



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Deleción del gen *pepA* en una cepa de  
*Aspergillus niger* para aumentar los rendimientos  
en la producción de una proteína heteróloga  
de interés industrial”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

María José Mosqueira Santillán



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente** Marco Antonio Ortiz Jiménez

**Vocal** Alejandro Camacho Cruz

**Secretario** Adán Chávez Castillo

**1er. Suplente** Norma Angélica Camacho de la Rosa

**2do. Suplente** Beatriz Ruiz Villafán

### **Sitio donde se desarrolló el tema**

Laboratorio de Microbiología Industrial,  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

---

**Adán Chávez Castillo**  
**Asesor**

---

**María José Mosqueira Santillán**  
**Sustentante**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del Dr. Sergio Sánchez Esquivel. Agradezco el tiempo y el interés otorgados al desarrollo de este trabajo.**

Agradezco a la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al Jurado que ayudó con la revisión, corrección y aprobación de esta tesis.

Agradezco al Dr. Adán Chávez Castillo por su valiosa asesoría en la realización de este proyecto y por todo el apoyo otorgado.

# ÍNDICE

<b>I. LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>Objetivo general</b>	
<b>Objetivos particulares</b>	
<b>Hipótesis</b>	
<b>III. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>9</b>
<b>Hongos filamentosos en la industria</b>	
<b><i>Aspergillus</i>, un género de interés industrial</b>	
✓ Características del género <i>Aspergillus</i>	
✓ <i>Aspergillus</i> en la industria	
<b><i>Aspergillus niger</i></b>	
✓ Características	
✓ <i>Aspergillus niger</i> en la industria	
✓ <i>A. niger</i> como sistema de expresión de proteínas heterólogas	
✓ Perfil proteolítico de <i>Aspergillus niger</i>	
✓ Aspergillopepsina A	
<b>Transformación de hongos filamentosos</b>	
✓ Deleción o disrupción de genes	
<b>IV. METODOLOGÍA.....</b>	<b>22</b>
<b>Purificación del vector pUC57-GS</b>	
<b>Transformación de <i>Aspergillus niger</i></b>	
✓ Transformación de <i>A. niger</i> por electroporación	
✓ Transformación de <i>A. niger</i> por formación de protoplastos	
✓ Selección de transformantes	
✓ Caracterización molecular	
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>VII. REFERENCIAS.....</b>	<b>49</b>

<b>VIII. APÉNDICE A. Preparación de soluciones y medios empleados .....</b>	<b>53</b>
<b>IX. APÉNDICE B. Protocolos.....</b>	<b>62</b>
<b>X. APÉNDICE C. Secuencias y primers .....</b>	<b>81</b>

## I. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>cbp</b>	cuanto baste para
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>F</b>	factor de dilución
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FW</b>	Forward
<b>g</b>	1. gramos, 2. fuerza centrífuga relativa
<b>gDNA</b>	ácido desoxirribonucleico genómico
<b>GRAS</b>	Generally Recognized As Safe
<b>h</b>	horas
<b>HEPES</b>	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil-(1)] etanosulfónico
<b>kb</b>	kilobases
<b>kDa</b>	kilodaltones
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligramos
<b>min</b>	minutos
<b>MES</b>	ácido 2-morfolino etano sulfónico
<b>ml</b>	mililitros
<b>mm</b>	milímetros
<b>mM</b>	milimolar
<b>N</b>	normal
<b>ng</b>	nanogramos
<b>nm</b>	nanomolar
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>pM</b>	picomolar
<b>PEG</b>	polietilenglicol
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RV</b>	reverse
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>Tm</b>	temperatura de fusión
<b>V</b>	volts
<b>μg</b>	microgramos
<b>μl</b>	microlitros

## II. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos tienen un papel importante en la industria biotecnológica debido a su capacidad de producir altos rendimientos de enzimas y metabolitos, incluidos antibióticos, ácidos orgánicos, pigmentos y otros aditivos para alimentos (Cullen, 2007; Punt, et al., 2002; Pel, et al., 2007). En particular el género *Aspergillus* ha sido un sistema prometedor para la expresión de proteínas tanto homólogas como heterólogas (Lubertozzi y Keasling, 2009). Sin embargo, a nivel industrial, uno de los mayores problemas con los que se enfrenta la producción de proteínas heterólogas en sistemas de expresión como *A. niger* y otros hongos filamentosos es la degradación por proteasas extracelulares (Gouka, et al., 1996). Se ha demostrado que las proteasas propias del hongo son en muchos casos las responsables de la obtención de bajos rendimientos en la producción de muchas proteínas heterólogas como en el caso de la interleucina-6 y la fosfolipasa A2 pancreática de cerdo (Gouka, et al., 1997). Dentro de estas proteasas, destaca el grupo de las aspergilopepsinas, donde la aspergilopepsina A juega un papel importante en la degradación de proteínas, representando más del 80% de la actividad proteolítica ácida del hongo (Van den Hombergh, et al., 1997). Muchos grupos de investigación han logrado aminorar el problema de las proteasas endógenas generando cepas deficientes en ellas (Archer, et al., 1992). En el año de 1990, se logró por primera vez suprimir el gen *pepA* de una cepa de *A. awamori* y se observó que esto redujo la actividad proteolítica aproximadamente en un 20% en comparación con la cepa silvestre (Berka et al., 1990). Si bien, en el caso de *A. niger*, se han logrado obtener cepas deficientes en proteasas extracelulares, que se ha comprobado han sido efectivas en el mejoramiento de los rendimientos en la producción de proteínas heterólogas, éstas no se encuentran disponibles de manera comercial.



Por ello, es importante que una compañía que desee establecerse como empresa productora de proteínas heterólogas con sistemas como *A. niger*, busque la manera de obtener las cepas deficientes en proteasas que le permitan optimizar su producción.

### **Objetivo general**

Crear una cepa mutante de *A. niger* deficiente en aspergiloepsina A ( $\Delta pepA$ ) que pueda emplearse para la producción de proteínas heterólogas de interés industrial.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar dos sistemas de transformación (electroporación y generación de protoplastos) para conocer cuál es el más conveniente para transformar la cepa de *A. niger* auxótrofa a uridina ( $pyrG^-/pepA^+$ ).
- Obtener una mutante  $\Delta pepA$  a partir de una cepa de *A. niger* auxótrofa a uridina ( $pyrG^-/pepA^+$ ).
- Caracterizar molecularmente las cepas obtenidas.

### **Hipótesis**

Mediante el empleo de dos métodos de transformación para hongos filamentosos (electroporación y generación de protoplastos); es posible obtener una cepa de *Aspergillus niger* deficiente en el gen que codifica para la aspergiloepsina A ( $pyrG^+/pepA^-$ ), que podrá emplearse como vehículo de expresión para la producción de proteínas heterólogas de interés industrial.

### **III. MARCO TEÓRICO**

#### **Hongos filamentosos en la industria**

Los hongos filamentosos han jugado un papel importante en muchos procesos biotecnológicos debido a que son capaces de producir altas cantidades de proteínas y metabolitos (Punt, et al., 2002). Actualmente, una gran variedad de compuestos, desde ácidos orgánicos simples hasta metabolitos secundarios complejos son producidos con este tipo de sistemas para ser aplicados en diversos sectores productivos, como por ejemplo la industria textil o la industria alimentaria (Meyer, 2007; Talabardon y Yang, 2005).

Se sabe que debido a su carácter saprófito y su capacidad secretora, los hongos filamentosos son excelentes productores de enzimas extracelulares como son las amilasas, proteasas, hemi-celulasas, pectinasas, fosfatasas, entre otras; mismas que emplean en la degradación de una gran diversidad de sustratos para obtener sus nutrientes (MacKenzie, et al., 1993; van den Hombergh, et al., 1997; Gouka, et al., 1997). Esta importante característica dio lugar a que los hongos filamentosos recibieran la atención por parte de diversos grupos de investigación para ser estudiados como sistemas de expresión de una gran variedad de enzimas homólogas y posteriormente el estudio profundo de estos sistemas dio lugar a su consideración como potencial sistema de producción de proteínas provenientes de organismos distintos a los hongos filamentosos (Archer, et al. 1995; Punt, et al., 2002; Wang, et al., 2005; Talabardon y Yang, 2005).

La producción de proteínas heterólogas a partir de sistemas como los hongos filamentosos se consideró en un principio atractiva debido a que

hay un número considerable de ventajas con respecto a otros sistemas eucariontes y bacterianos. Estas ventajas incluyen: (1) una gran habilidad para secretar altas cantidades de proteínas (Fleibner y Dersch, 2010); (2) capacidad de llevar a cabo modificaciones post-transcripcionales en las proteínas secretadas, como glicosilación, plegamiento de proteínas, entre otros (Liu, et al., 1998; Punt, et al., 2002); (3) la existencia de especies de hongos filamentosos designadas como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Lubertozzi y Keasling, 2009; Talabardon y Yang, 2005; van den Hombergh, et al., 1997), estatus que indica que son especies avaladas para su uso en procesos biotecnológicos que impliquen la obtención de productos destinados al consumo humano; y (4) la facilidad para purificar el producto de interés gracias a la morfología del sistema de producción que permite separar la biomasa del medio extracelular por filtración simple (Fleibner y Dersch, 2010; Lubertozzi y Keasling, 2009; van den Hombergh, et al., 1997).

La lista de hongos filamentosos de interés industrial incluye varias especies de los géneros *Mucor*, *Trichoderma* y *Aspergillus* (van den Hombergh, et al., 1997). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de enzimas y metabolitos homólogos y heterólogos producidos por algunas especies de hongos filamentosos que juegan un papel importante en la industria.

Sustancia	Microorganismo productor	Principales áreas de aplicación
<b>Ácidos</b>		
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Industria de alimentos, industria de bebidas
Ácido itacónico	<i>Aspergillus terreus</i>	Industria de polímeros
Ácido kójico	<i>Aspergillus oryzae</i>	Industria de alimentos
<b>Enzimas</b>		

$\alpha$ -amilasa	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>	Industria de alimentos, procesamiento de almidón
Quimosina	<i>Aspergillus niger</i>	Industria de alimentos
Celulasa	<i>Trichoderma viride, Trichoderma reesei</i>	Industria textil, industria papelera
Celobiohidrolasa	<i>Trichoderma viride, Trichoderma reesei</i>	Industria textil, industria papelera
Glucoamilasa	<i>Aspergillus phoenicis, Rhizopus delemar</i>	Procesamiento de almidón
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>	Industria textil, biosensores
Lacasa	<i>Trametes versicolor</i>	Industria textil, industria papelera
Lipasas	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>	Industria de alimentos, detergentes
Pectin liasa	<i>Trichoderma reesei</i>	Industria de alimentos
Proteasas	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>	Industria de alimentos, detergentes
Fitasas	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>	Industria de alimentos
Renina	<i>Mucor miehei</i>	Industria de alimentos
Xilanasas	<i>Trichoderma reesei, Trichoderma konignii, Aspergillus niger</i>	Industria de alimentos, industria panadera, industria papelera
<b>Exopolisacáridos</b>		
Escleroglucano	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Industria cosmética, producción de aceite
Pululano	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Industria farmacéutica, industria alimentaria
Esquizofilano	<i>Schizophyllum commune</i>	Industria farmacéutica
PSK, PSP	<i>Trametes versicolor</i>	Industria farmacéutica
<b>Metabolitos secundarios</b>		
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Industria farmacéutica
Ciclosporina	<i>Tolypocladium nivenum</i>	Industria farmacéutica
Alcaloides de ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	Industria farmacéutica
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Industria farmacéutica
Lovastatina	<i>Monascus rubber, A. terreus</i>	Industria farmacéutica

Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Industria farmacéutica
Taxol	<i>Taxomyces andreanae</i>	Industria farmacéutica
Zeranol	<i>Fusarium graminearum</i>	Industria ganadera
<b>Otros</b>		
Ácidos grasos poliinsaturados	<i>Mucor circinelloides</i>	Industria de alimentos, industria de piensos, industria farmacéutica
Ácido pantoténico	<i>Fusarium oxysporum</i>	Industria de alimentos, industria de piensos, industria farmacéutica
Hidrofobinas	<i>Trichoderma reesei</i>	Ingeniería de tejidos, nanotecnología
Biomasa	<i>Agaricus bisporus, Fusarium venentatum</i>	Industria de alimentos

**Tabla 1.** Compuestos producidos por hongos filamentosos y el sector industrial en el cual son empleados (Meyer, 2007).

## ***Aspergillus*, un género de interés industrial**

### Características del género *Aspergillus*

*Aspergillus* es un género muy grande y variado de hongos filamentosos que se reproducen asexualmente y que comprende más de 200 especies distintas, incluyendo algunas de alto valor comercial como *A. oryzae* y *A. niger* (Lubertozzi y Keasling, 2009). El género debe su nombre a Micheli, que en el año de 1729 al ver al microscopio las estructuras reproductivas de un hongo, le recordaron al dispositivo empleado por los clérigos de la Iglesia Católica Romana para esparcir el agua bendita y que recibía el nombre de aspergilo, del latín *aspergere*, que significa rociar o esparcir (Machida, 2010).

### *Aspergillus* en la industria

La ubicuidad y facilidad de cultivo de las especies que conforman este género ha llamado la atención de numerosos microbiólogos haciendo de

*Aspergillus* uno de los más conocidos. Además, un historial muy largo de uso en la industria de alimentos y bebidas, así como un alto potencial biotecnológico han dado lugar a que algunas especies, como son *A. niger* y *A. oryzae* hayan obtenido el estatus GRAS (Generally Recognized As Safe) asignado por la FDA (Lubertozzi y Keasling, 2009; Iwashita, 2002).

Este género es sin duda uno de los más empleados hoy en día en la producción comercial de proteínas, principalmente de enzimas, dentro de las que se encuentran varias celulasas, hemicelulasas, pectinasas, amilasas, inulasas, xilanasas, lipasas y diversas proteasas con distintas aplicaciones en la industria textil, alimentaria, del papel, y en la producción de detergentes y diversos químicos (Fleißner, 2010; Pel, et al., 2007).

### ***Aspergillus niger***

#### Características generales

Dentro de las características más importantes de *A. niger* destaca la forma de su estructura reproductiva, conocida también como cabeza aspergilar, que mide de 100 a 200  $\mu\text{m}$  y se compone de conidióforos cenocíticos largos y una vesícula redonda a partir de la cual surgen, en un ángulo de casi  $360^\circ$ , dos series de esterigmas o fiálides, la primera serie formada por esterigmas de mayor tamaño que la segunda. Los esterigmas son las estructuras especializadas que darán lugar a los microconidios negros (coloquialmente llamadas esporas), forma anamórfica o asexual de reproducción de estos hongos. Es importante mencionar que el tamaño de los componentes de la cabeza aspergilar, así como la disposición y color de los conidios, es una característica

relevante para la identificación de *A. niger*. Su micelio es macrosifonado, tabicado y sus hifas reproductivas miden de 4 a 6  $\mu\text{m}$ . En el laboratorio crece en medios comunes como agar Sabouraud o papa dextrosa agar (PDA) a 28°C y da lugar a colonias negras, granuladas y de rápido crecimiento (Bonifaz, 2009). De esta especie, es importante señalar que sólo se ha llegado a conocer reproducción asexual. Sin embargo, se ha sugerido que algunas especies como *A. fumigatus* y *A. oryzae* pudieran tener potencial para la reproducción sexual y que una situación similar podría aplicarse a *A. niger* (Pel, et al., 2007).

Otra característica importante de esta especie es su pared celular, que está compuesta de quitina, 1,3- $\beta$ -glucano, 1,6- $\beta$ -glucano, 1-3- $\alpha$ -glucano, galactosaminogalactana y galactomanana. La pared celular le proporciona a *A. niger* rasgos importantes durante la fermentación a nivel industrial, pues ésta se encuentra relacionada con la morfología e integridad celular del hongo. Además, se sabe que *A. niger* es capaz de secretar sustancias conocidas como hidrofobinas, compuestos que también llegan a tener un papel relevante en la morfología celular debido a su estructura de monocapa anfipática (Pel, et al., 2007).

### *Aspergillus niger* en la industria

El hongo filamentoso *A. niger* ha sido usado durante mucho tiempo a nivel industrial para la producción de ácido cítrico, el cual se emplea en la industria de alimentos, bebidas y productos farmacéuticos (Cullen, 2007). Además de las ventajas que un hongo filamentoso puede ofrecer, este hongo es una de las especies que posee el estatus GRAS y posee un metabolismo y versatilidad nutricional que le permiten desarrollarse y crecer en una gran diversidad de sustratos y bajo varias condiciones ambientales (Cullen, 2007; Pel, et al., 2007).

## *Aspergillus niger* como sistema de expresión de proteínas heterólogas

En la Tabla 2 se muestra un listado de algunas proteínas heterólogas producidas por *A. niger*, y el organismo del cual provienen.

<b>Proteína</b>	<b>Organismo de origen</b>
GM-CSF, interferón $\alpha$ -2, interleucina-6, IgG1 (kappa) humanizada, fragmento de unión a antígeno (Fab), anticuerpos, etc.	Humano
Fosfolipasa pancreática A2, pro-quimosina	Cerdo
Lisozima de huevo blanco	Gallina
Glicoproteína de superficie celular	<i>Boophylus microplus</i>
Peroxidasa	<i>Pleurotus eryngii</i>
Subunidad B de enterotoxina	<i>Escherichia coli</i>
Lipasa	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
Taumatina	<i>Thaumatococcus daniellii</i>
Lignina peroxidasa H8, manganeso peroxidasa H4	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Piranosas deshidrogenasa	<i>Agaricus meleagris</i>
Proteína verde fluorescente	<i>Aequoria victoria</i>
Doquerina	<i>Clostridium thermocellum</i>

**Tabla 2.** Proteínas heterólogas que se han expresado en *A. niger* (Fleißner y Dersch, 2010).

Si bien *A. niger* es uno de los microorganismos de elección para la expresión de proteínas heterólogas, un problema que se presenta en la producción de las mismas, cuando se emplean éste y otros hongos filamentosos, es que los rendimientos de proteínas heterólogas suelen ser bajos en comparación con aquellos obtenidos para proteínas homólogas, pues se alcanzan niveles que con pocas excepciones exceden algunas decenas de miligramos por litro de medio de cultivo. Se ha encontrado que hay diversas razones para que esto suceda y que la producción de proteínas heterólogas puede verse limitada a cualquier nivel, ya sea en la transcripción, la traducción, la secreción, o por

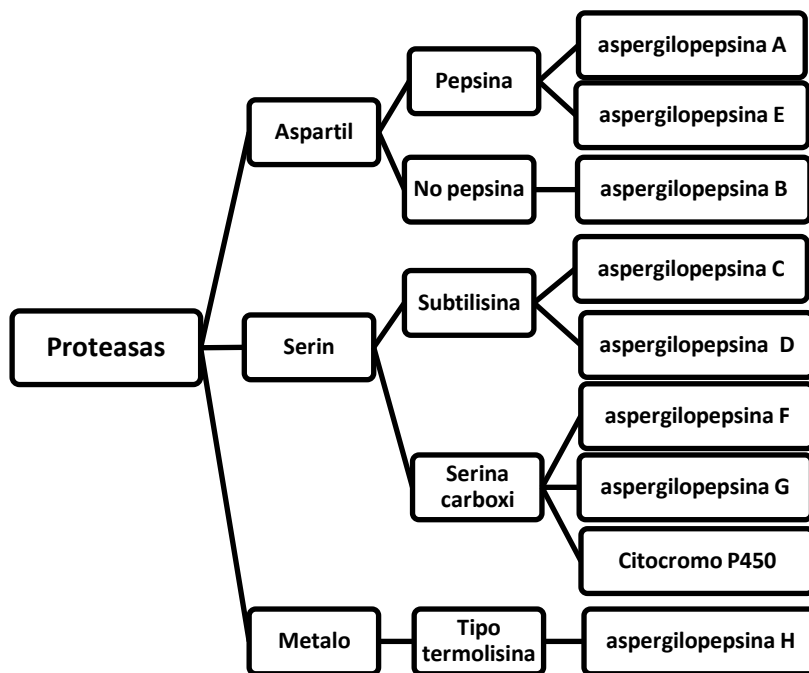


degradación a nivel extracelular (Cullen, 2007; Gouka, et al., 1997; Liu, et al., 1998, Punt, et al., 2002).

Como se mencionó anteriormente, una de las características que definen a los hongos es su gran capacidad de liberar enzimas al medio extracelular. Si bien esto resulta una ventaja nutricional para el hongo, a nivel industrial esta característica representa un gran problema en la producción de proteínas heterólogas, pues se ha encontrado que los bajos rendimientos obtenidos para este tipo de proteínas se deben en gran parte a la degradación por las proteasas extracelulares que el hongo produce (Gouka, et al., 1996; Liu, et al., 1998; Talabardon, 2005; Yoon, et al., 2008). En el caso de *A. niger*, se ha demostrado que las proteasas son las responsables de la degradación de diversas proteínas como en el caso de la interleucina-6, la quimosina bovina y la fosfolipasa pancreática A2 de cerdo (Gouka, et al., 1997).

#### Perfil proteolítico de *Aspergillus niger*

El espectro de proteasas en *Aspergillus* suele ser muy diverso entre cada especie. El genoma de *A. niger* codifica para 198 proteínas involucradas en la degradación de polipéptidos y se cree que su función radica en la degradación inespecífica de proteínas, así como en la activación de zimógenos (Pel, et al., 2007; van den Hombergh, et al., 1997). En el siguiente esquema (ver figura 1) se presenta una breve clasificación de las principales enzimas proteolíticas de *A. niger* en función de su mecanismo de acción.



**Figura 1.** Esquema simplificado de la clasificación de las proteasas de *A. niger*. (van den Hombergh, et al., 1997).

El grupo de proteasas conocidas como aspergiloepsinas tiene un papel muy importante en la actividad proteolítica de este hongo. Se sabe que en cuanto a la secuencia de aminoácidos, estas enzimas presentan alta homología con las peniciloepsinas producidas por el género *Penicillium*, con la diferencia de que las aspergiloepsinas son sintetizadas sólo por ciertos hongos filamentosos del género *Aspergillus* (Berka, et al., 1990).

De esta familia de proteasas se sabe que la aspergiloepsina A (PEPA), la aspergiloepsina B (PEPB), la aspergiloepsina D (PEPD), aspergiloepsina F (PEPF), la aspergiloepsina G (PEPG) y la aspergiloepsina H (PEPH) son extracelulares, mientras que el resto son intracelulares; y que de éstas las aspergiloepsinas A, B, F y G presentan una mayor actividad a pH ácido (van den Hombergh, et al., 1997). Debido a la acidificación que *A. niger* lleva a cabo en el medio de cultivo en el que se desarrolla, su perfil proteolítico revela un

predominio de proteasas ácidas, de las cuales, la aspergiloepsina A (PEPA) constituye el 84% de la actividad proteolítica ácida extracelular de *A. niger*. (van den Hombergh, et al., 1997; Yoon, et al., 2008).

### Aspergiloepsina A

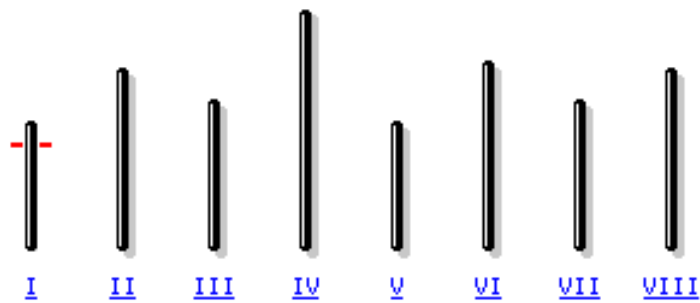
La aspergiloepsina A es una proteasa de 325 aminoácidos cuya clasificación EC es 3.4.23.18, donde 3 implica que pertenece al grupo de las hidrolasas; el 4 que actúa sobre enlaces peptídicos (grupo de las peptidasas); el 23 indica que según el grupo funcional presente en el sitio activo de esta enzima, puede clasificarse dentro del grupo de las aspartil proteasas; y 18 es un número arbitrario para diferenciar a las enzimas que comparten estas tres características (Revisar: [www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org), [www.chem.qmul.ac.uk](http://www.chem.qmul.ac.uk)).

La actividad catalítica de las aspartil proteasas depende de la presencia de residuos de ácido aspártico en el sitio activo. Este tipo de proteasas son conocidas también como proteasas ácidas y muestran una actividad máxima a un pH bajo (entre 3 y 4), con puntos isoeléctricos entre 3 y 4.5, y masas moleculares entre 30 y 45 kDa. Las peptidasas de este grupo tienen una estructura bilobular, en la cual el sitio catalítico se encuentra entre ambos lóbulos (Rao, et al., 1998).

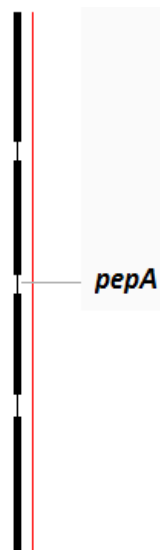
Además, la aspergiloepsina A se subclasifica dentro de la familia de las aspartil proteasas tipo pepsina (A1). La gran mayoría de las peptidasas de esta familia son endopeptidasas, lo que implica que rompen de manera preferente enlaces peptídicos de sitios internos de una cadena polipeptídica. También se sabe que suelen ser proteasas secretadas por las células como proenzimas inactivas, en el caso de la aspergiloepsina A, ésta es secretada como una proenzima de 374 aminoácidos, que se

activa autocatalíticamente a pH ácido para dar lugar a la proteína madura (Rao, et al., 1998; revisar: [www.ncbi.nlm.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.gov/protein); [merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk)).

El gen que codifica para la aspergillopepsina A, el gen *pepA*, se encuentra localizado en el cromosoma I del genoma de *A. niger* y consta de 4 exones y 3 intrones en una secuencia de 1588 pb (ver figuras 2 y 3).



**Figura 2.** Esquema simplificado de los 8 cromosomas de *A. niger* y la posición que ocupa el gen *pepA* (línea roja) dentro del genoma (Revisar: [www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)).



**Figura 3.** Esquema simplificado del gen *pepA* de *A niger*. El gen está formado por 4 exones y tres intrones ([www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)).

## **Transformación de hongos filamentosos**

Se entiende por transformación a la introducción o incorporación de DNA exógeno presente en el medio a una célula huésped o célula receptora y que hace que ésta adquiera un nuevo genotipo. Actualmente, la transformación de hongos filamentosos es una parte importante de la investigación de este tipo de microorganismos altamente empleados a nivel biotecnológico (Nelson y Cox, 2010; Hynes, 1996).

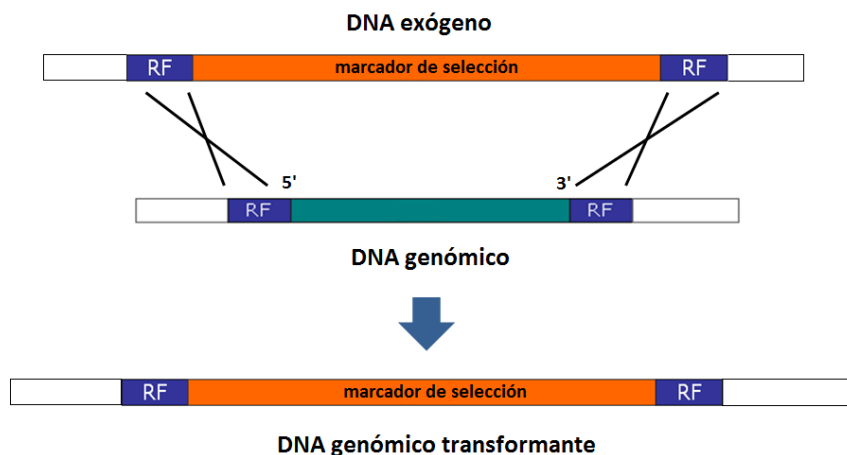
Para llevar a cabo la transformación se utiliza un vector de expresión. Existen dos tipos de vectores disponibles para la transformación de hongos filamentosos. Por un lado se cuenta con los vectores integrativos, que introducen el ADN dentro del genoma del hongo. También están los vectores con independencia replicativa, que permiten la existencia extra-cromosomal del ADN introducido. En hongos filamentosos, la transformación se lleva a cabo de manera primordial mediante el primer mecanismo, es decir, por recombinación del ADN exógeno con el genoma (Prabha y Puneekar, 2004).

Existen actualmente distintas técnicas para llevar a cabo la transformación en hongos, desde la transformación de células electrocompetentes, hasta la transformación de protoplastos o incluso el uso de métodos biolísticos (Ruiz-Díez, 2001; Weld, et al., 2006). Sea cual sea el método seleccionado, al momento de realizar la transformación sólo algunas células captan el ADN exógeno, por lo que es necesario un método para seleccionar aquellas que han sido exitosamente transformadas. La estrategia más común consiste en incluir en el ADN una secuencia que permita que la célula huésped crezca en determinadas condiciones. A este gen se le conoce como marcador de selección. Existen dos tipos de marcadores de selección, en

primer lugar están los marcadores de resistencia, que confieren resistencia a un determinado antibiótico o inhibidor; y por otro lado, están los marcadores nutricionales, que se basan en la complementación nutricional de la cepa a transformar a través de la introducción de un alelo silvestre (Nelson y Cox, 2010; Prabha y Puneekar, 2004).

### Delección o interrupción de genes

La delección de un gen ubicado en el genoma requiere de la recombinación homóloga entre éste y el DNA introducido. Para ello, es necesario crear una construcción en la que el marcador de selección elegido se encuentre flanqueado por las dos secuencias colindantes del gen que se desea eliminar. Una doble recombinación entre las secuencias homólogas daría lugar a la sustitución del gen por la secuencia que contiene el marcador de selección (ver figura 4). Sin embargo, la eficiencia de estos procesos se ve afectada por la preponderancia de recombinaciones heterólogas o ilegítimas (Hynes, 1996; Prabha y Puneekar, 2004).



**Figura 4.** Esquema simplificado del mecanismo de recombinación homóloga doble para la delección o interrupción de un gen (Prabha, et al., 2004).

## **IV. METODOLOGÍA**

### **Purificación del vector pUC57-GS**

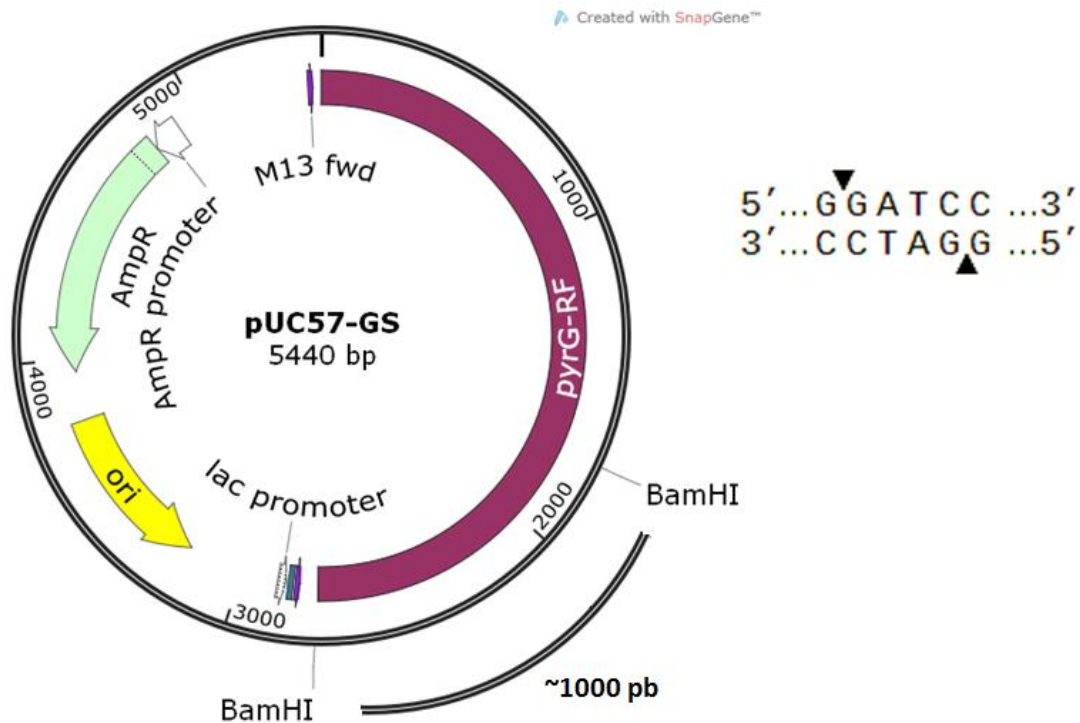
Se llevó a cabo la reconstitución del vector pUC57-GS, el cual fue sintetizado a partir del plásmido pUC57 y clonado con el inserto *pyrG*-RF (características del plásmido y secuencia del inserto en el Apéndice C) según el protocolo sugerido por la casa comercial GeneScript® (ver protocolo en el Apéndice B).

Una vez reconstituído se realizó la transformación de una cepa de *E. coli* JM109 empleando el Kit TransformAid Bacterial Transformation de Fermentas®. Para ello se siguió el protocolo sugerido por la casa comercial (ver protocolo en Apéndice B). Se eligió la cepa JM109 debido a que es una de las más empleadas por tener un genotipo estable, además, es una cepa de tipo K, *recA*- y *endA*-, características que minimizan la recombinación y mejoran la calidad del ADN plasmídico obtenido.

Posteriormente, se realizó una midipreparación por lisis alcalina con SDS para extraer el DNA plasmídico de las bacterias. Esto se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook et al. (Ver protocolo en Apéndice B). Tal metodología se fundamenta en la exposición de una suspensión bacteriana a un detergente aniónico, en este caso el SDS, que en condiciones alcalinas rompe la pared celular liberando el plásmido al sobrenadante, a la vez que desnaturaliza el ADN cromosómico y las proteínas. Estos últimos forman agregados que son recubiertos por SDS y que precipitan al ser sustituidos los iones sodio por iones potasio, permitiendo la remoción del precipitado de proteínas y ADN cromosomal por centrifugación (Sambrook, et al., 2001).

Después de la purificación del plásmido se determinó su concentración por espectrofotometría a 260 nm (ver protocolo en Apéndice B). Para comprobar la presencia de DNA plasmídico se llevó a cabo un ensayo de restricción de pUC57-GS con la enzima *BamHI* (ver protocolo en Apéndice B). Esta enzima es una restrictasa tipo II que reconoce la secuencia palindrómica de doble cadena GGATCC y realiza el corte después de G-1 dejando extremos 5'-fosfato.

Debido a que se encuentran en el plásmido dos sitios *BamHI*, después de la restricción se obtendrían dos fragmentos de distinta longitud, uno de ~1000 pb y otro de ~4440 pb (ver figura 5) cuya presencia se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (ver protocolo en Apéndice B).

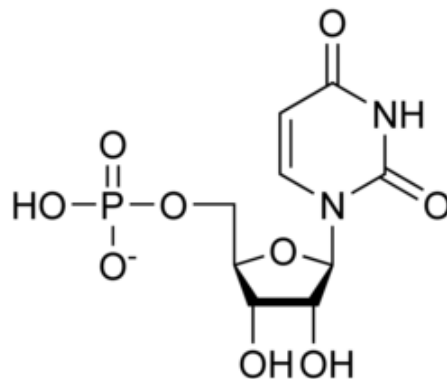


**Figura 5.** Esquema del plásmido PUC57-GS y los dos sitios de corte que presenta para la enzima *BamHI*, la cual reconoce la secuencia GGATCC y corta en los sitios indicados por las flechas.



## Transformación de *Aspergillus niger*

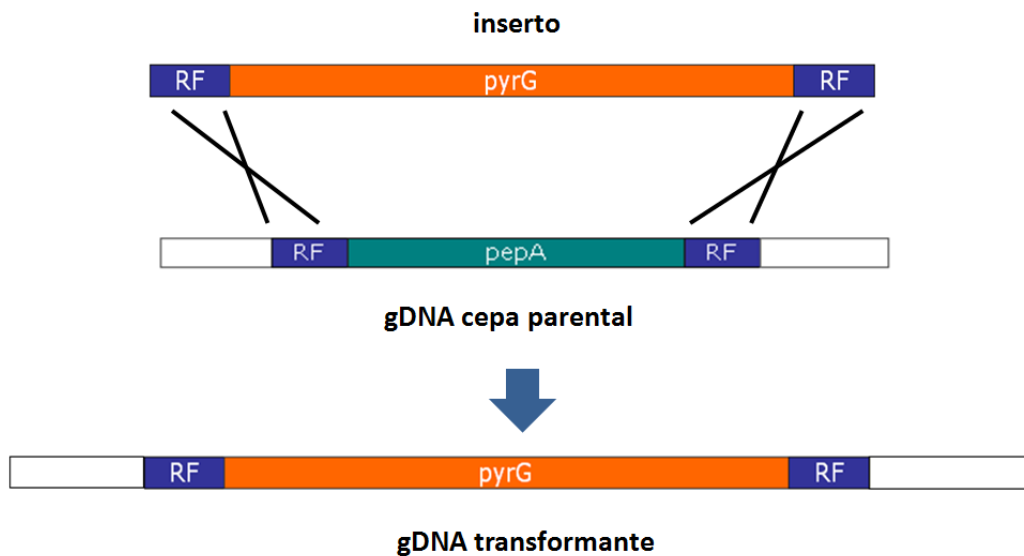
Una vez que se comprobó que el plásmido pUC57-GS fue extraído se realizó la obtención de esporas de la cepa parental de *A. niger* auxótrofa a uridina (ver protocolo en Apéndice B). La cepa parental posee la auxotrofia a uridina debido a que carece del gen que codifica para la enzima orotidina 5' descarboxilasa, esto implica que solamente crece en medios suplementados con este compuesto o medios suplementados con uracilo (ver figura 6) (Weld, et al., 2006). La elección de esta cepa, se llevó a cabo considerando que como marcador de selección se emplearía el gen *pyrG* el cual codifica para la enzima mencionada.



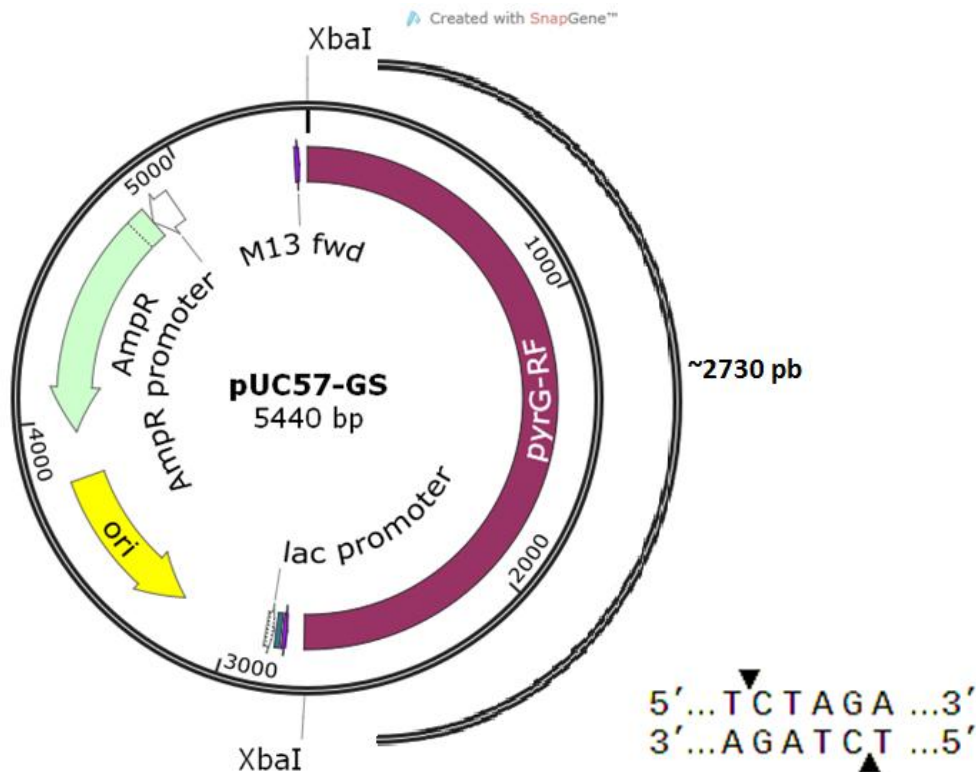
**Figura 6.** Estructura química de la uridina.

El diseño del inserto *pyrG*-RF para llevar a cabo la delección del gen *pepA* se fundamenta en el mecanismo de recombinación homóloga, por el cual, la presencia de las regiones flanqueantes del gen de la aspergiloepsina A a ambos costados del gen *pyrG* en el inserto (300 pb a cada lado), pueden permitir la recombinación homóloga del inserto en el gADN genómico de la cepa parental y con esto la sustitución del gen de la aspergiloepsina A por el gen de la orotidina 5' descarboxilasa (ver

figura 7). Los eventos de recombinación pueden ser diversos según la forma en que se encuentre el DNA exógeno (circular o lineal) y la forma de recombinación (doble o simple) (Weld, et al., 2006). Se ha visto que el ADN de doble cadena en su forma circular da lugar de manera preferente a recombinaciones ectópicas o ilegítimas, mientras que en el caso de ADN de doble cadena linearizado, los eventos de transformación suelen tener más probabilidades de ocurrir de forma homóloga (Fincham, 1989). Es por ello que se eligió realizar la transformación con el inserto linearizado con el fin de favorecer la recombinación que permitiera la delección del gen *pepA*. Esta linearización se llevó a cabo mediante digestión con la enzima *XbaI*, restrictasa que reconoce dos sitios de corte TCTAGA en el plásmido pUC57-GS (ver protocolo en Apéndice B). *XbaI* da lugar a dos fragmentos, uno de ~2710 pb correspondiente al plásmido sin inserto y otro de ~2730 pb, correspondiente al fragmento *pyrG*-RF (ver figura 8)



**Figura 7.** Esquema simplificado que muestra el mecanismo por el cual el gen *pepA* es sustituido por el gen *pyrG* (marcador de selección) a partir de la secuencia lineal del inserto *pyrG*-RF.



**Figura 8.** Esquema del plásmido pUC57-GS y los dos sitios de corte que presenta para la enzima *XbaI*, la cual reconoce la secuencia TCTAGA y corta en los sitios indicados por las flechas.

Además de la transformación de la cepa parental con el inserto *pyrG*-RF, se decidió realizar una cotransformación, en la cual se usarían de manera simultánea este inserto y el plásmido-p linearizado con la enzima *AatII* (ver protocolo en el Apéndice B). El plásmido-p (secuencia, características y esquema del plásmido no mostrados) contiene la secuencia del gen que codifica para una proteína heteróloga de interés (p), pero éste no contiene un marcador de selección, en este caso, una opción era la transformación con el plásmido-p junto con el vector pUC57-GS, el cual contiene el marcador de selección *pyrG*, a esto se le llama cotransformación (Fincham, 1989). La cotransformación con el inserto *pyrG*-RF nos permitiría una fácil selección mediante la complementación de la auxotrofia a uridina, además nos permitiría

obtener una cepa deficiente en aspergiloepsina A y que además fuera productora de la proteína de interés (p).

#### Transformación de *Aspergillus niger* por Electroporación

La primera técnica que se empleó fue la transformación por electroporación (ver protocolo en Apéndice B). Esta técnica es una de las más utilizadas en la transformación de hongos filamentosos. Su fundamento reside en la exposición de esporas germinadas a pulsos eléctricos de alto voltaje y corta duración (milisegundos) en presencia del ADN exógeno (Ruiz-Díez, 2001). Los pulsos inducen una permeabilidad temporal de la membrana en la cual se generan poros que permiten la internalización del ADN exógeno. (Ozeki, et al., 1994; Prabha y Puneekar, 2004; Weld, et al., 2006).

Inicialmente, para la obtención de la cepa  $\Delta pepA$ , se realizó un control sin ADN y una transformación empleando el plásmido pUC57-GS linearizado. Para la obtención de la cepa  $\Delta pepA$ -p se realizaron dos co-transformaciones utilizando ambos plásmidos (plásmido-p:pUC57-GS en relación 3:1 y 5:1). Para esta transformación se probó como medio de selección un medio Czapek-Dox modificado (ver Apéndice A).

#### Transformación de *Aspergillus niger* mediante formación de protoplastos

La segunda técnica empleada fue la transformación de *A. niger* por formación de protoplastos (ver protocolo en Apéndice B). Ésta también es una de las técnicas más empleadas e involucra la preparación de protoplastos seguida de la introducción del ADN exógeno a éstos, mediado por un tratamiento con  $\text{CaCl}_2/\text{PEG}$  (Hynes, 1996). En *Aspergillus*, los protoplastos pueden ser obtenidos a partir de esporas o

de micelio joven por digestión enzimática de la pared celular. En hongos, así como en los sistemas bacterianos o células animales, el componente universal de las mezclas de transformación es el ion calcio (Fincham, 1989; Ruiz-Díez, 2001). Con pocas excepciones, la internalización del ADN, ya sea como molécula lineal o circular, se lleva a cabo en la presencia de iones calcio y adicionando posteriormente altas concentraciones de PEG. Un requerimiento esencial para obtener las colonias transformantes es que los protoplastos deben estar protegidos con la presencia de un estabilizador osmótico, usualmente sorbitol a concentraciones entre 0.8 y 1.2 M que les permita sobrevivir después de la transformación hasta que la pared celular sea regenerada por completo (Fincham, 1989; Hynes, 1996; Ozeki, et al., 1994; Ruiz-Díez, 2001). Sin embargo, una desventaja que presenta esta técnica en el caso de *A. niger* es la gran dificultad que representa el obtener los protoplastos debido a los altos niveles de melanina de su pared celular; además, durante la germinación de esporas es común la formación de una gran cantidad de agregados, razón por la cual la transformación de protoplastos es considerada muy laboriosa (Prabha y Puneekar, 2004; Hynes, 1996; Fincham, 1989).

En este caso se realizó un control sin DNA; para la obtención de la cepa  $\Delta pepA$ , se llevó a cabo la transformación empleando el plásmido pUC57-GS digerido y se realizó un control sin ADN. Para la obtención de la cepa  $\Delta pepA-p$ , se usó la técnica de cotransformación utilizando los plásmidos plásmido-p:pUC57-GS en relación 5:1, respectivamente.

#### Selección de transformantes

Para ambas técnicas de transformación, parte de las esporas resultantes fueron inoculadas en 50 ml de caldo MN con uridina y sin uridina para

comprobar la complementación de la auxotrofia a este compuesto. Al mismo tiempo, las esporas generadas después del proceso de transformación fueron transferidas a placas con medio MN sin uridina (primer resiembra). Se realizaron dos resiembras adicionales en el mismo medio a partir de las esporas generadas en cada etapa con el fin de fijar la mutación. La razón para llevar a cabo este procedimiento es que los protoplastos pueden ser multinucleados y las colonias seleccionadas inicialmente después de la transformación pueden ser heterocariontes, lo que implica que algunos de sus núcleos estarán modificados genéticamente y otros no (Lubertozzi y Keasling, 2009). Esto puede dar lugar a falsos positivos al momento de seleccionar, por lo que es necesario llevar a cabo un proceso adicional de purificación genética, que se puede realizar a través de resiembras sucesivas de la cepa transformada (Weld, et al., 2006). Se ha visto que tres resiembras en medio selectivo han sido suficientes para tener altas probabilidades de haber perdido los núcleos no modificados (Fincham, 1989).

#### Caracterización molecular de las cepas transformantes

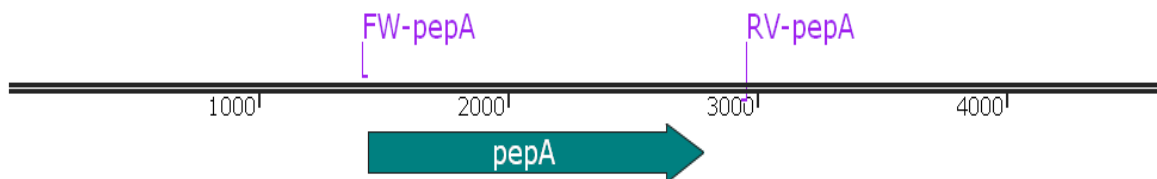
Una vez que las cepas de la tercera resiembra crecieron lo suficiente y produjeron esporas, se procedió a obtener el micelio de las posibles transformantes y de la cepa parental; enseguida se procedió a realizar la extracción del gADN de cada una de las cepas cultivadas utilizando el método de extracción con fenol-cloroformo (ver protocolo en Apéndice B). Una vez obtenido el gADN se determinó su pureza y concentración y se realizó la amplificación de la región ribosomal que abarca los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y el rRNA 5.8S para cada gADN extraído de cada transformante (ver figura 9), ver primers en Apéndice C y protocolo en Apéndice B). Aunque la amplificación de esta región suele ser utilizado para la identificación molecular de

hongos, en este caso se emplea con la finalidad de comprobar la integridad de cada gADN obtenido a partir del micelio (Korabecna, 2007). El análisis del gADN y el producto de la amplificación de la región ribosomal se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. (ver protocolo en Apéndice B).

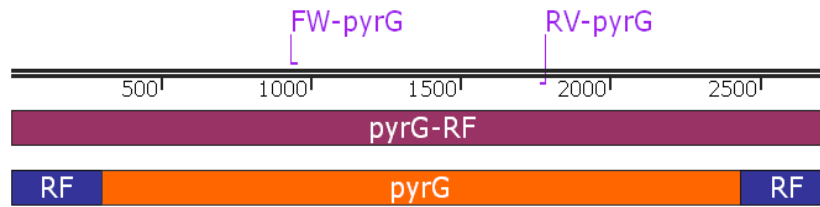


**Figura 9.** Esquema simplificado de la región ribosomal ITS1-5.8s-ITS2 y el sitio de alineación de los primers empleados ITS1-F e ITS4A.

Posteriormente, mediante PCR, se realizó la amplificación de dos regiones, una correspondiente al gen *pepA* y otra al gen *pyrG* de *A. niger* con el fin de determinar si las transformantes poseían el genotipo esperado (ver figura 10 y 11, ver primers en Apéndice C y protocolo en Apéndice B). Ambas amplificaciones se corroboraron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Ver protocolo en Apéndice B).



**Figura 10.** Esquema simplificado del gen *pepA* y los sitios de alineación de los primers empleados para la amplificación, FW-*pepA* y RV-*pepA*.



**Figura 11.** Esquema simplificado de la región del marcador de selección *pyrG* en el inserto y los sitios de alineación de los primers empleados para la amplificación, *FW-pyrG* y *RV-pyrG*.

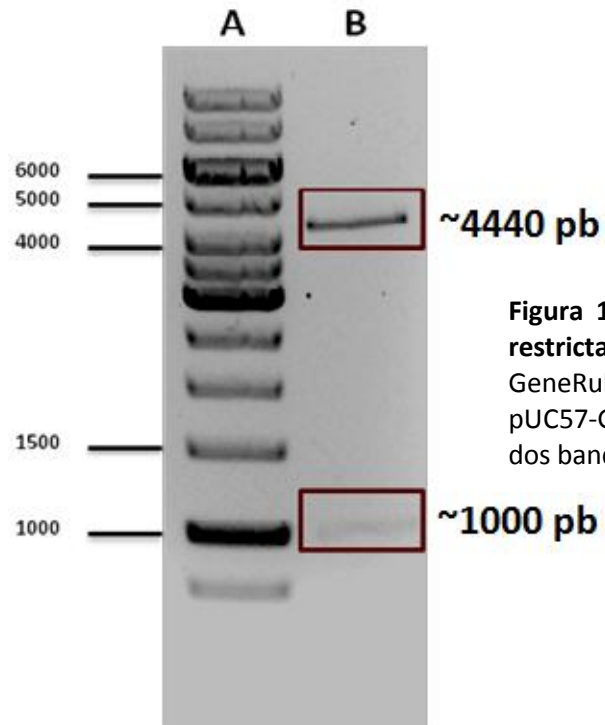


## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la transformación de la cepa JM109 de *E. coli* con el plásmido pUC57-GS. Tras un día de incubación a 37°C de las placas de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml (medio de selección) se observó el crecimiento de algunas colonias, de las cuales se tomó una única colonia aislada para propagar la bacteria transformada en caldo LB con el antibiótico a la misma concentración. Se recolectó la biomasa y se extrajo el plásmido pUC57-GS mediante midipreparación por lisis alcalina. La concentración del ADN plasmídico final fue de 11.1 mg/ml con una pureza ( $A_{260/280}$ ) de 1.83.

Al realizar el análisis de restricción con la enzima *BamHI* y la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se encontraron dos bandas que correspondían con las esperadas para este plásmido, es decir, bandas de ~1000 pb y ~4440 pb (ver figura 12). Con esto, se pudo comprobar la presencia del plásmido pUC57-GS en la muestra.

Se sembraron esporas de la cepa parental de *A. niger* en medio PDA y se observó crecimiento a partir del segundo día de incubación. Dicho crecimiento se caracterizó en una etapa inicial por la presencia de micelio blanco y más tarde (a partir del tercer día), por la aparición de esporas negras de un aspecto granuloso. La cosecha de esporas se llevó a cabo hasta que la superficie del medio se cubrió en su totalidad de esporas de color negro (ver figura 13). Se determinó la concentración de la suspensión final de esporas por conteo en Cámara de Neubauer.



**Figura 12.** Digestión del plásmido pUC57-GS con la restrictasa *Bam*HI. **A.** Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); **B.** Plásmido pUC57-GS digerido con enzima *Bam*HI, se observan dos bandas, una de ~1000 pb y otra de ~4440 pb.

**Figura 13.** Crecimiento de *A. niger* en medio PDA (quinto día post-inoculación).



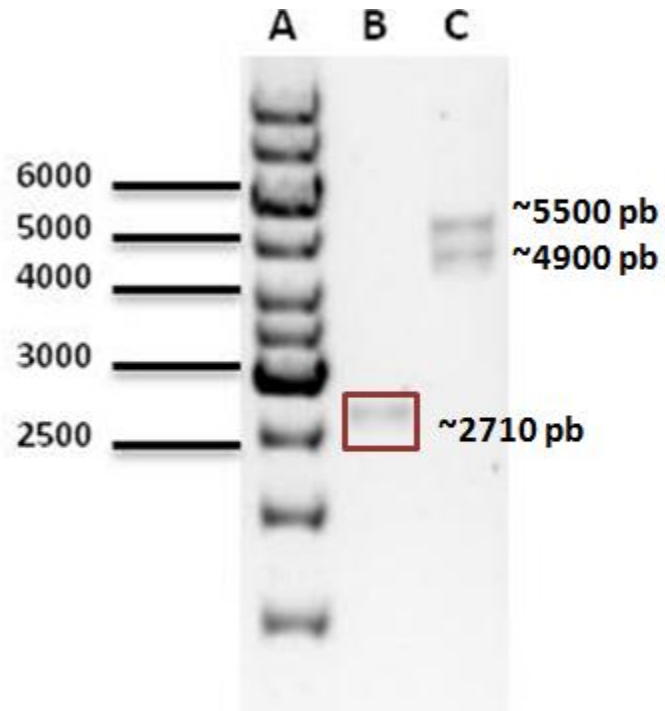
La concentración de esporas de *A. niger* obtenida después de la cosecha fue de  $2.43 \times 10^9$  esporas/ml. Éstas fueron utilizadas para llevar a cabo la transformación por electroporación y por formación de protoplastos.

Antes de realizar la transformación se linearizaron ambos plásmidos, pUC57-GS y plásmido-p con las enzimas de restricción *XbaI* y *AatII*, respectivamente. Al realizar los ensayos de digestión y la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se observaron las bandas correspondientes en ambos casos (ver figura 14).

Al digerir el plásmido pUC57-GS con *XbaI* y analizarlo por electroforesis en gel de agarosa a 0.8%, se observó solamente una banda cercana a los 2700 pb. Esto corresponde a lo esperado, pues si bien la enzima *XbaI* presenta dos sitios de corte dentro de la secuencia del plásmido, los fragmentos generados son de  $\sim 2710$  y  $\sim 2730$  pb, tamaños muy cercanos entre sí que generan bandas con la cercanía suficiente para ser percibidas como una sola. Por otro lado, al realizar la digestión del plásmido-p con *AatII* se generaron dos bandas correspondientes a las esperadas una banda de  $\sim 4900$  y otra de  $\sim 5500$ .

Una vez comprobado que las condiciones de reacción establecidas para los ensayos de digestión eran las adecuadas y que ambos plásmidos se encontraban en forma lineal se procedió a realizar la transformación con los mismos de la cepa parental de *A. niger*.

**Figura 14. Digestión de los plásmidos pUC57-GS y Plásmido-p con las restrictasas *Xba*I y *Aat*II, respectivamente. A. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); B. Plásmido pUC57-GS digerido con enzima *Xba*I, se observa una banda única de ~2710 pb; C. Plásmido-p digerido con enzima *Aat*II, se observan dos bandas, una de ~4900 pb y otra de ~5500 pb.**



El primer ensayo fue la transformación de *A. niger* por electroporación. Al realizar la selección con medio Czapek-Dox modificado hubo crecimiento de algunas colonias al tercer día a partir de la siembra. Se seleccionaron 9 colonias, de las cuales, 4 correspondieron a la transformación con el plásmido pUC57-GS ( $\Delta pepA$ ), 3 a la cotransformación 3:1 ( $\Delta pepA$ -p), y 2 a la cotransformación 5:1 ( $\Delta pepA$ -p). Todas las colonias presentaron un fenotipo muy similar a la cepa parental, con un crecimiento inicial en forma de micelio blanco y una posterior formación de esporas negras. A las posibles transformantes  $\Delta pepA$  se les denominó EP $\Delta$ -1, 2, 3 y 4; y a las posibles transformantes  $\Delta pepA$ -p se les llamó EP $\Delta$ p-1, 2, 3, 4 y 5.

Se procedió a realizar la prueba de complementación de la auxotrofia en medio MN con y sin uridina y posteriormente el crecimiento de la cepa en medio PDA sin uridina (primera resiembra). En la Tabla 3 se observan los resultados obtenidos en la prueba de complementación:

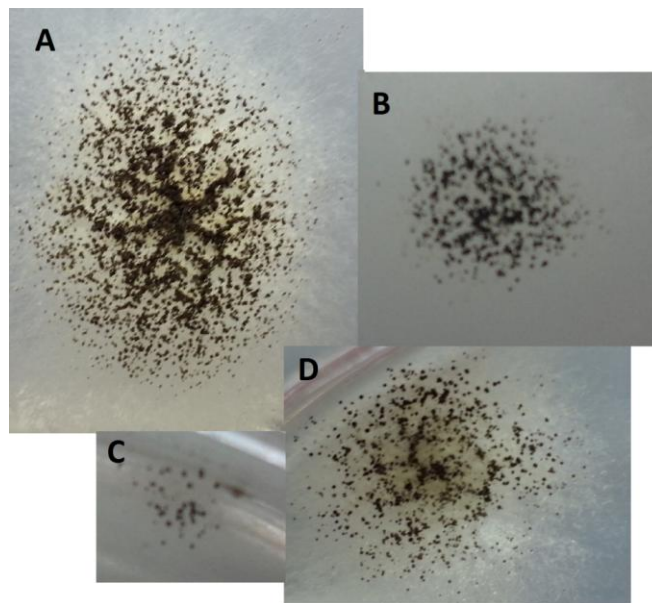
<b>Cepa</b>	<b>Crecimiento en MN con uridina</b>	<b>Crecimiento en MN sin uridina</b>
Cepa parental	✓	✗
EPΔ-1	✓	✓
EPΔ-2	✓	✗
EPΔ-3	✓	✗
EPΔ-4	✓	✗
EPΔp-1	✓	✗
EPΔp-2	✓	✗
EPΔp-3	✓	✗
EPΔp-4	✓	✗
EPΔp-5	✓	✗

**Tabla 3.** Resultados obtenidos en la prueba de complementación auxotrófica al hacer crecer las posibles cepas transformantes de *A. niger* obtenidas por electroporación en caldo MN en ausencia y presencia de uridina.

Al inocular esporas de todas las colonias seleccionadas en medio MN sin uridina y con uridina, se observó que todas crecieron en presencia de uridina mientras que ninguna creció en medio sin uridina, con excepción de una cepa, la cepa EPΔ-1, una de las colonias correspondiente a la transformación con el plásmido pUC57-GS, es decir, potencialmente deletada en el gen de la aspergillopepsina A ( $\Delta pepA$ ). Esta cepa presentó crecimiento tanto en el medio con uridina, como en el medio carente de este compuesto. Sin embargo, hubo una diferencia considerable en el tiempo de crecimiento de la cepa EPΔ-1 en los dos medios, pues mientras el medio con uridina presentaba crecimiento a partir del tercer día, el medio sin uridina no presentó este crecimiento sino hasta el quinto día de incubación y éste no fue tan abundante como en el medio

enriquecido. Con los resultados obtenidos a partir de la prueba de complementación se decidió continuar únicamente con las resiembras de la cepa EPΔ-1.

Por otro lado, al realizar la transformación por formación de protoplastos y la selección de las posibles transformantes con el medio AMM-N, se obtuvo crecimiento hasta el cuarto día de incubación a 29°C (ver figura 15). De esta transformación se seleccionaron 13 colonias, las cuales correspondieron en su totalidad a la cotransformación  $\Delta pepA$ -p 5:1 (plásmido-p:pUC57-GS), esto implica que potencialmente podían presentar una delección del gen *pepA* y además producir una proteína heteróloga específica. Las trece colonias presentaron un fenotipo muy similar, con un crecimiento rápido en forma de micelio blanco con una rápida producción (al segundo día de aparición de la colonia) de esporas negras. A las posibles transformantes  $\Delta pepA$ -p se les denominó  $\Delta p$ -1, 2, 3, 4, etc.



**Figura 15.** Crecimiento en AMM-N de las cepas de *A. niger* transformadas por formación de protoplastos (cuarto día). **A.**  $\Delta p$ -1; **B.**  $\Delta p$ -3; **C.**  $\Delta p$ -4; **D.**  $\Delta p$ -2.

Se procedió a realizar la siembra de la cepa en medio MN sin uridina (primera resiembra) y la prueba de complementación de la auxotrofia en caldo MN sin y con uridina. En la Tabla 4 se observan los resultados para las cepas obtenidas:

<b>Cepa</b>	<b>Crecimiento en MN con uridina</b>	<b>Crecimiento en MN sin uridina</b>
Cepa parental	✓	x
$\Delta p-1$	✓	✓
$\Delta p-2$	✓	✓
$\Delta p-3$	✓	✓
$\Delta p-4$	✓	✓
$\Delta p-5$	✓	✓
$\Delta p-6$	✓	✓
$\Delta p-7$	✓	✓
$\Delta p-8$	✓	✓
$\Delta p-9$	✓	✓
$\Delta p-10$	✓	✓
$\Delta p-11$	✓	✓
$\Delta p-12$	✓	✓
$\Delta p-13$	✓	✓

**Tabla 4.** Resultados obtenidos en la prueba de complementación auxotrófica al hacer crecer las cepas de *A. niger* obtenidas mediante formación de protoplastos en caldo MN en ausencia y presencia de uridina.

Se observó que todas las cepas crecieron tanto en presencia como en ausencia de uridina. En ambos medios se observó que el crecimiento para las trece cepas fue abundante y rápido (ver figura 16).



**Figura 16.** Crecimiento de cepas transformantes de *A. niger* en medio MN. Imagen izquierda; crecimiento de cepa  $\Delta p-2$  en caldo MN sin uridina (tercer día). Imagen derecha; crecimiento de cepa  $\Delta p-1$  en caldo MN con uridina (tercer día). Todas las cepas mostraron un crecimiento similar en ambos casos.

Tanto en el caso de la cepa obtenida por electroporación, como en el caso de las cepas obtenidas mediante la generación de protoplastos, el crecimiento en ambos medios implicaba que probablemente el marcador de selección *pyrG* había recombinado en alguna parte del genoma de las distintas cepas y por lo tanto que cabía la posibilidad de que en alguna de ellas se hubiera llevado a cabo la delección del gen *pepA*. Se decidió continuar con la resiembra en MN sin uridina.

Una vez que se tuvo la tercera resiembra de las cepas seleccionadas con ambos métodos y se logró obtener la cantidad de micelio suficiente, se realizó la extracción de gADN y se determinó la concentración de éste. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos:



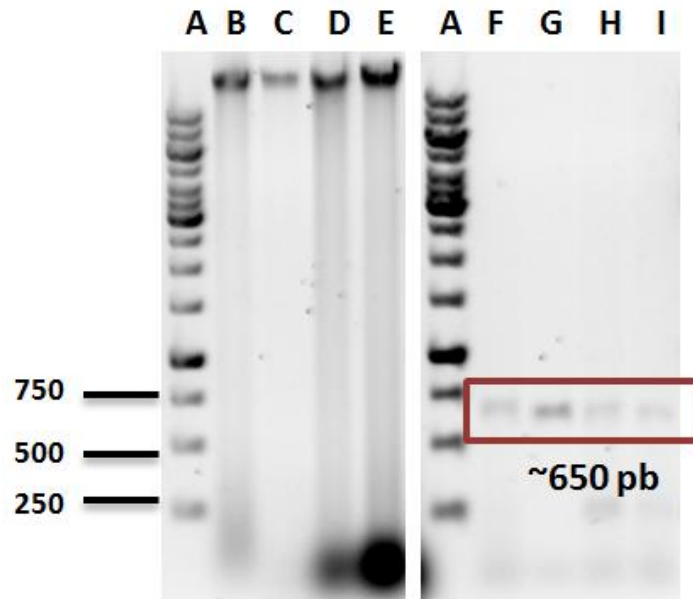
<b>Cepa</b>	<b>Concentración gADN</b>	<b>Pureza</b>
EPΔ-1	703.8 µg/ml	1.95
Δp-1	1030.5 µg/ml	1.92
Δp-2	1928.0 µg/ml	1.89
Δp-3	1315.7 µg/ml	1.98
Δp-4	1841.2 µg/ml	1.99
Δp-5	26213.2 µg/ml	1.99
Δp-6	1758.8 µg/ml	1.98
Δp-7	1306.9 µg/ml	1.94
Δp-8	698.0 µg/ml	1.90
Δp-9	438.3 µg/ml	1.89
Δp-10	1554.7 µg/ml	1.99
Δp-11	1836.8 µg/ml	1.97
Δp-12	1000.6 µg/ml	2.00
Δp-13	1375.4 µg/ml	1.96

**Tabla 5.** Concentración y pureza del gADN empleado para la caracterización genotípica de cada cepa de *A. niger* transformante.

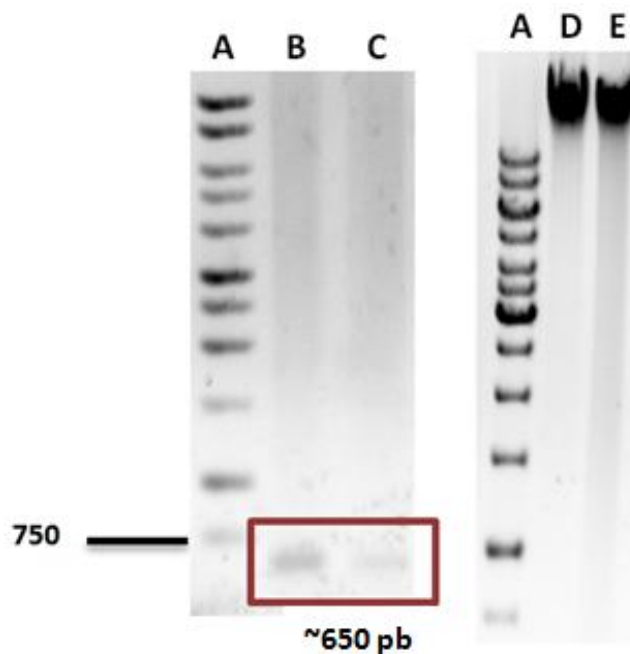
Al realizar la amplificación de la región ribosomal que abarca los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y el rRNA 5.8S y correr el gel de agarosa de estas muestras se observó la presencia de una banda entre 500 y 750 pb para el gADN de la mayoría de las cepas (con excepción de las cepas Δp-9 y Δp-10), lo cual corresponde con lo esperado para la región que amplifican los primers empleados: ITS1-F e ITS4A (ver figuras 17, 18 y 20). Esta amplificación corroboró la integridad del gADN de las cepas que presentaron dicha banda. Se observaron también otras bandas de ~250 pb, probablemente debidas a una amplificación inespecífica, dichas bandas fueron especialmente intensas en el caso de las cepas Δp-5 a 13 (ver figura 20).

En el caso de las cepas  $\Delta p-9$  y  $\Delta p-10$ , a pesar de que no se observó la banda correspondiente a la región ITS1-5.8s-ITS2, se observó una banda intensa de  $\sim 250$  pb. A pesar de que la amplificación que se llevó a cabo fue inespecífica, ésta fue suficiente para corroborar la integridad del gADN.

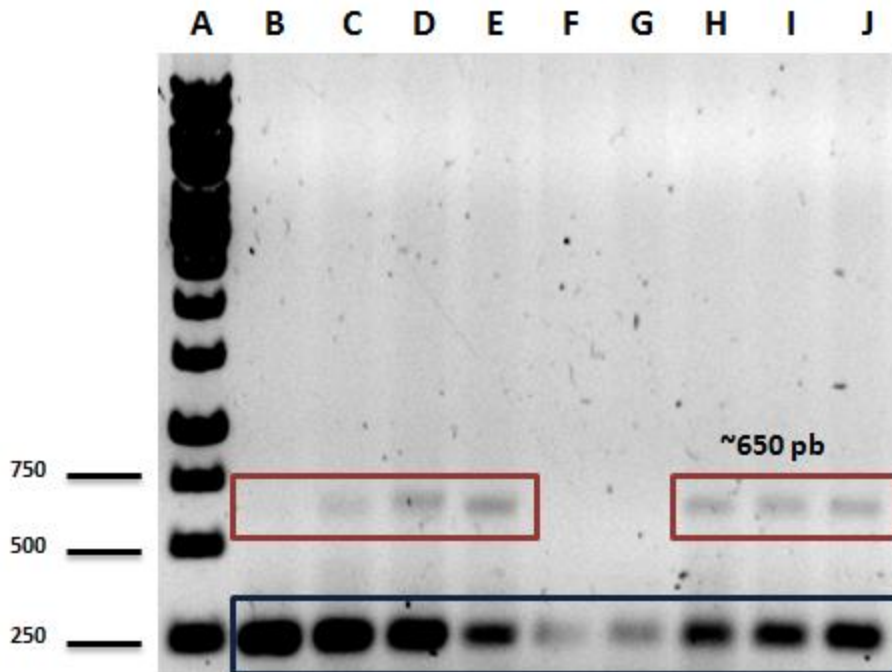
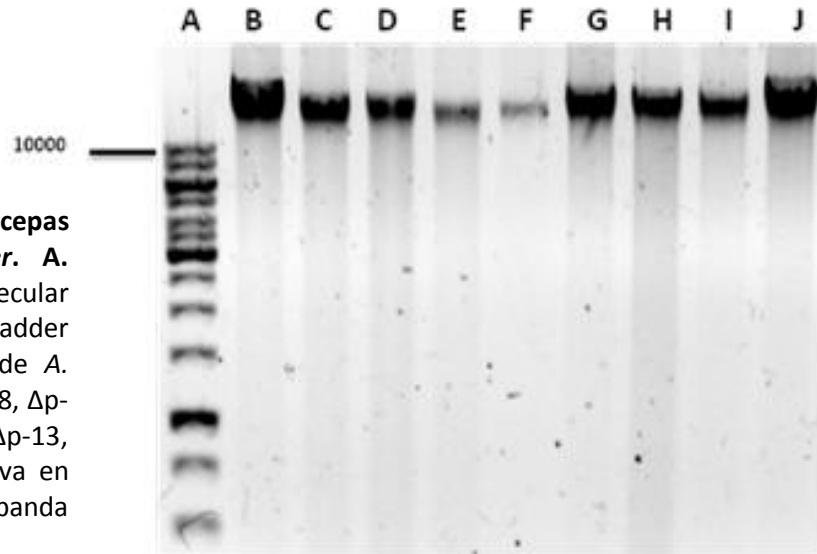
**Figura 17. gADN y amplicón de región ITS1-5.8s-ITS2 de cepas transformantes de *A. niger*.** A. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); B-E. gADN de *A. niger* cepa parental, EPA-1,  $\Delta p-1$  y  $\Delta p-2$ , respectivamente. Se observa una banda por arriba de los 10000 pb. G-I. Amplicón de región ITS1-5.8s-ITS2 de cepa parental EPA-1,  $\Delta p-1$  y  $\Delta p-2$ , respectivamente. Se observa una banda de  $\sim 650$  pb.



**Figura 18. gADN y amplicón de región ITS1-5.8s-ITS2 de cepas transformantes de *A. niger*.** A. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); B y C. Amplicón de región ITS1-5.8s-ITS2 de  $\Delta p-3$  y  $\Delta p-4$ , respectivamente. Se observa una banda de  $\sim 650$  pb. D y E. gADN de  $\Delta p-3$  y  $\Delta p-4$ , respectivamente. Se observa una banda por arriba de los 10000 pb



**Figura 19. gADN de cepas transformantes de *A. niger*.** A. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); B-J. gADN de *A. niger*  $\Delta p-5$ ,  $\Delta p-6$ ,  $\Delta p-7$ ,  $\Delta p-8$ ,  $\Delta p-9$ ,  $\Delta p-10$ ,  $\Delta p-11$ ,  $\Delta p-12$  y  $\Delta p-13$ , respectivamente. Se observa en todos los carriles una banda superior a 10000 pb.

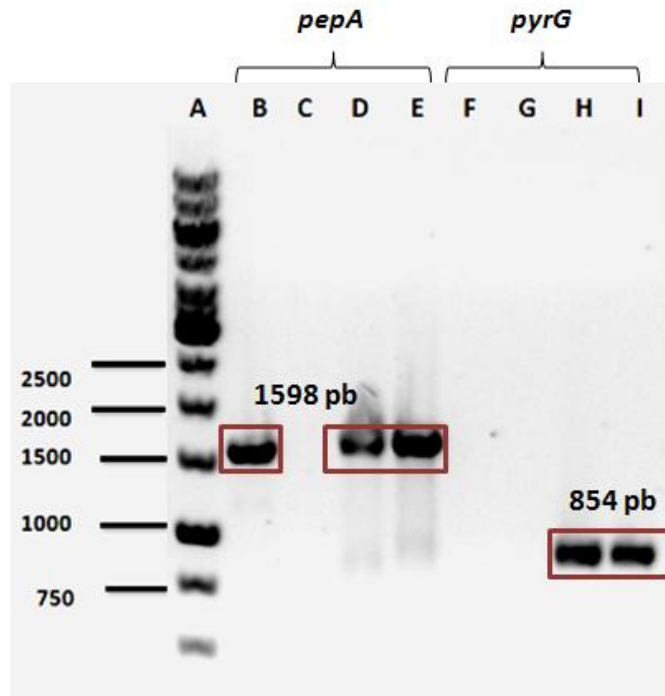


**Figura 20. Amplicón de región ITS1-5.8s-ITS2 de cepas transformantes de *A. niger*.** A. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); B, C, D, E, H, I y J. Amplicón de la región ITS1-5.8s-ITS2 de EPA-5,  $\Delta p-6$ ,  $\Delta p-7$ ,  $\Delta p-8$ ,  $\Delta p-9$ ,  $\Delta p-10$ ,  $\Delta p-11$ ,  $\Delta p-12$  y  $\Delta p-13$ . Se observa en cada carril una banda de ~650 pb; F y G. A partir de las cepas  $\Delta p-9$ ,  $\Delta p-10$ . No se produjo amplicón de la región ITS1-5.8s-ITS2. En todos los casos se observa una amplificación inespecífica, correspondiente a una banda muy intensa de aproximadamente 250 pb.

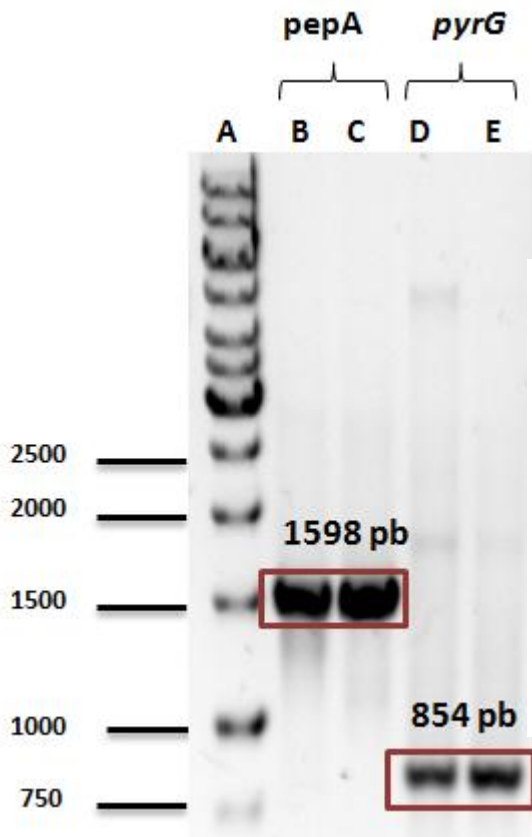
Una vez comprobada la integridad de cada gADN, se procedió entonces a hacer la caracterización genotípica de las cepas obtenidas mediante la amplificación del gen *pepA* y del marcador de selección *pyrG* y las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa (ver figuras 19 y 20).

La amplificación de la secuencia del gen *pepA* produce un amplicón de 1598 pb y la amplificación de parte de la secuencia del marcador de selección *pyrG*, genera una banda de 854 pb. La amplificación a partir del gADN de la cepa parental de *A. niger* resultó según lo esperado ya que se observó un resultado positivo para la amplificación de la secuencia de *pepA* y un resultado negativo en la amplificación del marcador de selección *pyrG*. Esto último se explica fácilmente por el hecho de que la cepa parental es auxótrofa a uridina, es decir que en su genoma no se encuentra el gen que codifica para la orotidina-5'fosfato descarboxilasa (*pyrG*<sup>-</sup>).

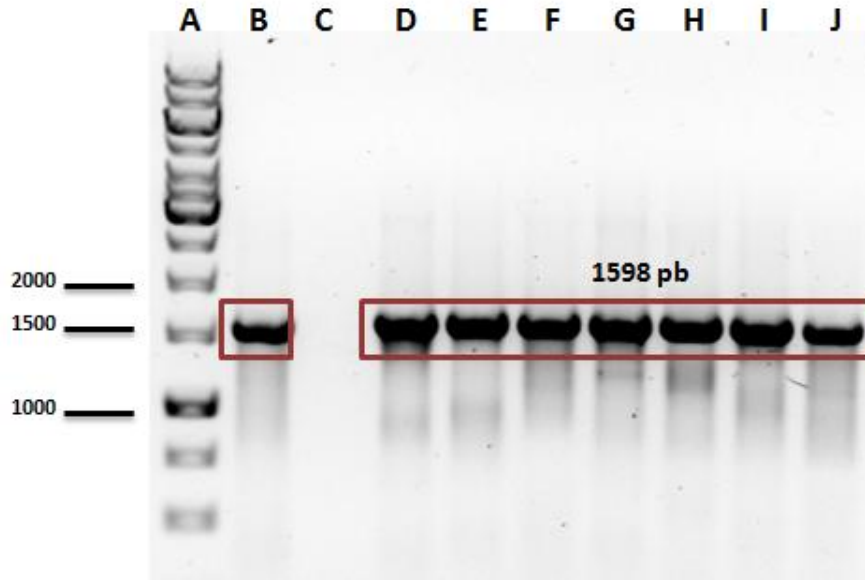
El resultado de la amplificación del gADN de las posibles transformantes se esperaba que produjera un genotipo *pyrG*<sup>+</sup>/*pepA*<sup>-</sup>, lo que indicaría que la delección de gen *pepA* se había llevado a cabo mediante la recombinación homóloga con el inserto linearizado del plásmido pUC57-GS, conteniendo el gen *pyrG*. Sólo dos cepas, EPΔ-1 y EPΔ-6, resultaron con un genotipo *pepA*<sup>-</sup>. Sin embargo, únicamente EPΔ-6 resultó *pyrG*<sup>+</sup>/*pepA*<sup>-</sup>, pues en el caso de EPΔ-1, el marcador de selección no logró ser amplificado. Las restantes presentaron un genotipo *pyrG*<sup>+</sup>/*pepA*<sup>+</sup> (ver figuras 21, 22, 23 y 24).



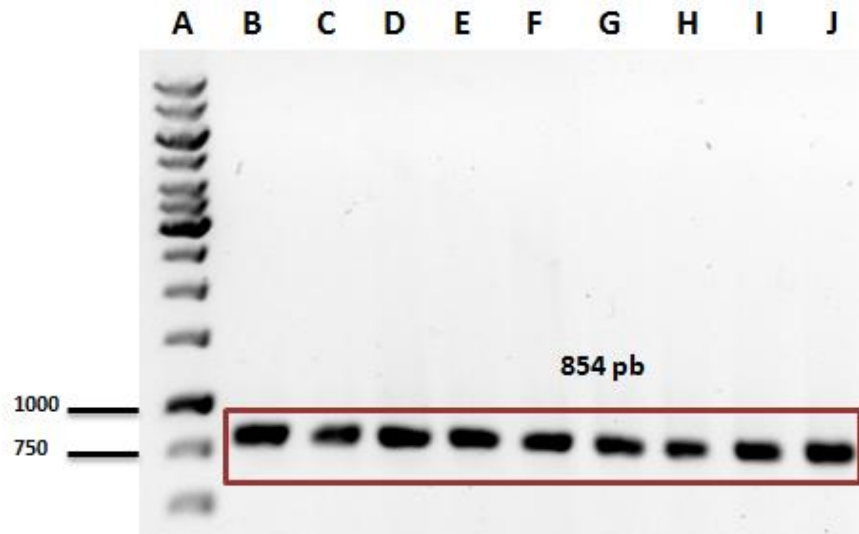
**Figura 21.** Amplificación de *pepA* y marcador de selección (*pyrG*) de cepas transformantes de *A. niger*. **A.** Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); **B-E.** Amplificación con los primers FW y RV-*pepA* (aspergillopepsina A) de *A. niger* cepa parental, EPΔ-1, Δp-1 y Δp-2, respectivamente. Se observa una banda de ~1598 pb en el caso de la cepa parental, Δp-1 y Δp-2; **F-I.** Amplificación con los primers FW y RV-*pyrG* (orotidina-5'fosfato descarboxilasa) de *A. niger* cepa parental, EPΔ-1, Δp-1 y Δp-2, respectivamente. Se observa una banda de ~854 pb.



**Figura 22.** Amplificación de *pepA* y marcador de selección (*pyrG*) de cepas transformantes de *A. niger*. **A.** Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); **B y C.** Amplificación con los primers FW y RV-*pepA* (aspergillopepsina A) de Δp-3 y Δp-4, respectivamente. Se observa una banda de ~1598 pb; **D y E.** Amplificación con los primers FW y RV-*pyrG* (orotidina-5'fosfato descarboxilasa de Δp-3 y Δp-4, respectivamente. Se observa una banda de ~854 pb.



**Figura 23. Amplificación de *pepA* de cepas transformantes de *A. niger*.** A. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); B-J. Amplificación con los primers FW y RV-*pepA* (aspergillopepsina A) de  $\Delta p-5$ ,  $\Delta p-6$ ,  $\Delta p-7$ ,  $\Delta p-8$ ,  $\Delta p-9$ ,  $\Delta p-10$ ,  $\Delta p-11$ ,  $\Delta p-12$  y  $\Delta p-13$ , respectivamente. Se observa una banda de  $\sim 1598$  pb en todos los carriles con excepción del correspondiente a  $\Delta p-6$  (carril C).



**Figura 24. Amplificación de marcador de selección (*pyrG*) de cepas transformantes de *A. niger*.** A. Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas®); B-J. Amplificación con los primers FW y RV-*pyrG* (orotidina-5'fosfato descarboxilasa de  $\Delta p-5$ ,  $\Delta p-6$ ,  $\Delta p-7$ ,  $\Delta p-8$ ,  $\Delta p-9$ ,  $\Delta p-10$ ,  $\Delta p-11$ ,  $\Delta p-12$  y  $\Delta p-13$ , respectivamente. Se observa una banda de  $\sim 854$  pb en todos los carriles.

En el caso de la cepa EPΔ-1, cuyo genotipo resultó ser *pyrG*<sup>-</sup>/*pepA*<sup>-</sup>, si bien la caracterización molecular indicó la ausencia del gen *pepA* en el gADN, tampoco fue posible la amplificación del marcador de selección. Existen varias opciones por las que esto pudiera ocurrir. Tomando en cuenta que el gADN se encontraba en buenas condiciones y que dio un resultado positivo al realizar el análisis molecular de la región ITS1-5.8s-ITS2, no se puede decir que el resultado negativo en la amplificación de *pyrG* y *pepA* sea a causa de la integridad del gDNA. Una de las causas para que se haya dado este fenómeno puede ser que la recombinación no se haya llevado a cabo y que alguna mutación espontánea dentro del genoma haya ocurrido; esto explicaría en primer lugar la ausencia del marcador de selección, y en segundo lugar el resultado negativo en la amplificación de *pepA*, pues la mutación espontánea podría haberse dado en el sitio de alineamiento de alguno de los primers utilizados, ya sea RV-*pepA* o FW-*pepA*. Otra explicación posible, es que la recombinación se haya dado en el sitio homólogo y que haya ocurrido una mutación espontánea en el sitio de alineamiento para los primers FW-*pyrG* y RV-*pyrG*, esto explicaría en primer lugar el resultado negativo al amplificar el gen *pepA*, y en segundo lugar que la amplificación de *pyrG* no se haya llevado a cabo, sin embargo, también implicaría que la recombinación no se hubiera llevado a cabo más que en el sitio homólogo y en ningún sitio heterólogo o ectópico.

Los resultados obtenidos para las cepas Δp-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 (todas las que resultaron *pyrG*<sup>+</sup>/*pepA*<sup>+</sup>) sometidas a transformación por formación de protoplastos, indican que probablemente se dio la transformación de la cepa parental. Sin embargo, la secuencia *pyrG*-RF pudo haber recombinado en un sitio distinto al correspondiente al gen de la aspergiloepsina A. En un principio se sabía que una de las desventajas y problemas que presenta

la delección o disrupción de genes de hongos filamentosos es que en los eventos de transformación es común que la recombinación sea heteróloga (Lubertozzi y Keasling, 2009; Prabha y Punekar, 2004). La probabilidad de que esto pase puede disminuirse empleando regiones flanqueantes más extensas, incluso de hasta 1000 pb a cada lado, con el fin de aumentar las posibilidades de recombinación dirigida al sitio homólogo (Weld, et al., 2006; Timberlake, 1991; Fincham 1989). Por otro lado, si bien el uso del inserto linearizado es una estrategia comúnmente empleada para favorecer la recombinación homóloga, el hecho de no haber llevado un tratamiento con fosfatasa alcalina del vector digerido, da lugar a que exista un equilibrio entre la forma lineal y un intermediario circular del vector (Timberlake, 1991). Se sabe que los patrones de recombinación seguidos por especies circulares difieren de las lineales y que para el caso de las primeras la recombinación es primordialmente ectópica, situación que dista de favorecer la disrupción del gen no deseado (Fincham, 1989).

Por último, la cepa  $\Delta p-6$  es una cepa con delección en el gen de la aspergilopepsina A; ya que los resultados obtenidos en la amplificación por PCR ( $pyrG^+/pepA^-$ ) de las regiones correspondientes a cada uno de estos genes, indican que se llevó a cabo una recombinación homóloga y que esta cepa podría emplearse como punto de partida para la expresión de la proteína recombinantes de interés, evitando así la expresión de la principal proteasa causante de la degradación de dichas proteínas. Como un ensayo complementario que corrobore la integración homóloga del marcador de selección, es necesario llevar a cabo una caracterización genotípica más profunda mediante la secuenciación del amplicón correspondiente a la región donde se llevó a cabo la recombinación.



## VI. CONCLUSIONES

De los dos métodos empleados para realizar la transformación de la cepa de *A. niger* auxótrofa a uridina, la transformación por formación de protoplastos resultó más eficiente que la electroporación, al no dar falsos positivos.

Cabe la posibilidad de que aproximadamente el 92% de las cepas de *A. niger* obtenidas por formación de protoplastos fueron resultado de una recombinación ectópica, ya que su genoma es  $pepA^+/pyrG^+$ .

Hasta el momento no se ha llegado a una conclusión precisa sobre la cepa EPA-1 ( $pepA^-/pyrG^-$ ), pues a pesar de que el análisis genotípico produce un resultado negativo sobre la presencia de *pepA*, y poseer un fenotipo  $pyrG^-$ ; la cepa es capaz de crecer en ausencia de uridina, por lo deberá profundizarse en la confirmación del análisis fenotípico y genotípico de esta cepa en particular.

La cepa  $\Delta p-6$  ( $pepA^-/pyrG^+$ ) presenta el genotipo correspondiente al producto de un evento de recombinación homóloga, ya que se logró la sustitución del gen de la aspergiloepsina A por el marcador de selección (*pyrG*).

La cepa  $\Delta p-6$  ( $pepA^-/pyrG^+$ ) puede ser empleada como punto de partida para la producción de proteínas recombinantes en el hongo filamentoso *Aspergillus niger*, con la ventaja de evitar en todo momento el efecto negativo que ejerce la aspergiloepsina A en la producción de dichas proteínas.

## VII. REFERENCIAS

Archer, D. B., MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J., & Roberts, I. N. (1992). Proteolytic degradation of heterologous proteins expressed in *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters*, 14(5), 357-362.

Archer, D. B., MacKenzie, D. A., & Ridout, M. J. (1995). Heterologous protein secretion by *Aspergillus niger* growing in submerged culture as dispersed or aggregated mycelia. *Applied microbiology and biotechnology*, 44(1-2), 157-160.

Bennett, J. W. (2010). *An overview of the genus Aspergillus* (pp. 1-17). Caizer Academic Press, Portland.

Berka, R. M., Ward, M., Wilson, L. J., Hayenga, K. J., Kodama, K. H., Carlomagne, L. P., & Thompson, S. A. (1990). Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopepsin A from *Aspergillus awamori*. *Gene*, 86(2), 153-162.

Cullen, D. (2007). The genome of an industrial workhorse. *Nature*, 200, 7.

Fincham, J. R. (1989). Transformation in fungi. *Microbiological reviews*, 53(1), 148-170.

Fleißner, A., & Dersch, P. (2010). Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(4), 1255-1270.

Gouka, R. J., Punt, P. J., Hensing, J. G., & van den Hondel, C. A. (1996). Analysis of heterologous protein production in defined recombinant *Aspergillus awamori* strains. *Applied and environmental microbiology*, 62(6), 1951-1957.

Gouka, R. J., Punt, P. J., & Van Den Hondel, C. A. (1997). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 47(1), 1-11.

Hynes, M. J. (1996). Genetic transformation of filamentous fungi. *Journal of Genetics*, 75(3), 297-311.

Iwashita K. (2002). Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6), 530-535.

Korabecna M. (2007). The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its biological meaning and application in medical mycology. En A. Méndez-Vilas (Ed.) *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: (pp. 783-787). España: ISBN.

Liu, F., Li, W., Ridgway, D., Gu, T., & Moo-Young, M. (1998). Inhibition of extracellular protease secretion by *Aspergillus niger* using cell immobilization. *Biotechnology Letters*, 20(6), 539-542.

Lubertozzi, D., & Keasling, J. D. (2009). Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology advances*, 27(1), 53-75.

MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J., Belshaw, N. J., & Archer, D. B. (1993). Regulation of secreted protein production by filamentous fungi: recent developments and perspectives. *Journal of general Microbiology*, 139, 2295-2307.

Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi: progress, obstacles and future trends. *Biotechnology advances*, 26(2), 177-185.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2010). *Lehninger principles of biochemistry*. Wh Freeman.

Ozeki, K., Kyoya Fujii, F., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M., & Nunokawa, Y. (1994). Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(12), 2224-2227.

Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., ... & Oliver, S. G. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology*, 25(2), 221-231.

Prabha, V. L., & Puneekar, N. S. (2004). Genetic transformation in *Aspergilli*: Tools of the trade. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 41, 205-215.

Punt, P. J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., & van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in biotechnology*, 20(5), 200-206.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.

Ruiz-Díez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of applied microbiology*, 92(2), 189-195.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 1-3.

Talabardon, M., & Yang, S. T. (2005). Production of GFP and glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger*: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. *Biotechnology progress*, 21(5), 1389-1400.

Timberlake, W. E. (1991). Cloning and analysis of fungal genes. *More gene manipulations in fungi. Academic Press, Inc., San Diego, Calif*, 51-83.

van den Hombergh, J. P., van de Vondervoort, P. J., Fraissinet-Tachet, L., & Visser, J. (1997). *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in biotechnology*, 15(7), 256-263.

Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A., Ridgway, H. J. (2006). Approaches in functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research*, 16, 31-44.

Yoon, J., Kimura, S., Maruyama, J. I., & Kitamoto, K. (2009). Construction of quintuple protease gene disruptant for heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(4), 691-701.

## VIII. APÉNDICE A. Preparación de soluciones y medios empleados.

- **Solución de elementos traza 500x.**

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.1 %
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.55 %
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.25 %
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 %
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.085 %
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.08 %
NaMoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.075 %
Na <sub>2</sub> EDTA	2.5 %

Ajustar a pH 6.5.

### NOTAS:

- ✓ Añadir los componentes en orden ignorando los precipitados.
- ✓ Hervir a 60°C, ajustar el pH y dejar enfriar a temperatura ambiente.

- **Solución de sales 25x.**

NaNO <sub>3</sub>	15 %
KCl	1.3 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.8 %

NOTA:

✓ Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.1kg/cm<sup>3</sup> durante 20 min.

• **MgSO<sub>4</sub> 50x.**

MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.6 %
-------------------------------------	-------

NOTA:

✓ Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.1kg/cm<sup>3</sup> durante 20 min.

• **Solución de lisis alcalina I.**

EDTA 1 M pH 8.0	1 % (v/v)
Glucosa	0.9 %
Tris-HCl 1 M pH 8.0	2.5 % (v/v)

NOTA:

✓ Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.1kg/cm<sup>3</sup> durante 20 min y almacenar a 4°C.

- **Solución de lisis alcalina II.**

NaOH 10 N	2 % (v/v)
SDS	1 %

NOTA:

- ✓ Preparar en el momento y mantener a temperatura ambiente.

- **Solución de lisis alcalina III.**

Acetato de potasio 5 M	60 % (v/v)
Ácido acético glacial	11.5 % (v/v)

NOTA:

- ✓ Almacenar a 4°C.

- **Buffer Tris-acetatos-EDTA (TAE) 50x.**

Tris base	24.5 %
Ácido acético glacial	0.08 %
EDTA 1 M pH 8.0	5 % (v/v)

- **Buffer EB.**

Tris base 1 M pH 7.5	1 % (v/v)
Sacarosa	0.009 %
Acetato de litio 1 M	0.1 %



- **Solución de lavado de micelio.**

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14.8 %
--------------------------------------	--------

NOTA:

- ✓ Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.1kg/cm<sup>3</sup> durante 20 min y almacenar a 4°C.

- **Amortiguador MM.**

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	29.58 %
MES	0.4 %

Ajustar a pH 5.8

- **Amortiguador NM.**

NaCl	5.85 %
MES	0.4 %

Ajustar a pH 5.8

NOTA:

- ✓ Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.1kg/cm<sup>3</sup> durante 20 min y almacenar a temperatura ambiente.

- **STC 1x.**

Sorbitol	18.22 %
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.735 %

NOTA:

- ✓ Esterilizar por filtración en membrana de 0.45 μm y colocar en un recipiente estéril. Almacenar a 4°C.

- **STC 2x.**

Sorbitol	36.4 %
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.5 %

NOTA:

- ✓ Esterilizar por membrana de 0.45 μm y colocar un recipiente estéril. Almacenar a 4°C.

- **Amortiguador PEG.**

PEG 8000	50 %
CaCl <sub>2</sub> 1 M	1 % (v/v)
Tris base 1 M pH 7.5	1 % /v/v)

NOTA:

- ✓ Esterilizar por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y colocar un recipiente estéril. Almacenar a temperatura ambiente.

- **Buffer TE con sacarosa.**

Tris base 1 M pH 8.0	1 % (v/v)
EDTA 0.5 M pH 8.0	0.2 % (v/v)
SDS	4 %
Sacarosa	25 %

NOTA:

- ✓ Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.1kg/cm<sup>3</sup> durante 20 min y guardar a temperatura ambiente.

- **Medio Luria-Bertani (LB).**

Triptona	1 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	1 %
Agar*	1.5 %
Ampicilina**	Concentración final: 100 $\mu\text{g/ml}$

\*Para la preparación de medio sólido

\*\*Para la preparación de medio con ampicilina

- **Medio Papa Dextrosa Agar (PDA).**

Infusión de papa (Sólidos)	3.9 %
Dextrosa	2 %
Agar	1.5 %
Uracilo o uridina*	Concentración final: uracilo 0.03% uridina 0.1%

\*Para la preparación de medio para cepas auxótrofas  
Ajustar a pH 5.6

- **Caldo YG.**

Glucosa	2 %
Extracto de levadura	0.5 %

- **Caldo YED.**

Glucosa	1 %
Extracto de levadura	1 %
HEPES	0.5 %

Ajustar a pH 8.0

- **Medio Czapek-Dox modificado.**

Almidón	2 %
Casaminoácidos	0.5 %
KCl	0.2 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 %
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 %
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 %
Agar	2 %

- **Medio AMM-N (*Aspergillus* Minimal Medium sin fuente de Nitrógeno) con sorbitol 1.2 M.**

Glucosa	1 %
Sorbitol	21.8 %
Elementos traza 500 x	2 % (v/v)
Sales 25x	40 % (v/v)
MgSO <sub>4</sub> 50x	20 % (v/v)
Agar	1.5 %

Ajustar a pH 6.5

- **Medio Minimal Nutrients (MN).**

Almidón	1 %
Extracto de levadura o Casaminoácidos	0.05 % 0.1 %
Elementos traza 500x	0.2 % (v/v)
Sales 25x	4 % (v/v)
Agar*	1.5 %
Uracilo o uridina**	Concentración final: uracilo 0.03% uridina 0.1%

\*Para la preparación de medio sólido

\*\*Para la preparación de medio para cepas auxótrofas

Ajustar a pH 5.5

## **IX. APÉNDICE B. Protocolos**

- **Reconstitución de plásmido pUC57-GS (protocolo sugerido por GeneScript®).**

Antes de realizar la reconstitución se deberá centrifugar el tubo de microcentrífuga con el plásmido liofilizado a 6000 x g durante 1 min a 4°C. Antes de realizar la reconstitución en agua Milli-Q, abrir el tubo y añadir 20 µl de agua Milli-Q estéril. Agitar con ayuda de un vórtex durante 1 min y calentar a 50°C durante 15 min para disolver el DNA. La concentración final de la mezcla debe ser aproximadamente de 0.2 µg/µl.

### NOTAS:

- ✓ El procedimiento se lleva a cabo en hielo y en condiciones de esterilidad.
  - ✓ Almacenar la solución del plásmido a -20°C.
- 
- **Transformación de cepa de *E. coli* JM109 con plásmido pUC57 clonado con inserto *pyrG*-RF con el Kit TransformAid Bacterial Transformation (catálogo #K2710) (Protocolo sugerido por Fermentas®).**

Este protocolo está diseñado para obtener una eficiencia de transformación del rango de  $10^6$  -  $10^7$  transformantes por µg de ADN plasmídico.

## Obtención de bacterias químicamente competentes

Sembrar la cepa de *E. coli* JM109 en una caja Petri con medio LB e incubar toda la noche a 37°C. Transferir unas colonias con ayuda de un asa bacteriológica a 1.5 ml de medio-C previamente precalentado a 37°C e incubar a la misma temperatura y con agitación de 180 rpm durante 2 h. Centrifugar a 12000 x g durante 1 min, desechar el sobrenadante, resuspender el pellet en 300 µl de solución-T e incubar la suspensión en hielo durante 5 min. Centrifugar 1 min a 12000 x g y desechar el sobrenadante. Resuspender las células fueron en 120 µl de solución-T e incubar en hielo durante 5 min.

## Transformación

Añadir ~100 ng de ADN plasmídico en un tubo de microcentrífuga nuevo y dejar reposar en hielo durante 2 min. Añadir un volumen de 50 µl de las células preparadas al tubo con ADN, mezclar e incubar durante 5 min en hielo. Inmediatamente después de la incubación sembrar las bacterias se sembraron en una caja Petri con medio LB con ampicilina (100 µg/ml) precalentada a 37°C. Incubar las cajas sembradas durante una noche a 37°C.

## NOTAS:

- ✓ Llevar a cabo el procedimiento en hielo y en condiciones de esterilidad.
- ✓ Llevar a cabo todas las centrifugaciones a temperatura ambiente cuidando que las bacterias no estén por más de 5 min a esta temperatura.



- ✓ No utilizar más de 5  $\mu$ L de mezcla de ligación por 50  $\mu$ l de células competentes.
  - ✓ La solución-T se prepara mezclando 250  $\mu$ l de Solución-T (A) y 250  $\mu$ l de Solución-T (B).
  - ✓ Realizar un control negativo de la transformación llevando a cabo el mismo procedimiento con otro grupo de bacterias JM109, pero sin agregar el ADN plasmídico.
- **Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS: Midipreparación (Sambrook, et al., 2001).**

#### Preparación de las células

Sembrar la cepa de *E. coli* JM109 transformada con el plásmido pUC57-GS en una caja de medio LB. Incubar a 29°C durante una noche y una vez que aparezcan colonias aisladas, inocular una de ellas en 50 ml de medio LB con ampicilina (100 $\mu$ g/ml). Incubar el medio durante una noche a 37°C con agitación de 180 rpm. Una vez terminada la incubación, transferir el medio a un tubo de centrifuga de 50 ml y recuperar las bacterias centrifugando a 2000 x g durante 20 min a una temperatura de 4°C. Decantar el sobrenadante suavemente y realizar un lavado con agua bidestilada estéril. Repetir la centrifugación a 2000 x g durante 20 min a 4°C y decantar el agua suavemente, aspirar al vacío el agua remanente con ayuda de una pipeta Pasteur conectada a un matraz kitazato, teniendo cuidado de no aspirar el pellet.

#### Lisis de las bacterias transformadas

Una vez separado el pellet del sobrenadante, resuspender las bacterias en 200  $\mu$ l de Solución de Lisis Alcalina I y agitar el tubo vigorosamente

con ayuda de un vórtex. Transferir la suspensión de bacterias a un tubo de microcentrífuga y añadir 400  $\mu$ l de Solución de Lisis Alcalina II. Agitar suavemente invirtiendo el tubo cinco veces. Después de esto añadir 400  $\mu$ l de Solución de Lisis Alcalina III y agitar el tubo invirtiéndolo varias veces. Incubar en hielo durante 3-5 min y centrifugar el lisado a 12000 rpm durante 5 min. Transferir 600  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo y añadir un volumen de fenol:cloroformo 1:1. Agitar la mezcla con ayuda de un vórtex. Centrifugar la emulsión a 12000 rpm durante 2 min y recuperar la fase acuosa (fase superior).

NOTA:

- ✓ Llevar a cabo todo el procedimiento de lisis, incluidas las centrifugaciones, a 4°C.

#### Purificación del plásmido

Precipitar los ácidos nucleicos del sobrenadante añadiendo 600  $\mu$ l de isopropanol. Mezclar la solución con ayuda de un vórtex y dejar reposar durante 2 min a temperatura ambiente. Centrifugar la mezcla a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante suavemente y mediante aspiración al vacío con una pipeta Pasteur. Dejar reposar el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel para permitir que la mayor cantidad de fluido escurra y aspirar los restos de líquido en la pared. Adicionar 1 ml de etanol al 70% al pellet y recuperar por centrifugación a 12000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Desechar nuevamente el sobrenadante de la misma manera que en la cetrifugación anterior. Remover todo rastro de etanol de las paredes del tubo y dejar abierto en reposo hasta que todo el etanol se evapore. Para disolver el pellet de plásmido obtenido, agregar 100  $\mu$ l de

agua libre de nucleasas con RNAsa a una concentración de 20 µg/ml. Agitar suavemente para la resuspensión.

NOTA:

- ✓ Almacenar la solución del plásmido a -20°C.
  
- **Determinación espectrofotométrica de la concentración de ADN.**

La determinación se lleva a cabo por espectrofotometría a 260 nm en el BioPhotometer plus de Eppendorf®. Para ello se debe preparar un blanco de agua bidestilada en una celda de plástico y realizar la lectura mediante la opción *dsDNA* para determinación de DNA de doble cadena. Después de ajustar el blanco realizar inicialmente una dilución 1:10 del plásmido y leer en la misma celda estableciendo en el aparato el parámetro de dilución.

NOTA:

- ✓ En el caso de no ser suficiente la dilución realizada, hacer muestras más diluidas hasta que el espectrofotómetro pueda realizar la determinación.

- **Digestión de plásmido pUC57-GS con enzima *BamHI* FastDigest.**

Realizar la siguiente mezcla de reacción:

DNA plasmídico	~1 µg
Buffer FD 10x Fermentas®	2 µl
Enzima BamHI FD Fermentas® (catálogo #K1991)	1µl
Agua libre de nucleasas	cbp 20 µl

Incubación: 37°C durante 5 min

Inactivación: 80°C durante 5 min

- **Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0.8%**

Pesar 0.32 g de agarosa y disolver en 40 ml de buffer TAE 1X. Calentar la mezcla durante 1 min con el fin de solubilizar la agarosa y dejar enfriar durante unos momentos a temperatura ambiente. Vaciar posteriormente la disolución en el molde para gel previamente nivelado y añadir con cuidado 1 µL de disolución de bromuro de etidio 20 mg/ml. Homogeneizar con la punta de la pipeta. Inmediatamente después colocar el peine con pozos tratando de evitar la formación de burbujas. Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta solidificación. Introducir el gel en la cámara de electroforesis y cubrir por completo con buffer TAE 1X. Sobre papel parafilm, mezclar 1 µl de buffer de carga con 3 µl de la muestra. Correr el gel a 80 V durante ~1.5 h empleando como marcador de peso molecular el GeneRuler de 1 kb (Fermentas®).

- **Producción y cosecha de esporas de *A. niger***

Siembra de esporas.

Preparar 300 ml de medio PDA con uracilo al 0.03% para repartir 100 ml en tres matraces Erlenmeyer de 500 ml. Esterilizar el medio a 121°C durante 25 min y dejar enfriar hasta alcanzar una temperatura anterior a la solidificación. Antes de la solidificación, inocular los matraces con 100 µl de stock de esporas del hongo o con algunas esporas a partir de crecimiento en placa (no es necesario inocular un número específico de esporas) y agitar suavemente hasta homogeneizar. Incubar a 29°C durante ~5 días o hasta que el hongo crezca y esporule en toda la superficie del medio.

NOTA:

- ✓ La siembra, y el manejo del medio posterior a la esterilización se realizan en condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar.

Cosecha de esporas.

Verter 100 ml de Tween 20 al 0.1% estéril y colocar un agitador magnético estéril sobre las colonias fúngicas. Colocar el matraz en agitación magnética con el fin de desprender las esporas. Una vez que la mayor parte de las esporas haya sido desprendida, filtrar la suspensión final de esporas con trampas de fibra de polialómero para eliminar el micelio. Centrifugar la suspensión obtenida a 6000 rpm durante 20 min, decantar el sobrenadante y lavar el pellet con agua destilada estéril. La

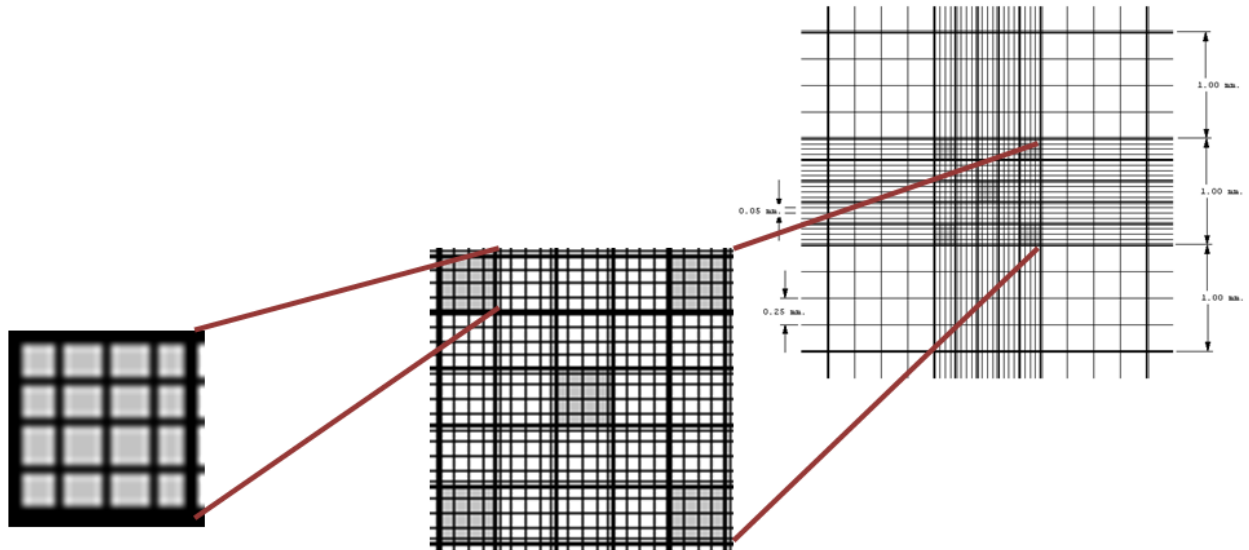
centrifugación y lavado se realizan por duplicado. Resuspender el pellet obtenido en glicerol al 20%.

#### NOTAS:

- ✓ Todo el procedimiento de la cosecha de esporas se realiza en condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar.
- ✓ Repartir la suspensión de esporas en alícuotas de 500  $\mu$ l y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Conteo de esporas

Para determinar la concentración de la suspensión de esporas se emplea una cámara de Neubauer. Hacer una dilución inicial 1:500 de la suspensión de esporas 1:500 con Tween 20 al 0.1% con el fin de evitar la formación de agregados. Colocar un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm sobre la Cámara de Neubauer y tomar un volumen de 10  $\mu$ l de la dilución de esporas. Colocar la punta de la micropipeta en el borde del cubreobjetos y dejar que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos por capilaridad. En el retículo central, la cámara de Neubauer posee un cuadro primario que contiene nueve cuadros secundarios, de éstos, el cuadro central es aquel que se emplea para el conteo de las esporas. El cuadro central está dividido en 25 cuadros terciarios, de los cuales, solamente se hará la cuantificación en el cuadro del centro y en aquellos que se encuentren en las esquinas del cuadro central (ver figura 21).



**Figura 21.** A la izquierda, uno de los 5 cuadros terciarios donde se realiza el conteo de esporas en la cámara de Neubauer. Al centro, cuadro central, marcados en gris los 5 cuadros terciarios donde se realiza el conteo. A la derecha, cuadro primario.

Después de realizar el conteo en los 5 cuadros pequeños, cada uno dividido a su vez en 16, emplear la siguiente fórmula para determinar el número de esporas:

$$\frac{\# \text{ esporas}}{\text{mL}} = \text{promedio} \times 25 \times F \times 10^4$$

Donde F es el factor de dilución empleado, 25 es el número de cuadros pequeños en el cuadro secundario y  $10^4$  es el factor de volumen de la Cámara de Neubauer.

NOTA:

- ✓ En caso de que el número de esporas por cuadro terciario sea muy bajo o muy alto, proceder a probar distintas diluciones de manera que se tenga un promedio de 25 esporas por cuadro.

- **Digestión de plásmido pUC57-GS con enzima *XbaI*.**

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

ADN plasmídico	~1 µg
Buffer 4 10x New England Biolabs®	2 µl
Enzima <i>XbaI</i> New England Biolabs® (catálogo #R0145L)	1µl
BSA New England Biolabs®	0.2 µl
Agua libre de nucleasas	cbp 20 µl

Incubación: 37°C durante 1.5 h  
Inactivación: 65°C durante 20 min

- **Digestión de plásmido plásmido-p con enzima *AatII*.**

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

DNA plasmídico	~1 µg
Buffer 4 10x New England Biolabs®	2 µl
Enzima <i>AatII</i> New England Biolabs® (catálogo #R0117L)	1µl
Agua libre de nucleasas	cbp 20 µl

Incubación: 37°C durante 1.5 h  
Inactivación: 65°C durante 20 min



- **Transformación de *A. niger* mediante electroporación de esporas**

#### Preparación de esporas electrocompetentes

Realizar cinco lavados con agua destilada estéril de esporas frescas incluidas en glicerol pertenecientes a la cepa parental auxótrofa a uridina. Dichos lavados se llevan a cabo a 10000 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 min. Resuspender las esporas en 40 ml de agua bidestilada estéril. Inocular  $5 \times 10^9$  esporas en un matraz con 100 ml de caldo YG. Incubar a 29 °C a 100 rpm durante 4 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, repartir volúmenes iguales del caldo con esporas en 4 tubos de 50 ml estériles. Realizar una centrifugación a 10000 rpm durante 5 min a 4°C, decantar sobrenadante y resuspender cada pellet de esporas en 40 ml de agua bidestilada estéril fría. Centrifugar a 10000 rpm a una temperatura de 4°C durante 15 min y decantar nuevamente el sobrenadante. Resuspender cada pellet en 12.5 ml de caldo YED frío a pH 8.0 e incubar a 29°C durante 1 h a 100 rpm. Una vez finalizado el tiempo de incubación centrifugar a 10000 rpm durante 15 min a 4°C, decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 800 µl de buffer EB frío. Repartir las esporas en alícuotas de 400 µl y almacenar a -80°C.

#### NOTA:

- ✓ Se requiere una alícuota de 400 µl de la suspensión de esporas electrocompetentes para cada transformación.

## Electrotransformación de *A. niger*

Para cada transformación se empleó una alícuota (400  $\mu$ l) de la suspensión de esporas electrocompetentes. Se realizan un blanco; una transformación con el plásmido pUC57-GS linearizado (el cual contiene el marcador de selección); y una cotransformación empleando pUC57-GS y el plásmido-p (el cual contiene la proteína de interés), ambos linearizados. Para la transformación simple mezclar 3  $\mu$ g del pUC57-GS con la suspensión de esporas en un tubo de 50 ml. Por otro lado, para la cotransformación se mezclar la misma cantidad pUC57-GS más 3 y 5 veces en equimolaridad del plásmido-p.

Incubar las mezclas en hielo durante 15 min y transferir cada una a una cubeta de electroporación estéril (Biorad<sup>®</sup>) de 400  $\mu$ l estéril. Aplicar un pulso de 1200 V y adicionar inmediatamente 1 ml de caldo YED frío en la cubeta. Incubar en hielo durante 15 min y transferir a un tubo estéril de 15 ml frío. Incubar a 30°C durante 90 min a 100 rpm. Sembrar por extensión inmediatamente, 100, 200 y 700  $\mu$ l de la mezcla de reacción en placas del medio de selección (Czapek-Dox modificado o Medio Mínimo para *Aspergillus*) y se incubaron de 48 a 72 h a 29°C.

### NOTA:

- ✓ Todo el procedimiento, tanto la preparación de las esporas electrocompetentes, como la transformación, se realiza en condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar.

- **Transformación de *A. niger* mediante formación de protoplastos**

#### Producción de protoplastos

Inocular 100 ml de medio MN con uridina al 0.1% en un matraz de 250 ml con  $\sim 2 \times 10^8$  esporas/ml de la cepa parental auxótrofa a uridina e incubar a 30°C a 200 rpm durante 18-20 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, filtrar el micelio obtenido con Miracloth estéril y lavar con aproximadamente 100 ml de amortiguador de lavado de micelio. Exprimir el exceso de líquido del micelio y una vez seco colocarlo en un tubo de 500 ml estéril previamente pesado. Pesar el tubo con el micelio y calcular por diferencia la masa de micelio. Pesar las cantidades requeridas de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich catálogo #L1412) y BSA (60.8 mg/g de micelio húmedo), y disolverlas en amortiguador MM (5 ml/g de micelio húmedo). Colocar el micelio en un matraz de 125 ml previamente esterilizado y resuspender en la solución de enzimas líticas y BSA. Mezclar con cuidado e incubar a 30°C a 50 rpm. La formación de los protoplastos se visualiza al microscopio a 40x a partir de la primera hora de incubación y cada media hora a partir de la primera observación; para tal observación se diluyen 10  $\mu$ l de la suspensión de protoplastos con 10  $\mu$ l de agua. Una vez que se observan 50-100 protoplastos por campo, proceder a purificarlos por filtración con trampas de fibra de polialómero. Recolectar el filtrado en un tubo estéril de 50 ml y añadir 2 volúmenes de amortiguador NM frío. Mezclar suavemente por inversión. Centrifugar la mezcla a 2100 x g a una temperatura de 4°C durante 5 min y decantar el sobrenadante. Resuspender el pellet con 50 ml de STC frío y mezclar por inversión. A partir de este punto en todo momento se mantiene la muestra en hielo. Centrifugar los protoplastos durante 10

min a 6000 rpm a una temperatura de 4°C y decantar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 1 ml de STC frío y hacer un conteo de los protoplastos con ayuda de una cámara de Neubauer de la misma manera en que se realizó el conteo de esporas.

#### Transformación de protoplastos de *A. niger*

Colocar 200  $\mu$ L de la suspensión de protoplastos en un tubo de 50 ml estéril para cada transformación. Realizar un blanco (sin ADN), una transformación con el plásmido pUC57-GS, y una cotransformación empleando el plásmido pUC57-GS y el plásmido-p. Para la transformación simple mezclar 3  $\mu$ g del plásmido pUC57-GS con la suspensión de protoplastos en el tubo de 50 ml. Para la cotransformación mezclar la misma cantidad de vector de selección más 5 veces en equimolaridad del plásmido-p. En los casos en el que el volumen de ADN agregado es mayor a 10  $\mu$ L es necesario agregar un volumen igual de STC 2X. Adicionar a la mezcla final 50  $\mu$ L de PEG a temperatura ambiente, agitar suavemente e incubar en hielo durante 20 min. Al finalizar la incubación, agregar 2 ml de PEG a temperatura ambiente, mezclar suavemente por inversión y dejar reposar a temperatura ambiente por 5 min. Añadir 4 ml de STC a temperatura ambiente, mezclar nuevamente por inversión y centrifugar a 3000 x g a temperatura ambiente durante 5 min. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 400  $\mu$ L de STC a temperatura ambiente. Finalmente, sembrar por extensión 100  $\mu$ L de la suspensión en placas de agar AMM-N con sorbitol 1.2 M. Incubar a 30°C durante 3 a 5 días.

NOTA:

- ✓ Todo el procedimiento, tanto la preparación de los protoplastos, como la transformación, se realiza en condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar.
- **Extracción y purificación de gADN de *A. niger* por el método fenol:cloroformo (Protocolo propio del laboratorio)**

Cosecha de micelio de *A. niger*

Inocular 100 ml de caldo MN contenidos en un matraz de 250 ml con esporas de la cepa de *A. niger*. Esto se lleva a cabo para las cepas obtenidas de las transformaciones y para la cepa parental. Incubar a 29°C con agitación constante de 180 rpm durante 2-4 días o hasta ver crecimiento suficiente. Filtrar el micelio al vacío con un sistema Millipore empleando filtros Whatman 1 estériles para llevar a cabo la filtración del micelio obtenido. Filtrar la mitad del micelio contenido en el matraz y sin dejar secar, lavar con dos volúmenes iguales de agua destilada estéril. Realizar lo mismo con la segunda mitad de micelio. Dejar secar el micelio filtrado y añadir un volumen de acetona. El filtrado seco obtenido es conocido como polvos de acetona.

Extracción de ADN de *A. niger*

Triturar 100 mg de polvo de acetona de cada muestra en un mortero previamente esterilizado con ayuda de trozos de hielo seco hasta la obtención de un polvo fino y la sublimación total del hielo seco. Mezclar el triturado con buffer TE con sacarosa (20 ml por gramo de polvo de acetona) y seguir moliendo hasta obtener una solución homogénea.

Transferir a un tubo para centrífuga. Agregar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitar por inversión, centrifugar durante 15 min a 12000 rpm a 4°C (primera extracción) y recuperar la fase acuosa de la suspensión (fase superior). Realizar una segunda extracción. La fase acuosa se toma evitando tomar la interfase. Precipitar el ADN agregando 0.1 de volumen de NaCl 1 N, 2.5 volúmenes de etanol absoluto a la fase acuosa y almacenando a -20°C durante una noche.

#### Purificación de ADN de *A. niger*

Centrifugar las muestras a 12000 rpm a 4°C durante 15 min. Decantar el etanol absoluto y lavar el pellet con 5 ml de etanol al 70%. Centrifugar 10 min bajo las mismas condiciones. Decantar el etanol y remover el excedente con una pipeta Pasteur (\*). Dejar secar el pellet y resuspender en ~5 ml de buffer TE. Adicionar RNAsa hasta una concentración final de 50 µg/ml e incubar durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, repartir el volumen total en fracciones de 500 µl en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Realizar la extracción de cada alícuota de 500 µl con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y recuperar la fase acuosa. Precipitar el DNA con 0.1 de volumen de NaCl 1 N, 2.5 volúmenes de etanol absoluto y almacenamiento a 4°C durante al menos 20 min. Repetir los pasos iniciales de la Purificación hasta la parte en la que se debe quitar el excedente de etanol con una pipeta Pasteur (paso indicado con \*). Resuspender el pellet en agua destilada estéril.

- **Amplificación de espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y rRNA 5.8S**

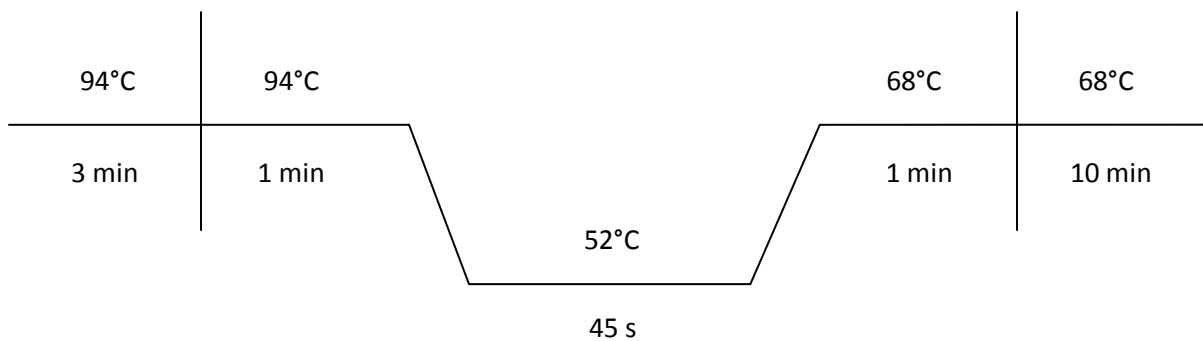
Realizar la siguiente mezcla de reacción:

Buffer 10x Bio TecMol <sup>®</sup>	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM Bio TecMol <sup>®</sup>	2.5 $\mu$ L
dNTPs 1.25 mM	8 $\mu$ L
Primer ITS1-F (Forward) 20 pM	1 $\mu$ L
Primer ITS4-A (Reverse) 20 pM	1 $\mu$ L
gDNA	$\sim$ 7.5 $\mu$ g
Amplificasa Bio TecMol <sup>®</sup>	0.5 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	cbp 50 $\mu$ L

NOTA:

- ✓ Adicionar la amplificasa hasta finalizar el primer ciclo de desnaturalización.

La reacción de PCR se lleva a cabo durante 30 ciclos bajo las siguientes condiciones:



- **Amplificación de gen *pepA***

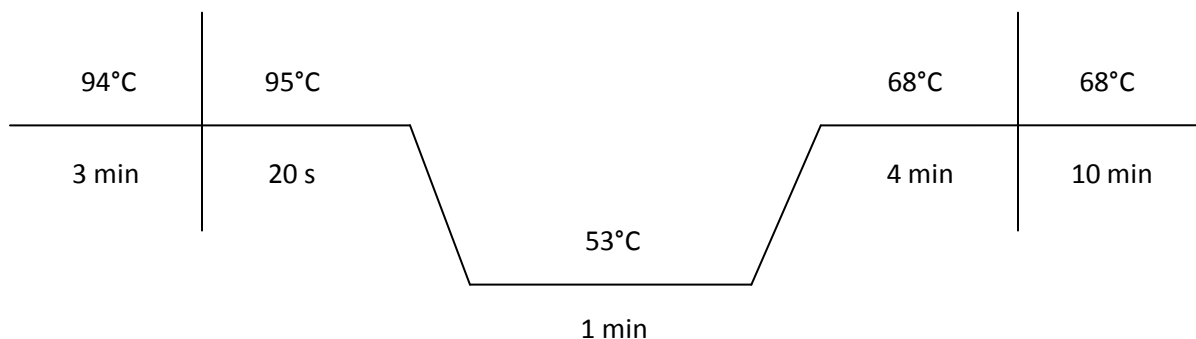
Realizar la siguiente mezcla de reacción:

Buffer 10x con MgCl <sub>2</sub> 15 mM Fermentas®	5 µL
dNTPs 2 mM	5 µL
Primer Fw- <i>pepA</i> (Forward) 4.7 µM	10.6 µL
Primer Rv- <i>pepA</i> (Reverse) 3.2 µM	15.6 µL
gDNA	~1 µg
Enzima Long PCR Fermentas®	0.5 µL
Agua libre de nucleasas	cbp 50 µL

NOTA:

- ✓ Adicionar la enzima a la mezcla de reacción hasta finalizar el primer ciclo de desnaturalización.

La reacción de PCR se lleva a cabo durante 30 ciclos bajo las siguientes condiciones:





- **Amplificación de gen *pyrG***

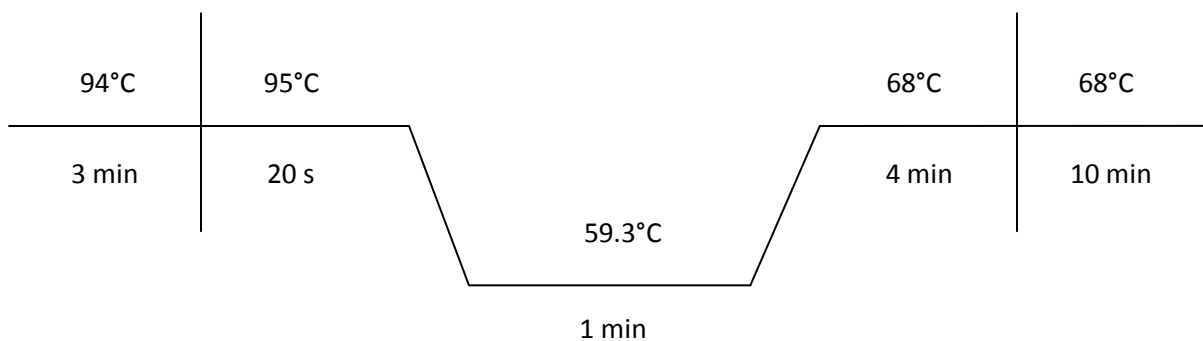
Realizar la siguiente mezcla de reacción:

Buffer 10x con MgCl <sub>2</sub> 15 mM Fermentas®	5 µL
dNTPs 2 mM	5 µL
Primer Fw- <i>pyrG</i> (Forward) 4.2 µM	11.9 µL
Primer Rv- <i>pyrG</i> (Reverse) 3.8 µM	13.2 µL
gDNA	~1 µg
Enzima Long PCR Fermentas®	0.5 µL
Agua libre de nucleasas	cbp 50 µL

NOTA:

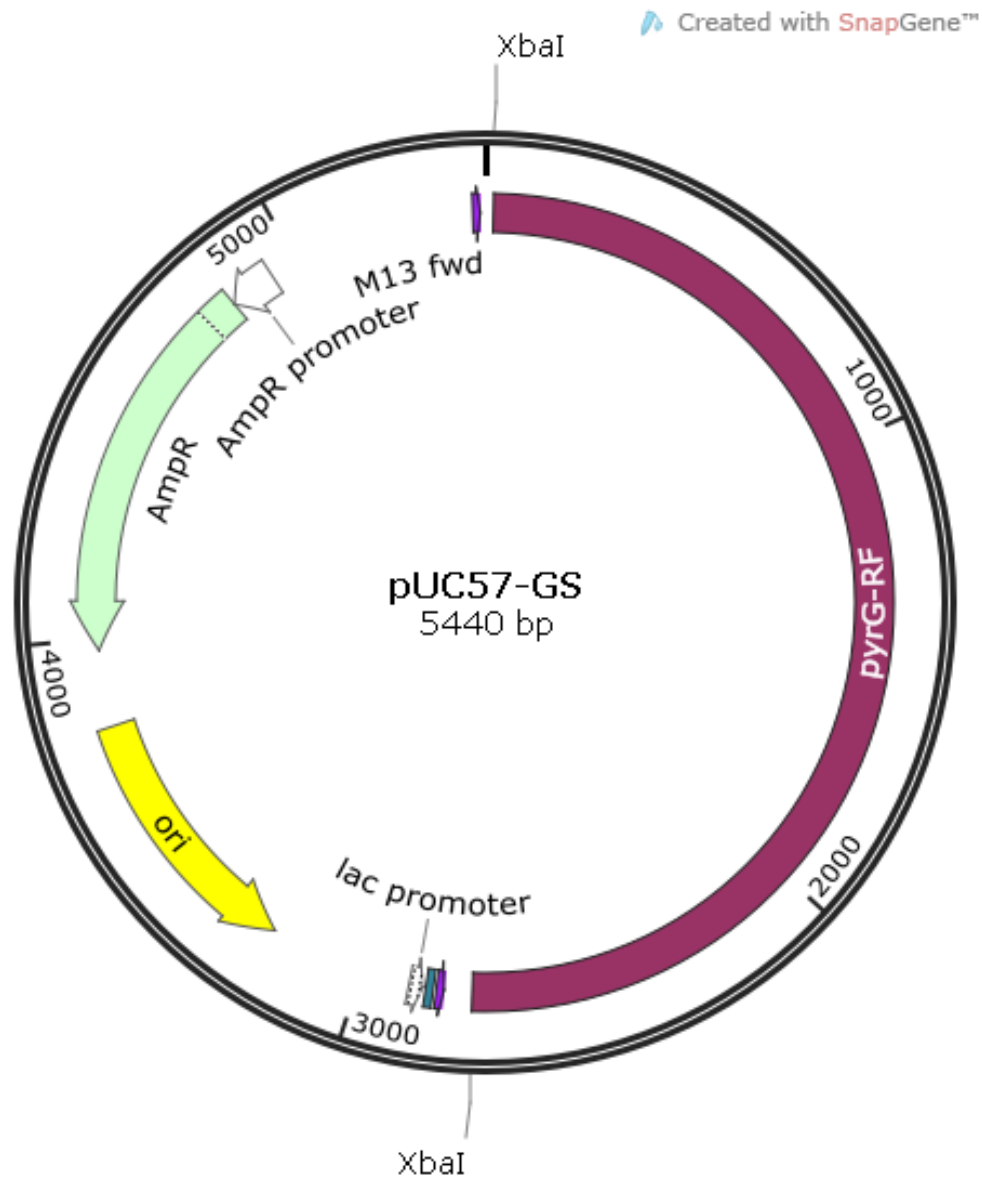
- ✓ Adicionar la enzima a la mezcla de reacción hasta finalizar el primer ciclo de desnaturalización.

La reacción de PCR se lleva a cabo durante 30 ciclos bajo las siguientes condiciones:



## X. APÉNDICE C. Secuencias y primers.

- **Plásmido pUC57-GS: Características y secuencia.**



La construcción posee las siguientes características:

- Un origen de replicación ColE1 con el fin de producir un elevado número de copias.

- Un cassette de resistencia a ampicilina, como marcador de selección bacteriana.
- Un inserto *pyrG*-RF (región sombreada) de 2731 pb que corresponde al gen *pyrG* de *A. niger* flanqueado por 300 pb a ambos lados del gen (regiones subrayadas y en negritas). Dichas secuencias flanqueantes son homólogas a las regiones de *A. niger* que flanquean al gen de la aspergiloepsina A, *pepA*, en el genoma del hongo.

5'

**TCTAGAGAATTCTGTACACGCCTAGCTCCAGCGCGACCAAGCTGAGCGGCTACACTTGGGACATCTCCTACG  
GTGACGGCAGCTCGGCCAGCGGAGACGTGTACCGGGATACTGCTACTGTCTGGCGGTGTCACCACCAACAAGC  
AGGCTGTTGAAGCAGCCAGCAAGATCAGCTCCGAGTTCGTTTCAGAACACGGCCAATGACGGCCTTTTGGGACT  
GGCCTTTAGCTCCATCAACACTGGTGAGTCAATCCTACATCAGCCGGGTTGACCTACCTGCTGACCGATACACA  
GTCCAGCCCAAGGCGCAGAC**CCTTCTACTTGCTTGCACAGGGAGCTCTCTGGGGCTTGACGTCTTTTGGAGTTGCGAG  
GGAGTTGATTTCTACTTCTAAGTTTGGACTGAATCCGTGGTGTGATTGAGGTGATTGGCGATGTTTGGCTATACCAGCT  
ATATGTAATAATCTCTACTGTATACTACTATTCAACGCATTTTACTATGCGTGCTGCTAGGGTCGGCAATGACAATGGCAA  
TCTGACTGACGTGGTCTATTTCTCCATGTGCAGCAGGGAATACGAGCTCCAATGGACCTCGGGAGTGGCACAGTCAATG  
GCAAGGAAACTCCGCCTTTGCAGGTGTGGCTGAACCCACGGGTGCGAGGCGGAGCAATCCACCCCGATGTGGCTG  
GTGCGTGGAGGGGCTCGCGATGATTTTACTGAGCTTGCTTTTCTTGTGCGACATTGAACATTGTCCTTGGTCTTCCTCAG  
ATTTAAGGGTCAGTCACTGCTACATTTTTCAGTAGTATCCGCGCACGTCTCTGGATTTACGAATCAGGGTCCACCAGTGC  
AAACTTCGAACTACTCTCATTATACAATCCTCTTTCCATTTCCGCATTAACCCCTCCATCAACACCATGTCCTCCAAGTCG  
CGATTGACCTACACTGCCCGTCCAGCAAGCATCCCAATGCTCTGGCGAAGAGGCTGTTTCGAGATTGCCGAGGCCAAG  
AAGACCAATGTGACTGTCTCGGCTGACGTTACCACCACTAAGGAGCTACTAGATCTTGCTGACCGTAGGCCGACCCGCT  
ACTCTGCCTGATTATGCTGCATGCAAACCTTATTAACGGTGATACCGGACTGCAGGTCTCGGTCCCTACATTGCCGTGATC  
AAAACCCACATCGATATCCTCTCTGATTTTCAGCAACGAGACCATTGAGGGACTTAAGGCTCTCGCGCAGAAGCAAACT  
TTCTCATCTTCGAGGACCGCAAGTTCATTGACATCGGCAACACGGTCCAGAAGCAATACCACGGCGGTACCCTCCGTAT  
CTCGGAATGGGCCACATCATCAACTGCAGCATTCTCCCTGGTGGGGTATCGTCGAGGCTCTCGCTCAGACGGCGTCT  
GCACCGGACTTCGCTACGGCCCCGAACGCGGTCTGTTGATCTTGGCAGAGATGACCTTAAGGGCTCCTTGGCTACC  
GGCCAGTACACTACTTCTCGGTGATTATGCCCGGAAATACAAGAACTTCGTTATGGGATTCGTGTCGACGCGCGCT  
TGGGTGAGGTGACGTCGGAAGTCAGCTCTCCTTCGGATGAGGAGGACTTTGTGGTCTTACGACTGGTGTGAACATTTG  
TTCCAAGGGAGATAAGCTTGGTACGAGTACCAGACGCCCGGATCGGCTATCGGCCGGGGTCTGACTTCATTATCGC  
GGGTGCGGGTATCTACGCCGCGCCGGATCCGGTGCAGGCTGCGCAACAGTATCAGAAGGAGGGGTGGGAAGCCTACC  
TGGCCCGTGTGCGCGGAAAATAACTATAAAAGGAGGATCGAAGTTCTGATGGTTATGAATGATATAGAAATGCAAC  
TTGCCGCAACGGATACGGAAGCGGAAACGGACCAATGTCGAGCACGGGTAGTCAGACTGCGGCATCGGATGTCCAAC  
GGTATTGATCCTGCAGGCTACTATGGTGTGGCACAAGGATCAATGCGGTACGACGATTTGATGCAGATAAGCAGGCTG  
CGAAGTAGTAACTCTTGCCTAGAGAAAATGGCGACGGGTGGCTGATAAGGGCGGTGATAAGCTTAATTGTCATCGCAG  
ATAAGCACTGCTGTCTTGCATCCAAGTCAGCGTCAGCAGAAAATACGGGACTTCCGAAAGTATATGGCAAAATTAAGAA  
CTTACTCTCCAGCAATGTTTTGCCCTGACCGTCGCTAAAACGTTACTACCCCTATACCCGTCTGTTTGTCCAGCCCGA

GGCATTAGGTCTGACTGACAGCACGGCGCCATGCGGGCTTGGGACGCCATGTCCGTGCGGTGATAAAGGTTGATCCAT  
GCAGCTACTATCCTTCCATCGTTCCATTCCCATCCTTGTCTATCTCCATCCTTGAACTTTACTAGTTTAGTTGGATGCT  
**CCACCTTCTTCGACACCGTCAAGTCCCAGCTGGACTCTCCCTTTTCGCCGTGCAGCTGAAGCACGACGCCCC**  
**GGTGTTTACGACTTTGGCTACATCGATGACTCCAAGTACACCGGTTCTATCACCTACACGGATGCCGATAGCTC**  
**CCAGGGTACTGGGGCTTCAGCACCGACGGCTACAGTATCGGTGACGGCAGCTCCAGCTCCAGCGGCTTCAGC**  
**GCCATTGCTGGTAAGAACCGCTTCATTTAACACACAACCTGTCCACCTTTTACTAACTAGTGTATAGACACC**  
**GGTACCGAATTCT**CTAGATATCGGATCCCGGGCCCGTGCAGTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGG  
TCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGAAAGC  
CTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTGC  
TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTTTCGGCTTCCCTCGCTC  
ACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACA  
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTT  
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC  
GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACC  
GGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGT  
AGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCG  
TCTTGAGTCCAACCCGTAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT  
GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTC  
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT  
TTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACG  
CTCAGTGGAAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAAT  
TAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA  
CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG  
CTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAG  
CCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAG  
CTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC  
GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG  
GTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC  
ATAATTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT  
GTATGCGGGCAGCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCT  
CATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTC  
GTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC  
AAAAAAGGGAAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGG  
GTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGA  
AAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTAATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCG  
TCTCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCG  
GATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTACGCGGTGTTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACTATGCCGGC  
ATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATC  
AGGCGCCATTGCGCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTTCGCTATTACGCCAGCTG  
GCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTA AACGACG  
GCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGGAATGCA

3'

- **Primers universales para a amplificación de la región ITS1-5.8s-ITS2**

**ITS1-F (FW)**     CTTGGTCATTTAAGAGGAAGTAA

**ITS4A (RV)**     CGCCGTTACTGGGGCAATCCCTG

- **Primers empleados para la amplificación de secuencia de 1589 pb perteneciente al gen *pepA***

**FW-*pepA***     AAGTCTAGATCTTGCTTGACATTCTCGTGGTC     **T<sub>m</sub> = 61.8°C**

**RV-*pepA***     AAGTCTAGACATCACATAGATACAGTCACATTT     **T<sub>m</sub> = 58.2°C**

- **Primers empleados para la amplificación de secuencia de 854 pb perteneciente al gen *pyrG***

**FW-*pyrG***     CAATTGACCTACACTGCCCGTGCCAGCAAG     **T<sub>m</sub> = 65.7°C**

**RV-*pyrG***     TACGCCTCCCAACCTTCCTTCTGGTACTG     **T<sub>m</sub> = 64.3°C**