



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA



“Transfección de una secuencia codificante de la enzima diacilglicerol aciltransferasa como medio para incrementar la acumulación de triacilglicéridos en *Dunaliella salina*”

TESIS

**QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JOSÉ IBRAHIM GUZMÁN ORÓZTICO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA



"Transfección de una secuencia codificante de la enzima diacylglycerol aciltransferasa
como medio para incrementar la acumulación de triacilglicéridos en *Danaëlla salina*"

TESIS

QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOSE IBRAHIM GUZMAN OROZTICO

Aprobado por:

José Luis Stepienano Hornedo
Director de tesis

M.C. María del Rosario Gonzales Esparza
Sinodal

M.C. Eva Luz Sánchez Álvarez
Sinodal

Ensenada, Baja California

9 de febrero de 2015

ÍNDICE

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	6
Antecedentes.....	9
Objetivos.....	14
Hipótesis.....	15
Diseño experimental.....	16
Materiales y métodos.....	17
cultivo de <i>Dunaliella salina</i>	17
Aislamiento del promotor crRBCS2.....	19
Construcción de un casete de expresión de resistencia a nourseotricina.....	21
Construcción de una variante sin péptido de fusión ni etiquetas de purificación.....	30
Variante marcada de la enzima DGAT2D.....	33
Variante de doble resistencia.....	40
Métodos de transformación de <i>Dunaliella salina</i>	42
Transformación mediante microesferas de vidrio.....	41
Transformación por biobalística.....	43
Transformación con <i>A. tumefaciens</i>	45
Resultados.....	48
Secuencia sintética del gen DGAT.....	48
Aislamiento del promotor crRBCS2.....	50
Construcción de los plásmidos.....	50
Conclusiones.....	59
Bibliografía.....	60

Abreviaturas

DGAT: acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa.

DGAT2D: acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 2 variante D.

crDGAT2D: Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 2 variante D, de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Generalmente refiriéndose al gen.

NOS poly A: Señal de poliadenilación de nopalina sintetasa.

Medio LB: medio Luria-Bertani.

Medio TAP: medio tris-acetato-fosfato.

crRBCS2: Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Small Subunit 2 de *Chlamydomonas reinhardtii*.

LPS: lipopolisacaridos.

Transfección de una secuencia codificante de la enzima diacilglicerol aciltransferasa como medio para incrementar la acumulación de triacilglicéridos en *Dunaliella salina*.

Resumen

Dunaliella salina es una microalga conocida por habitar ambientes de estrés fisiológico. Esta adaptación, junto al hecho de que su forma de vida favorece al anabolismo de lípidos en alta salinidad, la convierte en una de las alternativas para la producción de biocombustibles. Con la finalidad de incrementar la producción de triacilglicéridos, se realizó una construcción en base al promotor de la ribulosa bifosfato carboxilasa 2 de *Chlamydomonas reinhardtii*, dentro del plásmido pCAMBIA 1302, para la expresión del gen de diacilglicerol aciltransferasa en *D. Salina*, y posteriormente llevar a cabo la transformación de *D. salina* con este plásmido, en las que posiblemente se lleve a cabo la integración y expresión del gen DGAT2D. La selección de las microalgas transformantes se llevo a cabo mediante un medio de cultivo con higromicina, lo que permitió la recuperación de microalgas en las cuales presuntamente se integró el gen de interés y posiblemente su expresión. La transformación se confirmó mediante la amplificación de una secuencia del plásmido introducido a la microalga por PCR de DNA genómico. Como parte del proceso de construcción, se obtuvieron 3 plásmidos en base al plásmido pCAMBIA 1302 y uno en base a pUC18 con distintas finalidades. La eficiencia de transformación muestra una media de 49 colonias transformantes de *D. Salina* por cada 5 millones de células. Así como la confirmación de la presencia de ADN plasmídico dentro de la microalga transformada tiene un porcentaje aproximado del 75% mediante la transformación con esferas de vidrio para un plásmido de aproximadamente 4 kilobases.

Introducción

En la actualidad existe una fuerte dependencia hacia los productos derivados del petróleo, de manera que en gran medida el estilo de vida cotidiano no sería posible sin éstos. Sin embargo, el petróleo tiene una fuerte desventaja: no es un recurso renovable, y en el futuro su disponibilidad será regida por las necesidades de cada país productor y las políticas que estos decidan aplicar a las demás naciones (Nehring, 2009).

El desarrollo de tecnologías para la producción de biocombustibles se ha favorecido debido a varios factores. Por ejemplo, la variabilidad de los precios de los hidrocarburos, aunado a su disponibilidad incierta a futuro (Nehring, 2009) y el impulso de medidas legales y beneficios fiscales a quienes impulsen energías alternativas, entre otras.

La microalga *Dunaliella salina* ofrecen una buena alternativa para la producción de aceite: alta proporción aceite:biomasa, sus cultivos se pueden realizar en tierras no aptas para cultivo agrícola, además de ser escalables por volumen, aprovechamiento total de la biomasa, bajo consumo de fertilizantes o aditivos, y aprovechamiento de agua no potable o salada entre otros (Smith et al, 2009); todo esto permite cultivar microalgas sin competir por los recursos necesarios para los cultivos alimenticios. A la par de sus ventajas, existe un antecedente histórico de su cultivo y las condiciones óptimas para éste, dado que *D. salina* fue propuesta como organismo de producción de químicos en el año 1966, en el que la ex Unión Soviética comenzó a experimentar su producción en plantas piloto con el fin de obtener β -caroteno (Massyuk, 1966). Actualmente, países como Israel, Estados Unidos y Australia tienen plantas de producción de *D. salina* con fines comerciales (Emeish, 2012).

En industrias alimenticias, biotecnológicas, y enfocadas a la salud, *D. salina* muestra múltiples ventajas. Hay varios productos de interés a futuro, como matrices en base a sustancias poliméricas extracelulares (Mishra et al, 2012), o producción de β -caroteno no derivado de vitamina A, el cual además de su efecto antioxidante, se ha observado también actividad anticancerígena (Jayappriyan et al 2013) y actividad antiinflamatoria contra LPS (Hui-Wen et al, 2014).

Dependiendo de las condiciones de cultivo de *D. salina*, el porcentaje de triacilglicéridos puede ser mayor al producido por plantas superiores. Este porcentaje puede variar dependiendo de la etapa del cultivo y las condiciones ambientales y químicas, bajo las cuales se ha observado una acumulación de triacilglicéridos del 35% hasta el 44% en condiciones de privación de nitrógeno y estrés oxidativo

(Yilancioglu et al, 2014).

Si bien estos rendimientos de productividad de lípidos son altos a comparación de otros sistemas de producción, aun no son óptimos como un producto comerciable y energético, ya que la inversión tanto de materiales como energética para llevar a cabo el proceso desde el inicio del cultivo hasta la obtención del biocombustible o la extracción de productos como β -caroteno no es viable (Chisti 2008). Para ampliar este margen y convertir a los productos derivados de la producción de lípidos en un producto viable es necesario incrementar la productividad de la microalga. Para ello se necesita aumentar la productividad y la acumulación final de lípidos en los triacilglicéridos por parte de la microalga (Radakovitz et al, 2010).

Una de las estrategias para incrementar la producción de triacilglicéridos en organismos vegetales consiste en la modificación de las rutas anabólicas, en especial el último paso de la ruta Kennedy, en el cual el diacilglicerol gana una molécula más de ácido graso mediante la actividad de la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Estudios anteriores han demostrado las ventajas de la enzima DGAT para incrementar la acumulación de aceite en semillas de *Arabidopsis thaliana* elevando su peso y contenido de aceite (Jako, 2001). Esto lo hace mediante la reacción enzimática que une un ácido graso libre acoplado a coenzima A a una molécula de diacilglicerol para formar triacilglicéridos, los cuales pasan a los cuerpos lipídicos de la célula para su almacenamiento. Sin embargo, algunas investigaciones con *C. reinhardtii* han generado dudas sobre si la transcripción del gen de una enzima DGAT está correlacionada a su traducción y actividad enzimática en microalgas (La Russa et al. 2012); es conveniente resaltar que el resultado de estos estudios puede ser influido por el casete de expresión, por lo que no está realmente descartado el empleo de enzimas de este tipo como mecanismo para incrementar la producción de lípidos.

Aunque el primer reporte de una enzima con actividad específica del tipo DGAT fue realizado aproximadamente hace 70 años (Weiss & Kennedy, 1956) las secuencias genómicas que las codifican no fueron descubiertas hasta hace unos años (Lardizabal et al, 2001) y con ello comenzó la caracterización de su producto, y su regulación genética.

Dentro de la homeostasis fisiológica y la regulación de la expresión de un organismo, la expresión de los genes DGAT endógenos conlleva a la respectiva acumulación de triacilglicéridos a un nivel adecuado a los requisitos celulares y de almacenamiento (Li et al, 2010). Esta enzima cataliza la

última reacción en la ruta Kennedy, agregando una molécula de acil-CoA a una de diacilglicerol para formar el producto final: una molécula de triglicérido (Weiss et al, 1960). Las dos variantes presentes en los seres vivos de esta enzima -DGAT1 y DGAT2- presentan un bajo nivel de homología entre diversos organismos, así como un origen evolutivo distinto aunque convergen en función (Turchetto et al, 2011). El bajo nivel de homología, la variabilidad de las funciones fisiológicas de cada gen, el hecho de que se han estudiado en múltiples sistemas y la actual dificultad para expresar y purificar adecuadamente la enzima funcional (Cao et al, 2012), no permiten hacer muchas generalizaciones sobre una estructura típica o propiedades generalizadas para las enzimas de este tipo.

Antecedentes

Las algas pertenecen a uno de los grupos más diversos entre las distintas formas de vida del planeta. Entre ellas se presentan organismos tanto procariotas (cianobacterias) como eucariotas, con una amplia variabilidad morfofisiológica; tienen una gran importancia ecológica debido al alto porcentaje con el que contribuyen a la producción fotosintética global (Wiessner et al., 1995), además forman la base de la cadena alimenticia al contribuir con el 70% de la biomasa producida anualmente en el planeta (Andersen, 1996).

La microalga *D. salina* ha sido blanco de la bioprospección, principalmente debido a su característica acumulación de β -caroteno, sin embargo, cada vez se buscan más productos aprovechables. Como herramienta biotecnológica, esta microalga posee fuertes ventajas. El análisis funcional de su transcriptoma muestra que bajo condiciones de estrés osmótico, el 42.5% de su maquinaria celular está enfocada a la transcripción y traducción de proteínas, así como a la producción de chaperones moleculares (Alykayal et al, 2010). Junto a esto parece poseer un set de promotores cuya respuesta depende de salinidad, donde el más resaltante y mejor caracterizado es el de la anhidrasa carbónica, el cual muestra la transcripción de forma dependiente de la salinidad en el medio hasta una concentración de 2 M de NaCl.

Cultivo de microalgas

El cultivo *in-vitro* de microalgas, como tal, es un método de conservación *ex-situ* cuya función es mantener la viabilidad de las líneas celulares y garantizar la estabilidad fisiológica, morfológica y genética de las diversas especies (Day, 1999). El cultivo *in-vitro* permite además la identificación de los requerimientos nutricionales de las microalgas así como evaluar la respuesta fisiológica de éstas a las modificaciones de los distintos parámetros de cultivo.

De los factores que intervienen en el cultivo *in-vitro* de las microalgas, aquellos que deben tenerse a consideración son aquellos que pueden afectar directamente la tasa de crecimiento y la biomasa (Weldy & Huesemann, 2007), y posteriormente aquellos que pueden afectar la producción de lípidos (Junying et al, 2013). En 2007, Weldy y Huesemann comprobaron el efecto del cultivo de *D. Salina* en condiciones de privación de nitrógeno y alta intensidad lumínica, acumulando hasta un 55% de lípidos neutros. Mas importante que la cantidad de nitrógeno presente en el medio, es la proporción

N:P presente (When *et al* 2009), ya que ésta incluso puede inhibir el crecimiento del cultivo. Otros factores como la intensidad de luz, el suministro de CO₂ (Wu *et al* 2004), el pH (Yang *et al* 2007) e incluso los metabolitos secundarios que actúan como moléculas de señalización en otras especies de microalgas (Sun *et al* 2008) pueden afectar de forma directa la tasa de crecimiento, la densidad celular y la biomasa total de un cultivo de microalgas y con ello, la productividad final de lípidos.

La producción de lípidos en microalgas, como en otros organismos vegetales, comienza con la producción del precursor para la síntesis de los ácidos grasos (Ohlrogge & Browse, 1995) acil-CoA, el cual actuará como sustrato para la producción y elongación de los mismos (Harwood, 1988). A partir de aquí, el ácido graso producido puede formar parte del metabolismo o las membranas del cloroplasto, o bien ser exportado al citoplasma de la célula (Schnurr *et al*, 2002), donde volverá a formar un complejo con la CoA y pasar a la ruta Kennedy; aquí será acoplado a una molécula de glicerol o productos acetilados de ésta para finalizar como una molécula de fosfolípido. Esta molécula se incorpora al sistema de membranas de la célula, o como una molécula de triglicérido (TAG) para pasar a los cuerpos lipídicos celulares (Kennedy, 1966).

Las rutas y mecanismos de modificación de los ácidos grasos presentes en la célula permiten una amplia variabilidad sobre la estructura final que los triacilglicéridos pueden poseer en las microalgas. La sobreexpresión de una enzima, permiten dirigir el producto final hacia una modificación en especial (Yu *et al*, 2011), por ejemplo, la sobreexpresión de la tioesterasa de *Cuphea hookeriana* incrementa la proporción de ácidos grasos de cadena corta (Cahoon *et al*, 1998). En otro caso, se logró incrementar la proporción de ácidos grasos con un menor grado de saturación mediante la expresión de desaturasas (Knothe & Dunn, 2003). Sin embargo cualquier tipo de modificación está limitada a la capacidad de carga de la maquinaria sintética de la microalga, al hecho de que si se produce un ácido graso poco común para el organismo, su maquinaria sintética no podrá almacenarla de forma adecuada en los triacilglicéridos (Davies, 1993); además el empleo de un gen endógeno de la especie, hará que los mecanismos de regulación de la expresión impidan su traducción (La Russa *et al*. 2012). Finalmente, ninguna de estas modificaciones genéticas incrementa la producción neta de triacilglicéridos y en cambio, si pueden disminuirla.

En plantas superiores, la sobreexpresión de la enzima DGAT ha generado una acumulación de triacilglicéridos notable; estos trabajos se han enfocado principalmente en *Arabidopsis thaliana* (Jako

et al 2001), *Brassica napus* (Weselake et al 2008), *Zea mays* (Oakes et al, 2009), y *Glicina max* (Lardizabal et al, 2008). En ellos, la enzima sobreexpresada corresponde a un transgen y no a un gen endógeno. Es resaltable el hecho de que en los casos exitosos, el gen endógeno del organismo fue eliminado por delección o interrupción génica. En *C. reinhardtii* se confirmó la presencia de 5 variantes distintas para DGATs de tipo 2. La sobreexpresión de los genes endógenos produjo un incremento en la transcripción y acumulación del transcrito, pero no llevo a la acumulación de lípidos, (La Russa et al, 2012), lo cual puede explicarse parcialmente debido al uso de los promotores y 5 UTRs endógenos de cada gen que codifica para DGATs.

En vista de lo anterior, las enzimas de tipo DGAT en microalgas parecen poseer un riguroso control de la expresión y traducción así como una amplia variabilidad en su secuencia y estructura. Los análisis filogenéticos llevados a cabo por Chen y Smith en 2012, han revelado relaciones estructurales y genéticas interesantes. Por ejemplo, la ausencia de enzimas DGAT tipo 1 entre algunas especies de microalgas, o la alta divergencia y el gran numero de variantes entre las enzimas DGAT tipo 2, aun dentro de la misma especie; esto podría sugerir múltiples orígenes para las enzimas de este tipo. En las enzimas DGAT tipo 2, algunas se relacionan en secuencia de aminoácidos a las enzimas de tipo MGAT. Otro detalle importante es que debido a las grandes diferencias entre secuencias, aun dentro de las isoformas de una misma especie, Las enzimas DGAT tipo 2 no provienen de eventos de duplicación genética, a la par de que la presencia de un alto número de variantes de un mismo tipo va en contra de las necesidades fisiológicas de un organismo unicelular.

De las 51 secuencias putativas para enzimas de tipo DGAT, solamente las de *C. reinhardtii* (Boyle et al. ,2012), *Phaeodactylum tricornutum* (Guiheneuf et al., 2011) y *Ostreococcus tauri* (Wagner et al., 2010) han sido caracterizadas en su patrón de expresión genética o bioquímicamente.

En *C. reinhardtii*; se ha observado la variación del patrón de expresión de los genes asociados a la acumulación de triacilglicéridos en condiciones de deficiencia de nutrientes en medio de cultivo TAP, particularmente de nitrógeno. En este caso, se ha observado un incremento en la transcripción de los genes DGTT1(DGAT2A), DGAT1 y PDAT1; mientras que los genes DGTT2(DGAT2B) y DGTT3(DGAT2C) no muestran cambios en el nivel de transcripción, además de poseer un nivel de expresión moderado. Finalmente los genes DGTT4 (DGAT2D) y DGTT5 presentan una expresión muy baja o nula como en el caso del DGTT5. Lo más sobresaliente sobre el patrón de transcripción

en medio deficiente de nitrógeno en *C. reinhardtii*, es la identificación de un regulador de la expresión genética: la proteína NRR1, la cual se correlaciona con la expresión de DGTT1. Sin este regulador la cantidad de triacilglicéridos disminuye un 50% (Boyle et al, 2012).

Con el fin de restablecer la acumulación de triglicéridos en una cepa mutante de *S. cerevisiae* deficiente de la enzima DGA1, se emplearon las secuencias codificantes de las enzimas DGAT2 de *P. tricornutum*. Esto demostró la importancia de la variante DGAT2B, al ser la única que permite restablecer la formación de cuerpos lipídicos dentro de la levadura. Esta misma variante, permite el incremento total de lípidos hasta 4 veces al expresarse en *Pichia pastoris*, con una marcada preferencia hacia los ácidos grasos insaturados 18:1 y 18:2 mientras que los ácidos grasos saturados 14:0, 16:0 y 18:0 decaen. En el caso del 18:0 se reduce hasta un 36%. Es necesario recalcar que la preferencia de sustrato en las enzimas del tipo DGAT2B varía según la microalga, ya que este mismo tipo en *C. reinhardtii* muestra una fuerte preferencia hacia los ácidos grasos 20:5 (Gong et al 2013).

Las enzimas de tipo DGAT1 parecen ser las principales responsables de la acumulación de ácidos grasos saturados (Guiheneuf et al, 2011) de 16 y 18 carbonos. Mientras que las enzimas de tipo 2 parecen estar dedicadas a la acumulación secundaria de ácidos grasos de posible importancia fisiológica, más que un mecanismo de acumulación masiva de reservas energéticas (Chen y Smith, 2012).

Finalmente, aunque estos estudios dan luz sobre la interacción y el mecanismo mediante el cual se regula intracelularmente el metabolismo de lípidos, no es posible hacer una comparación completa, dado que en algunos estudios se da seguimiento a genes y enzimas que no se contemplan en otros, así como a distintas condiciones experimentales en cuanto a los nutrientes de los medios de cultivo.

Hasta la fecha, se han transformado aproximadamente 30 especies distintas de microalgas; el éxito de la transformación depende tanto del método de transformación, de la forma de integrar el transgen en el genoma, así como también de la construcción de expresión del transgen, la cual tratará de garantizar la expresión estable de éste (Ying-fang et al, 2014).

Las primeras transformaciones de microalgas se llevaron a cabo bajo la expresión del promotor CaMV 35S, sin embargo la estabilidad de la expresión era baja y se suspendía después de un periodo de 1 a 2 meses de haber sido transformada (Hawkins & Nakamura, 1999); sin embargo, trabajos más recientes indican una pérdida de la expresión del transgen después de tan solo 5 días (Feng et al,

2009). Otros trabajos se enfocaron al empleo de promotores endógenos (Walker et al, 2004) en los generos *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, y algunas diatomeas; así como la integración de secuencias no traducidas 5', 3' y del primer intrón pertenecientes a secuencias de mensajeros endógenos (Lumbreras et al, 1998). Aún así hasta la fecha, las microalgas pueden ser consideradas como un sistema de expresión difícil.

Tomando en cuenta todo el trasfondo este proyecto tiene por finalidad el empleo de un transgene derivado de la enzima DGAT2D de *C. reinhardtii* como mecanismo para incrementar la acumulación de lípidos neutros totales, o en todo caso, la acumulación de un ácido graso determinado, dada la tendencia de las enzimas de tipo 2 a preferir un tipo de sustrato sobre otros (Davies, 1993). Esta modificación, presuntamente permitirá aumentar el rendimiento en la recuperación de lípidos para la producción de biocombustible, o la producción de β -caroteno, al depender esta de la producción de lípidos neutros. El presente trabajo emplea una construcción del promotor RBCS2 de *C. reinhardtii*, ya que la actividad de la expresión cruzada de esté ha sido confirmada para especies del género *Dunaliella* (Walker et al, 2005) además de que la similitud en secuencia de los promotores en ambas especies del genero fue confirmada previamente.

Además de la expresión de una secuencia sintética en base al gen crDGAT2D, se construyeron 3 plásmidos mas, cada uno con distintas finalidades; la coexpresión con un segundo gen de resistencia bajo el promotor crRBCS2, el cual permitiría asegurar la expresión del transgene dentro de las células transformadas; así como la prueba de un marcador de selección con el gen NAT1 en base a la combinación de promotor y señal de poliadenilación elegidos para llevar a cabo la transcripción; y por último la producción péptido de fusión de la enzima DGAT2D y GFP para la confirmación visual de la expresión, así como facilitar la manipulación de las células transformadas por cell-sorting.

Objetivos

Objetivo general

Transfección de *Dunaliella salina* con el gen DGAT2D basado en el gen de *Chlamydomonas reinhardtii* (crDGAT2D) como una estrategia para incrementar la acumulación de triacilglicéridos en la microalga.

Objetivos particulares

- 1.- Confirmación de la presencia del transgen de DGAT2D dentro del genoma de *Dunaliella salina*.
- 2.- Confirmación de la presencia del transcrito de la enzima DGAT2D entre los RNA mensajeros de *Dunaliella salina*.
- 3.- Confirmar la acumulación de lípidos neutros totales o específicos, de las microalgas transformadas.

Hipótesis

- 1.- La transfección del gen crDGAT2 en *Dunaliella salina* permitiría incrementar la acumulación de lípidos en la microalga.
- 2.- La presencia del transgene de crDGAT2 en el genoma de *Dunaliella salina* permitiría su transcripción.
- 3.-La transcripción del transgene de crDGAT2 permitiría la expresión de la enzima y con ello la acumulación de lípidos.

Diseño experimental

El diseño experimental del proyecto, se limita a evaluar la eficiencia y el resultado en los diferentes pasos principales, y el resultado final del proceso.

El promotor RBCS2 de *C. reinhardtii* fue aislado del DNA genómico de la microalga. La secuencia va desde el punto de inicio de la transcripción hasta el punto -200 pb de este. La secuencia no incluye el primer intrón del gen, y el gen de interés es introducido inmediatamente después del inicio de la transcripción, en donde se encuentra el codón de inicio de la traducción del gen nativo.

En el caso de la transformación, fue realizada por quintuplicado para la transformación mediante *A. tumefaciens* y microesferas de vidrio, y por triplicado para la transformación de biobalística. Las extracciones de DNA y fueron analizadas por PCR para confirmar la presencia del gen exógeno. Aquellas muestras que generaron un resultado positivo fueron analizadas por triplicado nuevamente.

Materiales y métodos

Cultivo de Dunaliella salina

Para la preparación del medio de cultivo Johnson modificado, se siguió la receta en la tabla 1. Los ingredientes que se indican añadidos por peso fueron disueltos en 5 ml de agua destilada, sobre el cual se añadieron las cantidades indicadas de las soluciones stock en el orden indicado en la tabla, después de lo cual se aforaron hasta completar 20 ml con agua destilada. Previamente se esterilizó una solución de 980 ml de agua destilada, en la cual fueron añadidos el NaCl necesario y el bicarbonato de sodio previamente a la esterilización por autoclave (121 °C, 15 psi, 15 min), así como el agar (para la preparación de medio sólido). Una vez que fue esterilizada esta solución, se agregaron los 20 ml de micronutrientes mediante filtración a través de un filtro Millex-GV de 0.22 µm (Millipore, cat. No. SLGV033RB). En el caso del medio TAP, todos los ingredientes fueron agregados a 962 ml de agua destilada en el orden indicado en la tabla, después de lo cual se esterilizó mediante una autoclave (121 °C, 15 psi, 15 min).

Dunaliella salina fue cultivada en medio Johnson modificado a una salinidad de 500 mM de cloruro de sodio (tabla 1), el cual fue empleado para el mantenimiento de rutina de la cepa virgen de *D. salina*, así como para los pasos de lavado previos a la transformación mediante el protocolo de bolitas de vidrio. El medio Johnson modificado, también fue empleado a una salinidad de 100 mM de NaCl para la selección de microalgas transformantes mediante el antibiótico higromicina.

reactivo	Concentración final	stock	Volumen/peso
KNO ₃	9.8 mM		0.988 gr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 mM		0.492 gr
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.3 mM	100 mM	
KH ₂ PO ₄	0.25 mM	100 mM	
H ₃ BO ₃	0.98 mM	100 mM	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.02 mM	100 mM	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	5 µM	100 mM	
FeCl ₃	9 µM	100 mM	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.03 mM	100 mM	
CaSO ₄	0.021 mM	100 mM	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.003 mM	100 mM	
MgCl ₂	7.3 mM	1 M	
KCl	2.6 mM		194 mg
CuCl ₂	1 µM	100 mM	
NaCl	100/250/500 mM	100 mM	5.84/14.61/29.22 gr
NaHCO ₃	50 mM		4.2 gr
Agar			15 gr
Agua			Aforar a 1 litro

Tabla 1: ingredientes y soluciones stock para medio Johnson modificado

reactivo	Concentración final	stock	Volumen/peso
Tris base	20 mM		2.42 gr
Sales TAP			25 ml
NH ₄ Cl	7 mM	15 g/L	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.8 mM	4 g/L	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.4 mM	2 g/L	
Solución de fosfatos			1ml
K ₂ HPO ₄	2 mM	28.8 g/100 ml	
KH ₂ PO ₄	1 mM	14.4 g/100 ml	
Elementos traza			
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.13 mM	200 mM	370 µl
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.13 mM	76.5 mM	500 µl
H ₃ BO ₃	0.18 mM	100 mM	200 µl
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.04 mM	20 mM	637 µl
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.03 mM	18 mM	500 µl
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 mM	2.1 mM	1.595 ml
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 mM	2.4 mM	1.31 ml
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.004 mM	3 mM	148 µl
Acido acético conc.			1 ml
NaCl			
agua			Aforar a 1 litro

Tabla 2: ingredientes y soluciones stock para medio TAP

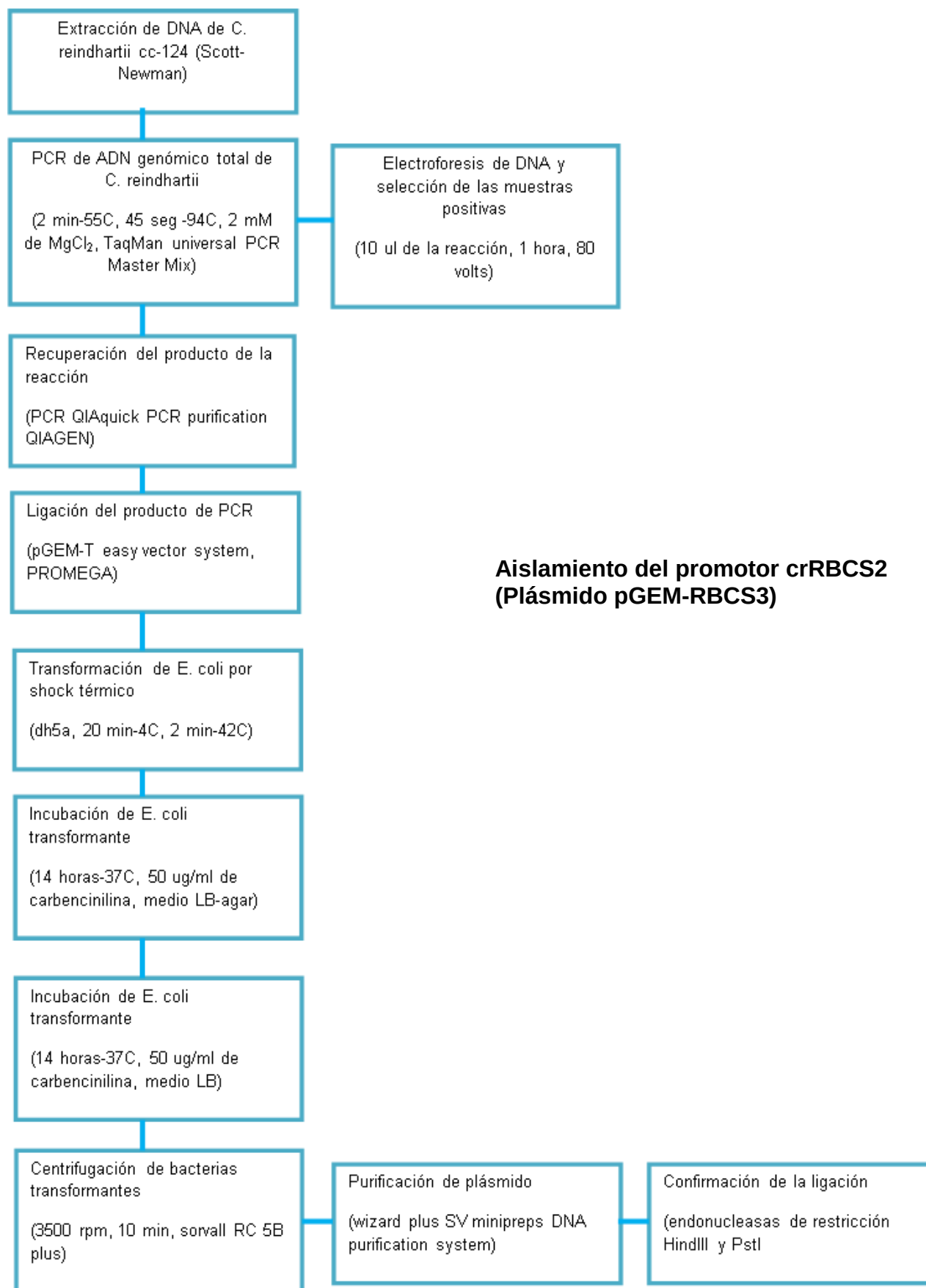
Para el proceso de transformación mediante *A. tumefaciens*, el medio empleado para el cultivo de *D. salina* fue el medio TAP agar (tabla 2) a una salinidad de 200 mM de cloruro de sodio, para la incubación y crecimiento previo al cocultivo con la bacteria, y de 100 mM para la selección en medio TAP liquido mediante el antibiótico higromicina.

Las microalgas fueron cultivadas bajo iluminación las 24 horas a temperatura ambiente en el medio determinado para cada etapa del proceso.

Aislamiento del promotor crRBCS2

El promotor crRBCS2 fue aislado de *C. reinhardtii* (cepa cc-125), con los oligonucleótidos RBCS2 sent y RBCS2 anti (tabla 1) mediante un PCR de 2 ciclos (2 min a 55°C, 45 seg a 94°C, 2 mM de MgCl₂, TaqMan universal PCR Master Mix, cat. no. 4324018) empleando ADN genómico de la microalga. Una muestra de 10 µl del producto de la reacción fue corrida durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE. La banda de interés poseía un tamaño aproximado de 200 pares de bases.

Las muestras positivas en gel y que no presentaron barridos o bandas accesorias de ningún tipo fueron recuperadas mediante el kit PCR QIAquick PCR purification (QIAGEN, cat. No. 28104), y se dejaron ligando toda la noche mediante el kit pGEM-T easy vector system (cat. #a1360) en una proporción 3:1 (inserto:vector). El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (DH5α) mediante choque térmico; después se plaquearon sobre medio LB-agar (50 µg/ml de carbencinilina) dejándolas incubar durante 14 horas a 37 °C. Las colonias recombinantes obtenidas, fueron inoculadas en medio LB líquido (50 µg /ml de carbencinilina), dejándolas incubar durante 14 horas a 37 °C con agitación constante. Con el fin de recuperar los plásmidos recombinantes, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus) y los plásmidos purificados con el kit Wizard plus SV minipreps DNA purification system (Promega, cat. #A1330). Después de la purificación, fueron digeridos mediante los sitios de restricción agregados (HindIII, PstI, USB) para confirmar la presencia del inserto. Los plásmidos que presentaban el inserto de un tamaño acorde al del promotor (200 pb), fueron seleccionados para su secuenciación con el fin de confirmar la identidad de la secuencia. El plásmido empleado para el siguiente paso en las construcciones fue el plásmido pGEM-RBCS3.



Construcción de un casete de expresión de resistencia a nourseotricina

Con la finalidad de mejorar la proporción entre el numero de colonias transformantes y las colonias que no poseen el gen de interés, se construyó una variante del plásmido pCAMBIA 1302, la cual posee un segundo gen de resistencia bajo el control del promotor crRBCS2 y la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (fig 7). El gen de resistencia empleado, el gen de la nourseotricin acetiltransferasa (NAT1) de *S. noursei*, permitirá la resistencia al antibiótico nourseotricina, mientras que el gen HPTII del plásmido pCAMBIA (fig 1) provee la resistencia a higromicina.

La construcción posee una longitud de aproximadamente 1000 pb, la construcción se localizó entre el sitio de clonación múltiple del vector, correspondiente al sitio de clonación múltiple del pUC19 dentro del plásmido pCAMBIA 1302 (MCS), entre los sitios de HindIII y XbaI.

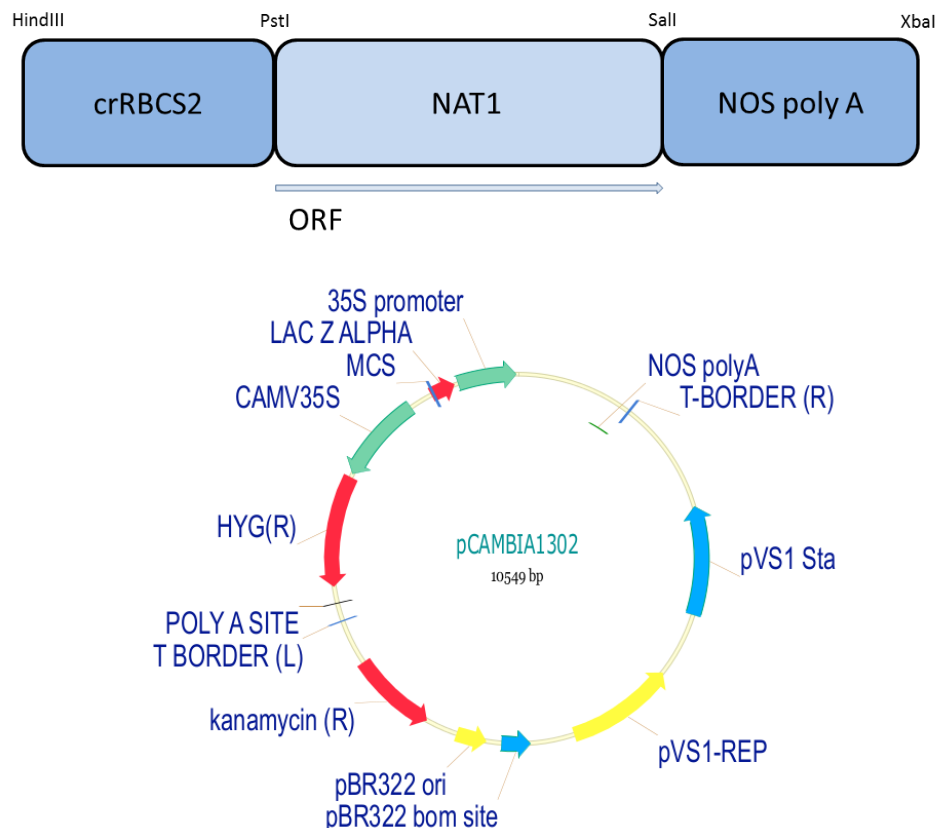
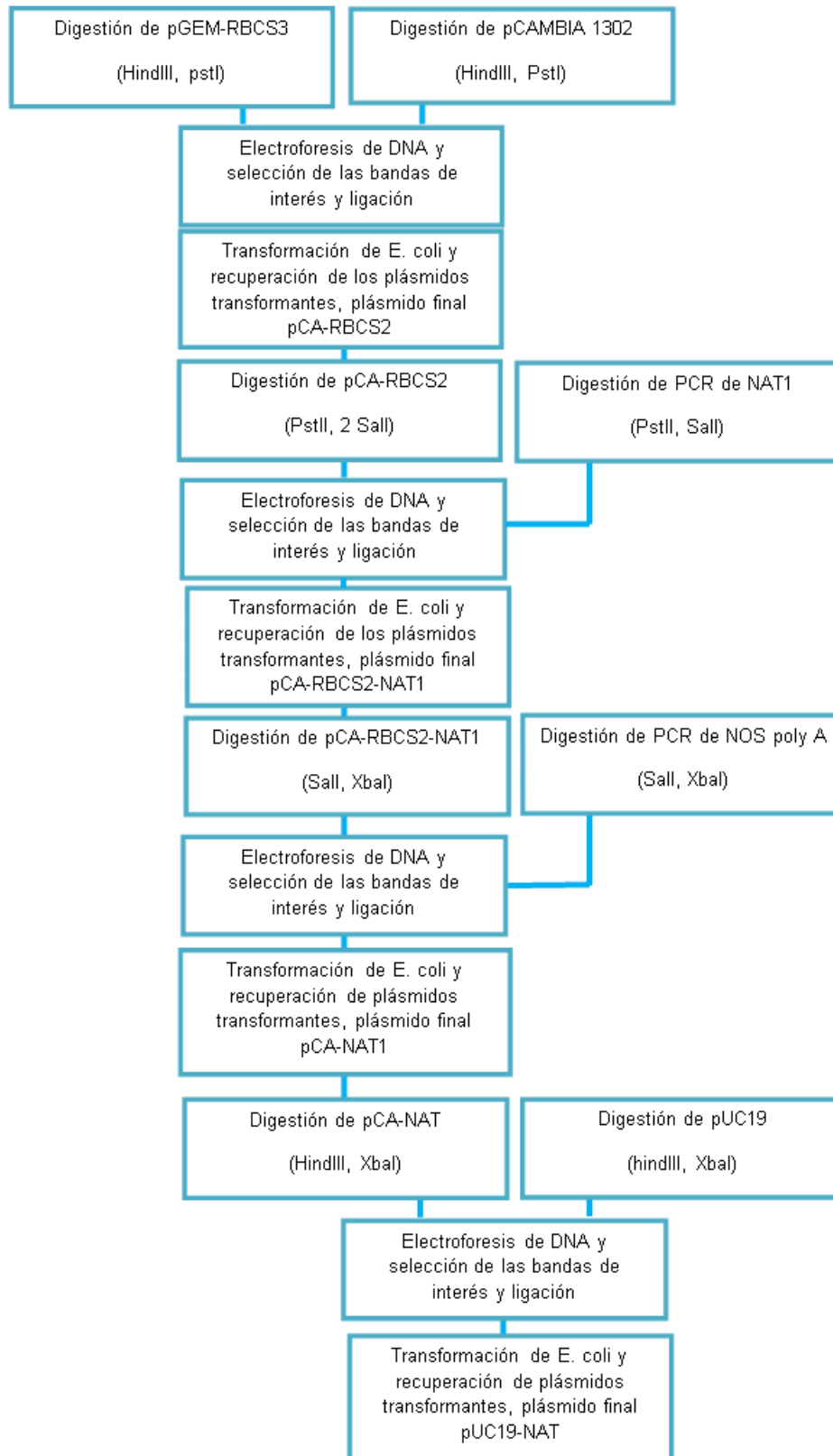


Fig 1: Casete para la expresión del gen NAT1. El casete se encuentra dentro del MCS del plásmido pCAMBIA 1302 (CAMBIA labs).

Construcción de plásmidos pCA-NAT y pUC19-NAT



Construcción del plásmido de resistencia a nourseotricina

Tanto el plásmido pGEM-RBCS3 como el plásmido pCAMBIA 1302 fueron digeridos con la enzima HindIII (USB, 50 U/μl) durante 2 horas, posteriormente fueron purificados mediante el kit Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035), y digeridos mediante la enzima PstI (USB, 50 U/μl) durante 2 horas. Una vez finalizada la reacción, las muestras fueron corridas durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE, del cual se recuperaron las bandas correspondientes al promotor crRBCS2 (~200 pb), y el plásmido pCAMBIA 1302 (~10 000 pb); se purificaron con el kit Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035) y se ligaron toda la noche mediante la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, cat. #15224-017) en una proporción 3:1 (inserto:vector) a una temperatura de 4 °C. El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (DH5α) mediante choque térmico a 42 °C; después de lo cual, fueron plaqueadas sobre medio LB-agar (50 μg/ml de carbencinilina), dejándose incubar durante 14 horas a 37 °C. Las colonias recombinantes obtenidas, fueron cultivadas medio LB líquido (50 μg/ml de carbencinilina), e incubadas con agitación constante durante 14 horas con el fin de recuperar los plásmidos recombinantes. Después del periodo de incubación, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus) y los plásmidos fueron purificados mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 3rd edición, 2001). Después de esto, los plásmidos fueron digeridos mediante los sitios de restricción correspondientes al promotor (HindIII, PstI) para confirmar la presencia del inserto. Los plásmidos que presentaron el inserto de un tamaño acorde al del promotor (200 pb) fueron seleccionados para el siguiente paso y nombrados como pCAMBIA-RBCS2.

El gen de NAT1 se amplificó mediante PCR (30 seg. a 94°C, 30 seg. a 55°C, 1 min a 68°C, (Platinum pfx DNA polimerase, Invitrogen Cat. No. 11708-013) con los oligonucleotidos pY sent y pY anti (tabla 1) para agregar los sitios de restricción necesarios (Sall y PstI), Una muestra de 10 μl del producto de la reacción fue corrido durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE, la banda de interés poseía un tamaño aproximado de 600 pares de bases, las muestras positivas en gel fueron purificadas de la reacción de PCR mediante el kit de purificación del gel Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035). Una vez recuperado, tanto el producto de PCR como el plásmido pCAMBIA-RBCS2 fueron digeridos con las enzimas pstI(USB, 50 U/μl) y Sall(USB, 15 U/μl) durante 2

horas a 37 °C. Una vez terminada la reacción, las muestras fueron corridas durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE, del cual se recuperaron las bandas correspondientes al PCR del gen NAT1 (~600 bp), y el plásmido pCAMBIA-RBCS(~10 500 bp), se purificaron con el kit Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035) y se dejaron ligando toda la noche mediante la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, cat. No. ·15224-017) en una proporción 3:1 (inserto:vector) una temperatura de 4 °C. El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (DH5 α) mediante sock térmico a 42 °C durante 30 sec; después de lo cual fueron plaqueadas sobre medio LB-agar (50 μ g/ml de carbencinilina) dejándolas incubar durante 14 horas a 37 °C. Las colonias recombinantes obtenidas, fueron crecidas en medio LB líquido (50 μ g/ml de carbencinilina) e incubadas a una temperatura de 37 °C durante 14 horas con agitación constante. Después del periodo de incubación, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus) con el fin de recuperar los plásmidos recombinantes mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 3rd edición, 2001), después de lo cual fueron digeridos mediante los sitios de restricción agregados (PstI, salI) para confirmar la presencia del inserto, los plásmidos que presentaban el inserto de un tamaño acorde al del gen NAT1(~600 bp) fueron seleccionadas para su secuenciación con el fin de confirmar la identidad del la secuencia y su unión con el promotor crRBCS2; las colonias que dieron positivas a estas pruebas, fue nombrada como pCAMBIA-RBCS2-NAT

El elemento final de la construcción, la señal de poliadenilación de la nopalina sintetaza, fue amplificada por PCR empleando como molde el plásmido pCAMBIA1302. (30 sec a 94°C, 30 sec a 55°C, 30 sec a 68°C, platinum pfx DNA polimerase, Invitrogen Cat. No. 11708-013) mediante los primers NOS sent y NOS anti (tabla 1), los cuales agregan los sitios de restricción de Sall y XbaI respectivamente. Una vez terminada la reacción, una alícuota de 10 μ l del producto de la reacción fue corrido durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE. La banda de interés poseía un tamaño aproximado de 200 pares de bases. Las muestras positivas en gel fueron purificadas mediante el kit de purificación del gel Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035). Una vez recuperado, tanto el producto de PCR como el plásmido pCAMBIA-RBCS2-NAT fueron digeridos con la enzima Sall(USB, 15 U/ μ l) durante 2 horas a 37 °C, purificados nuevamente mediante el kit Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035), y digeridos mediante la enzima XbaI(USB,

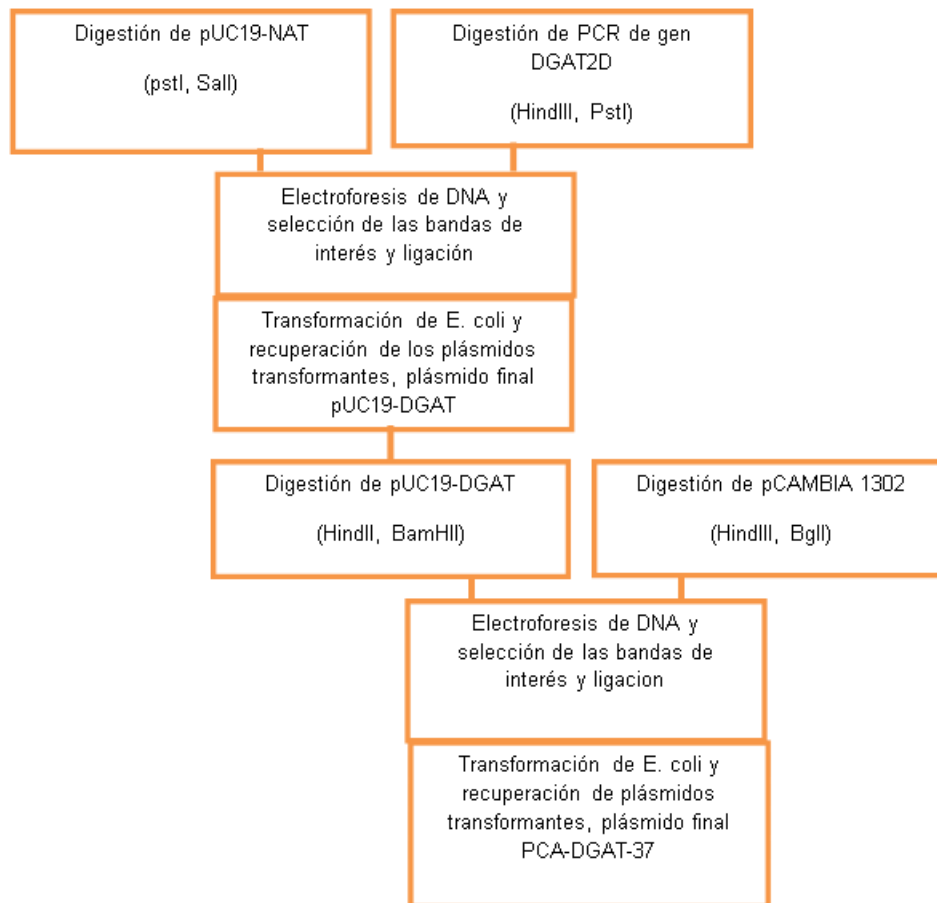
50/μl) durante 2 horas a 37 °C. Una vez terminada la reacción, las muestras fueron corridas durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE, del cual se recuperaron las bandas correspondientes al PCR de la señal de poliadenilación (~200 bp), y el plásmido pCAMBIA-RBCS2-NAT (~11 300 bp), se purificaron con el kit Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035) y se dejaron ligando toda la noche mediante la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, cat. No. ·15224-017) en una proporción 3:1 (inserto:vector) a una temperatura de 4°C. El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (DH5α) mediante choque térmico a 42 °C durante 30 segundos; después de lo cual, fueron plaqueadas sobre medio LB-agar (50 μ/ml de carbencinilina) dejándolas incubar durante 14 horas a 37 °C. Las colonias recombinantes obtenidas, fueron crecidas en medio LB líquido (50 μ/ml de carbencinilina) e incubadas en agitación constante a 37 °C durante 14 horas. Con el fin de recuperar los plásmidos, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus) y los plásmidos fueron purificados mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 3rd edición, 2001). Una vez purificados los plásmidos, fueron digeridos mediante los sitios de restricción agregados (Sall, XbaI) para confirmar la presencia del inserto y seleccionar estas clonas. Los plásmidos fueron digeridos nuevamente mediante las enzimas HindIII y XbaI durante 2 horas a 37 °C, y corridos en un gel de agarosa-TAE, con el fin de observar la presencia de la construcción completa (~1000 bp) el plásmido empleado para los pasos subsecuentes, fue nombrado pCA-NAT.

Una vez terminada la construcción del plásmido pCA-NAT, junto con el vector pUC19, se digirieron con la enzima HindII (USB, 50 U/μl) durante 2 horas a 37°C, después de lo cual fueron recuperados mediante el kit de purificación del gel Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035). A continuación se llevo a cabo la digestión con XbaI(USB, 50 U/μl) incubando durante 2 horas a 37°C. Posteriormente las muestras son corridas en un gel de agarosa-TAE al 1%, durante una hora a 80 volts. Las bandas correspondientes en peso molecular al plásmido pUC19 y la construcción de expresión de la resistencia NAT1 (10 kb y 1kb respectivamente) son recuperadas por squeeze-freeze, y preparadas para la reacción de ligación mediante la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, cat. No. ·15224-017). La reacción se dejó incubar durante 12 horas a 4°C, después de lo cual fue empleada para transformar la bacteria *E. coli* (DH5α) mediante choque térmico y plaqueada sobre medio LB-agar(50 μg/ml de carbencinilina), dejándolas incubar durante 14 horas a 37 °C. Las colonias

recombinantes obtenidas, fueron crecidas en medio LB líquido (50 µg/ml de carbencinilina), e incubadas con agitación constante a una temperatura de 37 °C durante 14 horas. Después del periodo de incubación, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus) con el fin de recuperar los plásmidos recombinantes mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 3rd edición, 2001). Una vez purificados, y con el fin de buscar los plásmidos con la construcción completa, los plásmidos fueron digeridos con los sitios de restricción de HindIII y XbaI (fig 9) durante una hora a 37 °C. Los plásmidos que dieron positivos para la construcción completa en el gel (~1000 bp) así como para el gen NAT1 se nombraron como pUC19-NAT.

El plásmido pUC19-NAT, fue la base para la construcción del plásmido de expresión de la enzima DGAT, así como para la construcción del plásmido de doble selección.

Construcción plásmido pCA-DGAT-37



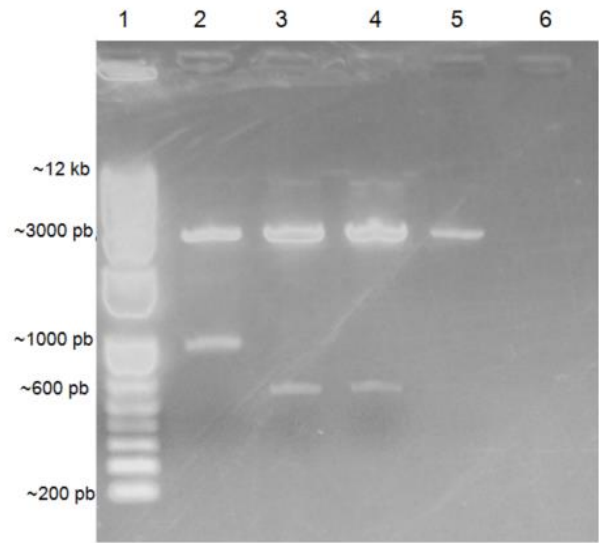
Introducción del gen DGAT

El gen de crDGAT2 el cual se optimizó para su expresión en *D. Salina* fue sintetizado por la compañía Genscript sin secuencias marcadoras ni etiquetas de purificación. Este gen fue amplificado por PCR empleando como molde el plásmido pUC57-DGAT. (30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 68°C, platinum pfx DNA polimerase, Invitrogen Cat. No. 11708-013) mediante los oligonucleótidos DGAT sent y DGAT anti (tabla 3), los cuales agrega los sitios de restricción de PstI y Sall respectivamente. Una vez terminada la reacción, una alícuota de 10 µl del producto de la reacción fue corrido durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE, la banda de interés poseía un tamaño aproximado de 800 pares de bases, las muestras positivas en gel fueron purificadas mediante el kit de purificación del gel Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035) para su introducción dentro del casete de expresión.

Tanto el producto de PCR del gen DGAT como el plásmido pUC19-NAT fueron digeridos con la enzima Sall(USB, 15 U/µl) durante 2 horas a 37 °C, purificados mediante el kit Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035), y digeridos mediante la enzima PstI (USB, 50 U/µl) durante 2 horas a 37 °C. Una vez terminada la reacción, las muestras fueron corridas durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE, del cual se recuperaron las bandas correspondientes a la enzima DGAT2 (~800 bp), y el plásmido pUC19-NAT (~4000 bp); se purificaron con el kit Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035) y se dejaron ligando toda la noche mediante la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, cat. No. ·15224-017) en una proporción 3:1 (inserto:vector) a una temperatura de 4 °C. El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (DH5α) mediante choque térmico; después de lo cual fueron plaqueadas sobre medio LB-agar (50 µg/ml de carbencinilina), dejándolas incubar durante 14 horas a 37 °C. Las colonias recombinantes obtenidas, fueron crecidas en medio LB líquido (50 µg/ml de carbencinilina) con agitación constante a una temperatura de 37°C durante 14 horas. Con el fin de recuperar los plásmidos recombinantes, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus) y los plásmidos purificados mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 3rd edición, 2001), después de lo cual fueron digeridos mediante los sitios de restricción correspondientes a la enzima DGAT (PstI, Sall) para confirmar la presencia del inserto (fig 2), los plásmidos que presentaban el inserto de un tamaño acorde al del gen

de la enzima DGAT (~1000 bp), fueron seleccionados y nombrados como pUC19-DGAT, el cual fue necesario para la construcción de la variante de doble resistencia y para la variante no marcada.

Fig. 2: confirmación de la ligación del gen DGAT2D en el casete de expresión (PstI-Sall). El carril 2 presenta la construcción completa con el gen DGAT2D, los carriles 3 a 5 presentan el gen NAT no retirado de la construcción. Escalera:



Oligonucleótido	Secuencia (sito de restricción subrayado)	Sitio de restricción
RBCS2 sent	TATAAGCTTCAGAAAGGAGCGCAGCCAAAC	HindIII
RBCS2 anti	TATCTGCAGCATTTTAAGATGTTGAGTGACTTCTCTTG	PstI
DGAT sent	TTTTCTGCAGATGCCTTTAGCTAAACTTCGCAATGTTG	PstI
DGAT anti	TTTTGTCGACCTACATTATGACAAGTTCCTCCCCC	Sall
Nos sent	TTTTGTCGACCGTTCAAACATTTGGCAATAAAG	Sall
Nos anti	TTTTCTAGACCCGATCTAGTAACATAGATG	XbaI
NAT sent	ATACTGCAGATATGACCACTCTTGACGAC	pstI
NAT anti	ATAGTCGACCGCTCAGGGGCAGGGCATGC	sall

Tabla 3: oligonucleótidos empleados para los casetes de expresión de genes NAT1 y DGAT2D.

Construcción de una variante sin péptido de fusión ni etiquetas de purificación

El diseño del plásmido para la expresión de la enzima DGAT2D dentro de *D. salina* permitiría la expresión continua del gen en base al promotor crRBCS2, el cual además es inducido mediante la exposición a la luz. La señal de nopalina sintetaza permitirá la poliadenilación del RNA mensajero obtenido de la transcripción; esta variante (fig 3) permitirá la expresión de la enzima dentro de *D. salina*, sin interferencias de ningún tipo sobre el polipéptido producido y sin etiquetas de purificación, además que el vector binario pCAMBIA 1302 permitirá su integración al genoma de la microalga mediante el sistema de recombinación que posee *A. tumefaciens*; la construcción tendrá una longitud total de 1456 pares de bases.

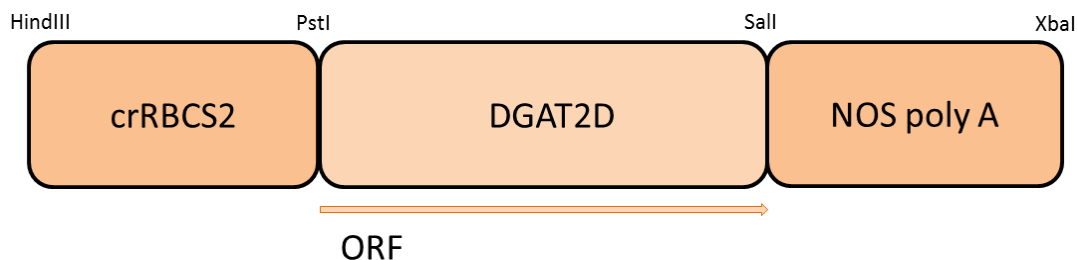


Fig 3, construcción para la expresión de la enzima DGAT2D.

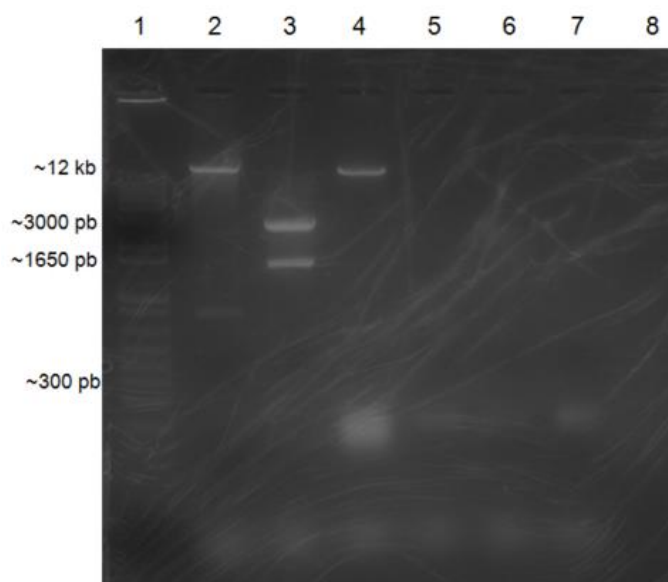
Construcción del plásmido de expresión de la enzima DGAT

El plásmido de expresión fue construido empleando el plásmido pUC19-DGAT, el cual fue digerido mediante enzimas de restricción para transferir la construcción al vector binario pCAMBIA 1302 (Cambia labs), empleando para ello el sitio de HindIII y BamHI del sitio de clonación múltiple del pUC19, y el sitio de HindIII y BglI presente en el sitio clonación múltiple y el extremo 3' del promotor CAMV 35S respectivamente.

Tanto el plásmido pUC19-DGAT como el plásmido pCAMBIA1302 fueron digeridos con la enzima HindIII(USB, 50 U/μl) durante 2 horas a 37 °C, purificados nuevamente mediante el kit Accuprep gel purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035), después de lo cual fueron digeridos mediante las enzimas BamHI(USB, 50 U/μl) para el plásmido pUC19-DGAT (50 U), y la enzima BglII(NEB, 10 U/μl) para el plásmido pCAMBIA 1302 durante 2 horas a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación, se agregó una unidad de fosfatasa alcalina de camarón (USB, product. Num. 70092Y) a la reacción del

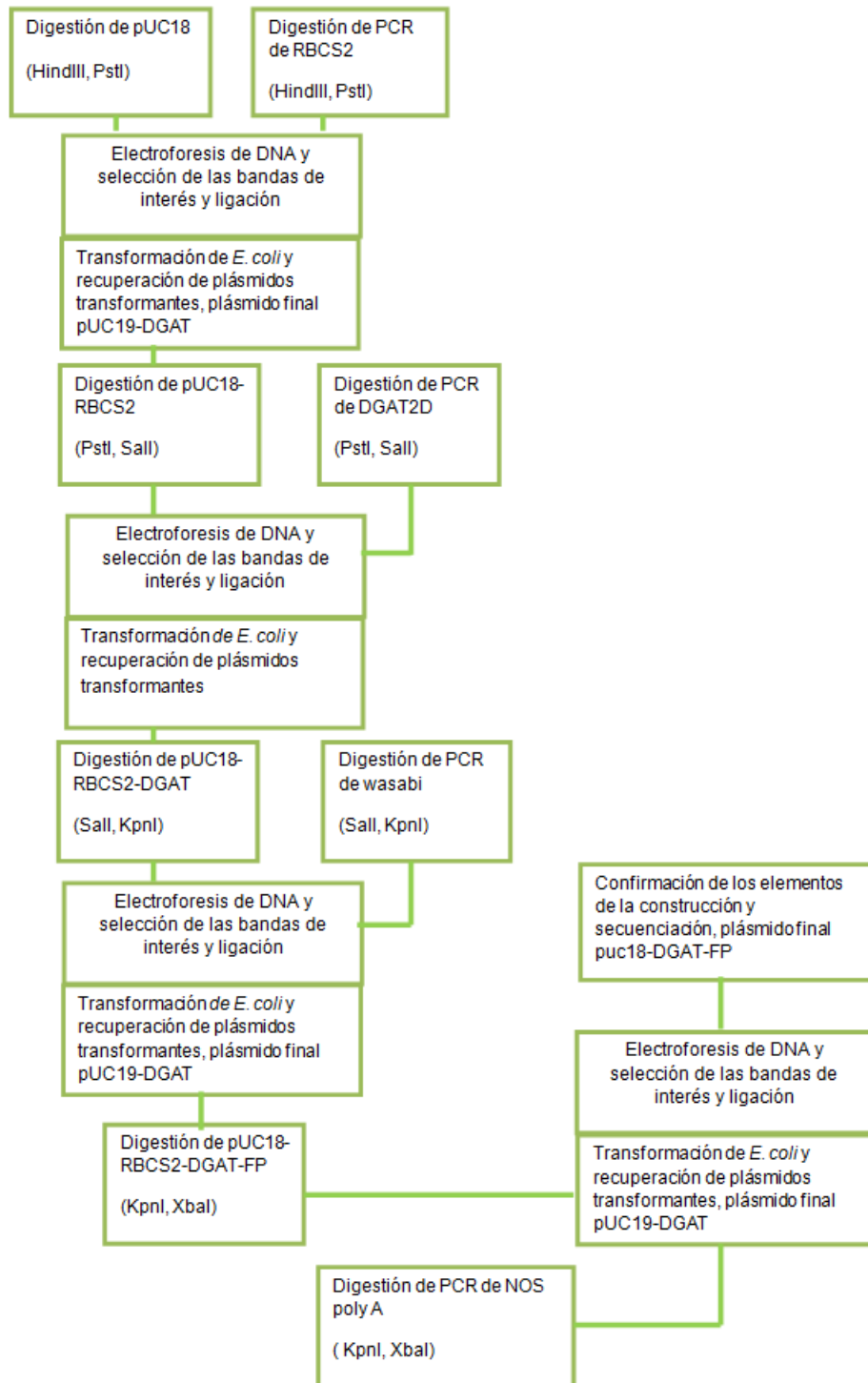
plásmido pCAMBIA1302, para después incubar durante una hora a 37°C. Una vez terminada la reacción, las muestras fueron corridas durante una hora a 80 volts en un gel de agarosa-TAE, del cual se recuperaron las bandas correspondientes a la construcción del gen DGAT (~1450 bp), y el plásmido pCAMBIA 1302(~10500)(fig 4); se purificaron mediante squeeze-freeze y se dejaron ligando toda la noche mediante la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, cat. No. ·15224-017) en una proporción 3:1 (inserto:vector) a una temperatura de 4 °C.

Fig 4. Fragmentos recuperados para la introducción del casete de expresión del gen DGAT dentro del plásmido pCAMBIA 1302.



El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (XL-10 GOLD) mediante choque térmico; después de lo cual fueron plaqueadas sobre medio LB-agar (70 µg/ml de kanamicina), dejándolas incubar 14 horas a una temperatura de 37 °C. Las colonias recombinantes obtenidas, fueron crecidas en medio LB líquido (70 µg/ml de kanamicina) con agitación constante a una temperatura de 37°C durante 14 horas. Con el fin de recuperar los plásmidos recombinantes, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus), y los plásmidos purificados mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 3rd edición, 2001), una vez recuperados, fueron digeridos mediante los sitios de restricción agregados (PstI, salI) para confirmar la presencia del gen DGAT, los plásmidos que presentaban el inserto de un tamaño acorde al del gen (1000 bp), así como de la construcción completa (~1200 bp) fueron seleccionadas para su secuenciación con el fin de confirmar la identidad del la secuencia. La colonia obtenida de esta ligación, fue nombrada como PCA-DGAT-37.

Construcción del plásmido pUC-DGAT-FP



Variante marcada de la enzima DGAT2D

Con los fines de observar directamente y de manera sencilla la expresión de la proteína de interés, la enzima fue fusionada a la proteína fluorescente Wasabi, la cual fue obtenida a partir de la proteína fluorescente mTFP1. La construcción está formada por secuencias promotoras de la transcripción (crRBCS2), así como terminadores de la transcripción y señal de poliadenilación (NOS poly A). El transcrito, codificara para una fusión genética produciendo un péptido el cual consiste en el gen de la enzima DGAT2D mientras que en el extremo amino de la enzima DGAT se encontrara el gen codificante de la enzima Wasabi en marco con el gen DGAT2D (fig 4). Entre cada elemento de la construcción, se agregó un péptido de unión, (secuencia de aa. GGSG) para proveer flexibilidad y disminuir las interferencias entre los 2 elementos del péptido, la construcción tendrá una longitud total de 2215 pares de bases.

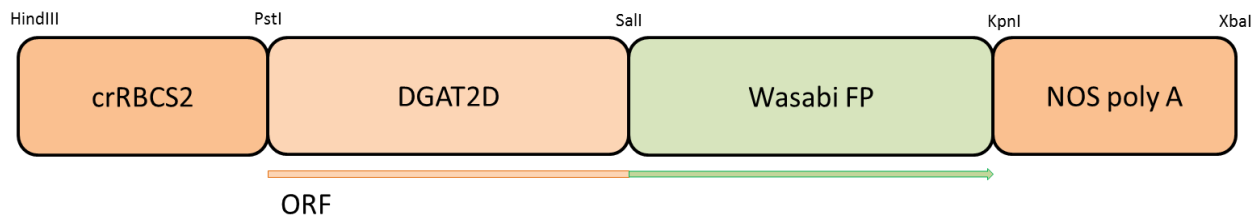


Fig 4: construcción para la expresión de la enzima FGAT2D marcada con proteína fluorescente.

Esta construcción permitirá la observación visual de la expresión, mediante un microscopio de fluorescencia, la selección de un inoculo de un cultivo con alto nivel de expresión mediante la técnica de *cell sorting*, o la detección de la fluorescencia mediante un fluorometro.

Construcción de la enzima DGAT2D marcada con Wasabi

Todos los elementos necesarios para la construcción de este casete de expresión fueron amplificados por PCR de 3 ciclos (30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C, 2.5 mM de MgCl₂, Fidelitaq DNA polimerase, Promega, numero de producto 71180).

Para cada reacción se empleo como molde el plásmido pUC18-DGAT para el promotor crRBCS2, el gen DGAT2D y el sitio de poliadenilación múltiple; y el plásmido pRSETB-Wasabi, para la proteína fluorescente. Cada elemento fue amplificado con sus respetivos oligonucleótidos (tabla 4).

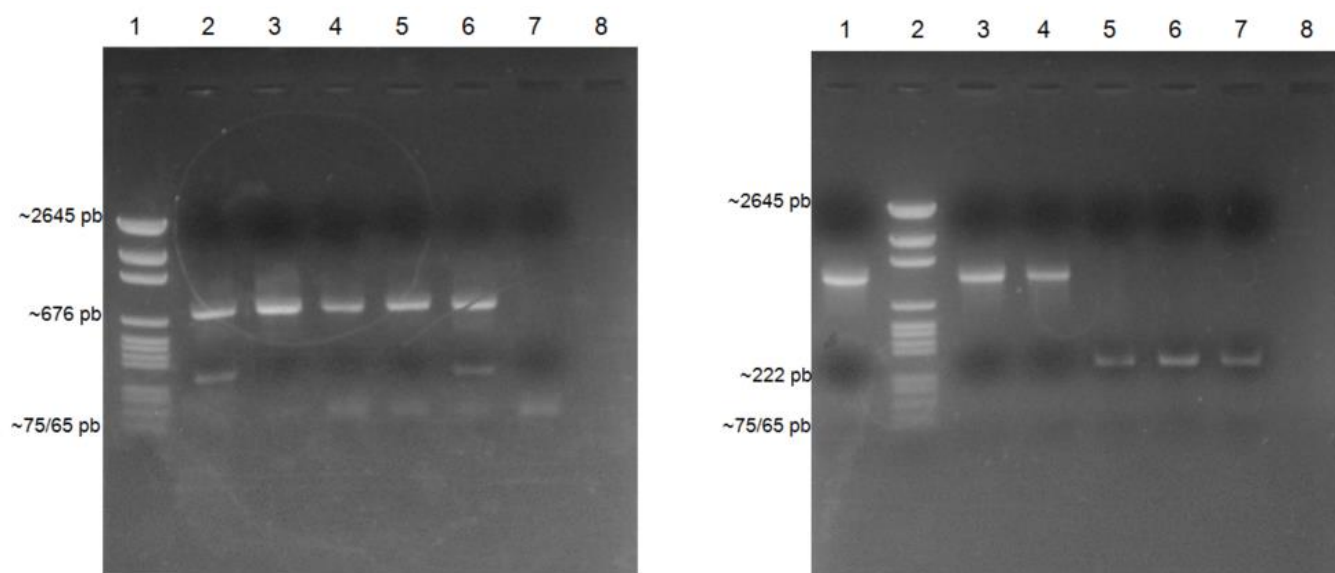


Fig. 5: Amplificación de los elementos genéticos para el casete de expresión de la enzima DGAT marcada: todos los elementos fueron amplificados mediante la enzima Fidelitaq (USB) en el primer gel, los carriles 2 a 7 corresponden a distintas proteínas fluorescentes; en el segundo gel los carriles 5 a 7 corresponde al sitio de poliadenilación múltiple. (Escala: Benchtop pGEM DNA markers, Promega).

Una vez terminada la reacción de PCR, los distintos productos de la reacción fueron corridos en un gel de agarosa-TAE durante una hora a 80 volts, empleando como referencia del peso molecular el marcador Benchtop pGEM DNA Markers (Promega, cat. G7521) obteniendo como productos bandas de un tamaño aproximado de 200 pares de bases para el promotor crRBCS2, ~250 pares de bases para el sitio de poliadenilación múltiple, de 1000 pb para el gen DGAT2D y de ~800 pares de bases para las proteínas fluorescentes (fig 5). El gel de agarosa es recortado en las posiciones de las bandas de ADN de cada elemento amplificado, las cuales fueron purificadas mediante el método de squeeze-freeze, y ligadas mediante el kit pGEM-T easy vector system, al plásmido pGEM-t easy. Cada ligación distinta fue empleada para transformar la bacteria *E. coli* (XL-10 GOLD) mediante choque térmico, después de lo cual fueron plaqueadas en medio LB (50 µg/ml de carbencinilina) dejándolas incubar durante 14 horas a 37 °C, una vez que crecieron las colonias, fueron inoculadas con medio LB liquido (50 µg/ml de carbencinilina) y se cultivaron en agitación constante a 37°C durante 14 horas. Después del periodo de incubación, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min,

Sorvall RC 5B plus) y los plásmidos purificados mediante el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific. cat. No. K0503). Todo esto con el fin de multiplicar el plásmido para facilitar la obtención del promotor para posteriores manipulaciones y su secuenciación. Los plásmidos que presentaban una banda del tamaño de su respectivo inserto (~200, ~250, ~1000 pb y ~800 pb) (fig 6) al digerir con EcoRI(USB, 15 U/μl), fueron secuenciados para confirmar la integridad de su secuencia y se eligieron para los siguientes pasos de la construcción.

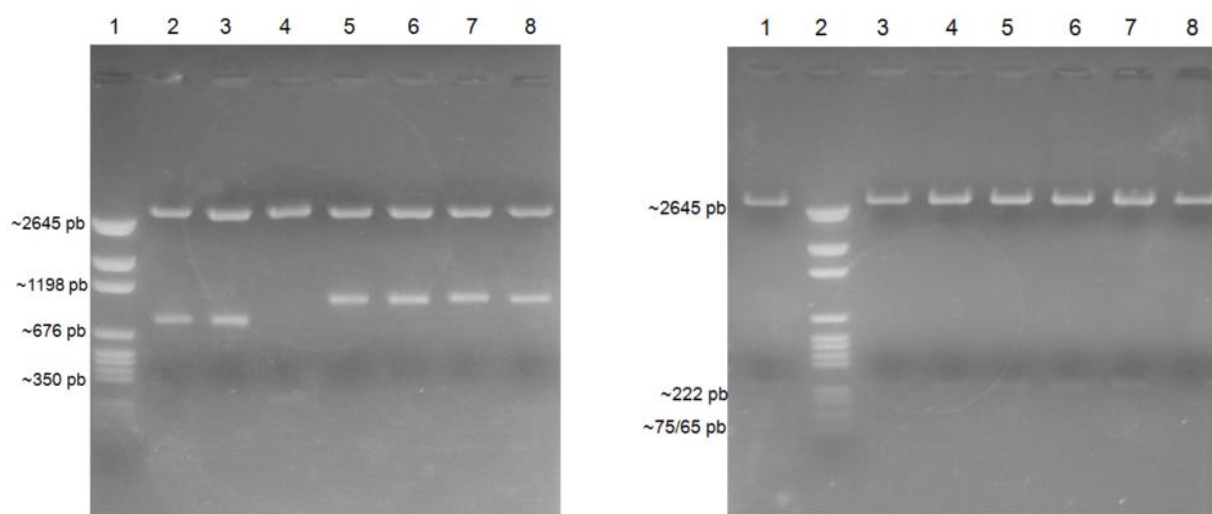


Fig 6: Confirmación de los insertos correspondientes a la proteína fluorescente Wasabi (primer gel.) y al promotor crRBCS2 (segundo gel) los cuales fueron seleccionados para la construcción de la variante DGAT2D marcada.

El plásmido pGEM-T-RBCS2 y el plásmido pUC18 fueron preparados para digerirlos mediante las enzimas de restricción HindIII(USB, 50 U/μl) y PstI(USB, 15 U/μl). Ambas digestiones fueron corridas en un gel de agarosa-TAE durante una hora a 80 volts, empleando como referencia del peso molecular el marcador O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (thermo scientific, cat. #SM1163). Una vez que termina de correr el gel de agarosa, es recortado en la posición de las banda de ADN tanto del fragmento correspondiente al promotor (~200 pb) como al pUC18 (~3000 pb). Las bandas se purificaron por squeeze-freeze, y se ligaron con la enzima T4 DNA ligase (promega cat. #M1801) a una temperatura de 4°C durante toda la noche. El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (XL-10 GOLD) mediante choque térmico. Después de lo cual fueron

plaqueadas en medio LB (50 µg/ml de carbencinilina) e incubadas durante 14 horas a 37 °C. Una vez que se desarrollan las colonias, estas fueron inoculadas en medio LB líquido (50 µg/ml de carbencinilina), e incubadas con agitación constante a 37 °C durante 14 horas. Con el fin de recuperar el plásmido, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus), y el plásmido recombinante fue purificado mediante el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific, cat. No K0503.) Una vez recuperado el plásmido de las colonias transformantes, se hicieron pruebas para confirmar la presencia del inserto, el plásmido fue nombrado, puc18-RBCS.

Una vez finalizada su construcción, el plásmido pUC18-RBCS y el plásmido PGEM-DGATmarc fueron preparados para digerirlos mediante las enzimas de restricción Sall(USB, 50 U/µl) y PstI(USB, 15 U/µl). Ambas digestiones fueron corridas en un gel de agarosa-TAE durante una hora a 80 volts, empleando como referencia del peso molecular el marcador O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (thermo scientific, cat. #SM1163). Una vez que termina de correr el gel de agarosa, es recortado en la posición de las banda de ADN tanto del fragmento correspondiente al gen de la enzima DGAT2D (~1000 pb) como al pUC18-RBCS (~3000 pb). Las bandas se purificaron por squeeze-freeze, y se ligaron con la enzima T4 DNA ligase (promega cat. #M1801). El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (XL-10 GOLD) mediante choque térmico. Después de lo cual fueron plaqueadas en medio LB (50 µg/ml de carbencinilina) e incubadas durante 14 horas a 37 °C. Una vez que se desarrollaron las colonias, estas fueron inoculadas en medio LB líquido (50 µg/ml de carbencinilina), e incubadas con agitación constante a 37 °C durante 14 horas. Con el fin de recuperar el plásmido, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus), y el plásmido recombinante fue purificado mediante el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific, cat. No K0503.) Una vez recuperado el plásmido de las colonias transformantes, se hicieron pruebas para confirmar la presencia del inserto. El plásmido fue nombrado, puc18-RBCS-DGAT.

El marcador de la construcción, la proteína Wasabi, fue amplificado mediante un PCR de 3 ciclos (30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C, fidelitaq DNA polimerase, promega, product number 71180) empleando los oligonucleótidos FP sent, y FP anti (tabla 2), los cuales agregan los sitios de restricción para Sall y KpnI. Para la reacción se empleó como molde un plásmido pRSETB el cual posee el gen de la proteína fluorescente Wasabi. El producto de la reacción fue preparado para

digerirlo mediante las enzimas de restricción Sall(USB, 15 U/ μ l) y KpnI(USB, 10 U/ μ l), junto con el plásmido pUC18-RBCS-DGAT, el cual fue digerido mediante las mismas enzimas. Ambas digestiones fueron corridas en un gel de agarosa-TAE durante una hora a 80 volts, empleando como referencia del peso molecular el marcador Benchtop pGEM DNA Markers (promega, cat. G7521) obteniendo como producto una banda de un tamaño aproximado de 800 pares de bases. El gel de agarosa es recortado en la posición de las banda de DNA y se purificaron estas por squeeze-freeze, después de lo cual se ligaron con la enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, cat. No. ·15224-017). El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (XL-10 GOLD) mediante choque térmico; después de lo cual fueron plaqueadas en medio LB (50 μ g/ml de carbencinilina), e incubadas a una temperatura de 37 °C durante 14 horas. Una vez que se desarrollan las colonias, estas fueron inoculadas en medio LB líquido (50 μ g/ml de carbencinilina), e incubadas con agitación constante a una temperatura de 37°C durante 14 horas. Con el fin de recuperar el plásmido recombinante, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm. 10 min, Sorvall RC 5B plus) y purificadas mediante el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific, cat. No K0503). Una vez recuperado el plásmido de las colonias transformantes, se hicieron pruebas para confirmar la presencia del inserto. El producto de esta ligación fue nombrado pUC18-RBCS-DGAT-FP para los pasos posteriores.

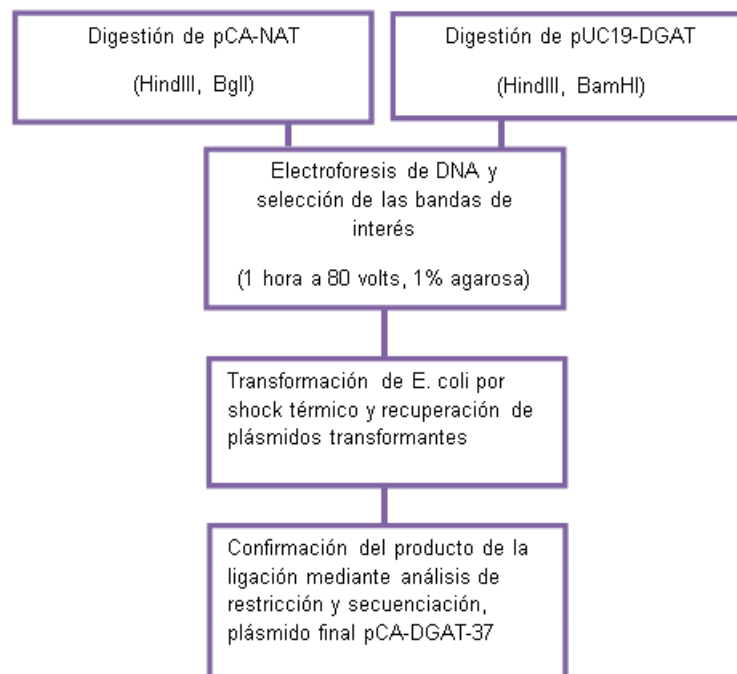
El pasó final de la construcción; la adición de una secuencia señal para la poliadenilación, se lleva a cabo una vez confirmada la secuencia de los elementos anteriores. La señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (NOS poly A) fue amplificado mediante un PCR de 3 ciclos (30 seg. a 94°C, 30 seg. a 55°C, 30 seg. a 72°C, fidelitaq DNA polimerase, promega, product number 71180) empleando los oligonucleótidos NOS sent, y NOS anti (tabla 2), los cuales agregan los sitios de restricción para KpnI y XbaI. Para la reacción se empleo como molde el plásmido pCAMBIA 1302 el cual posee la señal de poliadenilación como parte de una construcción de su gen reportero. El producto de la reacción fue preparado para digerirlo mediante las enzimas de restricción KpnI(USB, 10 U/ μ l) y EcoRI(USB, 50 U/ μ l), junto con el plásmido pUC18-RBCS2-DGAT2-FP, el cual fue digerido mediante las mismas enzimas con el fin de insertar la secuencia codificante para la NOS poly A en la posición 3' a continuación del gen para la proteína Wasabi. Ambas digestiones fueron corridas en un gel de agarosa-TAE durante una hora a 80 volts, empleando como referencia del peso molecular el

marcador Benchtop pGEM DNA Markers (promega, cat. G7521) obteniendo como producto una banda de un tamaño aproximado de 300 pares de bases. El gel de agarosa es recortado en la posición de las banda de ADN, se purificaron estas por squeeze-freeze, y se ligaron con la enzima T4 DNA ligase (promega, cat. #M1801). El producto de la ligación fue empleado para transformar la bacteria *E. coli* (XL-10 GOLD) mediante choque térmico, después de lo cual fueron plaqueadas en medio LB (50 µg/ml de carbencinilina), después de lo cual fueron incubadas a una temperatura de 37 °C durante 14 horas. Una vez que se desarrollan las colonias, son inoculadas en medio LB liquido (50 µg/ml de carbencinilina) e incubadas con agitación constante a una temperatura de 37 °C durante 14 horas. Con el fin de recuperar el plásmido recombinante; las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus), y el plásmido fue purificado mediante el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific, cat. No K0503). Una vez recuperado el plásmido de las colonias transformantes, se hicieron pruebas para confirmar la presencia del inserto así como su secuenciación para confirmar la ausencia de mutaciones. Una vez terminada la construcción, fue digerida mediante los sitios de restricción agregados para confirmar la presencia de todos los elementos, así como de que se encuentren en el orden indicado (fig 20), el plásmido final fue nombrado pUC-DGAT-FP.

Oligonucleótido	Secuencia (sitio de restricción subrayado)	Sitio de restricción
RBCS hindIII	TATA <u>AAGCTT</u> CAGAAGGAGCGCAGCCAAAC	HindIII
RBCS NcoI	TAT <u>CTGCAG</u> CATTTTAAGATGTTGAGTGACTTCTCTTG	NcoI
NOS KpnI	AAAGGTACCCGTTCAAACATTTGGC	KpnI
NOS XbaI	TTTT <u>CTAGAC</u> CCGATCTAGTAACATAGATG	XbaI
FP Sall	AAAGT <u>CGACG</u> GGCGGCTCTGGCATGGTGAGCAAGGGCG AGG	Sall
FP KpnI	AAAGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCC	KpnI
DGAT sent	TTTT <u>CTGCAG</u> ATGCCTTTAGCTAAACTTCGCAATGTTG	PstI
DGATmarc anti	TTTT <u>GTCGAC</u> GGGCATTATGACAAGTTCCTCCCC	Sall

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la construcción del plásmido pUC-DGAT-FP.

Construcción del plásmido pCA-DGAT-37



Variante de doble resistencia

Con la finalidad de mejorar la proporción entre el número de colonias transformantes y las colonias que no poseen el gen de interés, se construyó una variante del plásmido pCAMBIA 1302-DGAT la cual posee un segundo gen de resistencia bajo el control del promotor crRBCS2 y la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (fig 6). El gen de resistencia empleado, el gen de la nourseotricin acetiltransferasa (NAT1) de *S. noursei*, permitirá la resistencia al antibiótico higromicina, mientras que el gen hptII del plásmido pCAMBIA provee la resistencia a higromicina.

La construcción posee una longitud de 2204 pares de bases, la construcción se localizó entre el sitio de clonación múltiple del vector, y el sitio de corte BglII que está a continuación del promotor CAMV35S correspondiente al gen reportero del vector; por lo cual esta variante carece de la expresión de la proteína reportera.

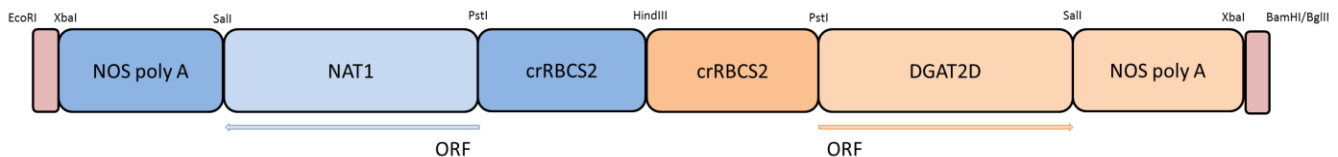


Fig 6: Variante de doble resistencia dentro del plásmido pCAMBIA 1302.

Construcción de la variante de doble resistencia

El plásmido de expresión fue construido empleando como esqueleto el plásmido pCA-NAT, sobre el cual se construyó inicialmente la construcción de resistencia a nourseotricina, para posteriormente introducir la construcción para la expresión de la enzima DGAT, la cual se encontraba en el plásmido pUC19-DGAT construido anteriormente. Las construcciones se encuentran orientadas en sentidos opuestos entre sí, encontrándose la hebra de la construcción del gen NAT1 en la hebra sentido del plásmido pCAMBIA 1032, mientras que la construcción del gen DGAT se encontrará en la hebra antisentido.

Tanto el plásmido puc19-DGAT como el plásmido pCA-NAT fueron digeridos con la enzima HindIII (USB, 50 U/μl) durante 2 horas, purificados nuevamente mediante el kit Accuprep gel

purification kit (Bioneer, cat. No. K-3035), y digeridos mediante la enzima BglIII(NEB, 10 U/μl) para el plásmido pCA-NAT; y BamHI (USB, 50 U/μl) para el plásmido pUC19-DGAT, durante 2 horas a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación, se agregó una unidad de fosfatasa alcalina de camarón (USB, product. Num. 70092Y) a la reacción del plásmido pCA-NAT, para después incubarla durante una hora a 37°C. Una vez terminado el tiempo de incubación, se inactivaron las enzimas calentando las muestras a 65 grados durante 15 min. Posteriormente las muestras fueron corridas en un gel de agarosa-TAE al 1%, durante una hora a 80 volts. Las bandas correspondientes en peso molecular al plásmido pCambia1302 y la construcción de expresión de la enzima DGAT (10 kb y 1.6 kb respectivamente) fueron recuperadas por squeeze-freeze, y preparadas para la reacción de ligación mediante la enzima ligasa T4 DNA ligase (Invitrogen, cat. No. ·15224-017) dejando incubar la reacción toda la noche a 4 °C. Una vez terminada la reacción de ligación; se agregó la reacción 15 U de la enzima BglIII(NEB, 10 U/μl), dejando incubar la reacción una hora a 37 °C; después de lo cual fue empleada para transformar la bacteria *E. coli*(XL10-GOLD) mediante choque térmico, después de lo cual fue plaqueada sobre medio LB-agar(70 μg/ml de kanamicina) dejándolas incubar durante 14 horas a 30 °C. Las colonias recombinantes obtenidas, fueron crecidas en medio LB líquido (70 μg/ml de kanamicina), e incubadas a 37 °C con agitación constante durante 14 horas. Después del periodo de incubación, las bacterias fueron centrifugadas (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus) y los plásmidos purificados mediante lisis alcalina (Sambrook & Russell, 3rd edición, 2001). Para identificar los plásmidos con la construcción completa, los plásmidos fueron digeridos con los sitios de restricción de Sall y PstI, los cuales liberan los genes NAT1 y crDGAT2D así como un fragmento correspondiente a los dos promotores de las construcciones. Solo se obtuvo una colonia con la construcción completa, la cual fue secuenciada para confirmar su integridad. La construcción final fue nombrada PCA-DGAT-12.

Métodos de transformación de *Dunaliella salina*

Para los distintos métodos de transformación; se empleó *D. salina*, aislada de las lagunas salinas San Quintín, en Ensenada, Baja California. La microalga, se mantiene en cultivo en medio Johnson modificado a una salinidad de 500 mM de cloruro de sodio. El cual una vez llegado al punto de saturación durante su crecimiento logarítmico, es empleado para los distintos métodos de transformación, o reinoculado en cajas de medio TAP (100 mM de NaCl) para la transformación mediante *A. tumefaciens*.

En el presente trabajo, se emplearon principalmente los métodos de cocultivo con *A. tumefaciens* (Anila et. al, 2011), transformación mediante agitación con microesferas de vidrio (Feng et al, 2009) y biobalística (Tan et al, 2005).

Una vez finalizado el correspondiente método, el volumen de cultivo obtenido será dividido para inocular medio TAP líquido (100 mM de NaCl) y cajas con medio TAP sólido (200 mM de NaCl). El primero será utilizado para extraer ADN a los 10 días de la transformación. El segundo será utilizado para evaluar la eficiencia en formación de colonias al mes de cultivo.

Transformación mediante microesferas de vidrio

Las microesferas de vidrio empleadas poseen un diámetro de 425 a 560 μm (Sigma-Aldrich, G8772-10G.) Las microesferas fueron lavadas con HCl, al cual le siguieron lavados con agua destilada hasta llegar a pH neutro; una vez alcanzado esto, fueron secadas calentándolas a 70 °C; una vez finalizado, se colocaron 300 mg de las microesferas en tubos Eppendorf de 1.5 ml, los cuales se prepararon para ser esterilizados en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Junto con las microesferas, se preparó una solución madre de PEG 6000 (Sigma-Aldrich, 1546580-1G) a una concentración del 20% la cual fue esterilizada por filtración mediante un filtro Millex de un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore, cat. no.SLVV 033 RS).

Protocolo de transformación

D. salina fue cultivada hasta llegar a fase logarítmica en medio Johnson modificado (500 mM de

NaCl), una vez que alcance una concentración celular de entre 5×10^6 y 10×10^6 , se toma el volumen de cultivo necesario para obtener una cantidad de 100×10^6 células, este volumen, fue centrifugado durante 2 min a 1000 rpm en tubos Falcon de 50 ml, el medio es desechado y se agrega 5 ml de medio de cultivo fresco; de esta manera se lavan las células 3 veces. Una vez finalizados los lavados, se resuspenden en 742.5 μ l de medio de cultivo Johnson modificado (500 mM de NaCl), los cuales se traspasan al tubo Eppendorf estéril, el cual contiene las bolitas de vidrio; después se adicionaron 60 μ g de plásmido (~ 2272 ng/ μ l) y 157.5 μ l de PEG 6000 al 20% (concentración final de 3.5%), se mezclan ligeramente todos los componentes por inversión del tubo y se les da vortex durante 15 segundos (2800 rpm, VWR lab dancer s41). Se dejan sedimentar las microesferas de vidrio y se recuperaron las células, las cuales se dejan en cultivo en tubos de vidrio estériles durante 24 horas con medio Johnson modificado (100 mM de NaCl). Después de 48 horas de la transformación, se lavan las células 3 veces con medio Johnson modificado (500 mM de NaCl). Finalmente se resuspenden en 20 ml de medio Johnson modificado (500 mM de NaCl), y se agrega Higromicina a una concentración final de 200 μ g/ml; igualmente están listas para confirmar visualmente la expresión de las proteínas reporteras introducidas dentro de la microalga. A 10 días después de la transformación, se realizaron las extracciones de DNA para las pruebas de confirmación por PCR para la presencia del gen introducido.

Transformación por biobalística

El procedimiento de transformación por biobalística se llevó a cabo en SCRIPPS Institute of Oceanography, University of California, San Diego. Mientras que la preparación de las partículas de tungsteno, el cultivo de microalgas para transformar y la preparación del plásmido empleado se llevaron a cabo en la Universidad Autónoma de Baja California, en el laboratorio Meredith Gould Chambers, en la Facultad de Ciencias.

Preparación de las partículas de tungsteno

Para el proceso, se emplearon micropartículas de tungsteno (tungsten M-10 microcarrier, 0.7 μ m, cat.

No 165-2266). De las cuales se prepararon 10 mg de las particular en 500 µl de etanol dentro de un tubo de Eppendorf de 1.5 ml; se resuspenden bien mediante vortex, se centrifugan 30 segundos a máxima velocidad, se desecha el sobrenadante, se resuspenden nuevamente en 250 µl de etanol y se les da vortex por 2 minutos. Una vez finalizado esto, se centrifugan durante 30 segundos a máxima velocidad, y se lavan 3 veces con 250 µl de agua destilada estéril, después de lo cual se resuspenden finalmente en 150 µl, el cual se divide el alícuotas de 50 µl cada una, las cuales se guardan a -20 °C hasta su uso.

Preparación del cultivo de D. salina para la transformación

Se prepara un cultivo de *D. salina*, en medio Johnson modificado, con 50 µl de inóculo del cultivo stock, hasta que alcance su fase exponencial. Ya en SCRIPPS, de este cultivo se tomara el volumen necesario para obtener 100×10^6 células, se centrifugan y se resuspenden en 100 µl de medio Johnson modificado (500 mM de NaCl), con el cual se inocularon cajas de petri de 10 cm con medio Johnson modificado (500 mM de NaCl) con 20% de agar. Una vez inoculadas, las cajas son empleadas para la transformación.

Recubrimiento de las partículas de tungsteno con el DNA plasmídico

Este procedimiento se realizó en las instalaciones de SCRIPPS, para lo cual se realizó lo siguiente: Se colocaron las partículas de tungsteno bajo vortex con los siguientes componentes: 5 µl de DNA plasmídico (1 µg/ml), 50 µl de CaCl_2 (2.5 M), y 20 µl de espermidina (0.1 M, libre de bases); una vez agregados, el vortex continua durante 3 minutos más. Se centrifugan las microparticulas por 10 segundos y se remueve el sobrenadante con todos los componentes. Se agregan 250 µl de etanol y se les da vortex por 1 minuto, se centrifugan nuevamente; se retira el sobrenadante, y se resuspenden finalmente en 50 µl de etanol, después de lo cual se mantienen en hielo hasta su uso en la transformación.

Transformación por biobalística

Antes de llevar a cabo la transformación, todos los componentes del aparato de biobalística deben

ser esterilizados, así como su interior. Los discos de ruptura son esterilizados con isopropanol, mientras que las rejillas de frenado son esterilizadas en autoclave.

Una vez preparadas las cajas con las microalgas y las partículas microacarreadoras, se les da vortex a éstas, y se colocan 10 µl de las partículas en el centro del disco de ruptura, después de lo cual se espera hasta que se hayan secado las partículas completamente del etanol. Una vez secas, se coloca el disco de ruptura en su soporte, y se ensambla dentro de la correspondiente unidad, el disco de soporte empleado debe de romperse a una presión de vacío de 1350 psi. Una vez ensamblada la unidad, se coloca dentro del aparato de biobalística y se coloca la rejilla de frenado, además de colocar en su lugar correspondiente la caja de cultivo con la microalga dentro del aparato de biobalística. Una vez que el aparato alcance la presión de ruptura, se retira la tapa de la caja de cultivo y se procede con el disparo.

Recuperación de las microalgas transformadas

Una vez finalizado el disparo, se adhieren 10 ml de medio de cultivo líquido Johnson modificado (500 mM de NaCl) y se dejan incubando bajo iluminación toda la noche. Al día siguiente, las células son despegadas de la caja de cultivo y depositadas en un tubo estéril, del cual fueron empleadas para inocular en medio de cultivo TAP solido (200 mM de NaCl) con 100 µg/ml de higromicina. Las cajas se mantienen bajo iluminación durante un mes; las colonias resistentes comienzan a aparecer aproximadamente a las 3 semanas de cultivo.

Transformación con A. tumefaciens

Una vez terminada la construcción del plásmido pCA-DGAT-37, éste fue transformado en la bacteria *A. tumefaciens* mediante el método de congelación/descongelación (Ang et al, 1988) y seleccionado en medio con 70 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de estreptomicina. Las colonias resultantes fueron crecidas en medio LB para purificar el plásmido y confirmar la presencia del gen crDGAT2 en las colonias resultantes. La integridad de la construcción fue confirmada mediante la digestión por enzimas de restricción. Las colonias positivas fueron sembradas en medio LB para su preservación a -80 °C y su empleo como stock para realizar la transformación de *D. Salina*.

La transformación de *D. salina* se realizó mediante una modificación del método publicado por Anila et. al en el 2011, en el cual *D. salina* es cultivada en medio Johnson modificado con 250 mM de NaCl hasta alcanzar la fase logarítmica (densidad aprox. de 7×10^6 hasta 1×10^7 células por ml), este cultivo es empleado como inóculo (2×10^6 células) para cajas con medio TAP agar (200mM), después de lo cual se dejan crecer durante 6 días a temperatura ambiente con luz continua.

El stock de *A. tumefaciens* con el plásmido pCA-DGAT-37 será empleado para inocular un cultivo en 10 ml de medio LB y el cultivo será incubado durante 2 días a 28 °C en presencia de kanamicina (70 µg/ml) y estreptomicina (25 µg/ml), después de lo cual se inocula un volumen de 150 ml de medio LB con kanamicina (70 µg/ml) y estreptomicina (25 µg/ml) con 1/100 de volumen del cultivo inicial, se incuba a 28°C hasta alcanzar una densidad de 0.6 a 600nm se centrifuga (3500 rpm, 10 min, Sorvall RC 5B plus) y se lava 3 veces en 1/10 del volumen de medio TAP (100 mM de NaCl). Esta resuspensión es empleada para cocultivar con *D. salina* en las cajas con medio TAP, empleando 1 ml de medio TAP con *A. tumefaciens* por caja de cultivo de *D. Salina*, homogenizando ambos y dejándolos incubar por 48 horas.

Terminado el tiempo de incubación, el cocultivo es recuperado en su totalidad, re suspendiendo el cocultivo con medio TAP (100 mM de NaCl), el cual se recupera y se centrifuga (1000 rpm, 1 min), se desecha el sobrenadante y se lava 3 veces con medio TAP (100 mM de NaCl) con 500 µg/ml de cefotaxime, después de lo cual se siembran finalmente en cajas de medio TAP (200 mM de NaCl) con 100 µg /ml de higromicina y glucosa a una concentración de 10 mM. Las colonias aparecerán aproximadamente entre las 3 y 4 semanas de cultivo.

Las colonias que se recuperarán mediante la selección con higromicina y se inocularán en cultivo en 500 µl de medio TAP líquido (100 mM de NaCl) con 100 µg/ml de higromicina. Una vez que alcancen una densidad de 1×10 se incrementará su volumen de cultivo a 5 ml.

Confirmación de la transformación.

Las líneas de microalgas que se obtendrán después de la transformación serán escaladas hasta alcanzar un volumen de cultivo de 10 ml, de los cuales se tomarán 3 ml (~8.3 millones de células/ml) para la extracción de DNA total (Scott Newman's, 1991) de la microalga transformada y la cepa nativa. El DNA total será empleado como molde para una reacción de PCR para confirmar la presencia de la construcción en el genoma de la microalga transformada. El fragmento amplificado mide aproximadamente 1 kb y abarca el gen crDGAT2, se confirmará su identidad mediante secuenciación, la cepa nativa deberá dar un resultado negativo a la prueba de PCR.

RESULTADOS

Secuencia sintética del gen DGAT

La secuencia sintética del gen DGAT corresponde a la variante crDGAT2D según la clasificación de las variantes hecha por La Russa et al en el 2012. El gen fue optimizado para su expresión en *D. salina* ajustando los codones a los usados preferencialmente por la microalga. La secuencia que sirvió como molde corresponde a la secuencia XP_001693189¹.

El análisis de la construcción sintética fue llevado a cabo mediante alineamientos de las secuencias publicadas de los cDNA de las 4 variantes endógenas de *C. reinhardtii* identificadas por La Russa et al. (fig 7); además, se alinearon los productos de la traducción de la secuencia sintética con el producto de la traducción de las 4 variantes (fig. 8). El alineamiento entre las secuencias de aminoácidos demostró la identidad del polipéptido producido por la construcción sintética como la variante DGAT2D de *C. reinhardtii*; mientras que a nivel del mensajero entre la construcción sintética y la variante crDGAT2D, presento una identidad general, aunque alterada debido al proceso de la optimización de codones (fig. 9).

Entre cada una de las diversas variantes de la enzima DGAT2 de *C. reinhardtii* no se presentó una similitud a nivel mensajero entre las 4 variantes, mientras que a nivel de polipéptido presentaban dominios compartidos, en especial los dominios asociados a la unión de diacilglicerol, los sitios catalíticos de la enzima (fig 7, marcas amarillas) y el dominio asociado a las enzimas LPAT y MGAT (fig 8, dominio marcado en rosa).

¹ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_001693189

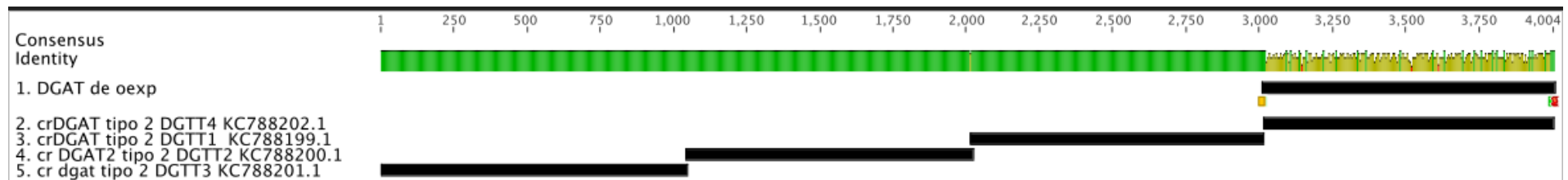


fig. 7: Alineamiento entre las variantes de *C. reinhardtii* y la construcción sintética.

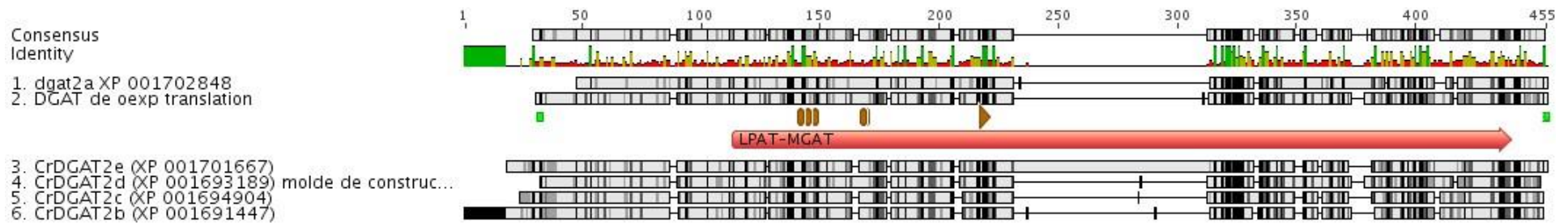


fig. 8: Alineamiento de los polipéptidos de las variantes de *C. reinhardtii* y la construcción sintética.

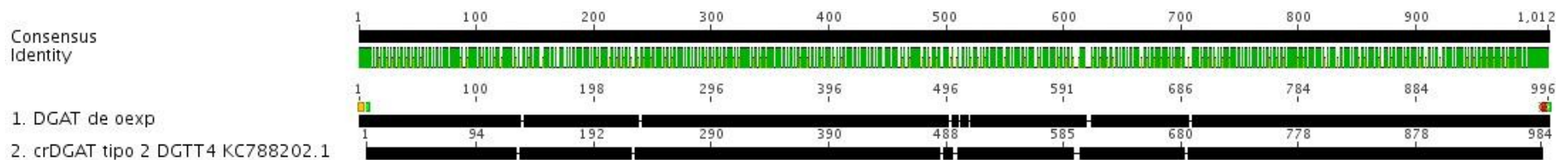


fig. 9: Alineamiento de la construcción sintética y la variante DGAT2d de *C. reinhardtii*.

Aislamiento del promotor crRBCS2

Una vez confirmada la presencia física del inserto de aproximadamente 200 pb dentro del plásmido pGEM-RBCS3, este fue secuenciado para confirmar la presencia del inserto (fig 10).

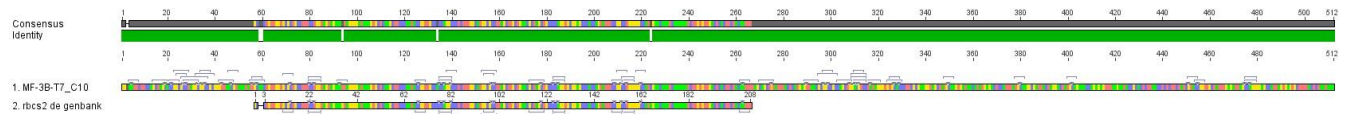


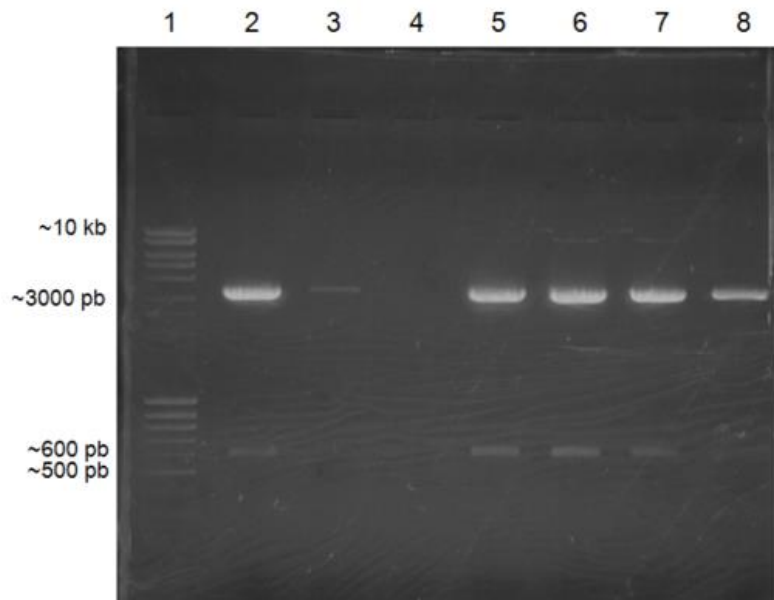
fig 10. Confirmación de la secuencia del promotor RBCS2 obtenido de *C reinhardtii*.

La secuencia mostrada presenta 3 sustituciones. Ninguna se encuentra en sitios regulatorios, y la última, se encuentra más allá de los 180 pb, por lo que tentativamente no deberían afectar la expresión.

Construcción de los plásmidos

Plásmidos de resistencia a nourseotricina: inicialmente, el producto de la amplificación del gen NAT1 fue secuenciado dentro del plásmido pGEM-T easy para confirmar su secuencia y el correcto remplazo de los sitios de restricción necesarios. Posteriormente, para confirmar la introducción del gen NAT1 o su casete en otros plásmidos, los plásmidos provenientes de la ligación pUC19 y el casete de expresión para NAT1 (fig 11), así como el plásmido pCA-NAT; fueron digeridos mediante las enzimas PstI-Sall, los cuales liberan el gen NAT1.

Fig. 11: Confirmación de la ligación del casete de expresión de NAT1 en el plásmido pUC19 (PstI-Sall). Las muestras positivas liberan una banda correspondiente al gen NAT1 (~600 pb), el plásmido posee un tamaño de ~3000 pb. Cada carril posee una muestra de plásmido distinta, las muestras 2,5,6,7 y 8 poseen el casete de expresión del gen NAT1 dentro del sitio de clonación múltiple. (Escala:



Una vez confirmada visualmente la presencia de una secuencia delimitada por los sitios de corte agregados al gen NAT1, las muestras fueron secuenciadas y alineadas contra sus secuencias modelo, las cuales provienen de la página oficial de WERNER BioAgents para el gen NAT1² (fig 12 y 13) y de la base de datos del NCBI para las secuencias del promotor crRBCS2 (fig 13) y Nos poly A del plásmido PCAMBIA 1302³ (fig 14).

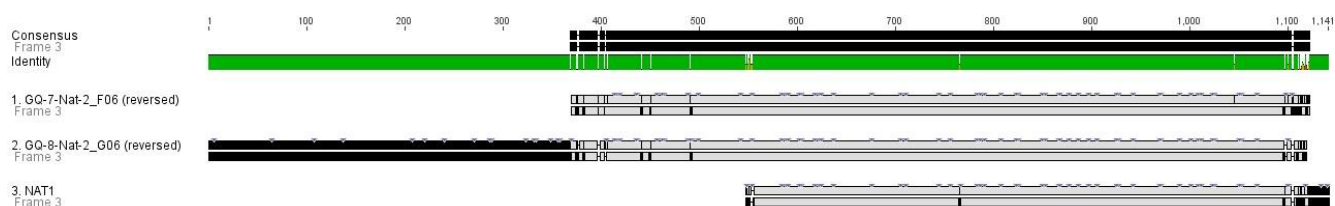


Fig 12: Alineamiento gen NAT1 contra secuencia modelo, plásmido pGEM-T easy.

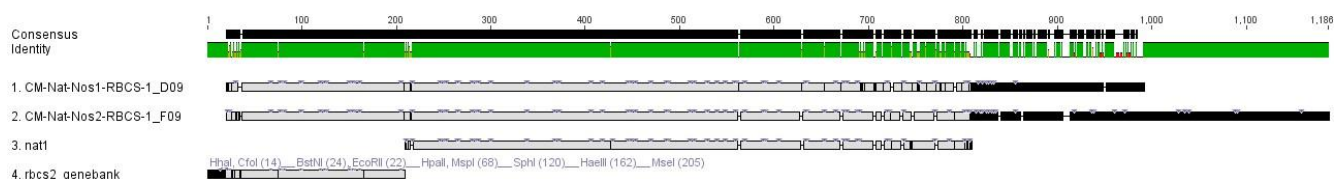


Fig 13: Alineamiento gen NAT1 contra secuencia modelo de NAT1 y promotor crRBCS2, plásmido pCA-NAT.

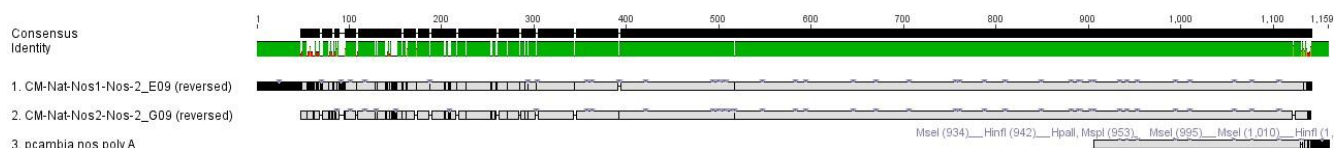


Fig 14: Alineamiento gen NAT1 contra secuencia modelo de NOS poly A proveniente de pCAMBIA 1302, plásmido pCA-NAT.

² http://www.webioage.de/eng/page_3_2.php

³ Código de acceso X04472 y AF234298.1

La secuencia del gen NAT1 se encuentra colocada inmediatamente al sitio de inicio de la transcripción, donde el sitio de corte de PstI hace la función de un 5 UTR corto. Inmediatamente al codón de paro de la traducción, se encuentra la señal de poliadenilación. Esta construcción no genera cambios mayores dentro del esqueleto del plásmido pCAMBIA 1302.

Plásmidos de expresión pUC19-DGAT, PCA-DGAT-37 y PCA-DGAT-12: una vez concluida la movilización del gen DGAT2D en el plásmido pUC19, este fue secuenciado para confirmar el estado del gen y su correcta localización dentro del casete de expresión (fig 15y 16).

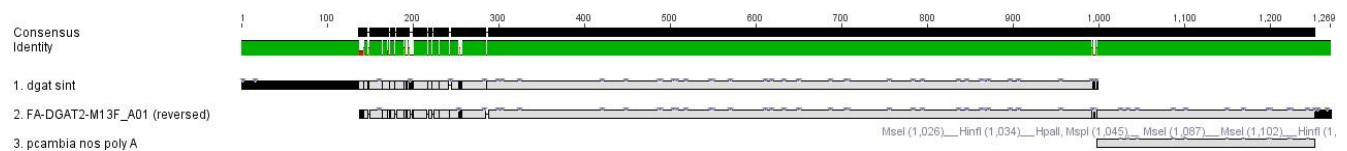


Fig 15. Alineamiento para confirmar estado de la secuencia del gen DGAT2D y la localización de la señal de poliadenilación.

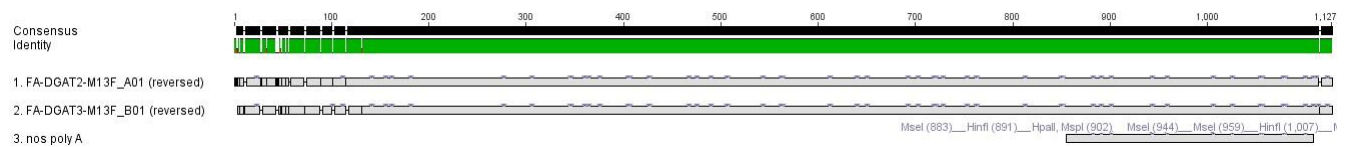


Fig 16. Confirmación de la secuencia de las dos clonas del gen DGAT2D y la localización de la señal de poliadenilación.

Los plásmidos pCA-DGAT37 y PCA-DGAT-12 fueron confirmados mediante análisis de los fragmentos obtenidos por la digestión de las enzimas empleadas en su construcción. Liberando el casete de expresión completo y el gen DGAT2D para el plásmido pCA-DGAT-37 (fig 17), y los genes NAT1 y DGAT2D, junto a una fusión de los promotores de ambos genes (fig 18), en el caso del plásmido pCA-DGAT-12. Ambas construcciones pierden el promotor CAMV 35S, por lo que ya no puede emplearse el gen reportero del plásmido ni puede emplearse este promotor para la introducción de un segundo o tercer gen de interés, según el caso.

Fig. 17: Confirmación de la construcción completa del casete de expresión del gen GDAT2D en pcambia 1302. Las muestras fueron digeridas con PstI-Sall para el tratamiento A y con HindIII-xbal para el tratamiento B, los cuales liberan el gen DGAT2D (~1000 bp) y el casete de expresión completo respectivamente (~1400 pb). el carril 2 presenta un control de puc19-DGAT, los carriles 3 y 4 la muestra 34 con los tratamientos A y B, los carriles 5 y 6 la muestra 37 con los tratamientos A y B, los carriles 7 y 8 la muestra 43 con los tratamientos A y B. (escalera:

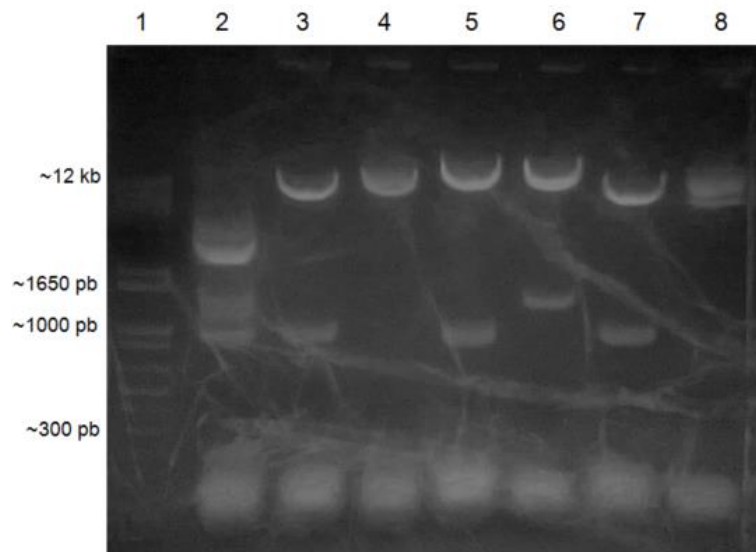
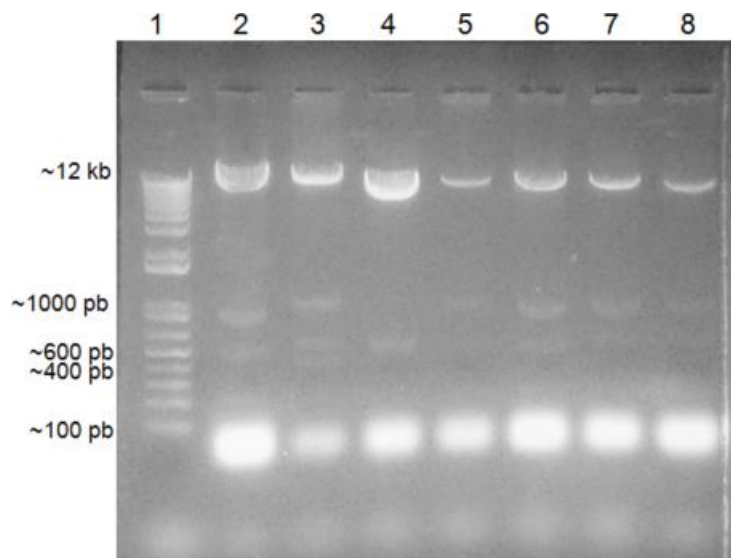


Fig 18: Digestión para la confirmación de los 2 cassettes de expresión. Las bandas a ~1000 pb corresponde al gen DGAT, las bandas a ~600 pb corresponden al gen NAT1, la banda aproximadamente 400 pb corresponde a la unión de los 2 promotores de los cassettes, solo el carril 3 presenta los 3 elementos, los demás carriles presentan construcciones incompletas.



Plásmido de expresión de la enzima DGAT2D marcado con la proteína fluorescente Wasabi

pUC-DGAT-FP: el plásmido marcado fue digerido mediante los sitios de restricción agregados para confirmar la presencia y el orden de los distintos elementos de la construcción (fig 19). Estos elementos fueron secuenciados previamente a la construcción para confirmar la secuencia que no tuvieran sustituciones de bases. Además de que fueron amplificados por PCR para confirmar la presencia de los elementos dentro de la construcción (fig 20). Como se muestra en la figura 19 y 20, tanto el gen DGAT2D como la proteína Wasabi se encuentran presentes y son contiguos dentro del casete, el promotor crRBCS2 y la señal de poliadenilación no son muy visibles debido a su tamaño.

Fig 19. Confirmación visual de los elementos del plásmido pUC-DGAT-FP.

Carril 2: promotor crRBCS2 (poco visible).
Carril 3: gen DGAT2D.
Carril 4: proteína fluorescente Wasabi.
Carril 5: al NOS poly A (no visible).
Carril 6: a la fusión DGAT+Wasabi.

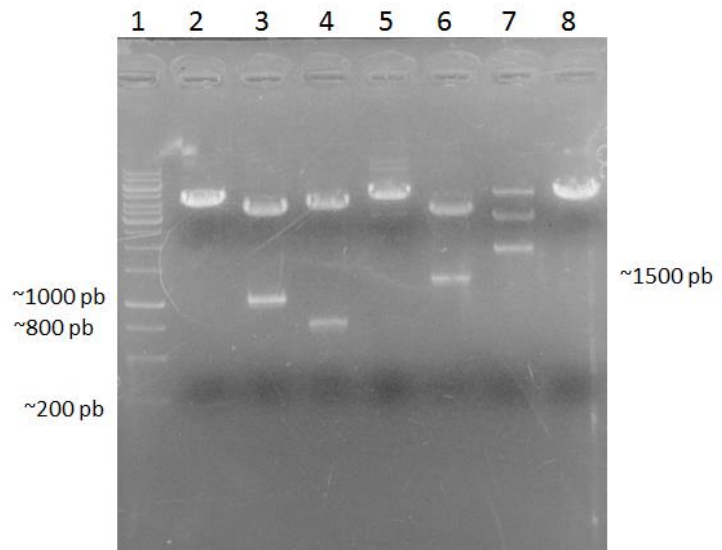
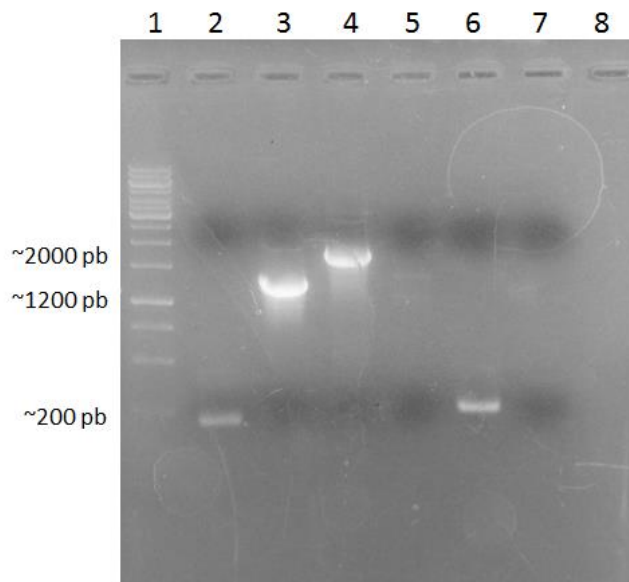


Fig 20. Amplificación por PCR de los elementos de la construcción pUC-DGAT-FP

Carril 2: promotor crRBCS2.
Carril 3: amplificación DGAT-FP.
Carril 4: amplificación FP-NOS poly A.
Carril 5: FP-NOS poly A (no salió la reacción)
Carril 6: NOS poly A.



Transformación, recuperación y cultivo de las colonias transformantes

Ajuste de las condiciones de PCR para amplificación de ADN: las condiciones de PCR fueron ajustadas empleando para ello el plasmido pUC-DGAT. Las principales variables fueron la concentración de cloruro de magnesio (1.5 a 3.5 mM) la temperatura de alineamiento (de 56°C a 62°C en pasos de 2°C) y el tiempo de alineamiento (30, 45 sec, y 1 minuto).

Las condiciones óptimas para la amplificación de la mínima cantidad de molde detectable presente en la muestra fueron: 2.5 mM de cloruro de magnesio a una temperatura de alineamiento de 62°C por 30 segundos. Bajo la cual se evita la amplificación inespecífica por parte del ADN total de *D. salina*.

Según la dilución y bajo las condiciones de PCR obtenidas, este debería amplificar una cantidad mínima de 52 copias del molde, generando un producto de PCR visible en gel (fig 21).

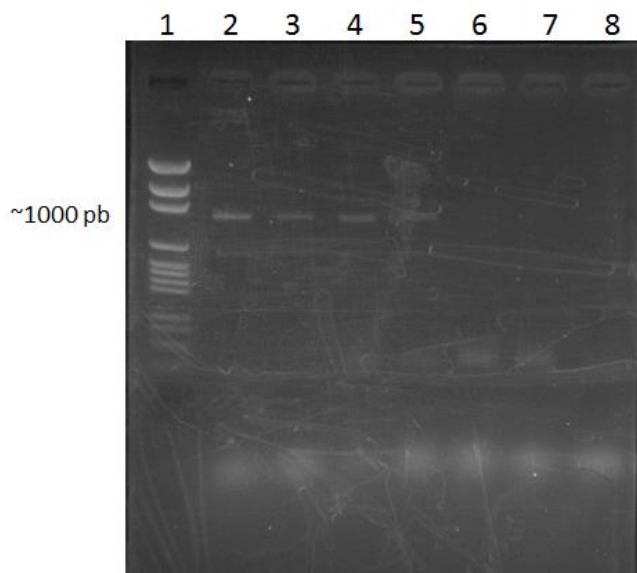


Fig 21. Pruebas de sensibilidad para la amplificación del gen DGAT2D.
1.- escalera pgem benchtop DNA ladder
2.-dilucion 1:64000.
3.-1:128 000.
4.-1:256 000.
5.-1:512 000.
6.-1:1024 000.
7.-1:2050 000.
8.-1:4100 000.

Transformación mediante *A. tumefaciens*: Se realizaron 5 transformaciones por cocultivo con *A. tumefaciens* (LBA4404), empleando medio TAP con una concentración de higromicina de 100 µg/ml. Se recuperaron aproximadamente 49 colonias tentativamente transformantes por cada millón de células inoculadas en el precultivo, sin embargo la densidad de la microalga en las cajas es muy variable y es difícil de estimar realmente si la cantidad inicial de células inoculada afecta directamente la tasa de transformación. Los controles negativos no presentan crecimiento de las microalgas.

Las colonias resistentes a higromicina comienzan a mostrar un crecimiento notable a partir de las 3 semanas de cultivo, mientras que a las 4 semanas de cultivo ya poseen un tamaño adecuado para la recuperación de la colonia, las colonias resistentes a higromicina pueden sobrevivir hasta aproximadamente 10 semanas en el medio TAP con higromicina, al resembrar las colonias en medio TAP nuevo con higromicina mediante un estriado directo del cultivo, estas mantienen la resistencia y la capacidad de crecer en el antibiótico (fig 22), formando colonias visibles después de 2 semanas de cultivo.

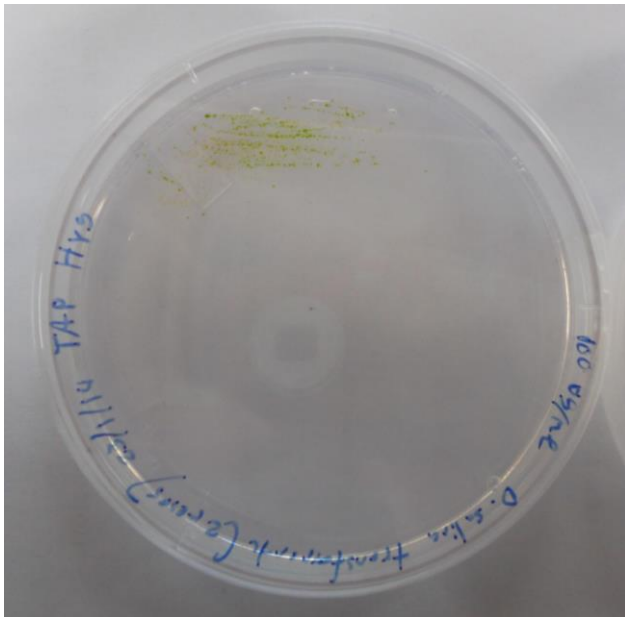


Fig 22. Reinoculo de una colonia presuntamente transformante de D salina en medio de cultivo TAP 100 mM de NaCl.

Las colonias resistentes a higromicina fueron inoculadas tanto en medio TAP con 100 µg/ml de higromicina, como en medio Johnson modificado con 200 µg/ml de higromicina. En medio TAP, las colonias tardan hasta 4 semanas en mostrar crecimiento. De 68 colonias inoculadas con medio TAP líquido, solo una se recuperó y se reinoculó en medio Johnson modificado (100 mM), de esta, se extrajo ADN para la prueba de confirmación del gen introducido. En medio Johnson modificado, se recuperaron 17 colonias, a las cuales se les realizó la correspondiente extracción de ADN para confirmar la presencia del gen de interés mediante PCR. Ninguna de las reacciones presentó resultados concluyentes.

Transformación mediante agitación con microesferas de vidrio: se realizaron 7 transformaciones mediante microesferas de vidrio, 3 con el plásmido pUC-DGAT-FP, 2 con una mezcla 1:1 de los plásmidos pUC-DGAT-FP y pCAMBIA1302, y 3 con el plásmido pCA-DGAT-37.

Los PCR realizados a partir de las extracciones de DNA total de las muestras obtenidas a partir del método de transformación de microesferas de vidrio presentaron en 2 ocasiones una banda del tamaño indicado para el gen DGAT2D (figuras 23 y 25) mientras que en la otra no se observó una amplificación clara (fig 24). Sin embargo en una de las ocasiones no pudieron obtenerse colonias transformantes de *e. coli* de la ligación de este producto de PCR mientras que en la tercera ocasión, al secuenciarse el producto de PCR y realizarse una búsqueda en BLAST⁴, la secuencia estaba emparentada en un 90% con secuencias derivadas del bacteriófago m13 y otros bacteriófagos filamentosos. Se desconoce el origen de esta secuencia, o por qué solo se presentaba en las muestras a las cuales se había agregado plásmido durante la transformación.

⁴ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

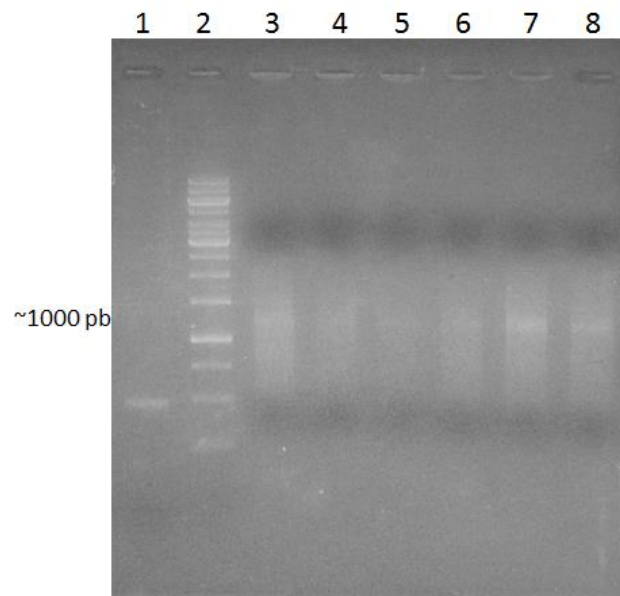


Fig 23. PCR de la extracción de ADN total de las cepas transformantes.

Carril 3: control negativo.

Carril 4: transformación FP1.

Carril 5: transformación FP2.

Carril 6: transformación FP3.

Carril 7: transformación Hyg1.

Carril 8: transformación Hyg2.

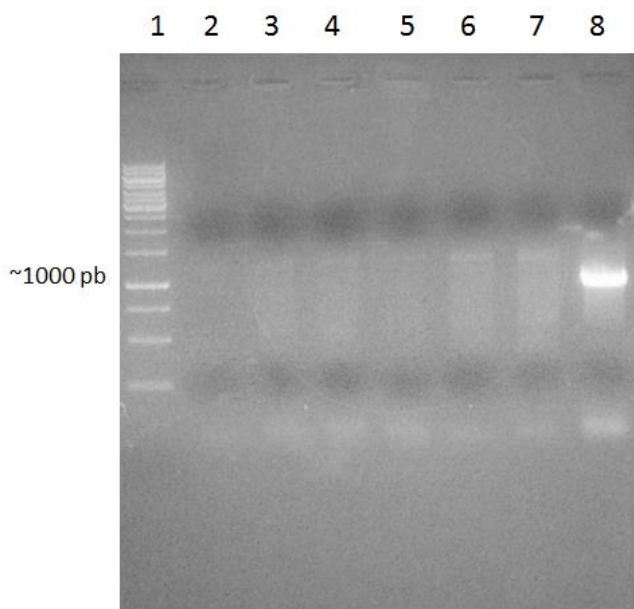


Fig 24. Segundo PCR de la extracción de ADN total de las cepas transformantes.

Carril 1: escalera

Carril 2: control negativo.

Carril 3: transformación FP1.

Carril 4: transformación FP2.

Carril 5: transformación FP3.

Carril 6: transformación Hyg1.

Carril 7: transformación Hyg2.

Carril 8: control positivo (pUC-DGAT, 1:500).

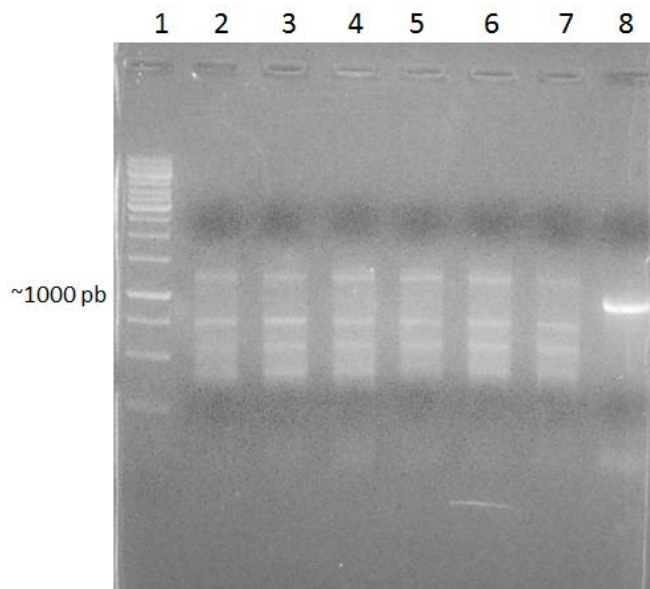


Fig 25. Tercer PCR de la extracción de ADN total de las cepas transformantes.
 Carril 1: escalera
 Carril 2: control negativo.
 Carril 3: transformación FP1.
 Carril 4: transformación FP2.
 Carril 5: transformación FP3.
 Carril 6: transformación Hyg1.
 Carril 7: transformación Hyg2.
 Carril 8: control positivo (pUC-DGAT, 1:500).

Transformación mediante biobalística: no pudieron recuperarse colonias transformantes del proceso de transformación de biobalística.

conclusiones

La selección mediante el antibiótico higromicina no permite discernir claramente entre Colonias transformantes y no transformantes.

La transformación mediante *A. tumefaciens* requiere mucho tiempo para completarse, y Dados los antecedentes, puede ser contraproducente si se busca la máxima expresión de Una proteína.

La transformación mediante microesferas de vidrio, es más rápida, sencilla y requiere poco equipo para su realización, sin embargo puede ser un poco susceptible a la contaminación si la preparación de plásmido no es preparada adecuadamente.

Se sugieren genes reporteros para la selección de las microalgas transformantes.

Bibliografía

1.-Richard Nehring. Traversing the mountaintop: world fossil fuel production to 2050 . Phil. Trans. R. Soc. B (2009) 364, 3067–3079 .

Val H. Smith, Belinda S.M. Sturm, Frank J. deNoyelles and Sharon A. Billings. The ecology of algal biodiesel Production. (2009) Elsevier. doi:[10.1016/j.tree.2009.11.007](https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.11.007).

Massyuk NP. 1966. Mass culture of the carotene containing alga Dunaliella salina Teod. Ukr. Bot. Zh. 23: 12–19.

Avinash Mishra, Bhavanath Jha.

2.-Melinda J. Griffiths & Susan T. L. Harrison . Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production . J Appl Phycol (2009) 21:493–507 .

3.-M. La Russa, C. Bogen, A. Uhmeyer, A. Doebbe, E. Filippone, O. Kruse, J.H. Mussgnug. Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* . Journal of Biotechnology 162 (2012) 13–20

Chun-Hsien Hung, Ming-Yang Ho, Kazue Kanehara, Yuki Nakamura. Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*. 2013 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.002>.

Fadi Alkayal, Rebecca L. Albion, Richard L. Tillett , Leyla T. Hathwaik, Mark S. Lemos, John C. Cushman. Expressed sequence tag (EST) profiling in hyper saline shocked *Dunaliella salina* reveals high expression of protein synthetic apparatus components. 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. doi:[10.1016/j.plantsci.2010.07.001](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.07.001)

Hui-Wen Lin, Yi-Chen Chen, Cheng-Wei Liu, Deng-Jye Yang, Shih-Yin Chen, Tien-Jye Chang Yuan-Yen Chang. Regulation of virus-induced inflammatory response by *Dunaliella salina* alga extract in macrophages. 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.026>.

K.R. Jayappriyan, R. Rajkumar, V. Venkatakrishnan, S. Nagaraj, R. Rengasamy. In vitro anticancer activity of natural β -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 3 (2013) 99–105

Nanette R. Boyle, Mark Dudley Page, Bensheng Liu, Ian K. Blaby, David Casero, Janette Kropat, Shawn J. Cokus, Anne Hong-Hermesdorf, Johnathan Shaw, Steven J. Karpowicz, Sean D. Gallaher Shannon Johnson, Christoph Benning, Matteo Pellegrini, Arthur Grossman, and Sabeeha S. Merchant. Three Acyltransferases and Nitrogen-responsive Regulator Are Implicated in Nitrogen Starvation-induced Triacylglycerol Accumulation in *Chlamydomonas*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 19, pp. 15811–15825, May 4, 2012

4.-Andersen, R. A. Algae. In: Hunter-Cevera, J. C.; Belt, A., ed. Maintaining cultures for biotechnology and industry. London: Academic Press, Inc.; 1996:29~64.

5.-Wiessner, W.; Schnepf, E.; Starr, R. C. Algae, environment and human affairs. Bristol, UK: Biopress Ltd.; 1995.

6.-Day, J. G. Conservation strategies for algae. In: Plant conservation biotechnology. Benson, E. E., ed. London: Taylor and Francis Ltd.; 1999:111-124.

7.-Chad Share Weldy and Michael Huesemann. LIPID PRODUCTION BY DUNALIELLA SALINA IN BATCH CULTURE: EFFECTS OF NITROGEN LIMITATION AND LIGHT INTENSITY . U.S. Department of Energy Journal of Undergraduate Research.

8.-Wu Y, Sun JM, Sun P H, Zhang DM. J Fisheries Chin, 2004, 28: 742

9.-Yang B, Chu Zh Sh, Jin X C, Yan F, Zeng Q R. Chin Environ Sci, 2007, 27:54

10.-Ohlrogge J, Browse J: Lipid biosynthesis. Plant Cell 1995, 7(7):957-970.

11.-Harwood JL: Fatty acid metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 1988, 39:101-138.

12.-Schnurr JA, Shockey JM, Boer G-Jd, Browse JA: Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl- coenzyme A synthetase from Arabidopsis. Plant Physiology 2002, 129(4):1700-1709.

13.-Koo AJK, Ohlrogge JB, Pollard M: On the export of fatty acids from the chloroplast. Journal of Biological Chemistry 2004, 279(16):16101-16110.

14.-Guschina IA, Harwood JL: Complex lipid biosynthesis and its manipulation in plants, pp. 253-279. In Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses. Edited by: Ranalli P. New York, NY: Springer; 2007.

15.-Kennedy EP: Biosynthesis of Complex Lipids. Federation Proceedings of the American Society of

Experimental Biology 1961, 20(4):934-940.

16.-Weiss SB, Kennedy EP, Kiyasu JY. The enzymatic synthesis of triglycerides. The Journal of biological chemistry 1960;235:40.

17.-Li R, Yu K, Hildebrand DF. DGAT1, DGAT2 and PDAT expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. Lipids 2010;45:145–57.

18.-Weiss SB, Kennedy EP. The enzymatic synthesis of triglycerides. J Am Chem Soc 1956;78:3550.

19.-Lardizabal KD, Mai JT, Wagner NW, Wyrick A, Voelker T, Hawkins DJ. DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. J Biol Chem 2001;276:38862–9.

20.-Turchetto-Zolet AC, Maraschin FS, de Moraes GL, Cagliari A, Andrade CM, Margis-Pinheiro M, et al. Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. BMC Evol Biol 2011;11:263.

21.-Cao H, Chapital DC, Howard Jr OD, Deterding LJ, Mason CB, Shockey JM, et al. Expression and purification of recombinant tung tree diacylglycerol acyltransferase 2. Appl Microbiol Biotechnol 2012.

22.-Weselake RJ, Shah S, Tang M, Quant PA, Snyder CL, Furukawa-Stoffer TL, et al. Metabolic control analysis is helpful for informed genetic manipulation of oilseed rape (*Brassica napus*) to increase seed oil content. J Exp Bot 2008;59:3543–9.

23.-Lardizabal K, Effertz R, Levering C, Mai J, Pedroso MC, Jury T, et al. Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean. Plant Physiol 2008;148:89–96.

24.-Oakes J, Brackenridge D, Colletti R, Daley M, Hawkins DJ, Xiong H, et al. Expression of fungal diacylglycerol acyltransferase2 genes to increase kernel oil in maize. Plant Physiol 2011;155:1146–57.

25.-Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, et al. Seed-specific over- expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. Plant Physiol 2001;126:861–74.

26.-Wei-Luen Yu¹, William Ansari², Nathan G Schoepp¹, Michael J Hannon², Stephen P Mayfield^{2,3} and Michael D Burkart^{1,3*}; Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol

production in microalgae; Microbial Cell Factories 2011, 10:91

27.-Cahoon EB, Shah S, Shanklin J, Browse J: A determinant of substrate specificity predicted from the acyl-acyl carrier protein desaturase of developing cat's claw seed. Plant Physiology 1998, 117(2):593-598.

28.-Knothe G, Dunn RO: Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals. Journal of the American Oil Chemists' Society 2003, 80(10):1021-1026.

29.-Davies HM: Medium chain acyl-ACP hydrolysis activities of developing oilseeds. Phytochemistry 1993, 33(6):1353-1356.

30.-Hawkins R L, and Nakamura M. Expression of human growth hormone by the eukariotic alga, 1999 chlorella, curr. Microbiol 38:335-341.

30.-Shuying Feng, Lexun Xue, Hongtao Liu, Pengju Lu . Improvement of efficiency of genetic transformation for Dunaliella salina by glass beads method . Mol Biol Rep (2009) 36:1433–1439 .

31.-T L Walker, D K Becker, C Collet. Characterisation of the dunaliella tertiolecta RbcS genes and their promoter activity in Chlamydomonas reinhardtii. Plant cell rep (2005) 23:727-735.

32.-Lumbreras V, Stevens D R, Purton S. Efficient foreign gene expression in Chlamydomonas reinhardtii mediated by an endogenous intron. 1998, plant J. 14:441-447.