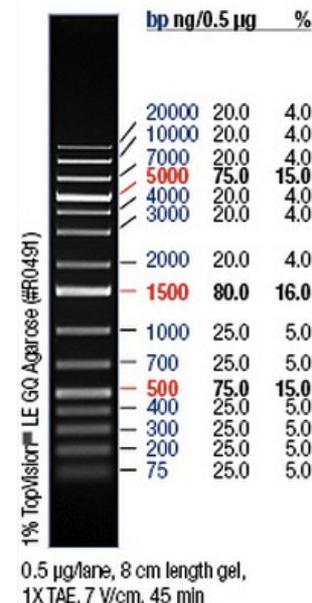
### 3.2.3- Análisis electroforético de los productos de amplificación

Los fragmentos de ADN obtenidos a partir de las técnicas anteriormente especificadas se analizan por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA (pH 8)) con 0.5 µl/ml de bromuro de etidio. Las muestras de ADN se cargan en el gel con la ayuda de un buffer de carga 6X (50% glicerol, 0.02% azul de bromofenol, 0.002% xylencianol). Como referencia de peso molecular se emplearon los marcador de peso molecular 1 Kb y 1 Kb plus DNA Ladder (Fermentas). Las corridas se realizan aplicando un voltaje de 8-9 Volts/cm de gel y el ADN se visualiza por exposición a luz UV de 302 nm.

1 Kb DNA Ladder



1 Kb plus DNA Ladder



## 3.3- Manipulación de *Escherichia coli*

### 3.3.1-Medios de cultivo

Medio LB: 10 g de triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl. Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 7 y se esteriliza en autoclave, mediante calor húmedo, durante 20 minutos a 121 °C.

El medio LB puede ser usado tanto para cultivo líquido como para sólido, agregando 1.5% de agar.

En los casos indicados, se utilizó ampicilina como marcador de selección, ésta se agregó a una concentración de 100 µg/ml. También se utilizó la selección blanco/azul con X-gal e IPTG 1000X.

### 3.3.2- Técnicas empleadas con *E. coli*

Se trabajó con la cepa de *E. coli* denominada DH5- $\alpha$ . Esta cepa posee el siguiente genotipo:

Cepa	Genotipo
DH5 $\alpha$	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), \lambda-$

En esta cepa, *lacZ* $\Delta M15$  permite la selección blanco/azul de células recombinantes en X-gal e IPTG. *recA1* reduce la recombinación homóloga para una inserción más estable.

#### 3.3.2a- Transformación de *E. coli* por el método de choque térmico:

- Se agrega no más de 50 ng de ADN plasmídico (en un volumen máximo de 10  $\mu$ l) a 100  $\mu$ l de células competentes descongeladas en hielo y se mezcla gentilmente.
- Se incuba 20-30 minutos en hielo.
- Luego de un choque térmico de 90 segundos a 42 °C la mezcla se pasa inmediatamente a hielo durante 1-2 minutos.
- Se adicionan 800  $\mu$ l de LB y se incuba a 1 hora a 37 °C con agitación, de forma tal de permitir a la bacteria recuperarse y expresar la resistencia al antibiótico que lleva el plásmido.
- Se plaquean 100  $\mu$ l en placas de Petri con medio LB selectivo. El resto de la transformación se centrifuga 10 segundos a máxima velocidad en microcentrifuga, se elimina el sobrenadante dejando un volumen pequeño para resuspender las células y también se plaquean.
- Las placas se incuban en estufa a 37 °C toda la noche.

#### 3.3.2b- Transformación de *E. coli* por electroporación:

- En un eppendorf frío se mezclan 40 de la suspensión de células electrocompetentes, descongeladas en hielo, con 1-2  $\mu$ l de ADN (el ADN se encuentra en una suspensión con agua). Se mezcla bien y se incuba en hielo 1 minuto.
- Se especifica en el electroporador las cubas que se utilizarán, 0.1 cm o 0.2 cm.
- La mezcla de células y ADN se transfiere a una cuba de electroporación fría, asegurándose que la suspensión quede en el fondo. Se coloca la cuba en la cámara de electroporación y se emite un pulso.
- Se remueve la cuba y se agrega inmediatamente 0.5 ml de medio SOC. Rápida pero suavemente se resuspende las células con pipeta Pasteur. El retraso en este paso provoca una gran disminución de eficiencia de transformación.
- La suspensión se transfiere en un eppendorf y se incuba por 1 hora a 37 °C con agitación.
- Se deben chequear los parámetros del pulso de electroporación. La constante del tiempo debe ser cercana a 5 milisegundos y la fuerza del campo calculada como volts (kV)/espesor de la cuba (cm).
- El producto de la transformación se plaquea en medio LB selectivo y se incuba en

estufa a 37 °C no mas de 20 horas.

Parámetros utilizados:

Voltaje: 500 V  
Duración del pulso: 8 milisegundos  
Nº de pulsos: 1

### 3.3.3- Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* por lisis alcalina

Minipreparacion

- Se inoculan 3 ml del medio LB/ampicilina (concentración final 100 µg/ml) con una colonia aislada y se incuba toda la noche a 37 °C.
- El cultivo se centrifuga 30 segundos y se resuspende el sedimentos bacteriano obtenido en 200 µl de solución I.
- Se adicionan 200 µl de solución II recién preparada. Se mezcla bien por inversión.
- Se agregan 150 µl de solución III, se mezcla por inversión y se deja 5 minutos en hielo.
- Se centrifuga 15 minutos a 12000 g. El sobrenadante se recupera e incuba 30 minutos a 37 °C con RNAsa a una concentración final de 10 µl/ml.
- El ADN se precipita con dos volúmenes de etanol 95% y se centrifuga 10 minutos a 12000 g.
- El precipitado se lava con EtOH 70% y se resuspende en 50 µl agua estéril.

Soluciones

I : 50 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA (pH 8).  
II : (preparar en el momento) 0.2 N NaOH, 1% SDS.  
III: 60 ml AcK 5M, 11.5 ml ác. acético glacial, 28.5 ml H<sub>2</sub>O

### 3.3.4- Análisis por digestión con enzimas restricción de plásmidos obtenidos en las minipreparaciones

Se realizó un análisis informático de las enzimas de restricción capaces de cortar el plásmido portador de la secuencia del gen *ureA* utilizando la página NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Las digestiones de los plásmidos se realizaron en un volumen final 20 µl utilizando alrededor de 5 U por µg de ADN y el buffer correspondiente de la enzima. Se incuba durante 2 horas a 37 °C.

## 3.4- Ensayo de transcripción *in vitro*

### 3.4.1- Amplificación del gen *ureA* para el ensayo de transcripción *in vitro*

Se utilizó como molde 100 ng de ADN genómico *wt* sin intrones o de plásmido que contiene el gen *ureA* 24-25 sin intrones. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo además:

1X Buffer HiFidelity (con Mg<sup>2+</sup>)  
0.3 mM dNTPs  
0.3 µM de cada primer  
0.5 U Enzima Kapa HiFi (Kapa Biosystems)  
H<sub>2</sub>O mQ c.s.p 25 µL

Secuencias de los primers ureA-Trpx-Fw y ureA-Trpx-Rv son:

– ureA-Trpx-Fw

5' CATTGAATACTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGTTGCGGTTATAGCTG 3'

– ureA-Trpx-Rv

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATTTTGCAACAATCTTCTCGCTC 3'

(Subrayado corresponde a la secuencia del primer que híbrido con *ureA*)

El primer Fw incorpora el promotor de la enzima T7 ARN polimerasa y el Rv contiene la secuencia que codifica para la cola poli-A característica en todos los mRNA y el terminador de la transcripción o codón stop, que desencadena la disociación de la enzima del molde de ADN.

Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 20 segundos, hibridación a 65 °C por 15 segundos, elongación a 72 °C por 2 minutos y una etapa final de extensión de 5 minutos a 72 °C.

### 3.4.2- Transcripción *in vitro*

Se siguió el protocolo provisto por el Kit de transcripción *in vitro*, “T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System” de la empresa Promega. Este kit es un sistema diseñado para la producción de miligramos de ARN en un corto tiempo. Las mezclas de reacción se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Mezclas de las reacciones de transcripción *in vitro*

Componentes de la reacción	wt (1 µg de ADN)	24-25 (1 µg de ADN)	24-25* (2 µg de ADN)	C+
Buffer 2x RiboMAX Express T7	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
ADN	8 µl	4.64 µl	8 µl	-
Control Positivo pGEM Express (1 µg)	-	-	-	1 µl
Nucleasa (Libre de agua)	-	3.36 µl		7 µl
Enzima T7 Express	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Inhibidor de Rnasa RiboLock	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Final Volumen	20.5 µl	20.5 µl	20.5 µl	20.5 µl

Se incubó durante 2 horas a 37 °C. Pasado este tiempo, se utilizó “RNeasy Mini Kit” de la empresa Qiagen para remover el ADN y los rNTPs no incorporados.

## 4. Resultados y Discusión

Como paso previo a la puesta a punto de los experimentos de transcripción *in vitro*, se llevó a cabo la obtención de construcciones génicas para eliminar los intrones del gen *ureA*, tanto del *salvaje* como del mutante *ureA24-25*. Esto es necesario ya que el sistema de transcripción *in vitro* utilizado es incapaz de realizar los mecanismos de maduración de ARNm, como el empalme de ARN donde se eliminan los intrones de la secuencia.

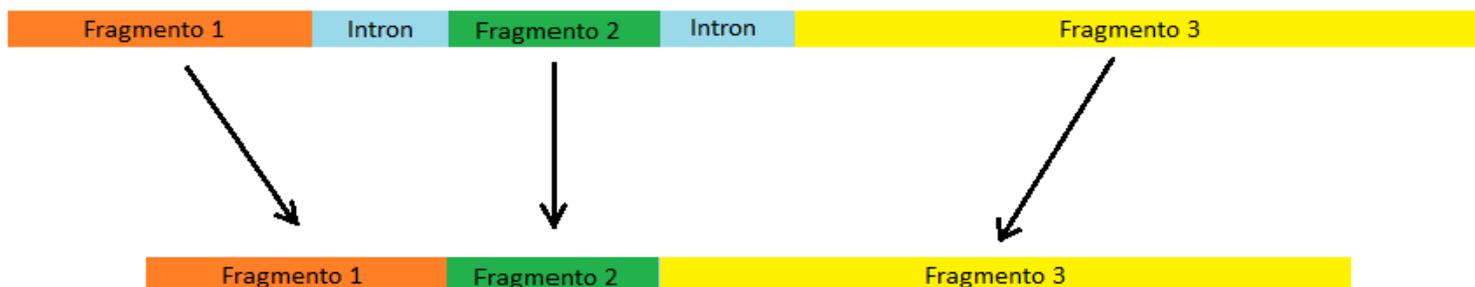
## 4.1- Obtención de los moldes para las reacciones de transcripción *in vitro*

Para la construcción de los moldes utilizados en la transcripción *in vitro*, primero se realizó la amplificación de las tres regiones exónicas del gen *ureA* salvaje y del mutante sinónimo *ureA24-25*. El gen *ureA* posee dos intrones, los cuales se pueden ver en la Figura 1. Una vez obtenidos los tres fragmentos que forman la región codificante del gen, se procedió al ensamblaje de éstos mediante la técnica de Fusion-PCR [24]. Finalmente, para obtener una cantidad suficiente del molde de *ureA* salvaje y *ureA24-25* sin intrones que serán utilizados en el ensayo de transcripción *in vitro*, los fragmentos se clonaron en un plásmido pBluescript utilizando la técnica de RF-Cloning [25].

### 4.1.1- Obtención de construcciones génicas con eliminación de intrones de *ureA* 24-25 y *ureA* salvaje.

Con el fin de obtener construcciones de *ureA* salvaje y *ureA24-25* sin intrones se realizó una primera instancia de amplificación por PCR de las regiones codificantes en cada caso. Se amplificaron los siguientes fragmentos:

- Fragmento 1, con un tamaño de 1520 pb. Contiene la región 5'-UTR de *ureA* y la región correspondiente al primer exón. En el caso del mutante *ureA24-25*, este fragmento incluye las mutaciones sinónimas de estos codones.
- El fragmento 2, con un tamaño de 215 pb, contiene la región correspondiente al exón 2.
- El fragmento 3, con un tamaño de 5408 pb. Contiene el tercer exón de *ureA*, el gen para la GFP, el marcador de selección *pyrG* de *Aspergillus fumigatus* y la región 3' no codificante de *ureA*.



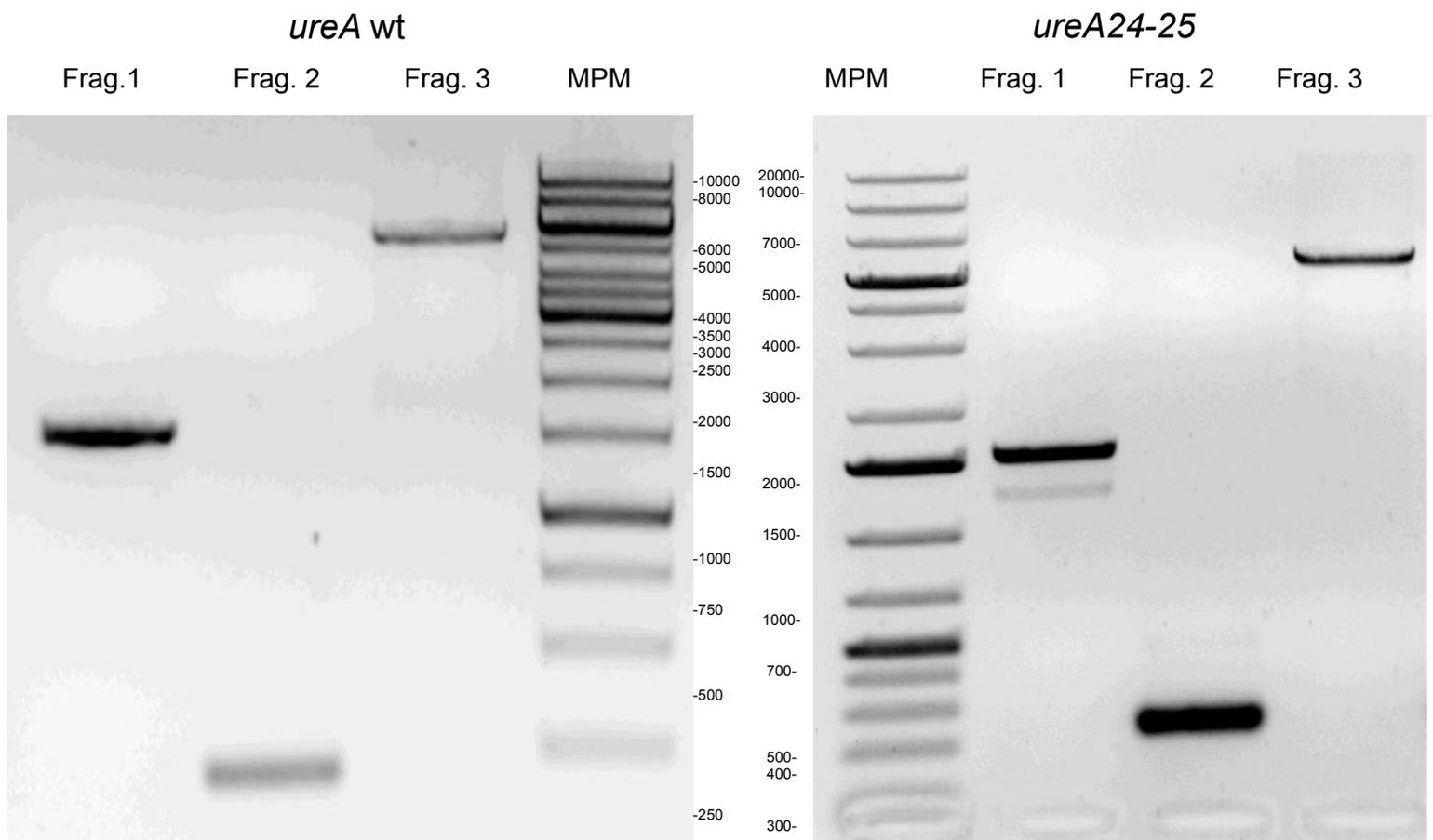
**Figura 1:** Esquema de las construcciones génicas del gen *ureA*, mostrando las regiones en donde se encuentran los exones e intrones.

El ADN genómico utilizado como molde se extrajo de las cepas MVD 10A y MVD 2425 siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la calidad del ADN extraído. El mismo se cuantificó a través de la comparación de la intensidad de la banda obtenida de

ADN con las bandas del marcador de peso molecular. Se realizó la amplificación de los tres fragmentos descritos para el gen salvaje y *ureA24-25* mediante el método de PCR. Las reacciones de amplificación se realizan mediante la utilización de cebadores específicos que contienen “colas” que son complementarias a nivel de los extremos del siguiente fragmento de modo que permiten el posterior ensamblaje de los fragmentos de interés, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

Una vez amplificados los tres fragmentos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar que éstos tuvieran los tamaños esperados y se los purificó siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. En el caso del fragmento 1, dado que se obtuvieron bandas inespecíficas como producto de la reacción de PCR, fue necesario hacer una corrida en un gel de agarosa 0.8% para cortar la banda de interés y luego purificarla.

Estos fragmentos fueron sometidos a una nueva corrida electroforética para cuantificarlos por gel, comparando sus intensidades con las de las bandas del estándar de peso molecular utilizado (Figura 2). Esta cuantificación nos permite calcular la cantidad de cada fragmento que se utilizará para la etapa de ensamblado (Fusion-PCR), dado que son necesarios 50 ng de cada fragmento para una reacción de 25  $\mu$ l de volumen final.



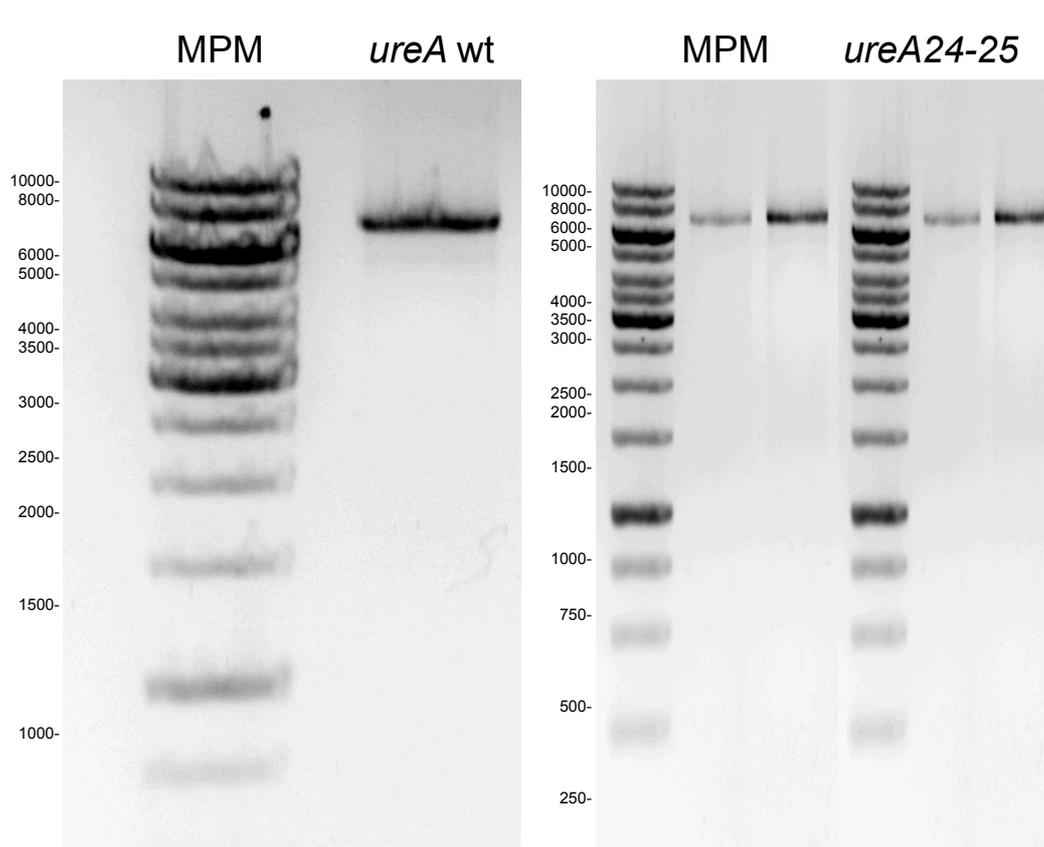
**Figura 2:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos purificados 1, 2 y 3 correspondientes a los exones del gen *ureA* salvaje (*wt*) y al gen *ureA24-25*. Se cargaron 2  $\mu$ l de cada uno de los fragmentos y 6  $\mu$ l de marcador de peso molecular 1kb y 1kb plus.

#### 4.1.2- Fusión de las regiones exónicas mediante Fusion-PCR

Una vez purificadas y cuantificadas las regiones exónicas del gen *ureA* (salvaje y mutante), se utilizó la técnica de Fusion-PCR para ensamblar los tres fragmentos en una única molécula.

La técnica de Fusion-PCR permite generar fragmentos lineales que pueden ser usados para generar una construcción que luego será introducida por transformación en *A. nidulans* sin tener que usar el procedimiento de clonado, lo que la convierte en una técnica más rápida para este fin.

Las reacciones de amplificación por Fusion-PCR se llevaron a cabo empleando dos cebadores anidados con el fin de ensamblar los tres fragmentos que son parcialmente solapantes, como se describe en el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Los productos de esta reacción se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% de una alícuota de 2  $\mu$ l de muestra, para verificar el tamaño de la construcción obtenida. Se obtuvo una única banda de alrededor de 6973 pb, que corresponde con el tamaño esperado. La misma fue purificada por el método descrito en Materiales y Métodos (Figura 3).



**Figura 3:** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto purificado de Fusion-PCR *ureA* salvaje (*wt*) y *ureA24-25*. Se cargaron 2  $\mu$ l de cada producto de fusión y 4  $\mu$ l del marcador de peso molecular 1Kb.

Las construcciones resultantes fueron clonadas utilizando el plásmido pBluescript mediante la técnica de RF-cloning. Los plásmidos generados, además de ser utilizados como molde para generar por PCR el molde para la transcripción *in vitro*, podrán ser utilizados en el futuro para transformar una cepa  $\Delta ureA$  (portadora de una delección del gen

*ureA*). Esto se realiza con el fin de tener cepas con *ureA* salvaje y *ureA2425* sin intrones, para verificar si las mutaciones sinónimas podrían estar afectando el empalme del ARN.

#### 4.1.3- Clonado de las construcciones *ureA* salvaje y *ureA 24-25* mediante el método de RF-Cloning

Para el proceso de clonado de las fusiones génicas obtenidas según se describe en las secciones anteriores, se utilizó la técnica de RF-Cloning. Esta técnica se basa primero en la amplificación por PCR del fragmento a clonar, utilizando dos cebadores que contienen además de la secuencia específica que es complementaria al gen a amplificar, “colas” en 5' y 3' que solapan con el sitio de inserción del vector de clonado (pBluescript II KS) [25].

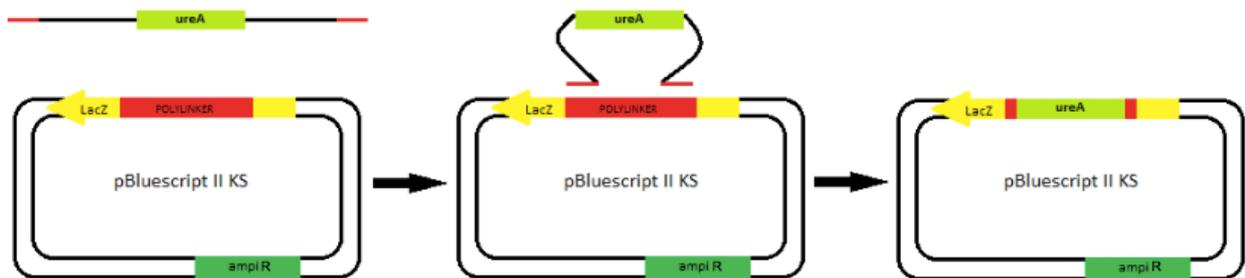


Figura 4: Representación esquemática de la integración de gen *ureA* en el plásmido “pBluescript II KS”, que ocurre en la técnica de RF-Cloning. En verde, el gen *ureA* con colas en 5' y 3' (líneas rojas) que solapan con el sitio de inserción del vector de clonado. En rojo, el sitio de policlonado del vector. En amarillo, el gen *lacZ* cuya pérdida de función indica la inserción del gen *ureA* dentro del sitio de policlonado. En verde, el gen *ampR* utilizado como marcador de selección.

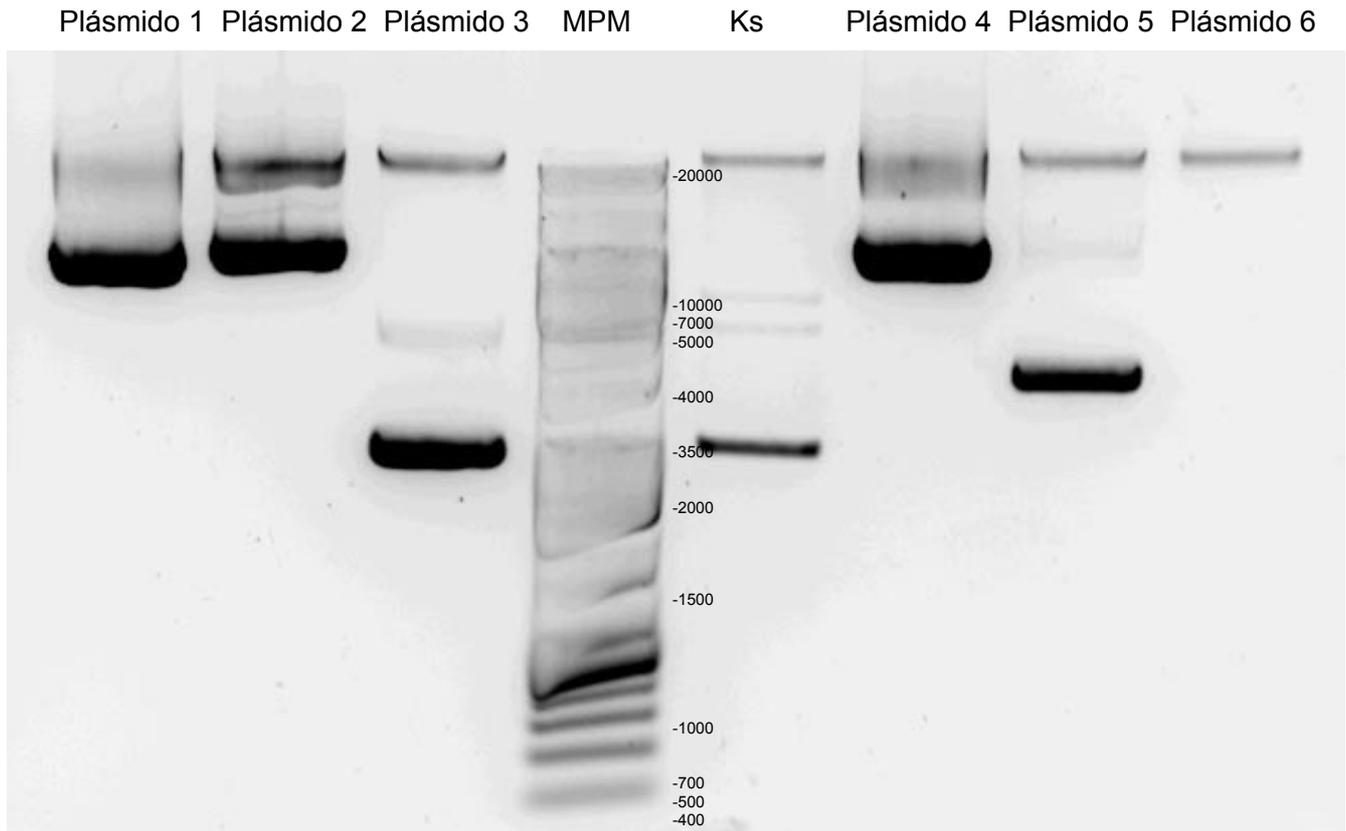
El producto de PCR obtenido en el paso anterior es utilizado como un “megaprimer” para la segunda reacción de amplificación. En ésta, gracias al diseño de los cebadores descritos anteriormente, los extremos del fragmento hibridan al molde de pBS-Bluescript y de esta manera se obtienen plásmidos que contienen el gen de interés (Figura 4). Luego se elimina el plásmido molde por tratamiento con la enzima de restricción *DpnI*. La enzima de restricción *DpnI* corta solo secuencias GATC metiladas que provienen de plásmidos clonados *in vivo*, ya que la metilación solo la hacen las bacterias. Los plásmidos provenientes de la reacción de PCR no se encuentran metilados, entonces la enzima *DpnI* no los corta. Luego del tratamiento con esta enzima, solo se conservan los plásmidos resultantes de la PCR, que son los que incorporaron la secuencia de interés.

Estos plásmidos son luego clonados en células de *E. coli DH5α*. Luego de varios intentos fallidos de transformación de *E. coli* por el método de choque térmico, se utilizó la técnica de transformación por electroporación (ver Materiales y Métodos), obteniéndose resultados positivos. La utilización del plásmido pBluescript II KS como vector en la transformación permite utilizar el método de selección de colonias blanco/azul, utilizando los reactivos IPTG y X-gal. El IPTG (isopropil-b-D-tiogalactósido) es un inductor artificial del gen *lacZ* y el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) es sustrato de la β-galactosidasa, que al ser hidrolizado produce un compuesto (indoxil) que en contacto con el aire se transforma en índigo insoluble el cual presenta un intenso color azul. El sitio de policlonado (polylinker) en el plásmido se encuentra en el interior del gen *lacZ*, por lo tanto, cuando el plásmido sin inserto mantiene el gen *lacZ* intacto, la β-galactosidasa escinde el X-gal y las colonias tienen un aspecto azul por la degradación del mismo. En cambio si el gen *lacZ* es interrumpido por la presencia del inserto, éste queda inactivo, por

lo cual las colonias presentan un color blanco.

Pasado el tiempo de incubación requerido, se seleccionaron colonias blancas al azar y se procedió a extraer el ADN plasmídico por lisis alcalina (ver Materiales y Métodos). Luego se realizó una electroforesis de los plásmidos obtenidos (Figura 5).

Debido a que el tamaño esperado del plásmido con el inserto se encontraba alrededor de los 10000 pb, se eligieron los plásmidos 1, 2 y 4 en el caso de *ureA24-25* (Figura 5) y los plásmidos 5 y 6 para *ureA* salvaje (no mostrados) como posibles candidatos, ya que tienen un tamaño mayor que el del control. Estos plásmidos fueron sometidos a análisis por enzimas de restricción para verificar que contenían el fragmento deseado.



**Figura 5:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN plasmídico *ureA24-25*, obtenido por la técnica de RF-Cloning, extraído por lisis alcalina. Se cargaron 2  $\mu$ L de Marcador de peso molecular 1Kb plus y 3  $\mu$ L de ADN plasmídico de cada plásmido seleccionado, obtenidos mediante la técnica de RF-Cloning. También se cargó una muestra de plásmido sin inserto identificado en la figura como Ks.

Tanto en el gel de la figura 5 como en los siguientes geles, se utilizó GelRed como marcador de ácidos nucleicos. El GelRed es un colorante fluorescente de ácidos nucleicos diseñado para sustituir el BrEt, el cual es altamente tóxico, para la tinción de ADN bicatenario, monocatenario o ARN en geles de agarosa o poliacrilamida. A diferencia del BrEt, el GelRed no es citotóxico, mutagénico o peligroso a las concentraciones de trabajo utilizadas en la tinción de geles [26]. A pesar de todas las ventajas que este colorante presenta, según la experiencia de nuestro laboratorio el GelRed produce una migración alterada del marcador de peso molecular utilizado en los geles, por lo que no se pudo comparar con claridad los resultados obtenidos para las diferentes muestras con el marcador de peso molecular usado.

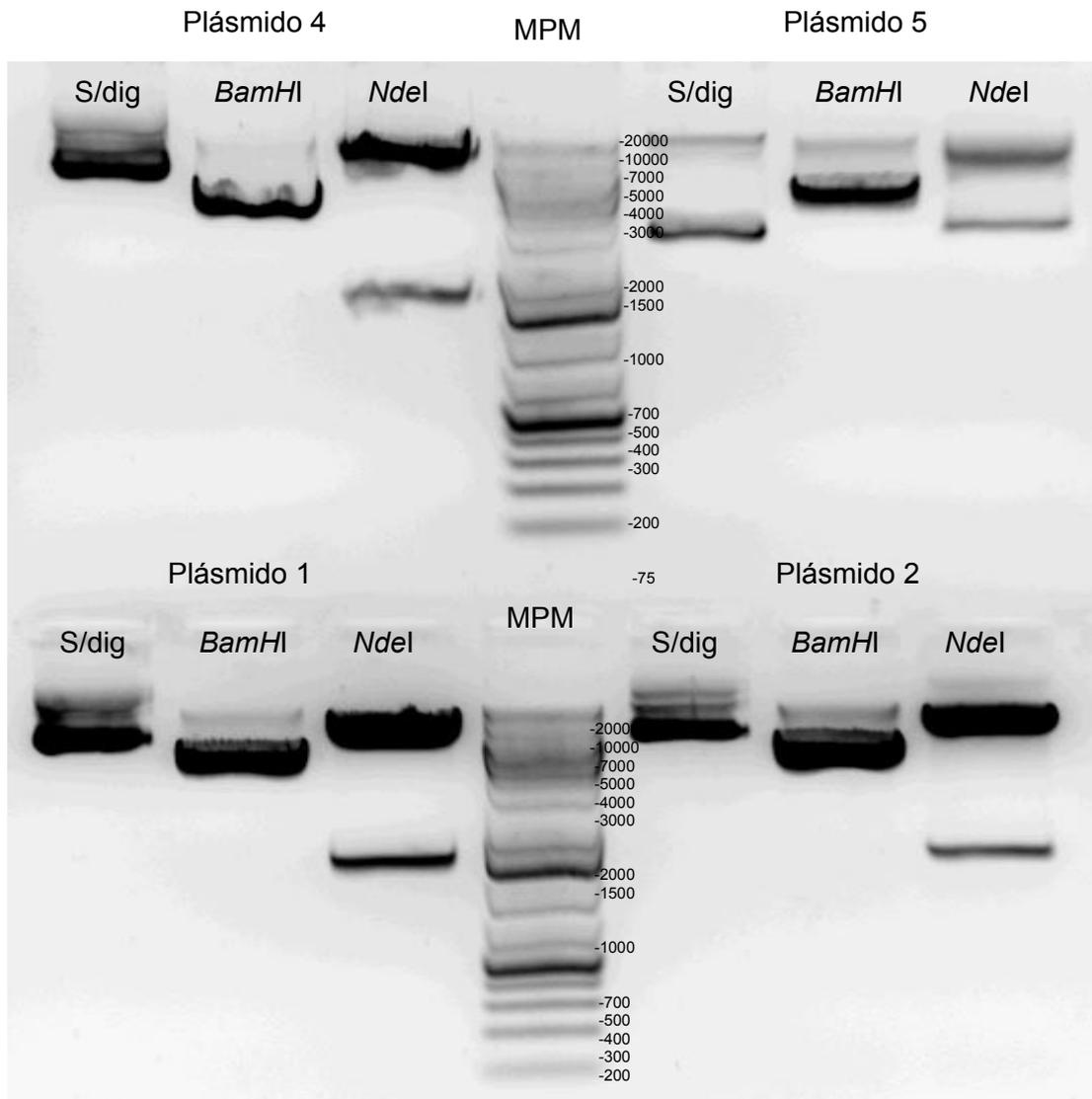
#### 4.1.4- Digestión con enzimas de restricción para verificar los plásmidos que contienen el gen *ureA*

Los plásmidos obtenidos anteriormente se analizaron por digestión con enzimas de restricción con el propósito de verificar que los plásmidos elegidos tienen el fragmento de interés. Mediante la utilización del programa de utilización en línea NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), se analizó la secuencia de interés para identificar los sitios donde dichas enzimas cortan. Se decidió trabajar con las enzimas *NdeI*, *BamHI* y *KpnI*. A partir de los sitios de corte de dichas enzimas esperamos obtener los siguientes fragmentos (Tabla 2):

**Tabla 2:** Enzimas de restricción utilizadas para verificar la presencia del inserto (*ureA/ureA24-25*) en los plásmidos candidatos.

Enzimas	Cantidad de fragmentos esperados	Tamaño de fragmentos esperados (pb)
<i>NdeI</i>	2	1334 y 8768
<i>BamHI</i>	2	5000
<i>KpnI</i>	3	3900, 1400 y 4600

Las digestiones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 5), donde se cargaron las diferentes digestiones y el plásmido sin digerir como control. En el caso de *ureA24-25*, se puede observar que de las digestiones de los plásmidos 1, 2 y 4 con *BamHI* se obtuvieron los fragmentos esperados, dos fragmentos de 5000 pb con *BamHI*, que se ven como una única banda ya que no pueden ser resueltos en el gel. En cambio de las digestiones con *NdeI* se deberían obtener fragmentos de 1334 y 8768 pb. Las bandas obtenidas en la digestión con esta enzima no concuerdan con el tamaño esperado de bandas, sino que comparando con el plásmido sin digerir se ven las mismas bandas que en éste, por lo que podemos suponer que esta enzima no digirió el plásmido. Según los datos obtenidos a través de la digestión con *BamHI*, se tomaron los plásmidos 1, 2 y 4 como posibles candidatos de contener el gen *ureA24-25*.



**Figura 5:** Análisis electroforético en gel de agarosa 1% de las digestiones de los plásmidos 1, 2, 4 y 5, con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I.  
*S/dig*: plásmido sin digerir con *ureA24-25*

De manera análoga, se obtuvieron los plásmidos 5 y 6 como posibles candidatos para que porten el gen *ureA* salvaje sin intrones.

#### 4.1.5- Secuenciación de los fragmentos obtenidos

Finalmente los plásmidos 1 y 2 en el caso de *ureA24-25* y los plásmidos 5 y 6 para *ureA* salvaje fueron enviados para su secuenciación en la empresa Macrogen (Korea). La secuencia obtenida se comparó, utilizando el programa de alineamiento de secuencias MEGA (<http://www.megasoftware.net/>), con la secuencia del gen *ureA* obtenida de *Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/seqTools>). A través de este alineamiento se verificó que los plásmidos 2 y 6 contenían los genes *ureA24-25* y *ureA* salvaje sin intrones, respectivamente. Es importante destacar que no se detectó en el alineamiento mutaciones no deseadas.

Los plásmidos obtenidos por RF-Cloning se utilizaron como molde en reacciones de PCR junto con primers que contienen secuencias esenciales para los ensayos de transcripción y traducción *in vitro*. Dichos primers portan el promotor T7, el sitio de reconocimiento ribosomal eucariota y la cola poli-T, la cual va a ser transcripta a cola poli-A típica de los ARN eucariotas. Los productos obtenidos mediante esta PCR son purificados y examinados por electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar que éstos son del tamaño esperado, que son productos únicos y que no se encuentran degradados. Estos productos fueron posteriormente purificados y utilizados como molde para el ensayo de transcripción *in vitro*.

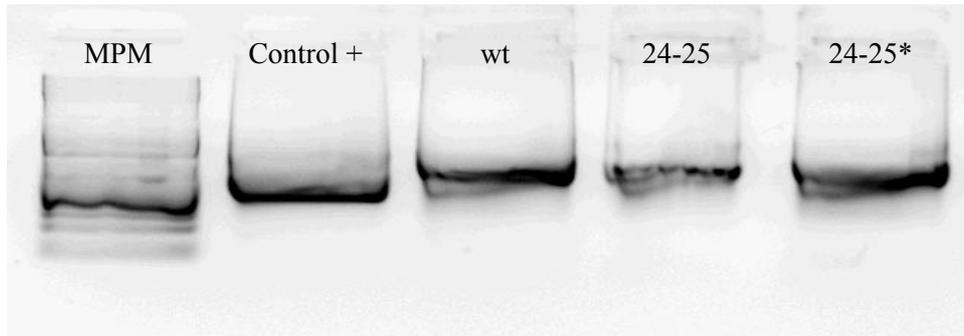
#### 4.2- Ensayo de transcripción *in vitro*

Una vez obtenidos los moldes del gen *ureA salvaje* y *ureA24-25* para la transcripción *in vitro*, se procedió a poner a punto este ensayo, con el fin de obtener cantidades significativas de ARN de dichos genes, los cuales serán utilizados para el ensayo de traducción *in vitro*. Con este fin, se siguió el protocolo indicado por el fabricante del kit, descrito en Materiales y Métodos.

El ensayo fue exitoso (Figura 6), luego de varios intentos, cambiando algunas de las condiciones especificadas en el protocolo del fabricante Promega del kit de transcripción *in vitro* (T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System - Promega). Uno de los cambios realizados, fue la incorporación de un inhibidor de RNasa (RiboLock), así como también se utilizó la misma cantidad de ADN molde de *ureA wt* y *ureA24-25*. También el tiempo y la temperatura a la cual se realiza el ensayo no se hicieron de acuerdo al protocolo del kit, sino que se utilizó como guía para determinar estas condiciones la tesis "*Influencia de la Maquinaria de Traducción en el Plegamiento de las Proteínas: Detección de Variantes Conformacionales del Receptor de Estrógenos alfa Humano en Sistemas de Traducción in vitro*" realizada por la Mag. Sofía Horjales [27]. Se logró obtener cantidades de ARN de los genes *ureA salvaje* y *ureA24-25* adecuadas para la reacción del ensayo de traducción *in vitro*.

Estos ARN producidos fueron purificados mediante la utilización del kit "RNeasy mini kit" (Qiagen), con el objetivo de purificar el ARN obtenido luego de reacciones enzimáticas (digestión con DNasa) y/o para la remoción de nucleótidos no incorporados después de la transcripción.

Los ARN obtenidos para ambos genes, se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se midieron a través del Nanodrop las concentraciones y otros parámetros relacionados, como la relación entre absorbancias 260/280 que nos indica si las muestras se encuentran contaminadas con restos de proteínas y la relación entre 260/230 nos indica la contaminación de la muestra con fenoles. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6 y en la Tabla 3.



**Figura 6:** Electroforesis de ARN en gel de agarosa 1% de los productos obtenidos en la transcripción *in vitro* del gen *ureA salvaje* y *ureA24-25* sin intrones. Se utilizó un marcador de peso molecular de ADN 1kb plus. (24-25\*: el ensayo se realizó utilizando 2 µg total de DNA, a diferencia de los otros ensayos que se utilizó 1 µg como indica el fabricante del kit)

**Tabla 3:** Resultados obtenidos mediante la medida con el Nanodrop de los ARN wt y 24-25 obtenidos mediante un ensayo de transcripción *in vitro*.

(24-25\*: el ensayo se realizó utilizando 2 µg total de DNA, a diferencia de los otros ensayos que se utilizó 1 µg como indica el fabricante del kit)

	ng/µl (dil. 1/100)	ng/µl	260/280	260/230
C+	10	1000	2,38	1,76
wt	12	1200	1,75	1,56
24-25	7,2	720	2,12	1,05
24-25*	15	1500	1,73	1,71

Los ARN obtenidos en el ensayo de transcripción *in vitro* serán posteriormente utilizados para ensayos de traducción *in vitro*.

## 5. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo se logró llevar a cabo con éxito la puesta a punto de un sistema de transcripción *in vitro* y obtener con éxito transcriptos del gen *ureA salvaje* y la versión mutante del gen *ureA24-25*, utilizando el kit “*T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System*” de Promega. El ARN mensajero obtenido de este modo podrá ser utilizado para posteriores ensayos de traducción *in vitro* y de esta forma determinar si existen pausas en la traducción que surjan del cambio de codones óptimos por codones lentos (*ureA 24-25*) en la secuencia de la misma y que puedan determinar diferencias en el plegamiento y la funcionalidad de la proteína.

La construcción del molde de ADN para la transcripción *in vitro*, gen *ureA wt* y *ureA24-25* sin intrones, se consiguió mediante la amplificación por PCR de las tres regiones exónicas del gen *ureA::gfp::AFpyrG* y del mutante *ureA24-25::gfp::AFpyrG*. Luego estas regiones exónicas se fusionaron utilizando la técnica de Fusion-PCR. A través de la técnica RF-Cloning, se clonaron las construcciones obtenidas, produciendo plásmidos que fueron utilizados como moldes para la transcripción *in vitro*. Estas construcciones podrán ser utilizadas para la generación de cepas portadoras de *ureA salvaje* y *ureA25-25* sin intrones.

En cuanto al ensayo de transcripción *in vitro*, se realizaron varios cambios al protocolo del fabricante del kit, debido a que siguiendo estas condiciones no se obtenía ningún resultado.

La puesta a punto del este sistema de transcripción *in vitro* también podrá aplicarse para generar moldes destinados a otros ensayos de traducción *in vitro*.

## 6. Bibliografía

- [1] Anfinsen C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223–230.
- [2] Plotkin J.B., Kudla G. (2011). “Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias”. *Nature* 12: 32-40
- [3] Eva Maria Novoa, Lluís Ribas de Pouplana (2012). “Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes”. *Cell Press* 1-8.
- [4] Marin M. (2008). “Folding at the rythm of the rare codon beat”. *Biotechnol. J.* 3 :1047-1057
- [5] Andres Iriarte, Manuel Sanguinetti, Tamara Fernandez-Calero, Hugo Naya, Ana Ramon, Hector Musto (2012). “Translational selection on codon usage in the genus *Aspergillus*”. *Gene* 506: 98-105.
- [6] Komar, A. A., T. Lesnik, et al. (1999). “Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation”. *FEBS Lett* 462(3): 387-91.
- [7] Ruth Hershberg, Dmitri A. Petrov. (2009). “General rules for optimal codon choice”. *PLoS Genetics* 5: 1-10.
- [8] Andrew T. Lloyd, Paul M. Sharp (1991). “Codon usage in *Aspergillus nidulans*”. *MGG* 230: 288-294.
- [9] Ivana Weygand-Durasevic, Michael Ibba (2011). “New role for codon usage”. *Science* 329: 1473-1474.
- [10] Crombie, T., J. P. Boyle, et al. (1994). “The folding of the bifunctional TRP3 protein in yeast is influenced by a translational pause which lies in a region of structural divergence with *Escherichia coli* indoleglycerol-phosphate synthase.” *Eur J Biochem* 226(2): 657-64.
- [11] Cortazzo, P., C. Cervenansky, et al. (2002). “Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*”. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 537-41.
- [12] De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M. (2006). “Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms”. *Thorax* 61(7):627-635.
- [13] Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr., Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A *et al*: (2008) “Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice”. *J Cyst Fibros* 7(3):179-196.
- [14] Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M *et al* (2009). “Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations”. *Eur J Hum Genet* 17(1):51-65.
- [15] Chava Kimchi-Sarfaty, Jung Mi Oh, In-Wha Kim, Zuben E. Sauna, Anna Maria Calcagno, Suresh V. Ambudkar, Michael M. Gottesman (2007). “A”silent”polimorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity”. *Science* 315: 525-528.

- [16] Gustavo H. Goldman, Stephen A. Osmani. (2008). "The Aspergilli. Genomics, medical aspects, biotechnology and reserch methods". Editorial CRC Press.
- [17] Sanguinetti, Manuel. (2008). "Gen *ureA*: Delecion y seguimiento subcelular de su producto, el trasportador de urea de *Aspergillus nidulans*". Trabajo Final. Facultad de Ciencias. Universidad de la Republica.
- [18] Lloyd A.T. & Sharp P.M., (1991) "Codon usage in *Aspergillus nidulans*". *Mol. Gen. Genet.* 230: 288-294
- [19] Cecilia Abreu, Manuel Sanguinetti, Sotiris Amillis, Ana Ramon. Elsevier (2010). "UreA, the major urea/H<sup>+</sup> symporter in *Aspergillus nidulans*". *Elsevier*
- [20] David L. Nelson, Michael M. Cox. 2008. "Lehninger Principios de Bioquímica". 3ra edición. Editorial Omega.
- [21] James D. Watson. "Biología molecular del gen". 5ta edición. Editorial Panamericana.
- [22] <http://worldwide.promega.com/resources/articles/pubhub/enotes/t7-ribomax-express-generation-of-27kb-in-vitro-transcripts-in-minutes/>
- [23] <http://portalga.knowledgebase.net/display/1/index.aspx?c=10537&cpc=brduhgtso7q8u3nw3rev5hb07vry1ko8ja4dp5cbww8hdl&cid=10234&cat=&atURL=&r=0.674766004085541>
- [24] Edyta Szewczyk, Tania Nayak, C Elizabeth Oakley, Heather Edgerton, Yi Xiong, Naimeh Taheri-Talesh, Stephen A Osmany, Berl R Oakley. (2007) "Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*" *Nature*. Nature Protocols 1(6): 3111-3120.
- [25] Tomas Unger, Yossi Jacobovitch, Ada Dantes, Reut Bernheim, Yoav Peleg (2010). "applications of the Restriccion Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression". *Elsevier*. Journal of Structural Biology 172: 34-44
- [26] [http://www.biotium.com/product/product\\_types/search/price\\_and\\_info.asp?item=41002](http://www.biotium.com/product/product_types/search/price_and_info.asp?item=41002)
- [27] Horjales, Sofía (2008). "Influencia de la maquinaria de traducción en el plegamiento de las proteínas: Detección de variantes conformacionales del receptor de estrógeno alfa humano en sistemas de traducción *in vitro*". Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

## 7. Anexo

### 7.1- Construcción *ureA::GFP*

- **Referencias:**

En negro y con fondo amarillo: codón de inicio ATG

En rojo: 5' y 3' *ureA*

En negro: *ureA*

En azul: intrones *ureA*

En verde: *gfp*

En Naranja: *pyrG*

Primers utilizados en la amplificación de las regiones exónicas de *ureA* salvaje y *ureA24-25*:

**Ure5-F** 5' GAAACCTGGAGCAGTCGAAG 3'  
**UreA cod5'-Rv** 5' ATCACCTGGTCCCTAAAGAG 3'  
**UreA cod5'-Fw** 5' GTATCAACATGAGATTATC 3'  
**UreA cod3'-Rv** 5' GTTCTTCTATGCATCGGG 3'  
**UreA cod3'-Fw** 5' CGCCACCGTTCAGATCATCT 3'  
**Ure3-R** 5' TCCTTGTCTCAGAAATCGGG 3'

- **Secuencia de *ureA::GFP***

AGTAGTCTCGCCAATCTTGTCTCAGTGTGCTTTGCCCGCAAATCTCGTTCTAGACTGGTATCTTGCCTCGCTACCGGCGG  
GAATACGAAGTATAGGTAAGGGTCTGCATGGTTCACCTCAACAGCCGCCTATCGACTTAATCCCCTCATGGATGTCAAGG  
AAACGCTTGGATTGGGGCTGGATTGTAATTAGAAATATATGCCTTGAATCTCATTTCGACACTAGTTAACTCAC **GAAACCT**  
**GGAGCAGTCGAAG**ATAGTATCACACCCACGCTCCAAGCCTCTGGGGTCTGAGCTTGTCTGGGTCCATGTGGTTCGATGCAC  
CGATGACAAGGGAGATCAGATAAGGAATCCAGATCTCGAAGCCACGGGCAAACGCGGTATTTCGCTACCCGGGTCTGGTT  
TGTGGGAATGTTAACGATCTGTAGCCTCTAGTAATCATTCAAGTAACCTGTGGGCTCTTCGCGTATGGCATATTCGGCGT  
ATTCTATGGGCTCTTGAGTCCCTGGGCCTTTGAGGTATATCCTCTCTAACTGCCCGCAGAAGTGGCGAAAACCTCATTGCAA  
GAACTTTTTGTACCATTTGTATGCTTACCTGGGCACTGTGGGCAGGCCTTCTTGGGAGTCCAACCTCCTACGGTCTACT  
TGGGATTAGGACGATATTCCTCCCTACTTCGTAGACTAACTCCCAGTGGAAAGCATTGGGGGGAGAGGTTTCGATGTGTGG  
ATTATAAATACTCTTGGGCGAAGAGACTGTTGCTATTGGTCTAGCAGAAAGACAGGACGAGTTCAAAACCGCTTGAGGTT  
GATAAGTGTGTAATATATTCCTGTGCCAGAGGAGCCGTAGTAACCCTGATAGGCATTTCCAGGGAGACAGCTGCACGTA  
GTCGGACAGTTCGGAGCTCTGGACATGTGGGGGAGCACAGAATCGAAAAGATTAGTGGGAGTATCGAGTAAAACGTTATC  
TGCAGTCAAGTTATCAGTTCTCGAGAATGACCATGGCCCTTCTCTTCAATGCGTGCTTCGGCCATGGCCGGCCCGTCCCC  
AGTTCAACTGTCCGGCCCGCTTATCAGCTGGCTTTCCCGTCCAATGGGATCACGTCAAGCTTTCCCTGATAAGCCTACAAT  
TTTCCAATGGGATGATTTGCTTCTTCCATCCACCACGATAACGAAACATCCTGCCAGTAAAGTTAACTCGCTCCAGG  
CCATTCTTTTCAGAGACCCCTGAGTACGAAGTGAAGGAATGATGGAGAAACCAAGAGCTATGCCAAGCTCAATCCTTTATT  
ACGAAACATGGTCGTCCTTATCATGCCTTCCACGAGCTGGGACAGCTCTCCTTGTATCAGCCTCGTTCTTATTTATCATT  
GCATCGCCAATAATTACTTGTCTATCGCGAGCTTCATCGATACTGCTTGAAGGTTGACGCAGCGGGATCGGAGATTTAAG  
TCCTTATATCAGCCCGTCAGTCCCTGCTCTGAGTTGTGCGCCATCACAACCTTAAAGATCTGGAAACTGCAGACACCAGAC  
TGCCTGAAATTGTACTACGAAGTAGAGCAGTTGTTTTCTGTTGAGGTTGCTAGTTCTCCACTGGTTCTTCGGTTATCCAA  
**AATG**GTTGCGGTTATAGCTGCCCCCGATGAAGCCGGGTAGAGACCGTTACGTTCACTGCTCCCCTCACCCAAGGGTTG  
GGTACGGGATCATCATCGGGCTCGGGTTCGCCTTTGCCCTGGTTCATGATCTTC **ATCACCTGGTCCCTAAAGAG** (1753  
pb)

**GTAAGTTTTGTCAGACATTGGTTTCGAGCAGGACTAACGGTCTAG**

**GTATCAACATGAGATTATC**ACGCTGAGATGTTCTCCACAGCTGGACGGAGTGTCAAGTCTGGCCTGGTGGCCTCTGCTG  
TCGTGAGCAGTTGGACCTGGGCAGCTACTCTGCTGCAATCTTCGGCCGTGGCCTACCAGTACGGCACCTCGGGGCC **GTTTC**  
**TTCTATGCATCGGG** (174 pb)

TTGGTCTTCACCCCGGTATGACACGAAGGATATACTGACAGTTTGCAGG

CGCCACCGTTCAGATCATCTTGTTTGCAACGCTCGCCATTGAACTCAAGAGACGCGCGCCTAACGCACACACATTCTGG  
AAGCCATCCGTGCCCCGTACGGTACCGTCGTACATCTCGTCTTCATCGTTTTCTGCCTGATGACCAACATCTCTCGTTACG  
GCCATGCTGCTCACTGGCGCGCAGCGGTGCTCAACTCTATGACTGGCGTCCCAGTTGTTGACGCTGCTTCTCTCTCCC  
AATCGGTGTGGTCTGTACACCCCTTTTCGGAGGCATTAAGCAACATTCATCAGGACTATATGACACACTGTTGTCTATG  
TCGTGATCATCTTCATCTTCGCTTTCTCTGCCTACGCCAGCAACGACCGTCTTGGCTCCCCCGGCAAAGTCTATGACCTC  
CTCGTCCAAGCTGCTCTGCGCAATCCGGTTTCAGGGAACGCTGAAGGTAGCTACCTCACCATGCGCTCCAAAGATGGCGG  
TATCTTCTGGGTATCAACCTCGTCGGTAACCTTCGGCACTGTCTTCTGGACAACGGCTACTACAACAAGGCCATCGCCG  
CGCACCCAGTCCACGCTTTCCCTGGATATGTCATCGGCGGTCTCTGCTGGTTCGCTATTCCCTGGCTCTGCGCGACAACG  
ATGGGTCTCTCTGCACTTGGCTAGAGGGAACGCGCCGATTGCCTCCGTTGACGTAACAGCCGGCCTCGTCTTCCCTT  
TGCATCTGTGCAACTCCTCGGATATAGTGGCGCAGTATGCACAACCCTTATGATCTTTATGGCCGTGACCTCTGCCTTCT  
CGGCCAGCTCATCGCCGTGTCTCGATCCTCACCTACGATATCTACCAAGCCTACATCAACCCTGCCGCAAAGGGCAA  
CGCTCGTCTGGGTCTCGCACCTCTCCTGCGTAGTCTTCGCAATCGCGATGGCTGCCTTTGCGACAGGTCTTCACTACGC  
TGGTATCGGTATGGGCTATCTCTACCTTCTCATGGGCGTCATCATCTCCTCAGCCGTGTTCCCGGGCGCCATGACCCTCG  
TCTGGAAGGGGCAGAACTGGATCGCGGCAGCCGCCTCTCCAGTTTTGGGCCTCGCAATGTCCCTGGTTGCGTGGCTTGT  
ACAACAAAGACAGAGTATGGCGTCTTACCCGTCGAAACCACAGGAGCAAACCTACCCCATGCTAGCGGGCAACGTGCGCCG  
CCTTCTCAGCCCTGTGCTTCTTCGCCAGTCTTGACATACCTCTTCGGCCCTCAGAATTACGACTACGAATCCATGCGCG  
CCATCCGCAAAGTTCGATGACTCGGATGTGCGCCGCGGCGGCACGTCGACCTCGAGCTCATTCCCGGGCCTTCCAATACA  
AATCGTCCCTTTCACAGCAACAGCAAGAGGAAGAGGAAATAAGAAAACCTCAACAAAGCCGCATTTATTTCCCGCTGTCT  
CACAGTTGGCATGGTAATTTGTTTCTTGATCCTCTGGCCTATACCCATGTATGGCAGCGGGTACGTCTTACGCAAGAAGT  
TCTTACAGGCTGGGTGTTGTGGGCATCATCTGGCTCTTTGGGACTCGCTTCGGGGTGATTCTATTCCCGCTCTGGGAG  
GGTAGGACAGTATCAAAGGGTTGGTAAGTATGCTGCTGCTGATGCGATGGGAAGGCGAGGAAAGGAGGCTCTCTGGT  
AGGCCAGGAGACGAAGAGAGTGAAGAGTCTGGTCTGGTGTGTTACACCGAGGAGAAGATTGTTGCAAAAAGGAGCTG  
GTGACGGCGTGGAGCCGGTGGCAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTCTTGTGAATTAGATGGT  
GATGTTAATGGGCACAAATTTTTCTGTGAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTAT  
TTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTACCTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGAT  
ACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTC  
AAAGACGACGGGAACCTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGGAGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGG  
AATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACCTACAACCTCCCAACAGTATACATCATGG  
CCGACAAGCAAAGAACGGCATCAAAGCCAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGGCTGCAACTCGCTGAT  
CATTATCAACAAAATACCTCAATTTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCT  
TTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGG  
ATGAACATAACAAATAAACCCGTCGCCCTCAAACAATGCTCTTACCCCTCTTCGCGGGTCTGAAATACCCTCACCTGGCAA  
CAGCAATTTGGCGCTTCATGGCTGTTTTTCCGATCTCTCTACTTGTACGGCTATGTGTACTCGGGTAAGCCACAAGGCAAG  
GGCAGATTTGCTGGGAGGTTTTCTTCTGGTTTTCTCAAGGCGCTCTGTGGGCTCTGAGTGTGTTTTGGTGTGGCAAAGACAT  
GATCTCTTACTGAGAGTTATTTCTGTGTCTGACGAAATATGTTGTGTATATATATATATGTACGTTAAAAGTTCCGTGGAG  
TTACCAGTGATTGACCAATGTTTTATCTTCTACAGTTCTGCCTGTCTACCCCATTTAGCTGTACCTGACTACAGAATAG  
TTTAATTTGTGGTTGACCCACAGTCGGAGGCGGAGGAATACAGCACCGATGTGGCCTGTCTCCATCCAGATTGGCACGCA  
ATTTTTACACGCGGAAAAGATCGAGATAGAGTACGACTTTAAATTTAGTCCCCGGCGGCTTCTATTTTAGAATATTTGAG  
ATTTGATTTCAAGCAATTTGATTTGGTTGGGTCACCCCTCAATTTGGATAATATACCTCATTGCTCGGCTACTTCAACTCAT  
CAATCAGCTCATACCCCGCATATAACCTCCATTTCCACGATGCTCGTCCAAGTCGCAATTTGACTTACGGTCTCGAGCC  
AGCAAGCACCCCAATCCTCTGGCAAAGAGACTTTTTGAGATTGCCGAAGCAAAGAAGACAAACGTTACCGTCTCTGCTGA  
TGTGACGACAACCCGAGAACTCCTGGACCTCGCTGACCGTACGGAAGCTGTTGGATCCAATACATATGCCGTCTAGCAAT  
GGACTAATCAACTTTTTGATGATACAGGTCTCGGTCCCTACATCGCCGTATCAAGACACACATCGACATCCTCACCGATT  
TCAGCGTCGACACTATCAATGGCCTGAATGTGCTGGCTCAAAGCACAACTTTTTGATCTTCGAGGACCGCAAATTCATC  
GACATCGGCAATACCGTCCAGAAGCAATACCACGGCGGTGCTCTGAGGATCTCCGAATGGGCCACATTATCAACTGCAG  
CGTCTCCCTGGCGAGGGCATCGTCGAGGCTCTGGCCCAGACCGCATCTGCGCAAGACTTCCCTATGGTCTGAGAGAG  
GACTGTTGGTCTTGGCAGAGATGACCTCAAAGGATCGCTGGCTACGGGCGAGTATAACCAAGGCATCGGTTGACTACGCT  
CGCAAATACAAGAACTTCGTTATGGGTTTTCTGTGTCGACGCGGGCCCTGACGGAAGTGCAGTCGGATGTGTCTTACGCCCTC  
GGAGGATGAAGATTTCTGGTCTTTCACGACGGGTGTGAACCTCTCTTCAAAGGAGATAAGCTTGGACAGCAATACCAGA  
CTCCTGCATCGGCTATTGGACGCGGTGCCGACTTTATCATCGCCGTCGAGGCATCTACGCTGCTCCCACCCGGTTGAA  
GCTGCACAGCGGTACCAGAAAGAAGGCTGGGAAGCTTATATGGCCAGAGTATGCGGCAAGTCATGATTTCTCTTGGAGC  
AAAAGTGTAGTGCCAGTACGAGTGTGTTGGAGGAAGGCTGCATACATTTGTGCCTGTCTTAAACGATGAGCTCGTCCGTA  
TTGGCCCTGTAAATGCCATGTTTTCCGCCCCCAATCGTCAAGGTTTTCCCTTTGTTAGATTCTTACCAGTCATCTAGCAA  
GTGAGGTAAGCTTTGCCAGAAACGCCAAGGCTTTATCTATGTAGTCGATAAGCAAAGTGGACTGATAGCTTAATATGGAA  
GGTCCCTCAGGGACAAGTCGACCTGTGCAGAAGAGATAACAGCTTGGCATCACGCATCAGTGCCTCCTCTCAGACTCATA  
TATCTTGGTGTGTTGTGTTTTCAGCTAGCTAGATTCATTTATGTTTTGCGTTTGAATTAACCTTATAGAGCGAAATATA  
GAAATACAAACTGGAAAAGACAAGAGCAATGTTCCCTCCAGAGATCAACCCCAACAGACCATAGAACAGTAACTTAGGTAT  
CGTCATCAATCTGAGAGTAAACTCCAGTCTTTCGAGGACCTGACGAACACTGCCTCAGAGGCATTTGCCATGAGCGCATC  
ACTTATACGCATACGGCTGTGGTGGCGGTGATGTAGCCCCGACGCTACGGGAGGATACTGCATTTGCTGCTGCGGGGTT  
TGCTGCTGCTGATACCCCCAAAGTATGCCTGCGGCGGAGGTTGTGGTCCGTAGCCTGCATTTGGGGGCGGCCGAGTGTC

TGGGTTAATATCGGGGCGATCACTATTCTTGTAGTTTATGAACAATATAAGCATGTACTGAGAAGCAGTGGATCAGATG  
AAAAAAGGAGAGCATAAGGCAAGGGAAGGATATACCGCAAGTCTGGGTAAATCGGCATGTGTAGCATGTAACCTCCTTG  
TACTTGTGCATTGCTAATGGGATCACGGGCTGTATGGGATATGTCAGTTCCTTTTCTTCGGTACAATACTGCCTTTAGCA  
AAGGCAGGATAGTGCATACAAATGAAGCAGATCGTGAAGAATGGCCTGTATACATGCGTTAGCCCCAGGCCTAGTTAGTT  
AACTCAGGACAACATACCATCGTGTACACACCCGTCATTCCAATGGTTGCCTGTACGGAGTTTAGTGCCAGATCCATTG  
GTAACGTGTAACAGCAGCCACGCCGTG**TCCTTGTCTCAGAAATCGGG** (5408 pb)

## 7.2- Construcción *ureA::GFP* sin intrones

- **Referencias**

**En negrita y subrayado:** codón de inicio ATG

**En rojo:** 5' y 3' *ureA*

En negro: *ureA*

En verde: *GFP*

En Naranja: *pyrG*

Primers utilizados en la fusión de las regiones exónicas:

(Subrayado corresponde a la secuencia del primer que hibrido con el plásmido pBluescript KS, Fermentas)

**RF-Ure5N**

5' ACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTC**GCACCGATGACAAGGGAGAT** 3'

**RF-Ure3N**

5' GAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCACCAATGGATCTGGCACTAAAC 3'

(complementario 5' GTTTAGTGCCAGATCCATTGGT 3')

Primers utilizados en la amplificación del gen *ureA* para el ensayo de transcripción in vitro:

(Subrayado corresponde a la secuencia del primer que hibrido con *ureA*)

**UreA-Trpx-Fw**

5' CATTGAATACTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACC**ATGGTTGCGGTTATAGCTG** 3'

**UreA-Trpx-Rv**

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**CATTTTGCAACAATCTTCTCGCTC** 3'

(Complementario 5' GAGCGAGAAGATTGTTGCAAAA 3')

- **Secuencia *ureA::GFP* sin intrones**

AGTAGTCTCGCCAATCTTGTCTCAGTGTGCTTTGCCCGCAAATCTCGTTCTAGACTGGTATCTTGCCTCGCTACCGGGCGG  
GAATACGAAGTATAGGTAAGGGTCTGCATGGTTCACCTCAACAGCCGCCTATCGACTTAATCCCGTCATGGATGTCAAGG  
AAACGCTTGGATTGGGGCTGGATTGTAATTAGAAATATATGCCTTGAATCTCATTTCGACACTAGTTAACTCACGAAACCT  
GGAGCAGTCGAAGATAGTATCACACCCACGCTCCAAGCCTCTGGGGTCAGCTTGTCTGGGTCCATGTGGTTCGAT**GCAC**  
**CGATGACAAGGGAGA**T CAGATAAGGAATCCAGATCTCGAAGCCACGGGCAAACGCGGTATTTCGCTACCCGGGTCTGGTT  
TGTGGGAATGTTAACGATCTGTAGCCTCTAGTAATCATTCAAGTAACCTGTGGGCTCTTCGCGTATGGCATATTCGGCGT  
ATTCTATGGGCTCTTGAGTCTGGGCCTTTGAGGTATATCCTCTCTAACTGCCCGCAGAAGTGGCGAAAACCTCATTGCAA  
GAACTTTTTGTCACCATTTGTATGCTTACCTGGGCACTGTGGGCAGGCCTTCTTGGGAGTCCAACCCTCCTACGGTCTACT  
TGGGATTAGGACGATATTCCTCCCTACTTCGTAGACTAACTCCCAGTGAAGCATTGTTGGGGGAGAGGTTTCGATGTGTGG  
ATTATAAATACTCTTGGGCGAAGAGACTGTTGCTATTGGTCTAGCAGAAAGACAGGACGAGTTCCAAAACGGCTTGAGGTT  
GATAAGTGTGAATATATTCCTGTGCCAGAGGAGCCGTAGTAACCCTGATAGGCATTTCCAGGGAGACAGCTGCACGTA  
GTCGGACAGTTCGGAGCTCTGGACATGTGGGGGAGCACAGAATCGAAAAGATTAGTGGGAGTATCGAGTAAAACGTTATC  
TGCAGTCAAGTTATCAGTTCTCGAGAATGACCATGGCCCTTCTCTTCAATGCGTGTCTTCGGCCATGGCCGGCCCGTCCCC  
AGTTCAACTGTGGGCCCCGCTTATCAGCTGGCTTTCCCGTCCAATGGGATCACGTCAAGCTTTCTGATAAGCCTACAAT  
TTTCCAATGGGATGATTTGCTTCTTCATCCACCACGATAACGAAACATCCTGCCAGTAAGGTTAACTCGCTGCTCCAGG  
CCATTCTTTTCAGAGACCTGAGTACGAAGTGAAGGAATGATGGAGAAACCAAGAGCTATGCCAAGCTCAATCCTTTATT

ACGAAACATGGTCGTCCTTATCATGCCTTCCACGAGCTGGGACAGCTCTCCTTGTATCAGCCTCGTTCTTATTTATCATT  
GCATCGCCAATAATTACTTGTCTATCGCGAGCTTCATCGATACTGCTTGAAGGTTGACGCGAGCGGGATCGGAGATTTAAG  
TCCTTATATCAGCCCGTCAGTCCCTGCTCTGAGTTGTCGCCATCACAACTTAAAGATCTGGAACTGCAGACACCAGAC  
TGCTGAAATTTGACTACGAAGTAGAGCAGTTGTTTTCTGTTGAGGTTGCTAGTTCTCCACTGGTTCTTCGGTTATCCAA  
AATGGTTGCGGTTATAGCTCCCCCGATGAAGCCGGGTAGAGACCCTTACGTTCACTGCTCCCCTCACCAAGGGTTTG  
GGTACGGGATCATCATCGGGTTCGGGTTCCGCTTTGCCCTGGCTATGATCTTCACTACCTGGTCCCTAAAGAGGATCAA  
CATGAGATTATCACGTCTGAGATGTTCTCCACAGCTGGACGGAGTGTCAAGTCTGGCCTGGTGGCCTCTGCTGTCTGAG  
CAGTTGGACCTGGGCAGCTACTCTGCTGCAATCTTCGGCCGTGGCCTACCAGTACGGCACCTCGGGGCCGTTCTTCTATG  
CATCGGGGCCACCGTTTACAGATCATCTTGTGTTGCAACGCTCGCCATTGAACTCAAGAGACGCGCGCCTAACGCACACACA  
TTCTTGGAAAGCCATCCGTGCCCGTTACGGTACCCTGCTACATCTCGTCTTTCATCGTTTTCTGCTGATGACCAACATCCT  
CGTTACGGCCATGCTGCTCACTGGCGGCGCAGCGGTGCTCAACTCTATGACTGGCGTCCCAGTTGTTGACGCTGCTTCC  
TCTCCCAATCGGTGTGGTCTGTACACCCTTTTCGGAGGCATTAAGCAACATTTCATCACCGACTATATGCACACTGTT  
GTCATTGCTGATCATCTTTCATCTTCGCTTTCTCTGCCTACGCCAGCAACGACCCTTGGCTCCCCCGCAAAGTCTA  
TGACCTCCTCGTCCAAGCTGCTCTGCGCAATCCGTTTCAGGGAACGCTGAAGGTAGCTACCTCACCATGCGCTCCAAAG  
ATGGCGGTATCTTCTGGGTATCAACCTCGTCCGTAACCTCGGCAGTGTCTTCTGGACAACGGCTACTACAACAAGGCC  
ATCGCCGCGCACCCAGTCCACGCTTTCCCTGGATATGTCATCGGCGGTCTCTGCTGGTTGCTATTCCTGGCTCTGCGC  
GACAACGATGGGTCTCTGCACTTGCCTAGAGGGAACGCGCCGATTGCCTCCGTTGACGTAACAGCCGGCCTCGTCC  
TTCCCTTTGCATCTGTGCAACTCCTCGGATATAGTGGCGCAGTATGCACAACCCTTATGATCTTTATGGCCGTGACCTCT  
GCCTTCTCGGCCAGCTCATCGCCGTGCTCTCGATCCTCACCTACGATATCTACCAAGCCTACATCAACCCTGCCGAAA  
GGGCAAACGCCCTCGTCTGGGTCTCGCACCTCTCCTGCGTAGTCTTCGCAATCGCGATGGCTGCCTTTGCGACAGGTCTTC  
ACTACGCTGGTATCGGTATGGGCTATCTTACCTTCTCATGGCGTTCATCTCCTCAGCCGTGTTCCCGGGCGCCATG  
ACCCTCGTCTGGAAGGGGACAGACTGGATCGCGGCAGCCGCTCTCCAGTTTTGGGCTCGCAATGTCCCTGGTTGCGTG  
GCTTGTACAAACAAGACAGATAGTGGGTCTTACCCTGCAAAACCAGGAGCAAACTACCCATGACGCGGCAACG  
TCGCGCCCTTCTCAGCCCTGCTCTTCTGCCAGTCTTGACATACCTCTTCGGCCCTCAGAATTACGACTACGAATCC  
ATGCGGCCATCCGCAAAAGTGCATGACTCGGATGTCGCGCGGCGGCGCAGTGCACCTCGAGTTCATTCCCGCGCTTC  
CAATACAAACTCGTCCCTTTCACAGCAACAGCAAGAGGAAGAGGAAATAAGAAAACCTCAACAAAGCCGCATTTATTTCCC  
GCTGTCTCACAGTTGGCATGGTAATTTGTTTTCTTGATCCTCTGGCCTATACCCATGTATGGCAGCGGGTACGTCTTCAGC  
AAGAAGTCTTTCACAGGCTGGGTGTTGTGTTGGGCATCATCTGGCTCTTTGGGACTGCGTTGGGGTGATTCTATTCCCGCT  
CTGGGAGGGTAGGAGCAGTATCAAAGGGTTGGTAAGCTTATGCTGCTCGATGCGATGGGAAGGCAGTGGAAAAGCAGTG  
CTCTGGTAGGCCAGGGAGACGAAGAGAGTGAAGAGTCTGGGTCTGGTGTGTTACACCAGCGAGAAGATTGTTGCAAAA  
GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCAGTAAAGGAGAAGAAGTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTCTGTTGAATT  
AGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTGCTAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTA  
AATTTATTTGCACACTGGAAGAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTACCTATGGTGTTCATGCTTT  
TCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCAT  
CTTCTTCAAAGACGACGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGC  
TTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACCTACAACCTCCCAACAGTATAC  
ATCATGGCCGACAAGCAAAAGAACGGCATCAAAGCCAACCTTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGGTGAACCT  
CGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAAT  
CTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGGATTGTAACAGCTGCTGGGATTACACAT  
GGCATGGATGAACATAACAATAAACCGGTGCGCTCAAACAATGCTCTTACCCTCTTCGCGGGTCTGAAATACCCTCAC  
CTGGCAACAGCAATGGCGCTTCATGGCTGTTTTTCCGATCTCTACTCTGTACGGCTATGTGTACTCGGTAAGCCACA  
AGGCAAGGGCAGATTGCTGGGAGGTTTCTTCTGGTTTTCTCAAGGCGCTCTGTGGCTCTGAGTGTGTTTGGTGTGCCA  
AAGACATGATCTCTTACTGAGATTATTTCTGTGTCTGACGAAATATGTTGTGTATATATATATATATGTACGTTAAAAGTTC  
CGTGGAGTTACCAGTGATTGACCAATGTTTTATCTTCTACAGTTCTGCCTGTCTACCCATTCTAGCTGTACCTGACTAC  
AGAATAGTTTAAATTGGTGTGACCCACAGTCCGAGGCGGAGGAATACAGCACCGATGTGGCCTGTCTCCATCCAGATTG  
GCACGCAATTTTTTACACGCGGAAAAGATCGAGATAGAGTACGACTTTAAATTTAGTCCCGGCGGCTTCTATTTTGAAT  
ATTTGAGATTTGATTTCAAGCAATTGATTTGGTTGGGTACCCTCAATTGGATAATATACCTCATTGCTCGGCTACTTC  
AACTCATCAATCACCGTCATACCCCGCATATAACCCTCCATTCCACGATGTCGTCCAAGTCGCAATTGACTTACGGTGC  
TCGAGCCAGCAAGCACCCCAATCCTCTGGCAAAGAGACTTTTTGAGATTGCCGAAGCAAAGAAGACAAACGTTACCGTCT  
CTGCTGATGTGACGACAACCCGAGAACCTCTGGACCTCGCTGACCGTACGGAAGCTGTTGGATCCAATACATATGCCGTC  
TAGCAATGGACTAATCAACTTTTTGATGATACAGGTCTCGGTCCCTACATCGCCGTCAATCAAGACACACATCGACATCCTC  
ACCGATTTTCAGCGTCGACACTATCAATGGCCTGAATGTGCTGGCTCAAAGCACAACTTTTTGATCTTCGAGGACCGCAA  
ATTCATCGACATCGGCAATACCGTCCAGAAGCAATACCACGGCGGTGCTCTGAGGATCTCCGAATGGGCCACATTATCA  
ACTGCAGCGTTCTCCCTGGCGAGGGCATCGTTCGAGGCTCTGGCCAGACCCGATCTGCGCAAGACTTCCCCTATGGTCTT  
GAGAGAGGACTGTTGGTCTGGCAGAGATGACCTCAAAGGATCGCTGGCTACGGGCGAGTATACCAAGGCATCGGTTGA  
CTACGCTCGCAAATAACAAGAACTTCGTTATGGGTTTTCTGTGTCGACGCGGGCCCTGACGGAAGTGCAGTCCGATGTGCTT  
CAGCCTCGGAGGATGAAGATTTCTGTTGTTTTCACGACGGGTGTGAACCTCTCTTCAAAGGAGATAAGCTTGGACAGCAA  
TACCAGACTCCTGCATCGGCTATTTGGACGCGGTGCCGACTTATCATCGCCGTCGAGGCATCTACGCTGCTCCCAGCCC  
GGTTGAAGCTGACAGCGGTACCAGAAAAGAGTGGAAAGCTTATATGGCCAGAGTATCGGCAAGTCAATGATTTCTC  
TTGGAGCAAAGTGTAGTGGCAGTACGAGTGTGTTGGAGGAAGGCTGCATACATTGTGCCTGTCAATTAACAGTATGAGCTC  
TGCCGTATTGGCCCTGTAATGCCATGTTTTCCGCCCCCAATCGTCAAGGTTTTCCCTTTGTTAGATTCTACCAGTCAT  
CTAGCAAGTGAGGTAAGCTTTGCCAGAAACGCCAAGGCTTTATCTATGTAGTCGATAAGCAAAGTGGACTGATAGCTTAA  
TATGGAAGGTCCTCAGGGACAAGTGCACCTGTGCAGAAGAGATAACAGCTTGGCATCACGCATCAGTGCCTCCTCTCAG  
ACTCATATATCTTGGCTTGTGTGTGTTACGCTAGCTAGATTCAATTTATGTTTTGCGTTTTGATTCAATTAACCCACTC

GTTACACATGTACCAAGTTTTTATACCAGGGTGGCGACCAGCGTTCATGATAAGATAGCTTATATAGAATATGGCTATTT  
 CATTAAGCATTATAATTCATTCTTACGGACCCTAGCTGAAGCAGTTATGTCGTCCAAGCCGTCATTAACCTTTATAGAGCG  
 AAATATAGAATTACAACTGGAAAGACAAGAGCAATGTTCCCTCCAGAGATCAACCCCAACAGACCATAGAACAGTAACT  
 TAGGTATCGTCATCAATCTGAGAGTAACTCCAGTCTTTCGAGGACCTGACGAACACTGCCTCAGAGGCATTTGCCATGA  
 GCGCATCACTTATACGCATACGGCTGTGGTGGCGGTGATGTAGCCCTCCAGCCTACGGGAGGATATGCATTTGTCTGCTG  
 CGGGGTTTGTCTGCTGATACCCCTCCAAAGTATGCCTGCGCGGAGGTTGTGGTCCGTAGCCTGCATTTGGGGGCGGCC  
 GAGTGTCTGGGTTAATATCGGGGCGATCACTATTCTTGTAGTTTATGAACAATATAAGCATGTACTGAGAAGCAGTGGA  
 TCAGATGAAAAAAGGAGAGCATAAGGCAAGGGAAGGATATACCGCAAGTCTGGGTAAATCGGCATGTGTAGCATGTAAC  
 TTCCTTGTACTTGTGCATTGCTAATGGGATCACGGGCTGTATGGGATATGTCAGTTCCTTTTTCTTCGGTACAATACTGCC  
 TTTAGCAAAGGCAGGATAGTGCCATACAATGAAGCAGATCGTGAAGAATGGCCTGTATACATGCGTTAGCCCCAGGCGTA  
 GTTAGTAACTCAGGACAACATAACCATCGTGTACACACCGTCCATTCCAATGGTTGCCTGTACGGA **GTTTAGTGCCAGA**  
**TCCATTGGT**AAC TGTGAACAGCAGCCACGCCGTGTCCTTGTCTCAGAAATCGGG

### 7.3- Construcción *ureA24-25::GFP* sin intrones

- **Referencias**

**En negro y con fondo amarillo:** codón de inicio ATG

**En negrita y subrayado:** los codones 24 y 25, con las respectivas **bases mutadas en rojo.**

**En rojo:** 5' y 3' *ureA*

En negro: *ureA24-25*

En verde: *GFP*

En Naranja: *pyrG*

- **Secuencia *ureA24-25::GFP* sin intrones**

GCACCGATGACAAGGGAGATCAGATAAGGAATCCAGATCTCGAAGCCACGGGCAAACGCGGTATTTCGCTACCCGGGTCTCT  
 GGTGTGGGAATGTTAACGATCTGTAGCCTCTAGTAATCATTCAAGTAACCTGTGGGCTCTTCGCGTATGGCATATTCG  
 GCGTATTCTATGGGCTCTTGAGTCCCTGGGCCTTTGAGGTATATCCTCTCTAACTGCCCGCAGAAGTGGCGAAAACCTCATT  
 GCAAGAACTTTTTGTCACCATTGTATGCTTACCTGGGCACTGTGGGCAGGCCTTCTTGGGAGTCCAACCTCCTACGGTC  
 TACTTGGGATTAGGACGATATTCCTCCCTACTTCGTAGACTAACTCCCAGTGGAAGCATTGGGGGGAGAGGTTTCGATGT  
 GTGGATTATAACTCTTGGGCGAAGAGACTGTTGCTATTGGTCTAGCAGAAAGACAGGACGAGTTCAAAACGGCTTGA  
 GGTTGATAAGTGCTGAATATATTCCTGTGCCAGAGGAGCCGTAGTAACCCTGATAGGCATTTCCAGGGAGACAGCTGCA  
 CGTAGTCGGACAGTTCGGAGCTCTGGACATGTGGGGGAGCACAGAATCGAAAAGATTAGTGGGAGTATCGAGTAAAACGT  
 TATCTGCAGTCAAGTTATCAGTTCCTCGAGAATGACCATGGCCCTTCTCTTCAATGCGTGCTTCGGCCATGGCCGGCCCGT  
 CCCCAGTTCAACTGTGGGCCCCGCTTATCAGCTGGCTTTCCCGTCCAATGGGATCACGTCAAGCTTTCTGATAAGCCTA  
 CAATTTTCCAATGGGATGATTTGCTTCTTCATCCACCACGATAACGAAACATCCTGCCAGTAAGGTTAACTCGCTGCTC  
 CAGGCCATTCTTTTCAGAGACCCTGAGTACGAAGTGAAGGAATGATGGAGAAACCAAGAGCTATGCCAAGCTCAATCCTT  
 TATTACGAAACATGGTCGTCTTATCATGCCTTCCACGAGCTGGGACAGCTCTCCTTGTATCAGCCTCGTTCTTATTTAT  
 CATTGCATCGCCAATAATTACTTGTCTATCGCGAGCTTCATCGATACTGCTTGAAGGTTGACGCAGCGGGATCGGAGATT  
 TAAGTCCTTATATCAGCCCGTCAGTCCCTGCTCTGAGTTGTGCGCCATCACAACTTAAAGATCTGGAAACTGCAGACACC  
 AGACTGCCGTGAAATTGTAAGTACGAAGTAGAGCAGTTGTTTTCTGTTGAGGTTGCTAGTTCTCCACTGGTCTTTCGGTTAT  
**CCAAAATG**GTTGCGGTTATAGCTGCCCCGATGAAGCCGGGTAGAGACCGTTACGTTCACTGCTCCCCTCACCC**CAGGGT**  
 TTTGGGTACGGGATCATCATCGGGCTCGGGTTCGCCTTTGCCCTGGTCATGATCTTCATCACCTGGTCCCTAAAGAGGTA  
 TCAACATGAGATTATCACGCTGAGATGTTCTCCACAGCTGGACGGAGTGTCAAGTCTGGCCTGGTGGCCTCTGCTGTGCG  
 TGAGCAGTTGGACCTGGGCAGCTACTCTGCTGCAATCTTCGGCCGTGGCCTACCAGTACGGCACCTCGGGGCCGTTCTTC  
 TATGCATCGGGCCACCCTGATCATCTTGTGTTGCAACGCTCGCCATTGAAGTCAAGAGACCGCGCCTAACGCACA  
 CACATTCCGGAAGCCATCCGTGCCGCTTACGGTACCGTCTGATCATCTCGTCTTCATCGTTTTCTGCTGATGACCAACA  
 TCCTCGTTACGGCCATGCTGCTCACTGGCGGCGCAGCGGTGCTCAACTCTATGACTGGCGTCCCAGTTGTTGAGCCTGC  
 TTCCTCCTCCCAATCGGTGTGGTCTGTACACCCTTTTCGGAGGCATTAAGCAACATTTCATCACCGACTATATGCACAC  
 TGTGTGCTATTGCTGATCATCTTCATCTTCGCTTTCTCTGCCTACGCCAGCAACGACCGTCTTGGCTCCCCGGCAAAG  
 TCTATGACCTCCTCGTCCAAGCTGCTCTGCGCAATCCGGTTTCAGGGAACGCTGAAGGTAGCTACCTCACCATGCGCTCC  
 AAAGATGGCGGTATCTTCTGGGTATCAACCTCGTGGTAACTTCGGCACTGTCTTCTGGACAACGGCTACTACAACAA  
 GGCCATCGCCGCGCACCCAGTCCACGCTTTCCCTGGATATGTCATCGGCGGTCTCTGCTGGTTTCGCTATTCCCTGGCTCT  
 GCGCGACAACGATGGGTCTCTCTGCATTGCGCTAGAGGGAACGCGCCGATTGCCTCCGTTGACGTAACAGCCGGCCTC  
 GTCCTCCCTTTGCATCTGTGCAACTCCTCGGATATAGTGGCGCAGTATGCACAACCTTATGATCTTTATGGCCGTGAC  
 CTCTGCCTTCTCGGCCAGCTCATCGCCGTGCTCTGATCCTCACCTACGATATCTACCAAGCCTACATCAACCCTGCCG  
 CAAAGGGCAAACGCCTCGTCTGGGTCTCGCACCTCTCCTGCGTAGTCTTCGCAATCGCGATGGCTGCCTTTGCGACAGGT

CTTCACTACGCTGGTATCGGTATGGGCTATCTCTACCTTCTCATGGGCGTCATCATCTCCTCAGCCGTGTTCCCGGGCGC  
CATGACCCCTCGTCTGGAAGGGGCGAAGTGGATCGCGGCAGCCGCTCTCCAGTTTTGGGCTCGCAATGTCCCTGGTTG  
CGTGGCTTGTTACAACAAAGACAGAGTATGGCGTCTTACCCTCGAAACCACAGGAGCAAACCTACCCCATGCTAGCGGGC  
AACGTCGCGCCCTTCTCAGCCCTGTCGTCTTCTCGCCAGTCTTGACATACCTCTTCCGGCCCTCAGAATTACGACTACGA  
ATCCATGCGCGCCATCCGCAAAGTCGATGACTCGGATGTCGCCGCGGCGGCACGTCGACCTCGAGCTCATTCCCGGGC  
CTTCCAATAACAACTCGTCCCTTACAGCAACAGCAAGAGGAAGAGAAATAAGAAAACCTCAACAAGCCGATTTATT  
TCCCGTGTCTCACAGTTGGCATGGTAATTTGTTTCTTGATCCTCTGGCCTATACCCATGTATGGCAGCGGGTACGTCTT  
CAGCAAGAAGTTCTTACAGGCTGGGTTGTTGGGCATCATCTGGCTCTTGGGACTGCGTTCCGGGTGATTCTATTCC  
CGCTCTGGGAGGGTAGGAGCAGTATCAAAAGGGTTGGTAAGCTTATGCTGCTCGATGCGATGGGAAGGCAGTGGAAAAGC  
AGTGCTCTGGTAGGCCAGGGAGACGAAGAGAGTGAAGAGTCTGGGTCTGGTGCTGTTACACCGAGCGAGAAGATTGTTGC  
AAAAAGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTGTTG  
AATTAGATGGTGTATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGCTGAGGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTACC  
CTTAAATTTATTTGCACACTGGAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTACCTATGGTGTTCATG  
CTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCAGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGA  
CCATCTTCTTCAAAGACGACGGGAACACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGGAGGAGACACCCTCGTCAACAGGATC  
GAGCTTAAAGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAACCTACAACCTCCACAACGT  
ATACATCATGGCCGACAAGCAAAAGAACGGCATCAAAGCCAACCTTCAAGACCCGCCACAACATCGAAGACGGCGGCGTGC  
AACTCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACA  
CAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTAC  
ACATGGCATGGATGAACTATACAAATAAACCGGTGCGCTCAAACAATGCTCTTACCCTCTTCCGGGTCTGAAATACCC  
TCACCTGGCAACAGCAATTTGGCGCTTCATGGCTGTTTTTCCGATCTCTACTTGTACGGCTATGTGTACTCGGGTAAGC  
CACAAGGCAAGGGCAGATTGCTGGGAGGTTTCTTCTGGTTTTCTCAAGGCGCTCTGTGGGCTCTGAGTGTGTTTGGTGT  
GCCAAAGACATGATCTTACTGAGAGTTATTTCTGTGTCTGACGAAATATGTTGTGTATATATATATATGTACGTTAAA  
GTTCCGTGGAGTTACCAGTGATTGACCAATGTTTATCTTCTACAGTTCTGCCTGTCTACCCCAATTTAGCTGTACCTGA  
CTACAGAAATAGTTTTAATTTGTTGGTTGACCCACAGTCCGAGGCGGAGGAATACAGCACCGATGTGGCCGTCTCCATCCG  
ATTGGCACGCAATTTTTTACACGCGGAAAAGATCGAGATAGAGTACGACTTTAAATTTAGTCCCCGGCGGCTTCTATTTTA  
GAATATTTGAGATTTGATTCTCAAGCAATTTGATTTGGTTGGGTACCCTCAATTTGGATAATATACCTCATTGCTCGGCTA  
CTTCAACTCATCAATCACCCTCATACCCCGCATATAACCCTCCATTCCACGATGTCTGTCGAAGTCGAATTTGACTTACG  
GTGCTCGAGCCAGCAAGCACCCCAATCCTCTGGCAAAGAGACTTTTTGAGATTGCCGAAGCAAAGAAGACAAACGTTACC  
GTCTCTGCTGATGTGACGACAACCCGAGAACCTCTGGACCTCGCTGACCGTACGGAAGCTGTTGGATCCAATACATATGC  
CGTCTAGCAATGGACTAATCAACTTTTGTGATGATACAGGTCTCGGTCCCTACATCGCCGTCAAGACACACATCGACAT  
CCTCACCATTTCAGCGTCGACACTATCAATGGCCTGAATGTGCTGGCTCAAAGCACAACTTTTTGATCTTTCGAGGACC  
GCAAATTCATCGACATCGGCAATACCCTCCAGAAGCAATACCACGGCGGTGCTCTGAGGATCTCCGAATGGGCCCCACATT  
ATCAACTGCAGCGTTCTCCCTGGCGAGGGCATCGTTCGAGGCTCTGGCCAGACCGCATCTGCGCAAGACTTCCCCTATGG  
TCCTGAGAGAGGACTGTTGGTCTGGCAGAGATGACCTCCAAAGGATCGCTGGCTACGGGCGAGTATACCAAGGCATCGG  
TTGACTACGCTCGCAAATACAAGAAGTTCGTTATGGGTTTTCGTGTGACGCGGGCCCTGACGGAAAGTGCAGTCCGGATGTG  
TCTTACGCTCGGAGGATGAAGATTTCTGTTGCTTACAGCAGGGTGTGAACCTCTTCCAAAGGAGATAAGCTTGGACA  
GCAATACCAGACTCCTGCATCGGCTATTGGACGCGGTGCCGACTTTATCATCGCCGGTTCGAGGCATCTACGCTGCTCCCG  
ACCCGGTTGAAGCTGCACAGCGGTACCAGAAAGAAGGCTGGGAAGCTTATATGGCCAGAGTATGCGGCAAGTCATGATTT  
CCTCTGGAGCAAAGTGTAGTGCCAGTACGAGTGTGTGGAGGAAGGCTGCATACATTGTGCCTGTCAATTAACGATGA  
GCTCGTCCGATTTGGCCCTGTAATGCCATGTTTTCCGCCCAATCGTCAAGGTTTTCCCTTTGTTAGATTCTTACCAG  
TCAATATGGAAGGTTCCCTCAGGGACAAGTCGACCTGTGCAGAAGAGATAACAGCTTGGCATCACGCATCAGTGCCTCCTC  
TCAGACTCATATATCTTGCCTGTTGTGTGTTTACGCTAGCTAGATTCAATTTATGTTTTGCGTTTTGATTCAATTAACCC  
ACTCGTTACACATGTACCAAGTTTTTATAACCAGGGTGGCGACCAGCGTTTATGATAAGATAGCTTATATAGAATATGGCT  
ATTTCAATTAAGCATTATAATTCATTTACGGACCCTAGCTGAAGCAGTTATGTCTGTCGAAGCCGTCATTAACCTTTATAG  
AGCGAAATATAGAATTACAACCTGGAAAGACAAGAGCAATGTTCCCTCCAGAGATCAACCCCAACAGACCATAGAACAGT  
AACTTAGGTATCGTCATCAATCTGAGAGTAACTCCAGTCTTTCGAGGACCTGACGAACACTGAGCCTGCATTTGGGGC  
GGCCGAGTGTCTGGGTTAATATCGGGCGATCACTATTCTTGTAGTTTATGAACAATATAAGCCTCAGAGGCATTTGCC  
ATGAGCGCATCACTTATACGCATACGGCTGTGGTGGCGGTGATGTAGCCCCGACGCTACGGGAGGATACTGCATTTGCT  
GCTGCGGGTTTTGCTGCTGCTGATACCCCCAAAGTATGCCTGCGGCGGAGGTTGTGGTCCGTGATGTACTGAGAAGCAG  
TGGATCAGATGAAAAAGGAGAGCATAAGGCAAGGGAAGGATATAACCGAAGTCTGGGTAATTCGGCATGTGTAGCATG  
TAACTTCTTGTACTTGTGCATTGCTAATGGGATCACGGGCTGTATGGGATATGTCAGTTCCTTTTCTTCCGTACAATAC  
TGCTTTTAGCAAAGGCAGGATAGTGCCATACAATGAAGCAGATCGTGAAGAATGGCCTGTATACATGCGTTAGCCCCAGG  
CGTAGTTAGTTAACTCAGGACAACATACCATCGTGTACACACCGTCCATTCCAATGGTTGCCTGTACGGAGTTTAGTGC  
CAGATCCATTGGT

# Indice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	
<b>1.1- Presentación del modelo utilizado</b> .....	
<b>1.2- Transcripción <i>in vitro</i></b> .....	
1.2.1- Transcripción en eucariotas .....	
1.2.2- Características del kit de traducción <i>in vitro</i> utilizado en el presente trabajo .....	
1.2.3- ¿Cuales son las fallas más comunes en las reacciones de la técnica de transcripción <i>in vitro</i> ? .....	
<b>2. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO</b>	
<b>2.1- Objetivo general</b> .....	
<b>2.2- Objetivos específicos</b> .....	
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b> .....	
<b>3.1- Manipulación de <i>Aspergillus nidulans</i></b> .....	
3.1.1- Cepas utilizadas y generadas en el presente trabajo .....	
3.1.2- Medios y condiciones de cultivo .....	
3.1.3- Técnicas empleadas en <i>A. nidulans</i> .....	
<b>3.2- Puesta a punto de la técnica de transcripción <i>in vitro</i></b>	
3.2.1- Obtención del molde de ADN para la transcripción: eliminación de intrones de <i>ureA</i> .....	
3.2.1a- Amplificación por PCR de regiones exónicas del gen <i>ureA::gfp::AFpyrG</i> y del mutante <i>ureA24-25::gfp::AFpyrG</i> .....	
3.2.1b- Purificación de los fragmentos obtenidos por PCR .....	
3.2.1c- Fusión de las regiones exónicas mediante Fusion-PCR .....	
3.2.2- Clonado de las fusiones generadas en 2.2.1 mediante el método de RF-Cloning .....	
3.2.2a- RF-Cloning PCR .....	
3.2.2b- Digestión con DpnI .....	
3.2.3- Análisis electroforético de los productos de amplificación .....	
3.2.4- Purificación de los fragmentos obtenidos por PCR .....	

<b>3.3- Manipulación de <i>Escherichia coli</i></b> .....	
3.3.1- Medios de cultivo .....	
3.3.2- Técnicas empleadas con <i>E. coli</i> .....	
3.3.2a- Transformación de <i>E. coli</i> por el método de choque térmico .....	
3.3.2b- Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación .....	
3.3.3- Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> por lisis alcalina .....	
3.3.4- Análisis por digestión con enzimas de restricción de plásmidos obtenidos en las minipreparaciones .....	

<b>3.4- Ensayo de transcripción <i>in vitro</i></b> .....	
3.4.1- Amplificación del gen <i>ureA</i> para el ensayo de transcripción <i>in vitro</i> .....	
3.4.2- Transcripción <i>in vitro</i> .....	

## **4. RESULTADOS Y DISCUSION** .....

<b>4.1- Obtención de los moldes para las reacciones de transcripción <i>in vitro</i></b> .....	
4.1.1- Obtención de construcciones génicas con eliminación de intrones de <i>ureA</i> 24-25 y <i>ureA</i> salvaje .....	
4.1.2- Fusión de las regiones exónicas mediante Fusion-PCR .....	
4.1.3- Clonado de las construcciones <i>ureA</i> salvaje y <i>ureA</i> 24-25 mediante el método de RF-Cloning .....	
4.1.4- Digestión con enzimas de restricción para verificar los plásmidos que contienen el gen <i>ureA</i> .....	
4.1.5- <i>Secuenciación de los fragmentos obtenidos</i> .....	

<b>4.2- Ensayo de transcripción <i>in vitro</i></b> .....	
---	--

## **5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA** .....

## **6. BIBLIOGRAFIA** .....

## **7. ANEXOS** .....

<b>7.1- Construcción <i>ureA::GFP</i></b> .....	
---	--

<b>7.2- Construcción <i>ureA::GFP sin intrones</i></b> .....	
--	--

<b>7.3- Construcción <i>ureA24-25::GFP sin intrones</i></b> .....	
---	--