

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**



**CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA EXPRESAR LA PROTEÍNA  
HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1) 2009 EN EL  
CLOROPLASTO DE *Dunaliella salina***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**CAROLINA MENDOZA DAMIÁN**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. NOVIEMBRE DE 2012

## RESUMEN

### **“Construcción de un vector para expresar la proteína hemaglutinina del virus de la influenza A (H1N1) 2009 en el cloroplasto de *Dunaliella salina*”**

Debido a la aparición de nuevas mutantes del virus de la influenza, tal como la influenza tipo A H1N1 2009, es necesario producir nuevas vacunas que provean inmunidad, que se produzcan a bajo costo y con gran rapidez. En los últimos años, se ha utilizado el sistema de expresión de proteínas recombinantes en microalgas, que pueden servir en la creación de nuevas vacunas. La microalga marina *Dunaliella salina*, ya que es de fácil cultivo y manipulación, se reproduce con rapidez y es capaz de realizar modificaciones post-traduccionales, características que la hacen atractiva por encima de otros sistemas como bacterias, levaduras, células de mamífero o plantas. Al ser halotolerante, se reduce el riesgo de contaminación con otros microorganismos, además, al carecer de pared celular rígida, hace que sea fácil su manipulación genética. La microalga *D. salina*, se aisló de las lagunas de San Quintín, se estandarizó su cultivo en laboratorio y se identificó molecularmente. Se sintetizó la secuencia de la proteína hemaglutinina (HA) de H1N1 (GenBank A/Mexico/4486/2009(H1N1) de 1754pb, optimizando sus codones para expresión en cloroplasto. Se sintetizó además, el promotor y extremo 5' UTR del gen *atpA* y el extremo 3'UTR del gen *psbA* y se transformaron temporalmente en el vector pUC57. Con primers específicos se amplificaron sitios de recombinación homólogos a *D. salina*, que comprenden los genes *psaA* y *psbA*, los cuales se ligaron al vector, también se realizó una mutación puntual en el gen *psbA* (proteína D1) para obtener resistencia a atrazina. Se confirmó por diferentes pruebas (PCR, enzimas de restricción y secuenciación), que cada parte de la construcción es la secuencia esperada y que se encuentra en el correcto marco de lectura. Para la selección de microalgas transformadas, se estandarizó la concentración efectiva de atrazina de 400µg/L en medio de cultivo Johnson Modificado con 1.5M de NaCl.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA EXPRESAR LA PROTEÍNA  
HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A (H1N1) 2009 EN EL  
CLOROPLASTO DE *Dunaliella salina***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

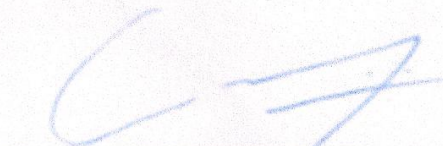
PRESENTA

**CAROLINA MENDOZA DAMIÁN**

Aprobada por:



Dr. José Luis Stephano Hornedo  
Director de tesis



Dr. José Manuel Aguilar Yáñez  
Sinodal



Dra. Ma. del Refugio González Esparza  
Sinodal

### Agradecimientos institucionales

Gracias a mi *alma matér* (UABC), al **Posgrado de Ecología Molecular y Biotecnología** (a todos los maestros y a la coordinación, especialmente a **Ivone Giffard y Angélica**), a **CONACyT** por la beca No. 237546, otorgada durante mis estudios de posgrado y al **Instituto de Ciencia y Tecnología del D.F. (ICyT)**, por creer y apoyar al proyecto (No. 51/2009) desde su inicio.

### Agradecimientos personales

La pequeña aportación que se pueda lograr con una tesis, es sólo una parte de la gran aportación que se hace a la vida de un estudiante de maestría. Se te abre un mundo de nuevos conocimientos, que a su vez hacen que te conviertas en especialista de un pequeño campo de conocimiento. Por eso quiero agradecer a todas las personas que me enseñaron, que contribuyeron en algo y sobre todo, que hicieron pasajero este recorrido.

Primero, al laboratorio **Meredith Gould**, especialmente al profesor **José Luis Stephano**, por haberme dado la oportunidad de participar en el comienzo de un nuevo e importante proyecto. A mis compañeros y amigos, que además también fueron maestros, gracias por su paciencia: **César Ortiz** (gracias por las revisiones), **José Echanove**, **Sharon Silva**, **Alejandro Carballo** (gracias por los artículos), **Alma Sánchez** (el laboratorio sin ti, no es igual), **Osmín Torres**, **Raymundo Aguas**, **Ibrahim Guzmán**, **Mario Yáñez**, **Julio Valencia**, **Ricardo Valencia**, **Alejandra Méndez** y a todos los integrantes del laboratorio, porque cada uno fue muy importante.

A mis sinodales, la maestra **Refugio González** y **Manuel Aguilar**, por haber sido tan pacientes, por darme consejos y ayudarme con la revisión de mi tesis. ¡Muchas gracias!.

A mis amigos y compañeros de posgrado que a lo largo de este camino han estado conmigo, dándome consejos y haciéndome feliz. **Aimée Ferrá**, **Diego Delgado** (gracias por las revisiones), **Sebastián Gómez** (gracias por todos los artículos que enviaste), **Leonardo de la Rosa**, **Paúl Marrón**, **Ariana Román**, **Jeanneth Pablo**, **Luvia García**, **Itzel Serrano**, **Alejandro Plata**, **Dora Cristino**, **Rosy López**, **Isadora Clark**, **Jovani Catalán**, **Jaime García** y tú (si se me olvidó mencionarte), cada uno sabe que es muy importante en mi vida.

Por último y más importante, quiero agradecer infinitamente a mi familia. A mis hermosos padres **Graciela Damián** y **Manuel Mendoza**, que no ha pasado ni un solo día durante toda mi vida, que no se pregunten cómo estoy. El amor es recíproco. ¡Gracias por todo!. A mis hermanas **Mariela Mendoza** y **Ariana Mendoza**, porque yo sé que me quieren. A mi abuela **Olga Borja**, mi consentida, que ya no está conmigo, pero que siempre será uno de los más grandes amores de mi vida.

A mi amor, **Roberto GutiErrez**, porque no hay nadie más que haya sentido esta tesis tanto como tú. Te adoro. ¡Gracias por TODO!.



**SIGLAS Y ABREVIATURAS**

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**ATR:** Atrazina o 2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine

**BC:** Baja California

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CaMV35S:** promotor del virus del mosaico de la coliflor

**CTAB:** Bromuro de cetiltrimetilamonio

**Ds.SQ DNA:** DNA de *Dunaliella salina* San Quintín

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**GUS:**  $\beta$ -glucuronidasa

**HEPES:** Ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-Pireraciril-Etanosulfónico

**HA:** Hemaglutinina

**JM:** Johnson Modificado

**Kb:** kilobases

**kDa:** kiloDalton

**mmHg:** milímetro de mercurio

**mtDNA:** DNA mitocondrial

**NA:** Neuraminidasa

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ptDNA:** DNA plastídico

**PEG:** Polietilenglicol

**pb:** pares de bases

**psi:** libra por pulgada cuadrada

**rRNA:** Ácido ribonucleico ribosómico

**tDNA:** DNA genómico o DNA total

**tRNA:** RNA de transferencia

**UTR:** Región no traducible

**SQ:** San Quintín

## ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>APROBACIÓN DE LA TESIS</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>SIGLAS Y ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	6
<b>HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	13
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	14
<b>METODOLOGÍA</b> .....	15
<b>1. Descripción del material biológico</b> .....	
a) Taxonomía.....	
b) Características morfológicas.....	
c) Reproducción.....	
d) Características fisicoquímicas.....	
e) Características de los genomas.....	
<b>2. Aislamiento y cultivo de la microalga <i>Dunaliella</i> de San Quintín, B.C.</b> ....	
<b>3. Extracción de DNA de microalga</b> .....	
3.1 Aislamiento de cloroplastos por gradiente de Percoll (20/45/65%).....	
3.2 Aislamiento de cloroplastos por rompimiento con sucrosa y Percoll (60/40/20%).....	
3.3 Extracción de DNA por fenol: cloroformo.....	
<b>4. Identificación molecular de <i>Dunaliella</i> de San Quintín B. C.</b> .....	
4.1 Amplificación y secuenciación de la región 18S DNAr de <i>Dunaliella</i> .....	
<b>5. Síntesis del gen de la proteína hemaglutinina (HA)</b> .....	
<b>6. Síntesis del promotor <i>atpA</i> y UTRs</b> .....	
<b>7. Ligación de HA con promotor <i>atpA</i> y UTRs</b> .....	
7.1 Clonación del vector pUC-57-HA en DH5 $\alpha$ .....	
7.2 Ligación de HA al vector pUC57- <i>atpA</i> .....	
<b>8. Obtención de secuencias homólogas para recombinación</b> .....	
8.1 Amplificación de la secuencia homóloga <i>psbA</i> .....	
8.2 Amplificación de la secuencia homóloga <i>psaA-psbA</i> .....	
<b>9. Mutación puntual en el gen <i>psbA</i> para resistencia a atrazina</b> .....	

10. Ligación de secuencias homólogas al vector puc57-*atpA*-HA:  
    *Construcción del cassette de expresión de HA*.....

11. Ensayo de sensibilidad de *Dunaliella salina* a atrazina.....

12. Transformación con biobalística.....

RESULTADOS.....

DISCUSIÓN.....

CONCLUSIONES.....

LITERATURA CITADA.....

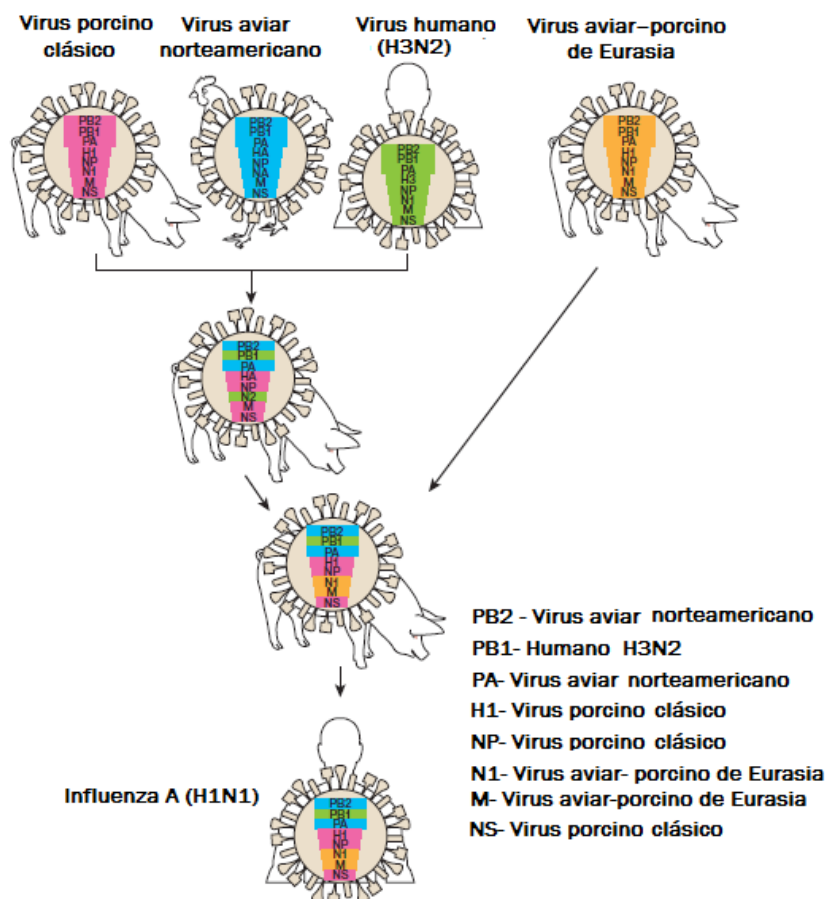
ANEXOS.....

## INTRODUCCIÓN

Los virus de influenza representan una importante amenaza en la salud pública a nivel global. Los virus de influenza tipo A, comúnmente causan epidemias estacionales que infectan anualmente alrededor del 5 al 15% de la población mundial. Durante el siglo pasado hubo tres grandes pandemias de influenza A, en 1918 la cepa H1N1 se empezó a esparcir en España, en 1957 en Asia se presentó la cepa H2N2 y en 1968 la H3N2 en Hong Kong, las cuales mataron entre 50 a 100 millones de personas alrededor del mundo. Cada uno de estos virus se derivó, al menos en parte, de un virus de influenza aviar por transmisión entre especies o intercambio de material genético entre virus aviares y humanos (Ekiert *et al*, 2009; Medina *et al*, 2010).

En México, entre febrero y abril de 2009, surgió un brote de una nueva variante de la cepa A (H1N1) y de ahí se distribuyó al resto del mundo, anunciándose una nueva pandemia que se distribuyó a más de 160 países. Esta nueva variante del virus, fue resultado de un reordenamiento cuádruple de segmentos de genoma de influenza aviar, humana y de dos linajes de influenza porcina (Fig.1). (Schnitzler, 2009). (Neumann *et al*, 2009).

En agosto de 2010, la OMS anunció el fin de la pandemia y para entonces ya había 18,500 muertes confirmadas en todo el mundo, pero se estima que esa sólo fue una fracción del número real de muertes, pues hubo otras 201,200 muertes ocasionadas por complicaciones respiratorias y otras 83,300 asociadas con enfermedades cardiovasculares, ambas enfermedades asociadas con el virus A (H1N1). Estas estimaciones son 15 veces más altas que las reportadas por los laboratorios (Dawood *et al*, 2012). Sólo en México, hasta agosto de 2012, el número de casos confirmados ascendió a 76,566 con más de 1,300 defunciones (WHO).



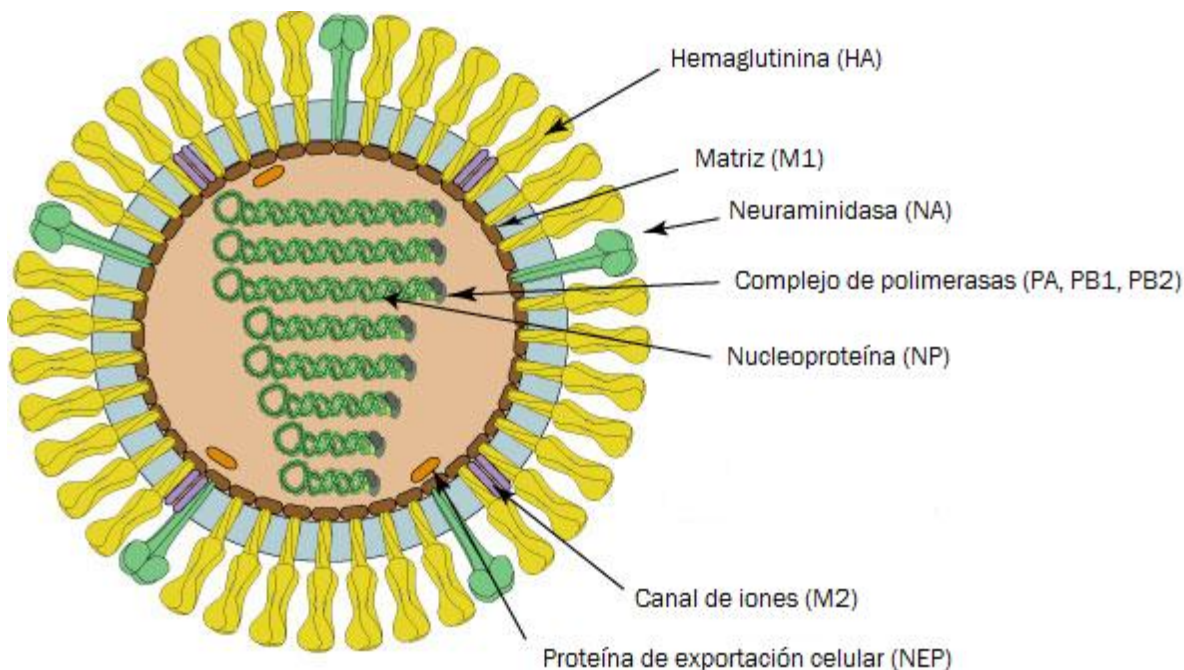
**Fig. 1.** Génesis del origen porcino virus de la gripe A/H1N1.

Fuente: Neumann G *et al*, 2009

Los virus de influenza A, pueden tener hasta 144 combinaciones y logran infectar tanto a humanos como a otras especies de mamíferos y aves, las cuales son el principal reservorio. Estos virus, pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, presentan un genoma de 8 segmentos de RNA de hebra sencilla de sentido negativo. La replicación y transcripción de sus RNAs, se lleva a cabo por 3 subunidades de polimerasas (PB1, PB2, PA) y la nucleoproteína (NP). Codifican 11 proteínas, incluyendo las glicoproteínas de superficie Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA), de la primera existen 16 subtipos y de la segunda 9 subtipos (Fig. 2).

La proteína HA es la que lleva a cabo la fusión de la membrana del virus con la membrana de la célula huésped y la NA facilita la liberación de los virus progenie (viriones), que se producen dentro de las células infectadas. La HA a su vez, se une a un receptor ácido siálico y cada organismo presenta diferentes tipos de receptores. La HA que infecta a humanos se une a células del tracto respiratorio que

tienen receptores tipo  $\alpha 2-6$  y la HA aviar tiene mayor afinidad a receptores  $\alpha 2-3$ , mientras que las células epiteliales de los cerdos tienen ambos tipos de receptores ( $\alpha 2-6$  y  $\alpha 2-3$ ) y pueden ser infectadas por ambos tipos de virus (Rodríguez-Valero *et al*, 2001; Schnitzler, 2009; Neumann *et al*, 2009).



**Fig. 2. Virus de influenza A.** Muestra las dos glicoproteínas de superficie (HA y NA). El genoma es compuesto de 8 segmentos de RNA de una hebra que interactúan con la nucleoproteína y los componentes del complejo de polimerasas (PB2, PB1 y PA)

Fuente: ViralZone 2010. Swiss Institute Bioinformatics

Para el tratamiento de influenza, se utilizan algunas moléculas, como las inhibidoras de Neuraminidasa: oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza), que impiden la liberación de los nuevos viriones y la amantadina que interfiere con la actividad del canal de protones (M2). Sin embargo, el uso excesivo de éstos, contribuye a que los virus resistentes se propaguen más rápido en todo el mundo (Ekiert *et al*, 2009). Existen también vacunas antigripales trivalentes que provocan una potente respuesta de anticuerpos neutralizantes en contra de las cepas que contiene la vacuna y otras estrechamente relacionadas, pero raramente protegen contra las cepas más divergentes dentro de un subtipo (Ekiert *et al*, 2009).

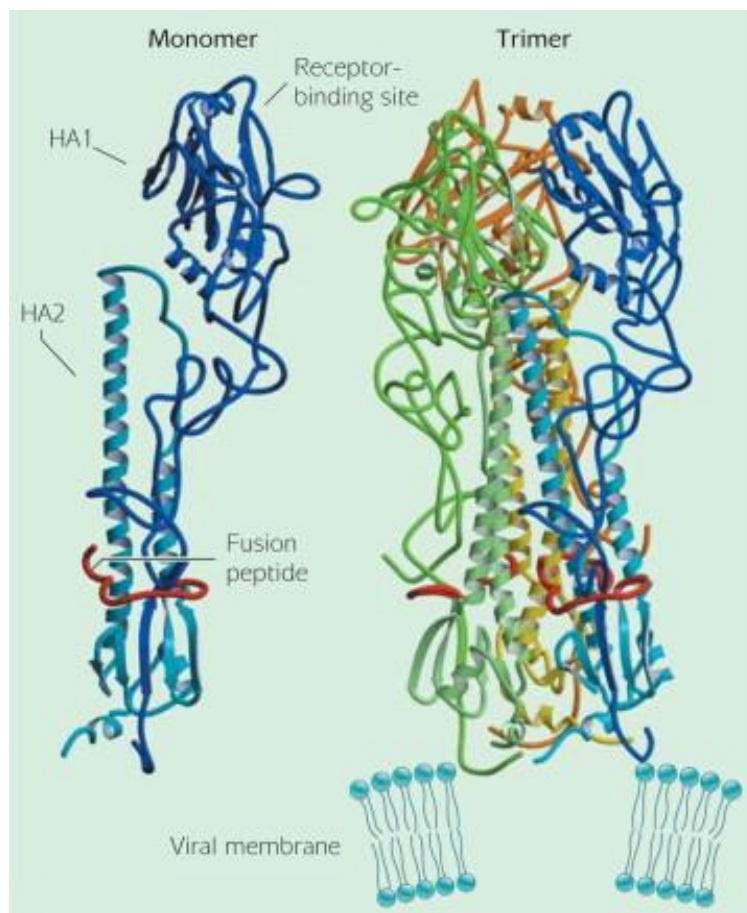
En 2009, la mayoría de las vacunas comerciales de H1N1 disponibles, eran producidas en huevos de gallina. El inconveniente de éstas, es su baja disponibilidad y el riesgo de posibles de reacciones alérgicas, además, el tiempo de obtención de la nueva vacuna es de alrededor de 6 a 8 meses. Por otro

lado, las vacunas derivadas de cultivos de células como bacterias, tardan más tiempo en obtenerse y por lo mismo, no satisfacen las demandas de vacunación. Asimismo, uno de los detalles importantes es que se requiere que la proteína HA esté glicosilada, lo cual no se logra con la expresión en bacterias (Bommakanti *et al*, 2010; Athmaram *et al*, 2011).

Debido a lo anterior, nuestro país se vio en la repentina necesidad de crear alternativas de creación de vacunas para neutralizar a la nueva variante de virus H1N1. Se requería que la vacuna pudiera obtenerse en grandes cantidades en un corto tiempo y a bajo costo. Que además, el sistema de producción fuera fácil de manipular y escalar. Dentro de las opciones, están las vacunas basadas en subunidades de proteínas recombinantes, pues éstas ofrecen una gran alternativa a las vacunas convencionales, ya que no hay necesidad de utilizar virus vivos o atenuados, ni grandes cantidades de huevo. Además, la secuencia del gen HA se puede obtener en un corto tiempo una vez aislado el virus (Athmaram *et al*, 2011).

La proteína HA se ha investigado ampliamente como candidata para usarse de forma independiente en una vacuna, pues es el blanco más importante de los anticuerpos contra el virus de influenza. Esta proteína es la más abundante en la cápside del virus y es altamente inmunogénica. Es sintetizada como un precursor (HA0) que después se trimeriza en el retículo endoplásmico, se transporta a la superficie celular por el aparato de Golgi y mediante proteasas celulares, se separa en las subunidades HA1 y HA2, a partir de esta ruptura se convierte en una proteína activa (Fig. 3). La subunidad HA1 es el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes que inhiben la unión del virus a las células diana (Yoshida *et al*, 2009; Bommakanti *et al*, 2010; Athmaram *et al*, 2011).

Por lo anterior, se planteó expresar la proteína HA, para utilizarla como antígeno en la creación de una nueva vacuna.



**Fig 3. Estructura tridimensional de la Hemaglutinina (HA).**

Fuente: Weis *et al.* Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. *J Molec Biol* 1990; 212:737-761

## ANTECEDENTES

Existen varios sistemas de expresión de proteínas recombinantes que ofrecen ventajas y desventajas en cuanto a rendimiento de proteína, manipulación y costo de operación. Las células de mamífero son un sistema de producción que resulta costoso por los medios de cultivo y cuidados que requieren, un ejemplo de éstas son las células CHO en donde se producen la mayoría de las proteínas terapéuticas (Manuell *et al* 2007). Las bacterias y las levaduras tienen un costo más viable, pero tienen la desventaja de que no pueden plegar proteínas foráneas eficientemente, no realizan otras modificaciones post-traduccionales, como glicosilación y tienen bajo rendimiento en expresión de proteínas eucariotas de gran tamaño (Athmaram *et al*, 2011).

Las proteínas producidas en plantas tienen la ventaja de que se consideran seguras, pues tienen poco riesgo de contaminación por virus, priones o endotoxinas de bacterias. Las células vegetales pueden producir proteínas complejas (ej. anticuerpos), la desventaja que presentan, es que para obtener cantidades utilizables de proteína se requieren varios años desde su transformación inicial (Manuell *et al.*, 2007).

Recientemente se han logrado expresar proteínas en algunos de los sistemas antes mencionados, las cuales son potenciales para usarse como vacuna contra la influenza A H1N1 2009. En *Escherichia coli* se expresó una proteína de 25kDa que comprende una región conservada del dominio de HA1 de la HA, que se une específicamente a los anticuerpos del suero de pacientes infectados y se comprobó *in vivo* (hurones) que la proteína expresada proporciona protección contra el virus. En este mismo estudio, se demostró que no necesariamente se requiere que la HA se encuentre glicosilada para que produzca inmunidad (Aguilar-Yáñez *et al*, 2010). También en *E. coli*, se expresaron dos formas de HA derivadas del virus H1N1/A/California/07/2009, ambas proteínas indujeron anticuerpos neutralizantes en hurones y tuvieron un rendimiento de proteína de 40mg/L y 0.4-0.8mg/L (Khurana *et al*, 2010).

En *Pichia pastoris*, se logró expresar el gen completo de HA como proteína soluble, la cual indujo anticuerpos neutralizantes en conejos y ratones (Athmaram *et al*, 2011). En *Picha methanolica*, se expresaron los genes completos de las proteínas HA y NA y por western blot y ELISA se comprobó que las proteínas recombinantes mostraban antigenicidad (Zhang Y, 2010). En plantas como *Nicotiana*

*benthamiana*, también se han producido grandes cantidades de HA (H1N1(A/California/04/09) y H5N1 logrando neutralización de anticuerpos (Shoji *et al*, 2011).

### **Expresión en microalgas**

Las microalgas, son un sistema de expresión de proteínas recombinantes de reciente investigación, que presenta muchas ventajas sobre los otros sistemas de expresión. Muchas especies de microalgas son fuente natural de productos de interés comercial y por muchos años han sido explotadas para aplicaciones biotecnológicas. El poder modificarlas genéticamente para que expresen genes heterólogos, abre las puertas a la producción de nuevos productos seguros y de bajo costo de interés en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica, como es el caso de vacunas (Fletcher *et al*, 2007). Hay evidencia de expresión de proteínas de mamífero complejas tales como hormonas o anticuerpos, ya que las microalgas presentan la maquinaria necesaria para plegarlas (Harris, 2001; Geng *et al*, 2003; Mayfield *et al*, 2003).

Las microalgas tienen un cultivo relativamente sencillo, crecen fotosintéticamente utilizando la luz del sol como fuente de energía y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Pueden reproducirse rápidamente y doblar su biomasa en poco tiempo. El sistema de microalgas comparado con otros sistemas, como las plantas vasculares, reduce drásticamente el tiempo que se emplea desde una transformación inicial hasta la obtención de las proteínas y es posible conseguir líneas transgénicas estables. Al cultivarse en sistemas cerrados se evita la liberación de microalgas modificadas y éstas se encuentran libres de patógenos humanos o endotoxinas (Manuell *et al.*, 2007).

### **Métodos de transformación**

Los métodos utilizados para transformar microalgas son principalmente: bombardeo de partículas (biobalística), electroporación, microinyección, transformación de protoplastos (PEG), agitación con esferas de vidrio, fibras de silicón y por medio de *Agrobacterium tumefaciens*. Entre éstos métodos, los más utilizados son biobalística y electroporación (Geng *et al*, 2003). Algunos métodos tienen sus inconvenientes, por ejemplo, para que la transformación con esferas de vidrio sea exitosa, se requieren

microalgas mutantes con la pared celular debilitada o que se hagan pasar por un proceso de degradación enzimática de la pared celular. La transformación por fibras de silicón, también requiere que se remueva la pared celular, además de que las fibras son difíciles de conseguir y puede ser peligroso para la salud (Coll, 2006)

El desarrollo de los métodos de transformación en microalgas, así como otras herramientas moleculares, se ha centrado principalmente en *Chlamydomonas reinhardtii*, pues fue la primer microalga transformada establemente tanto en núcleo como cloroplasto y hasta la fecha, sigue siendo una de las especies más estudiadas (El-Sheekh, 2000; León-Bañares *et al*, 2004; Purton, 2007). Algunos ejemplos de expresión en *C. reinhardtii*, es la expresión de la proteína M-SAA (suero bovino amiloide asociado a las glándulas mamarias) con rendimiento de 5% de proteína total (Manuell *et al*, 2007) y la expresión de anticuerpos monoclonales humanos (mAbs) (Mayfield y Franklin, 2005).

También existen muchos ejemplos de transformaciones estables en núcleo y cloroplasto en otras especies de microalgas. *Chlorella vulgaris*, ha sido transformada por electroporación para obtener resistencia a higromicina (Chow y Tung, 1999) y para expresar el gen de luciferasa con el promotor CaMV 35S (Jarvis y Brown, 1991), *Chlorella ellipsoidea* se transformó con electroporación y se logró expresión de la hormona de crecimiento del pez *Paralichthys olivaceus* (Dae-Hyun *et al*, 2002). La primera microalga roja transformada en cloroplasto, fue *Porphyridium* sp., que mediante biobalística expresó del gen AHAS, que confiere resistencia al herbicida sulfometuron metil (Lapidot *et al*, 2002). En 2005, se expresó establemente el gen de resistencia a bleomicina (*ble*) en *Dunaliella tertiolecta* (Walker *et al*, 2005) mediante electroporación.

Además de las microalgas mencionadas, existen otras transformaciones que se lograron transitoriamente como en *Lotharella amoebiformis*, *Ulva pertusa* y el alga roja *Cyanidioschyzon merolae* (Specht *et al*, 2010).

### **Biobalística**

Este método, también llamado bombardeo de micropartículas, se puede utilizar para

transformación de núcleo, mitocondria y cloroplasto. Para cloroplasto, es el método más eficiente y seguro para expresar transitoriamente y establemente genes heterólogos, tanto en macroalgas como microalgas (Tan *et al*, 2005; Fletcher *et al*, 2007).

El equipo más utilizado es el PSD-1000/He (Bio-Rad), que utiliza helio a alta presión, el cual acelera las micropartículas de oro o tungsteno (tamaño de 0.4 a 1.7 $\mu$ m) recubiertas de DNA a una distancia de 500 m s<sup>-1</sup> y dispara contra monocapas de microalgas inmovilizadas (en placas de agar o filtros) con presiones de vacío de 710-740 mmHg. La velocidad depende de la presión de helio (6-106 bars) y la distancia puede ser de 3 a 15 cm. (Coll *et al*, 2006). La energía cinética de las partículas es suficiente para penetrar la pared celular, la membrana plasmática y las dos membranas que recubren al cloroplasto. Dispersando así, múltiples copias del DNA transformante (Heifetz, 2000). Las micropartículas que más se utilizan son las de tungsteno, pues son más baratas, aunque tienen la desventaja de tener forma más irregular y existe la posibilidad de que degraden el DNA transformante. En general, el número de transformantes obtenidas en diversas especies de microalgas varían de 0.1 a 100 millones de microalgas transformadas (Coll *et al*, 2006). Las tasas de transformación obtenidas con otros métodos como la agitación con esferas o electroporación, son mucho más bajas que las obtenidas con biobalística (Purton, 2007).

### ***Dunaliella salina***

Utilizar a *Dunaliella salina* como sistema de expresión de proteínas heterólogas, ofrece una atractiva alternativa frente a los sistemas de cultivos tradicionales y a otras especies de microalgas.

Esta microalga, tiene una gran capacidad de adaptación a diferentes salinidades que van desde menos de 0.5 mol L<sup>-1</sup> hasta soluciones salinas saturadas, lo cual hace posible su cultivarla de forma intensiva, pues es difícil que un cultivo se contamine con otros microorganismos y/o especies competidoras. Al carecer de una pared celular rígida, facilita la introducción de genes a la célula (Geng *et al*, 2004). Se logra cultivar fácil y rápidamente en medios de cultivo baratos que contengan sales simples, por lo tanto, el costo de producción es muy bajo en este organismo. Estas y otras ventajas hacen que *D. salina* pueda

ser utilizado como un biorreactor potencial para la producción a gran escala de moléculas de interés comercial como hormonas, vacunas, anticuerpos monoclonales y factores de crecimiento (Tan *et al*, 2005; Feng *et al.*, 2008).

Otra de las razones para utilizar esta microalga se debe a que se cuenta con herramientas genéticas disponibles para la expresión de genes heterólogos ya que promotores para núcleo como cloroplasto, se encuentran ya caracterizados. Asimismo, el genoma de sus organelos (cloroplasto, núcleo y mitocondria) encuentra disponible en las bases de datos (Smith *et al*, 2010).

La capacidad de expresión de *D. salina* ha sido probada en varios estudios. En 2003, Degui Geng y su equipo, expresaron el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) con electroporación, esta expresión se mantuvo por al menos 60 generaciones. En 2005, se expresó transitoriamente en núcleo, el gen de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) con el promotor CamV35S por medio de biobalística (Tan *et al*, 2005). En 2006, Yurong Chai y colaboradores, expresaron con éxito el núcleo de la microalga con el gen de resistencia al herbicida bialafos (*bar*) usando el promotor de la anhidrasa carbónica (CAH) por medio de biobalística. Shuying Feng en 2009, logró mediante transformación con esferas de vidrio, la expresión en núcleo de GUS y obtuvo una eficiencia de transformación de  $10^2$  transformantes/ $\mu$ g de DNA.

### **Expresión en cloroplasto**

El cloroplasto de las microalgas contiene su propio sistema genético con un genoma de aproximadamente 100 a 250 genes, la mayoría de estos genes codifican componentes del aparato de transcripción y traducción del cloroplasto. Dentro del cloroplasto se llevan a cabo importantes rutas biosintéticas y sirve como organelo de almacenamiento para proteínas solubles y de membrana, así como de otras macromoléculas como clorofilas, carotenoides, almidón y lípidos (León-Bañares *et al*, 2004).

La transformación de cloroplastos en microalgas ha sido utilizada principalmente para conocer su genética, para caracterizar promotores, conocer la estabilidad del mRNA, entender funciones fotosintéticas y evaluar los requerimientos para la expresión de genes foráneos (El-Sheekh, 2000).

La primera transformación en cloroplasto se llevó a cabo en 1988 en *C. reinhardtii* con

biobalística por medio de recombinación con secuencias de DNA homólogas (Purton, 2007).

La expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos es más atractiva que en núcleo, ya que el cloroplasto tiene más de un centenar de copias de genes que codifican componentes del aparato fotosintético expresados a muy alto nivel. En estudios de transformación en cloroplasto, se ha demostrado que la integración del DNA ocurre casi exclusivamente por recombinación homóloga, lo que facilita la precisa inserción de genes foráneos al genoma y se evita el problema de “efecto de posición” relacionado con la inserción al azar de genes en el núcleo (Fletcher *et al*, 2007).

Los transgenes expresados en cloroplasto no tienen problemas de silenciamiento transcripcional y post-transcripcional, que se han observado en núcleo. Al tener herencia uniparental de los genes del cloroplasto en varias especies, facilita la estabilidad de los transgenes (Fletcher *et al*, 2007).

Para que se integren los transgenes en el cloroplasto, estos deben ser dirigidos a cualquier región del genoma que contenga “sitios silenciosos”, la integración en distintas regiones del genoma resulta en diferencias en el número de copias de genes. Para una transformación estable, se requiere que todas las copias del genoma se conviertan a la forma recombinante (Mayfield y Franklin, 2005).

Se ha demostrado que para obtener altos niveles de expresión de proteína en cloroplasto, la secuencia del gen a expresar se debe optimizar con la preferencia de codones para la especie, se deben utilizar promotores endógenos o promotores de especies muy cercanas y ser flanqueados con regiones no codificantes (UTRs) (Franklin *et al.*, 2002; Geng *et al*, 2003; Mayfield y Schultz, 2004; Surzycki *et al*, 2009). Para este trabajo se eligió el promotor *atpA* con su 5'UTR y el 3'UTR del gen *psbA*, pues se sabe que esta combinación produce altos niveles de acumulación de proteína (Fletcher, 2007).

### **Selección con herbicida**

La selección de transformantes es uno de los procedimientos clave en el establecimiento de un sistema de transformación (Tan *et al*, 2005).

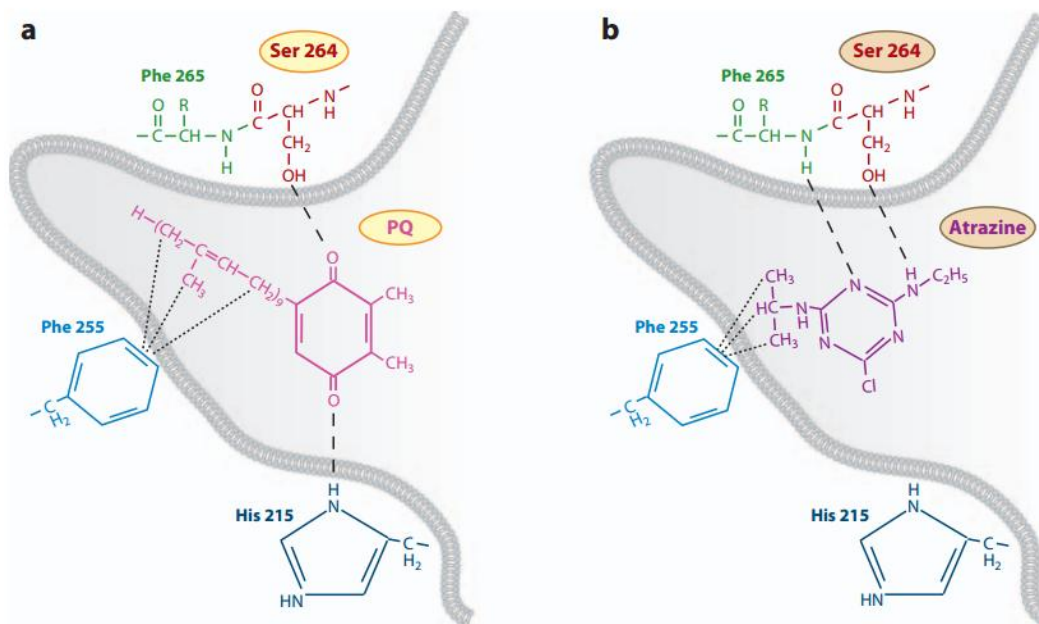
Existe la selección con antibióticos, mediante vectores que contienen secuencias de genes bacterianos, como el *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin y el *aphA-6* con resistencia a kanamicina y amikacina (Purton, 2007).

Para selección en cloroplasto de *D. salina*, existen pocos marcadores registrados. Tan, en 2005, probó selección con varios antibióticos: estreptomocina, kanamicina, higromocina, espectinomocina, geneticina (G418) zeocina, cloranfenicol y el herbicida Basta a concentraciones desde 100 hasta 1,600 $\mu$ g/ml en medio Johnson Modificado. En sus resultados observó que las células sólo fueron sensibles a cloranfenicol, zeocina y Basta.

En este trabajo, se ha planteado probar la eficacia de un marcador basado en una mutación puntual del gen *psbA* que potencialmente pueda ser utilizado para resistencia al herbicida Atrazina (ATR). El gen *psbA* codifica la proteína D1, que es parte del centro de reacción del fotosistema II (PSII). La D1 de *Dunaliella* es altamente conservada y tiene un porcentaje de identidad del 85-95% de homología entre todas las especies que contienen PSII (Ohad y Hirschberg, 1990).

Existen diversos estudios en donde se han investigado las mutaciones puntuales en el *psbA* en plantas (Powles y Yu, 2010), microalgas (Erickson et al, 1984; Przibilla et al, 1991) y cianobacterias (Ohad y Hirschberg, 1990). Estas mutaciones puntuales pueden conferir resistencia a diversos herbicidas como triazinas (atrazina) o ureas (DCMU).

El mecanismo de acción de los herbicidas es que inhiben la fotosíntesis, pues compiten con el sitio de unión a plastoquinona (PQ) de la D1, dentro del complejo del PSII. Los efectos son, la inhibición del transporte de electrones y la producción de NADPH y ATP, lo que conlleva a una reducción de carbohidratos y estrés oxidativo (Powles y Yu, 2010). En la Fig 4., se explica el mecanismo de interacción de la plastoquinona (PQ) y atrazina (ATR) con los aminoácidos.



**Fig. 4** Interacción de la plastoquinona (PQ) y atrazina (ATR) con los aminoácidos con sitio de unión de PQ de la proteína D1 (PSII). (a) El sitio de unión de PQ mantiene un puente de hidrógeno con His-215 y Ser-264 (b) ATR en el sitio de unión a PQ mantiene un puente de hidrógeno con Phe-265 y Ser-264 ((esto evita la unión a PQ). La sustitución de la Ser-264 con Alanina o Glicina remueve el puente de hidrógeno y previene la unión de ATR. Tomado de Powles y Yu, 2010.

## HIPÓTESIS

Se puede construir un nuevo vector con todos los elementos necesarios para expresión estable de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza A H1N1 en el cloroplasto de *Dunaliella salina*

## OBJETIVO GENERAL

Construcción de un vector de expresión para la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la influenza A H1N1 2009, para transformación en el cloroplasto de *Dunaliella salina* por medio de biobalística y establecer un medio de selección para microalgas transformadas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Cultivar e identificar a la cepa *Dunaliella* aislada de las lagunas saladas de San Quintín, Baja California.
- b) Sintetizar el gen de hemaglutinina (HA), el promotor *atpA* con su 5'UTR y 3'UTR de del gen *psbA*, optimizados para cloroplasto de *Dunaliella salina*

- c) Ligar el gen HA al vector pUC57 que contiene promotor y UTRs
- d) Amplificar secuencias homólogas *psbA* y *psaA* para la recombinación en el cloroplasto de *Dunaliella salina* y unir las al vector *atpA-HA* para construir el cassette de expresión.
- e) Hacer una mutación puntual en la región 264 del gen *psbA* (S264A), para desarrollar un marcador de selección potencial para el cloroplasto de *Dunaliella salina* basado en atrazina.
- f) Transformar por biobalística el vector de expresión *atpA-HA* en el cloroplasto de *Dunaliella salina*.
- g) Selección de microalgas transformadas con el herbicida atrazina

## METODOLOGÍA

### 1. Descripción del material biológico

*Dunaliella salina* es una microalga unicelular perteneciente a las clorofitas, descrita en 1905 por E. C. Teodoresco. Es una microalga halófila muy utilizada en biotecnología para obtener grandes cantidades de biomasa, glicerol y carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno (hasta 10% de su peso seco), que es una fuente de vitamina A y antioxidante (Borowitzka, 1988). El glicerol, se utiliza en la industria farmacéutica, cosmética y química, pues tiene propiedades antisépticas, humectantes y espesantes, *D. salina* puede alcanzar una concentración de hasta 50%. (DasSarma y Arora, 2001). Carece de una pared celular rígida y los contenidos celulares se encuentran encerrados por una

membrana plasmática elástica que permite cambios rápidos en su volumen celular como respuesta a cambios en la osmolaridad extracelular (Oren, 2005; Smith *et al*, 2010).

**a) Taxonomía**

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

Familia: Dunaliellaceae

Género: *Dunaliella*

Especie: *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905).

**b) Características morfológicas.** Mide de 8-25  $\mu$  de longitud y de 5-15  $\mu$  de ancho. Tiene un solo cloroplasto con un centro de almidón rodeado por un pirenoide, mitocondria, vacuolas pequeñas, un núcleo y nucléolo. La célula se encuentra envuelta por una membrana plasmática delgada y elástica recubierta por una superficie mucosa, la cual permite que la célula cambie de volumen en respuesta a cambios en el ambiente. Se desplaza por medio de un par flagelos que están situados en la parte apical de la célula (Tawfiq *et al*, 2010).

**c) Reproducción.** Se pueden reproducir por división longitudinal de la célula móvil o por fusión de dos células móviles que forman un cigoto (Lewis y McCourt, 2004; Oren, 2005). Se ha documentado la reproducción sexual en *D. salina*, así como en otras especies de *Dunaliella*. Se ha observado la formación de cigotos por la fusión de dos gametos del mismo tamaño, cuando hay una reducción en la concentración de sal de un 10 a un 3%. El cigoto tiene una gruesa capa exterior que puede soportar la exposición a agua dulce y puede sobrevivir largos periodos de desecación. Cuando se rompe la envoltura celular del cigoto, éste germina y libera hasta 32 células hijas haploides (Oren, 2005).

**d) Características fisicoquímicas.** Es una especie halófila, se adapta a altas salinidades que van hasta niveles de saturación, su rango de tolerancia de NaCl va desde 0.05 M a 5.5 M. Lo anterior le

permite crecer en cultivos libres de especies competitivas y de contaminantes biológicos. Tolera un amplio rango de condiciones ambientales, que incluyen alta intensidad lumínica, alta temperatura, amplios rangos de pH y deficiencias de nitrógeno y/o fósforo (Cifuentes *et al*, 1996).

## 2. Aislamiento y cultivo de *Dunaliella salina* de San Quintín, B.C.

La microalga *D. salina*, se recolectó de las lagunas saladas de San Quintín dentro de la Cooperativa Litoral de Baja California S.A. de C.V (LN: 30°31'12.37817212" y LO: 116°1'41.76155486") en 2009, en donde se encontraba en un estado de estrés salino, con a una temperatura ambiental de 16 °C (Fig.5).



**Fig. 5.** Lagunas saladas San Quintín, Cooperativa Litoral de B.C. S.A. de C.V. El pigmento rojo se debe a la presencia de *Dunaliella salina*.

Para hacer los cultivos de *D. salina* que se manejaron en este trabajo, se utilizó un cultivo base en medio Johnson Modificado (Borowitzka, 1988) (Anexo 1), de células individuales aisladas por el método de micromanipulación, cultivadas inicialmente en un volumen de 500µl y escalado a 100ml, a una temperatura ambiental de 25°C y luz blanca continua de 40watts. A partir de ese cultivo, se preparó uno nuevo de 1 litro, inoculando 100ml de microalgas, con una densidad de  $10 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> en 900ml de medio Johnson Modificado (JM) a 1.5 M de salinidad. Las células crecieron bajo condiciones de iluminación continua con luz blanca de 40 watts, a una temperatura ambiental de 25°C.

## 3. Extracción de DNA de *Dunaliella*

Para la extracción de DNA, se probaron dos métodos, los cuales consistieron en 1) Aislamiento de cloroplastos por medio de rompimiento celular por ósmosis con un buffer de sucrosa, centrifugación en un gradiente de Percoll (60/40/20%) y extracción de DNA de cloroplastos aislados con proteinasa K y fenol-cloroformo (Zachleder *et al*, 1989) y 2) Extracción de DNA total de microalga por medio de una extracción con buffer CTAB y fenol-cloroformo:alcohol isoamil (Chen *et al*, 2001)

### **3.1 Aislamiento de cloroplastos por rompimiento con sucrosa y gradiente de Percoll (60/40/20%).**

Este aislamiento se llevó a cabo según el método descrito por Zachleder *et al* en 1989. Se colectaron las células por centrifugación a 3,000g por 10 minutos a 4°C, se lavaron dos veces con buffer A (40mM Tris-HCl pH 7.5, 20mM KCl, 0.1M sucrosa, 5mM acetato Mg, 5mM EDTA, 10mM 2-mercapto-etanol, 100µg.ml<sup>-1</sup> cloranfenicol), el pellet se resuspendió con buffer A sin sucrosa y se incubó 1 hora a 4°C. La lisis celular se siguió con microscopio, hasta observar rompimiento de la célula y liberación de cloroplastos.

Las células lisadas se colocaron en la capa superior de un gradiente de Percoll (60/40/20%) y se centrifugaron a 4, 200g, siguiendo el protocolo de Mason CB *et al*, 2006. Los cloroplastos, se tomaron de la interfase entre 40-60% y tilacoides en la interfase de 20-40%.

Los cloroplastos y tilacoides recuperados se resuspendieron en un buffer de (50mM EDTA, 0.1% SDS y 50µg.ml<sup>-1</sup> de proteinasa K) y se incubó la muestra a 55°C por 1 hora. El DNA se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol a -20°C. Para observar el DNA extraído, se corrió una muestra en un gel de agarosa al 1%.

### **3.2 Extracción de DNA total de *Dunaliella salina***

El DNA de *D. salina* se aisló utilizando un método de CTAB (modificado de Chen *et al*, 2001). Las microalgas de un cultivo en JM 1.5 M de 1L, en fase exponencial (1x10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup>), fueron centrifugadas a 12,000g por 10 minutos, resuspendidas en 500µl de buffer CTAB (0.1M Tris HCl pH 8, 1.4M NaCl, 0.01M EDTA, 2% CTAB y 2% B-mercaptoetanol) e incubadas por una hora a 65°C con inversiones ocasionales. Se les agregó un volumen igual de fenol-cloroformo alcohol isoamil 25:24:1 v/v, se mezcló en vórtex durante 1 minuto, se dejó en reposo de 1-2 minutos y para separar las fases, se centrifugó a

12,000g por 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó a 20,850g por 30 minutos a 4°C. El DNA se lavó con 1 ml de etanol al 70%, el cual se dejó secar para finalmente resuspenderlo en 100µl de agua libre de nucleasas.

Del DNA total obtenido por CTAB, se amplificó una región del genoma del cloroplasto de 680 pares de base, entre los genes *psaA* y *psbA* de aproximadamente 680 pares de bases, para lo cual se diseñaron los siguientes oligonucleótidos (primers): Forward: 5'-cggaattccgcccgcctagcccttaggcga-3' y Reverse 5'-cgtgagggcgcgcgctaagtcg gttcctggtc-3'). La amplificación se realizó bajo las condiciones estándares de PCR de la enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Tabla I).

Tabla I. Amplificación de un fragmento de región intergénica (*psaA-psbA*) a partir de tDNA de *D. salina*.

<b>Iniciación</b>	94°C	1:15 min
<b>35 ciclos</b>		
<b>Desnaturalización</b>	94°C	25 seg
<b>Alineamiento</b>	58°C	25 seg
<b>Extensión</b>	68°C	1 min
<b>Elongación final</b>	68°C	10 min

#### 4 . Identificación molecular de *Dunaliella* de San Quintín, B.C.

##### 4.1 Amplificación y secuenciación de la región 18S DNAr de *Dunaliella*.

Las técnicas moleculares para estudios taxonómicos en *Dunaliella* abarcan los genes de 18S ribosomal RNA y regiones espaciadoras transcritas internas (ITS's), basadas en comparaciones de secuencias de genes así como en estudios de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. Gracias a las secuencias del gen 18S DNAr, se puede diferenciar entre las especies del género *Dunaliella*, tales como *D. salina*, *D. parva*, *D. tertiolecta* y *D. bardawil* que contienen uno, dos y cero intrones, respectivamente, que es en donde residen sus principales diferencias. (Olmos *et al*, 2000).

Para identificar correctamente a la cepa obtenida de la laguna de San Quintín, la cual por sus características morfológicas y fisiológicas indicaban que podía tratarse de *D. salina*, se amplificó una región del 18S rRNA de 1,770 pares de bases, a partir de DNA total utilizando los primers MA1 y MA2,

diseñados a partir de secuencias conservadas del 5' y 3' terminal del 18S rRNA de varias especies de *Dunaliella* (Olmos *et al*, 2000; Hejazi MA *et al*, 2010).

Tabla 1. Reactivos y volúmenes requeridos para la PCR del 18S DNAr de *Dunaliella*

Reactivos	µl
Buffer PCR 10x	2.5
dNTPs (10mM)	0.5
*MA1 (25µm)	0.25
**MA2 (25µm)	0.25
DNA total (590ng/µl)	1
Fideli Taq DNA polimerasa	0.125
H <sub>2</sub> O	20.37
Volumen final	25

\*MA1: 5'-cgggatccgtagtcatatgcttgctc-3'  
 \*\*MA2: 5'-cggaattccttctgcaggttcacc-3'

Tabla 2. Condiciones de amplificación de la región 18S DNAr de *Dunaliella*

Ciclos	Temperatura	Tiempo
Ciclo inicial	95°C	1 min
	95°C	30 seg
30 ciclos	55°C	30 seg
	68°C	2 min
1 ciclo	68°C	5 min

El producto de PCR se envió a secuenciar a Eton Bioscience Inc. utilizando los primers MA1 y MA2.

#### 4. Síntesis del gen de la proteína hemaglutinina (HA)

Se diseñó una secuencia de 1,754 bases de la proteína HA del virus de la influenza A H1N1, a partir de la secuencia de HA A/Mexico/4486/2009(H1N1) (GQ149623.1) publicada en GenBank (Anexo 2) y se sintetizó con la compañía GenScript. Esperando el mejor rendimiento de la recombinación en cloroplasto, se cambiaron los codones de la proteína original, optimizándolos con la frecuencia de codones más utilizada en *D. salina* (Nakamura *et al*, 2000; Franklin S *et al*, 2002; Surzycki *et al*, 2009). La secuencia sintetizada se integró al vector de clonación pUC57 que contiene el gen *bla*, el cual le confiere resistencia a ampicilina (Fig. 6). Se le agregó un sitio de restricción en 5' para la enzima NcoI (5'CCATTG 3'), un codón de inicio (ATG), después una marca de 6 histidinas (5'CATCATCATCATCAT 3'), una marca



NcoI  
 CC ATG GAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GAT GAT GAT GAT AAA ATG AAA GCT ATT TTA GTT GTT TTA TTA TAT A  
 CA TTT GCT ACA GCT AAC GCT GAT ACA TTA TGT ATT GGT TAT CAT GCT AAC AAC TCA ACA GAT ACA GTT GAT A  
 CA GTT TTA GAA AAA AAC GTT ACA GTT ACA CAT TCA GTT AAC TTA TTA GAA GAT AAA CAT AAC GGT AAA TTA T  
 GT AAA TTA CGT GGT GTT GCT CCA TTA CAT TTA GGT AAA TGT AAC ATT GCT GGT TGG ATT TTA GGT AAC CCA G  
 AA TGT GAA TCA TTA TCA ACA GCT TCA TCA TGG TCA TAT ATT GTT GAA ACA TCA TCA TCA GAT AAC GGT ACA T  
 GT TAT CCA GGT GAT TTT ATT GAT TAT GAA GAA TTA CGT GAA CAA TTA TCA TCA GTT TCA TCA TTT GAA CGT T  
 TT GAA ATT TTT CCA AAA ACA TCA TCA TGG CCA AAC CAT GAT TCA AAC AAA GGT GTT ACA GCT GCT TGT CCA C  
 AT GCT GGT GCT AAA TCA TTT TAT AAA AAC TTA ATT TGG TTA GTT AAA AAA GGT AAC TCA TAT CCA AAA TTA T  
 CA AAA TCA TAT ATT AAC GAT AAA GGT AAA GAA GTT TTA GTT TTA TGG GGT ATT CAT CAT CCA TCA ACA TCA G  
 CT GAT CAA CAA TCA TTA TAT CAA AAC GCT GAT GCT TAT GTT TTT GTT GGT TCA TCA CGT TAT TCA AAA AAA T  
 TT AAA CCA GAA ATT GCT ATT CGT CCA AAA GTT CGT GAT CAA GAA GGT CGT ATG AAC TAT TAT TGG ACA TTA G  
 TT GAA CCA GGT GAT AAA ATT ACA TTT GAA GCT ACA GGT AAC TTA GTT GTT CCA CGT TAT GCT TTT GCT ATG G  
 AA CGT AAC GCT GGT TCA GGT ATT ATT ATT TCA GAT ACA CCA GTT CAT GAT TGT AAC ACA ACA TGT CAA ACA C  
 CA AAA GGT GCT ATT AAC ACA TCA TTA CCA TTT CAA AAC ATT CAT CCA ATT ACA ATT GGT AAA TGT CCA AAA T  
 AT GTT AAA TCA ACA AAA TTA CGT TTA GCT ACA GGT TTA CGT AAC GTT CCA TCA ATT CAA TCA CGT GGT TTA T  
 TT GGT GCT ATT GCT GGT TTT ATT GAA GGT GGT TGG ACA GGT ATG GTT GAT GGT TGG TAT GGT TAT CAT CAT C  
 AA AAC GAA CAA GGT TCA GGT TAT GCT GCT GAT TTA AAA TCA ACA CAA AAC GCT ATT GAT GAA ATT ACA AAC A  
 AA GTT AAC TCA GTT ATT GAA AAA ATG AAC ACA CAA TTT ACA GCT GTT GGT AAA GAA TTT AAC CAT TTA GAA A  
 AA CGT ATT GAA AAC TTA AAC AAA AAA GTT GAT GAT GGT TTT TTA GAT ATT TGG ACA TAT AAC GCT GAA TTA T  
 TA GTT TTA TTA GAA AAC GAA CGT ACA TTA GAT TAT CAT GAT TCA AAC GTT AAA AAC TTA TAT GAA AAA GTT C  
 GT TCA CAA TTA AAA AAC AAC GCT AAA GAA ATT GGT AAC GGT TGT TTT GAA TTT TAT CAT AAA TGT GAT AAC A  
 CA TGT ATG GAA TCA GTT AAA AAC GGT ACA TAT GAT TAT CCA AAA TAT TCA GAA GAA GCT AAA TTA AAC CGT G  
 AA GAA ATT GAT GGT GTT AAA TTA GAA TCA ACA CGT ATT TAT CAA ATT TTA GCT ATT TAT TCA ACA GTT GCT T  
 CA TCA TTA GTT TTA GTT GTT TCA TTA GGT GCT ATT TCA TTT TGG ATG TGT TCA AAC GGT TCA TTA CAA TGT C  
 GT ATT TGT ATT TAA TGA TAA CTG CAG  
PstI

**Fig. 7.** Secuencia de hemaglutinina (HA) optimizada para cloroplasto.

## **6. Síntesis del promotor *atpA* y UTRs.**

Para que los transgenes expresen correctamente a las proteínas recombinantes, éstos deben contener elementos genéticos requeridos por la maquinaria del cloroplasto, que son promotores endógenos y regiones no traducidas de los genes (UTRs), tanto 5'-UTR y 3'-UTR, los cuales son insertados en el genoma del cloroplasto por recombinación homóloga.

Existen reportes sobre el uso de distintos promotores endógenos como: *atpA*, *psbA*, *psbD* y *rbcL* y sus respectivos UTRs. De los existentes, los que han mostrado tener la mejor tasa de transcripción y traducción (altos niveles de acumulación de mRNA y proteína), son el promotor y 5'-UTR del gen *atpA* en combinación con el 3'UTR del gen *psbA*. Debido a lo anterior, se seleccionaron para su síntesis el promotor y 5'UTR del gen *atpA* y el 3'UTR del gen *psbA*.

Se analizaron las secuencias existentes en la base de datos del gen *psbA* y *atpA* de *Dunaliella salina*. La primera pertenece al genoma completo de *Dunaliella salina* CCAP 18/19 (GQ250046.1) y la segunda al gen de la ATPasa subunidad alfa (*atpA*) y promotor de *D. salina* (EU590119.1), a partir de las cuales, se establecieron las secuencias que flanquean dichos genes para determinar la secuencia del promotor y extremo 5'UTR del gen *atpA* (499 pb) y el extremo 3'UTR del gen *psbA* (457 pb). A la secuencia sintética (sintetizada en GenScript), se le agregó un sitio de restricción para KpnI a cada extremo de la secuencia, así como también los sitios de restricción para NcoI y PstI, que se encuentran internamente, los cuales permitirán que el gen HA se integre dentro de los UTRs (Fig. 8).



Fig. 8. Secuencia de hemaglutinina (HA) optimizada para cloroplasto.

## **7. Ligación de HA con promotor *atpA* y UTRs.**

### **7.1 Transformación del vector pUC57-HA en DH5 $\alpha$ .**

Se prepararon células *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes con cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>). Las células competentes se transformaron con 200ng/ $\mu$ l del vector pUC57-HA siguiendo el protocolo de Sambrook, *et al* (1989). Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio líquido de Luria Broth con ampicilina (50ug/ml) y se cultivaron a 37°C por 12 horas, después de las cuales se realizó la extracción de DNA plasmídico siguiendo el protocolo del kit de extracción miniprep de Promega.

Para comprobar integración del vector pUC57-HA en DH5 $\alpha$ , se realizó una digestión de 20 $\mu$ l de volumen, utilizando las enzimas de restricción NcoI y PstI, las cuales cortan el gen HA, dejándolo con las puntas pegajosas, que después se utilizarán para integrar el gen HA al vector puc57-*atpA* que contiene el promotor *atpA* y UTRs. La digestión se observó en un gel de agarosa al 1%, del cual se cortaron las bandas de tamaño correspondiente a HA (1,754 pb) y se purificaron del gel con el método de “Freeze ‘N Squeeze” utilizando columnas Bio-Rad®. Las clonas positivas se criopreservaron en LB-glicerol a -80°C hasta su utilización.

### **7.2 Ligación de HA al vector pUC57-*atpA***

El gen HA purificado, se ligó al vector pUC57-*atpA*, mediante transformación química por CaCl<sub>2</sub> en células competentes DH5 $\alpha$ , utilizando la relación 3:1 inserto: vector. Las clonas transformadas, se seleccionaron en medio LB-agar con 50 $\mu$ g/ml de ampicilina después de una incubación a 37°C por 12 horas. Se extrajo DNA plasmídico de las colonias positivas con kit de extracción miniprep de Promega y se realizó una digestión con las enzimas NcoI y PstI para comprobar la integración de HA al vector pUC57-UTRs.

## **8. Obtención de secuencias homólogas.**

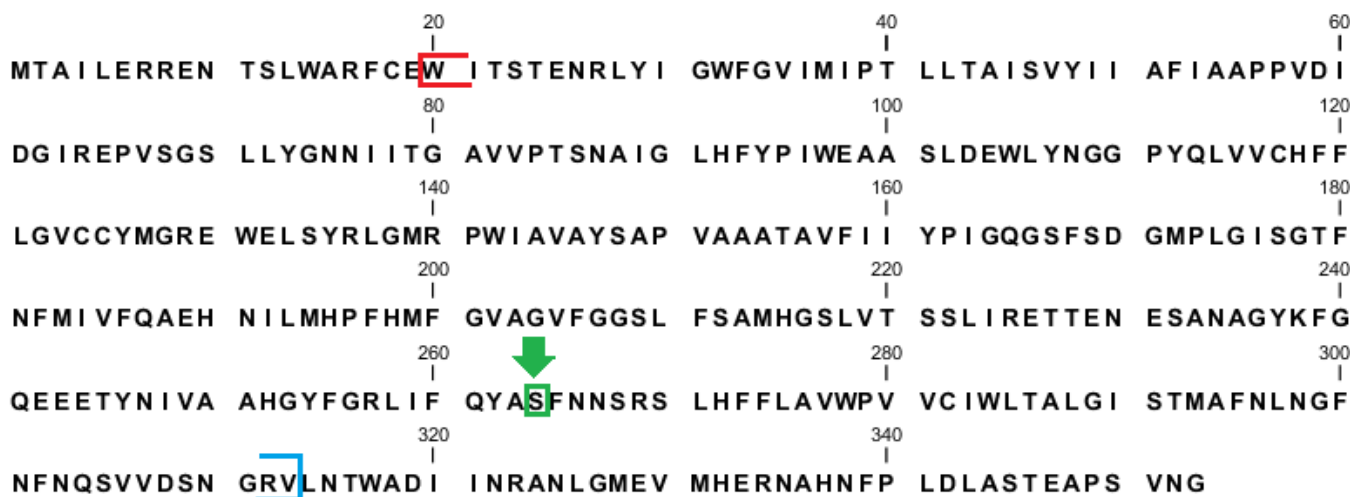
La ventaja que tiene la expresión en cloroplasto, es que se puede dirigir la integración del gen heterólogo en un segmento específico del genoma del cloroplasto mediante recombinación homóloga. Esto se debe a que se utilizan fragmentos o regiones homólogas de genes del cloroplasto para flanquear

el cassette que contiene al gen heterólogo con su promotor y UTRs.

Para dirigir el cassette de expresión de HA, se eligió una sección del genoma del cloroplasto que comprende el espacio intergénico entre los genes *psaA* y *psbA*, así como el gen *psbA*, que comprende la secuencia de la proteína D1. Estos elementos, se utilizarán como un método de recombinación homóloga y dirigida para integrar el gen de HA en el genoma plastídico sin afectar otros elementos genéticos. También funciona como un método de selección y homogenización del genoma dentro de la microalga, pues al hacer una mutación en el gen *psbA*, este fragmento puede emplearse como un método de selección para atrazina.

### 8.1 Amplificación de la secuencia homóloga *psbA*

Se diseñaron los oligonucleótidos FD1-25 (5'- ccaagtggttaatacacgaccggttgagtctacaac 3') y RD1-25 (5'- tggatcactcaactgaaaaccggttatacatcggt-3'), a partir de la secuencia del gen *psbA* de *Dunaliella salina* CCAP19/18 (GQ250046.1). Con dichos primers, se amplificó una región de 893pb a partir de DNA total de *D. salina* (Tabla 3 y 4). Esa región abarca la secuencia de la proteína D1 del fotosistema II de *D. salina* y una serina en la posición 264 (TCA) (Fig. 9), la cual, una vez cambiada por alanina (GCA) se espera que genere resistencia contra el herbicida atrazina.



**Fig 9.** Secuencia *psbA* de *Dunaliella salina* CCAP19/18 (GQ250046.1). El color rojo y azul marcan el inicio y final de la región recombinante. La flecha verde indica el aminoácido serina en la posición 264, a la cual se hará la mutación.

Tabla 3. Reactivos y volúmenes requeridos para la PCR del gen *psbA*

*de Dunaliella salina.*

Reactivos	µl
Buffer PCR HF 10x	5
dNTPs (10mM)	1
*FD1EcoRI (25µm)	1
** RD1Xbal (25µm)	1
DNA total	1
Platinum Taq DNA polimerasa HF	0.2
H <sub>2</sub> O	40.8
Volumen final	50

\*\*FD1-25 (5'-ccaagtgtttaatacacgaccgcttgagctacaac 3')

\*\*RD1-25 (5'-tggatcacttcaactgaaaaccgctttatacatcggt-3')

*Tabla 4. Condiciones de amplificación del gen psbA de Dunaliella salina.*

Ciclos	Temperatura	Tiempo
Ciclo inicial	94°C	2 min
	94°C	30 seg
35 ciclos	55°C	30 seg
	68°C	1 min
1 ciclo	68°C	5 min

El producto de PCR se ligó al vector de clonación pGEM-T Easy de PROMEGA y se transformó en células competentes DH5α. Se obtuvo DNA de las clonas positivas con el kit miniprep de Promega y se les realizó una digestión con enzimas de restricción EcoRI y XbaI para comprobar la ligación al vector pGEM-T Easy.

## **8.2 Mutación puntual en el gen *psbA* para resistencia a atrazina.**

Se diseñaron dos primers (D1fwd y D1rev) y se purificados por PAGE. Estos primers, contienen la mutación deseada de Serina (TCA) por Alanina (GCA), la cual sustituye el aminoácido Serina en la posición 264 en la secuencia de *psbA* (D1), que se encuentra dentro del vector pGEM T-easy. La mutación se llevó a cabo con el kit de mutagénesis dirigida (QuikChange® II), por medio de una PCR (Tabla 5 y 6). Inmediatamente después de la amplificación, a la reacción se le agregó 1µl de Dpn1 (10U/µl) y se incubó 1 hora a 37°C. Después de la incubación, el producto (2 µl) se transformó en células XL1blue químicamente competentes siguiendo el protocolo de de Sambrook, *et al* (1989), incubando las células en medio S.O.C, las cuales se estiraron en placas de LB con ampicilina (50ug/ml) y se dejaron en

cultivo a 37°C, por 12 horas. Las colonias positivas a la transformación, se cultivaron en medio líquido LB con ampicilina y se les extrajo DNA con el kit miniprep de Qiagen para secuenciar y comprobar la mutación.

Tabla 5. Reacción de amplificación de mutagénesis dirigida de la serina

Reactivos	µl
Buffer 10x	5
dsDNA (45ng/µl)	1
*D1Fwd (125ng/µl)	1
**D1Rev (125ng/µl)	0.54
dNTP Mix	1
H <sub>2</sub> O bi-destilada	42
Volumen final	50
<i>Pfu Turbo DNA polymerase (2.4U/µl)</i>	1

\*FD1-25 (5'-ccaagtggttaatacacgaccggttgagctacaac-3')

\*\*RD1-25 (5'-tggatcacttcaactgaaaaccggtttatacatcggt-3')

Tabla 6. Parámetros de los ciclos para la mutagénesis dirigida de la serina.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	30 seg
2	16	95°C	30 seg
		55°C	1 min
		68°C	5 min

### 8.3 Amplificación de la secuencia homóloga *psaA*

Se diseñaron los primers rrfwd28 y rrrev28 basados en la secuencia de *D. salina* 18/19 (GQ250046.1), para amplificar parte de la secuencia intergénica entre los genes *psaA* y *psbA* de 1,071 pb. Este fragmento se ligó temporalmente en el vector pGEM T-easy y se transformó en células

competentes DH5 $\alpha$ . Para comprobar la ligación, se cortó con la enzima PstI que libera el fragmento ligado a pGEM T-easy y una vez que se corroboró que el fragmento estuviera ligado, se envió a secuenciar para comparar la secuencia amplificada con la publicada en la base de datos (*D. salina* 18/19).

Tabla 7. Reactivos y volúmenes requeridos para la PCR de *psbA-psbA* de *Dunaliella salina*.

Reactivos	$\mu$ l
Buffer PCR HF 10x	5
dNTPs (10mM)	0.5
* <i>rrfwd28</i> (20 $\mu$ m)	1
** <i>rrev28</i> (20 $\mu$ m)	1
DNA total ( $\approx$ 300ng/ $\mu$ l)	2
HotStart-IT FidelityTaq	0.5
H <sub>2</sub> O	42
Volumen final	50
<i>*rrfwd28</i> (5'-gctgatcatcaaccgtgctaac-3')	
<i>**rrev28</i> (5'-gtaactcatccgaagaagtcaacac-3')	

Tabla 8. Condiciones de amplificación de *psbA-psbA* de *Dunaliella salina*.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
Ciclo inicial	94°C	2 min
	94°C	30 seg
35 ciclos	50°C	30 seg
	72°C	1 min
1 ciclo	68°C	5 min

### 9. Ligación de secuencias homólogas al vector pUC57-*atpA-HA*: Construcción del cassette de expresión de HA.

Para ligar las secuencias homólogas al vector pUC57-*atpA-HA*, se utilizó el kit de clonación Geneart® de la compañía Invitrogen. Este sistema puede clonar fragmentos en cualquier vector linearizado de *E. coli*. Contiene una mezcla de enzimas que ensamblan fragmentos de DNA que comparten una homología de 15 pares de bases, que se puede crear mediante un PCR de amplificación. La ventaja es que no necesita la utilización de ligasas o enzimas de restricción, tampoco de sitios de recombinación pre-existentes o secuencias adicionales.

### 9.1 Ligación de la secuencia homóloga *psbA* al vector pUC57-*atpA-HA*

Para ligar la secuencia *psbA* al vector, se utilizaron las mismas secuencias de los oligonucleótidos que amplifican la secuencia homóloga *psbA* y se le agregaron 15 bases de homología con el vector pUC57-*atpA-HA* (de 5,400pb) y un sitio de restricción para la enzima HindIII.

Primero se linearizó el vector con HindIII y se purificó con el kit AccuPrep PCR Purification Kit. Asimismo, se linearizó el vector pGEMTeasy-*psbA* con PstI. Teniendo ambos vectores linearizados, se utilizaron los primers Inf1-HindIII e Inf2-HindIII para, mediante PCR, agregarle 15 bases de homología a la secuencia homóloga *psbA*, siguiendo el protocolo de amplificación utilizado anteriormente (Tabla 3 y 4), pero con la enzima HotStart-IT FidelityTaq (Tabla 9 y 10). Del producto de este PCR, se tomaron 5µl sin purificar y se le agregaron 2µl de Cloning Enhancer Clontech® y se incubó por 15 min a 37°C y a 80°C por 15 min. Después de la incubación se hizo la siguiente reacción: 2µl de 5X In-Fusion Buffer, 1 µl de Enzima In-Fusion, 2 µl de Vector puc57-HA-utrs linearizado, 1 µl inserto tratado con Cloning Enhancer y 4 µl de dH<sub>2</sub>O, esta reacción e incubó 15 minutos a 37°C, 15 minutos a 50°C y después en hielo, después se llevó a un volumen de 50µl con buffer TE (pH 8) y se realizó una transformación en células competentes DH5α, las cuales se estiraron en placas con ampicilina (50ug/ml) y se dejaron creciendo 12 horas a 37°C. A las colonias que crecieron, se les extrajo DNA con el kit miniprep de Qiagen. Se hizo digestión del vector con HindIII para comprobar su integración y también se envió a secuenciar a Eton Bioscience.

Tabla 9. Reactivos y volúmenes de la PCR para agregar 15 bases de homología a la secuencia *psbA*.

Reactivos	µl
Buffer PCR HF 10x	5
dNTPs (10mM)	0.5
*Inf1-HindIII (20µm)	1
** Inf2-HindIII (20µm)	1
DNA total (≈300ng/µl)	2
	0.5
H <sub>2</sub> O	42
Volumen final	50
*Inf1-HindIII (5'-gcctgcatgcaagctt gtaactcatccgaagaagtcaaac-3')	
** Inf2-HindIII (5'-tgattacgccaagctgctgatatcatcaaccgtgctaac-3')	

La parte sombreada representa a la secuencia complementaria al gen de interés

Tabla 10. Condiciones de amplificación para agregar 15 bases de homología a la secuencia *psbA* con el kit Geneart®

Ciclos	Temperatura	Tiempo
Ciclo inicial	94°C	2 min
	94°C	30 seg
35 ciclos	50°C	30 seg
	72°C	1 min
1 ciclo	68°C	5 min

### 10. Ensayo de sensibilidad de *Dunaliella salina* a atrazina

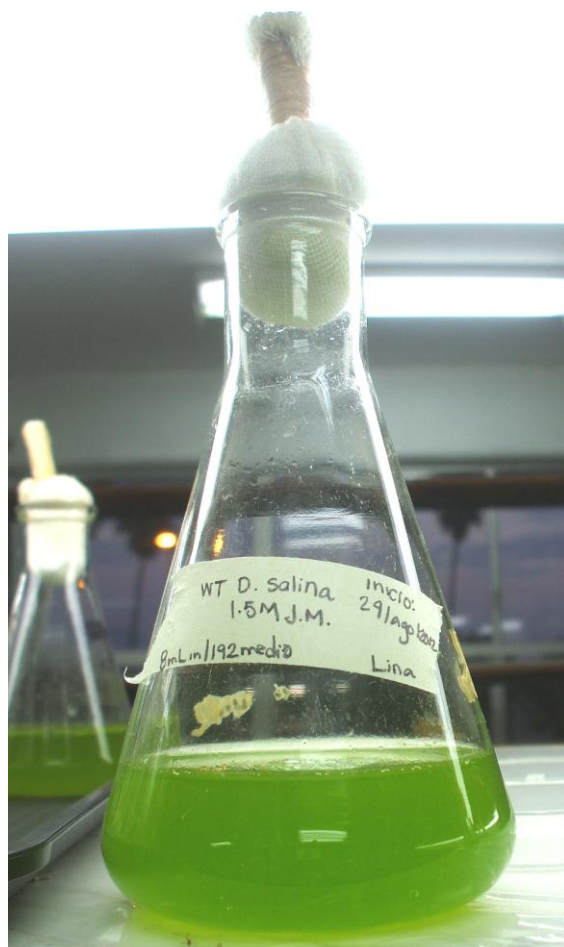
La selección de microalgas transformadas con HA en cloroplasto, se espera que se haga mediante el cultivo de *D. salina* con el herbicida atrazina. Para conocer la concentración mínima de atrazina que inhibe el crecimiento de *D. salina*, se realizaron por triplicado cultivos de 5ml de volumen con medio Johnson Modificado a una concentración de sales de 1.5M. Se preparó una solución stock de atrazina en 100% de acetona y se administró a los cultivos en concentraciones de 50, 100, 200, 400 y 800 µg/L, dejando en cada uno, un volumen final de 0.1% de acetona. Para verificar que la concentración de 0.1% de acetona en el cultivo, no afecta el crecimiento de las microalgas, se realizó un cultivo control con acetona al 0.1% sin atrazina.

### 12. Transformación con biobalística

A excepción de la preparación de cultivos de *D. salina*, todo el experimento de biobalística se llevó a cabo Scripps Institution of Oceanography, UCSD, en el laboratorio del Dr. Mark Hildebrand.

#### 12.1 Preparación de microalgas para bombardeo

Las microalgas se cultivaron en medio líquido Johnson Modificado a 1.5 M de NaCl, hasta fase exponencial (a los 6 días de crecimiento) (Fig. 10). También se prepararon cajas de agar 1.5% con medio JM a 1.5M y cajas con Johnson Modificado 1.5 M con atrazina a 400µg/L para seleccionar transformantes.



**Fig. 10.** Cultivo de *Dunaliella salina* en medio de cultivo Johnson Modificado 1.5M en fase exponencial.

### 12.2 Recubrimiento de tungsteno con el vector *atpA-HA*

Se utilizaron partículas de tungsteno como microacarreadores para recubrir el DNA (vector *atpA-HA*), las cuales lo ayudarán a integrarse dentro del cloroplasto. Las partículas de tungsteno utilizadas fueron M-17 Bio-Rad® de 1.1µm de diámetro y se lavaron con el siguiente protocolo:

- 1) En un tubo de 1.5ml se resuspendieron 10mg de partículas de tungsteno en 500µl de etanol.
- 2) Se centrifugaron 30 segundos en una microcentrífuga a alta velocidad.
- 3) Se resuspendió el pellet en 250µl de etanol
- 4) Se dio vórtex vigorosamente por 2 minutos

- 5) Se centrifugó por 30 segundos
- 6) El pellet se lavó 3 veces con 250µl de agua estéril y al final se resuspendió en 150µl de agua.
- 7) Se dividieron en alícuotas de 50µl y se guardaron a -20°C.

Para cubrir las partículas de tungsteno con el DNA, se utilizó el siguiente protocolo:

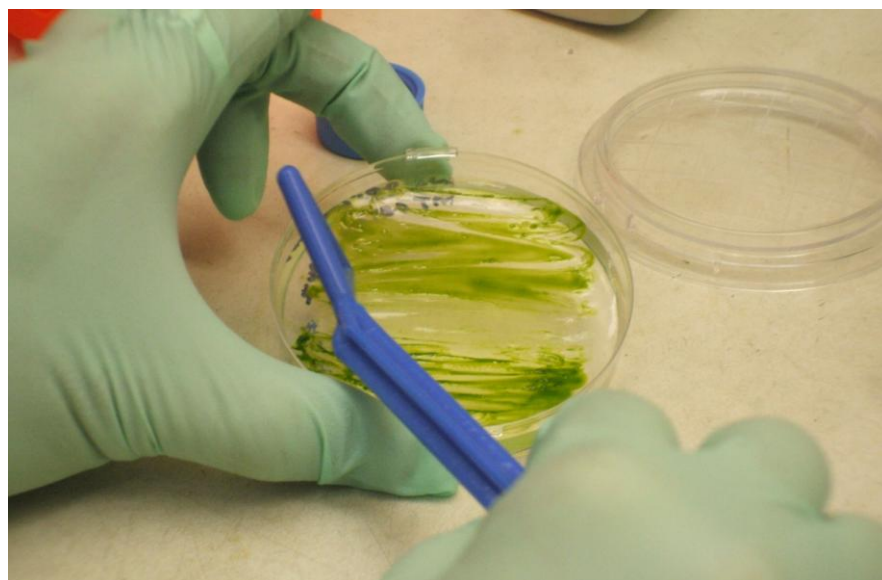
- 1) Los tubos con las alícuotas de 50µl de tungsteno, se colocaron en vórtex y mientras se encontraban en movimiento, a cada uno se le agregaron: 5µl de del plásmido (1µg/µl), 50µl de CaCl<sub>2</sub> (2.5M) y 20µl de espermidina (0.1M).
- 2) Se dio vórtex por 3 minutos
- 3) Se centrifugó por 10 segundos y se removió el sobrenadante
- 4) Se resuspendió el pellet en 250µl de etanol
- 5) Se dio vórtex por un minuto y se centrifugó 10 segundos para remover sobrenadante.
- 6) Se resuspendió en 50µl de etanol.

### 12.3 Preparación de las células para bombardeo en caja petri

Para realizar el bombardeo, se colocó una capa de microalgas en placas de agar con medio de cultivo JM de 1.5M sin selección, por lo cual, se centrifugó el cultivo de microalgas a 3,000g por 10 minutos y se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo (Fig. 11), la concentración final de células fue de  $1 \times 10^8$  cel/ml en cada caja. Utilizando una espátula de plástico, se estriaron las células en las cajas de petri, formando una capa densa de células (Fig. 12)



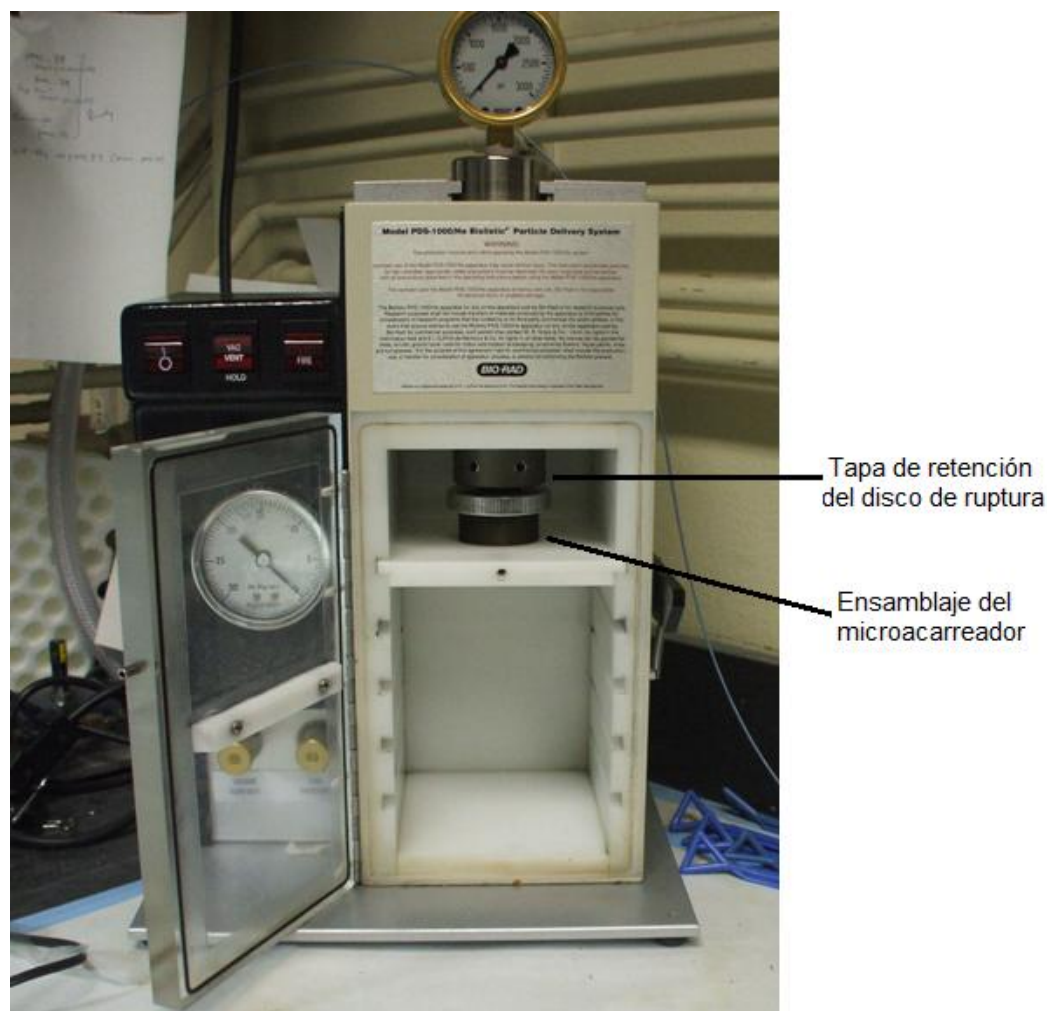
**Fig. 11.** Microalgas resuspendidas en 2ml de medio JM 1.5M, a una concentración de  $1 \times 10^8$  cel/ml.



**Fig. 12.** Espatulado de microalgas en caja petri para su bombardeo (arriba). Se muestran las cajas listas para bombardeo con una capa de microalgas (abajo).

## 12.4 Bombardeo

Para realizar el bombardeo de microalgas, se utilizó el equipo de biobalística PDS-1000/He de Bio-Rad® (Fig. 13). Primero se desarmaron las piezas y se limpió el equipo con etanol al 70%. Se esterilizaron los microacarreadores de 450psi y la pantalla de stop.



**Fig 13.** Se muestra el equipo de biobalística PDS-1000/He Bio-Rad®

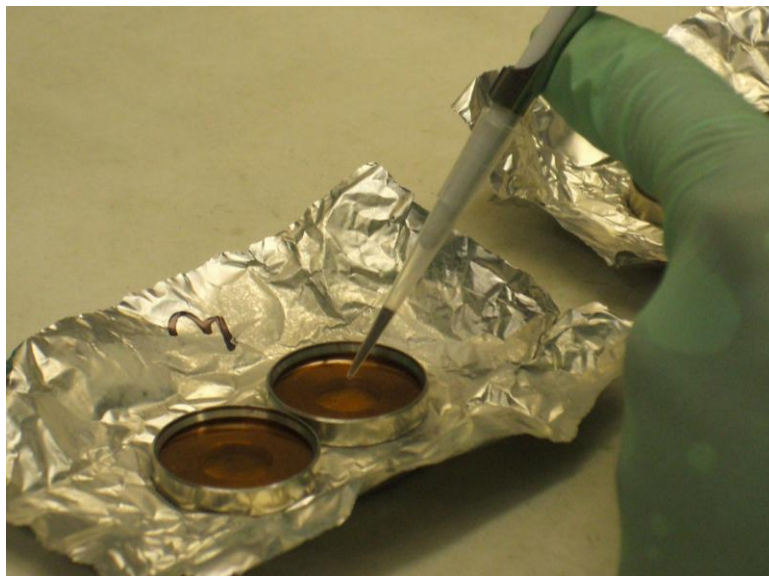
En esterilidad, se agregaron 10 $\mu$ l de las partículas de tungsteno recubiertas con DNA en el centro de los microacarreadores (Fig. 14). Los discos de ruptura se lavaron con isopropanol absoluto momentos antes de realizar el bombardeo, se colocaron en la tapa de retención para disco de ruptura y se ensamblaron en el

equipo de biobalística, al igual que la unidad de soporte del microacarreador con la pantalla de stop (Fig. 15). Una vez ensamblado todo el equipo, se colocó la caja petri (sin la tapa) a una distancia de 6 cm y se hicieron disparos a una presión de 450 psi (Fig. 16). Los disparos se hicieron de acuerdo a la Tabla 11.

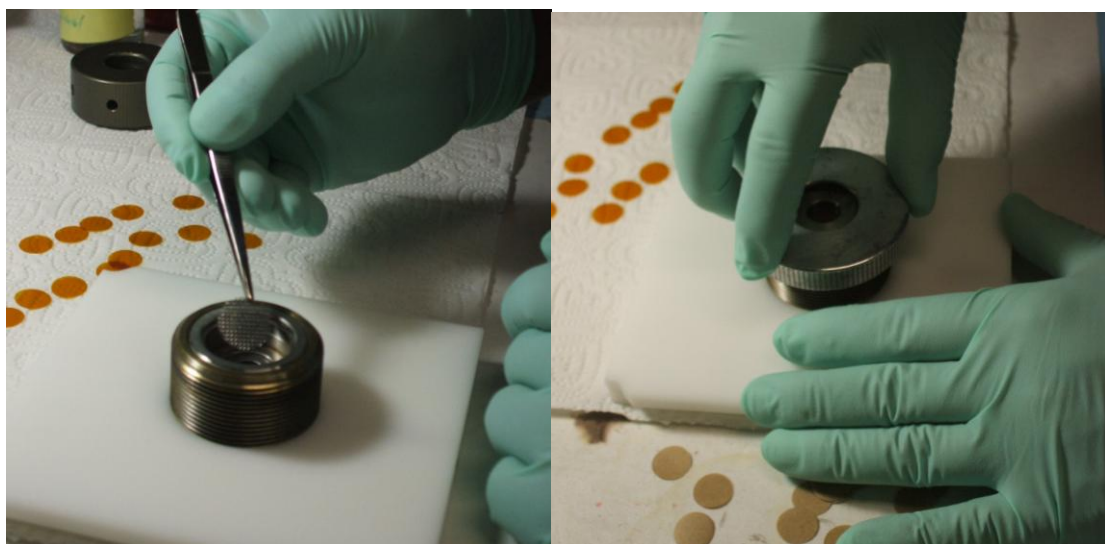
Tabla 11. Condiciones de bombardeo

Vector	Blanco	Condiciones vector	Número de disparos	psi	Distancia
<i>atpA-HA</i>	Cloroplasto	Plásmido cerrado	2	450	6cm
<i>atpA-HA</i>	Cloroplasto	Plásmido linearizado	2	450	6cm
<i>atpA-HA</i>	Cloroplasto	Mezcla 50% plásmido cerrado/ 50% linearizado	1	450	6cm

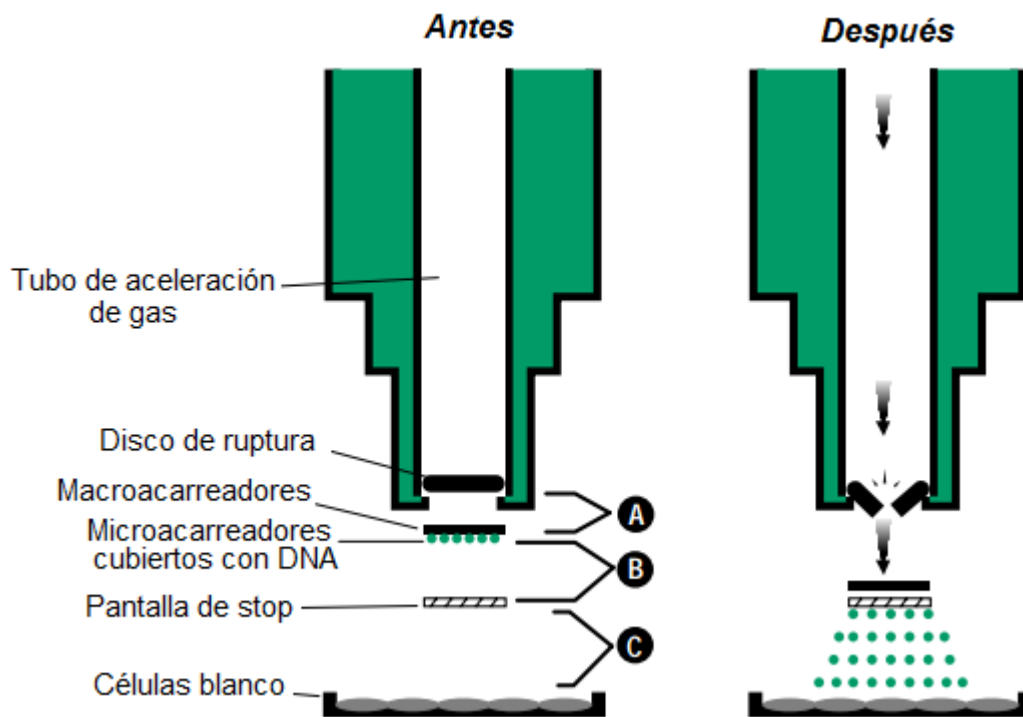
Después de los disparos, se agregó a cada caja 2 ml de medio de cultivo sin selección. Después de una hora, se colectaron las células de la caja petri con una pipeta y se colocaron en tubos estériles de 15 ml. Las microalgas se dejaron en cultivo por 24 horas bajo iluminación constante. Este paso se realiza para que las células se recuperen después del bombardeo. Después de las 24 horas, una parte de las células recuperadas (200µl por caja) se estrió en cajas de petri con medio JM 1.5M y atrazina a 400 µg/L. La otra parte de las células, se cultivó en tubos por triplicado con medio líquido JM 1.5 M con 200 µg/L y 400 µg/L de atrazina y un control sin atrazina



**Fig. 14.** En esterilidad, se agregaron 10 $\mu$ l de tungsteno con DNA a cada microacarreador, cada uno sirve para un disparo.



**Fig. 15.** Ensamblaje de la unidad de soporte del microacarreador con la pantalla de stop.



**Fig. 16.** Diagrama donde se muestra el proceso de bombardeo y los componentes del equipo.

Fuente: Catálogo Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System Bio-Rad®

## RESULTADOS

### 1. Cultivo de *Dunaliella salina*

La microalga *D. salina*, aislada de San Quintín, fue cultivada en el medio Johnson Modificado (Anexo 1) con una concentración de NaCl de 1.5 M, con luz blanca continua de 40 watts y a una temperatura ambiental de 25°C. La Fig.17, muestra la cinética de crecimiento de *D. salina*, con un cultivo inicial de 14,950 cél/ml, se alcanza la fase exponencial al segundo día y el quinto día comienza la fase estacionaria.

Las tasas de crecimiento fueron calculadas a partir de recuentos diarios de células, utilizando la siguiente fórmula  $\mu_2 = [\ln(N_t) - \ln(N_0)]/\ln 2 (t - t_0)$ , donde N es la densidad celular en el tiempo  $t$  (expresado en días) (Tabla 12)

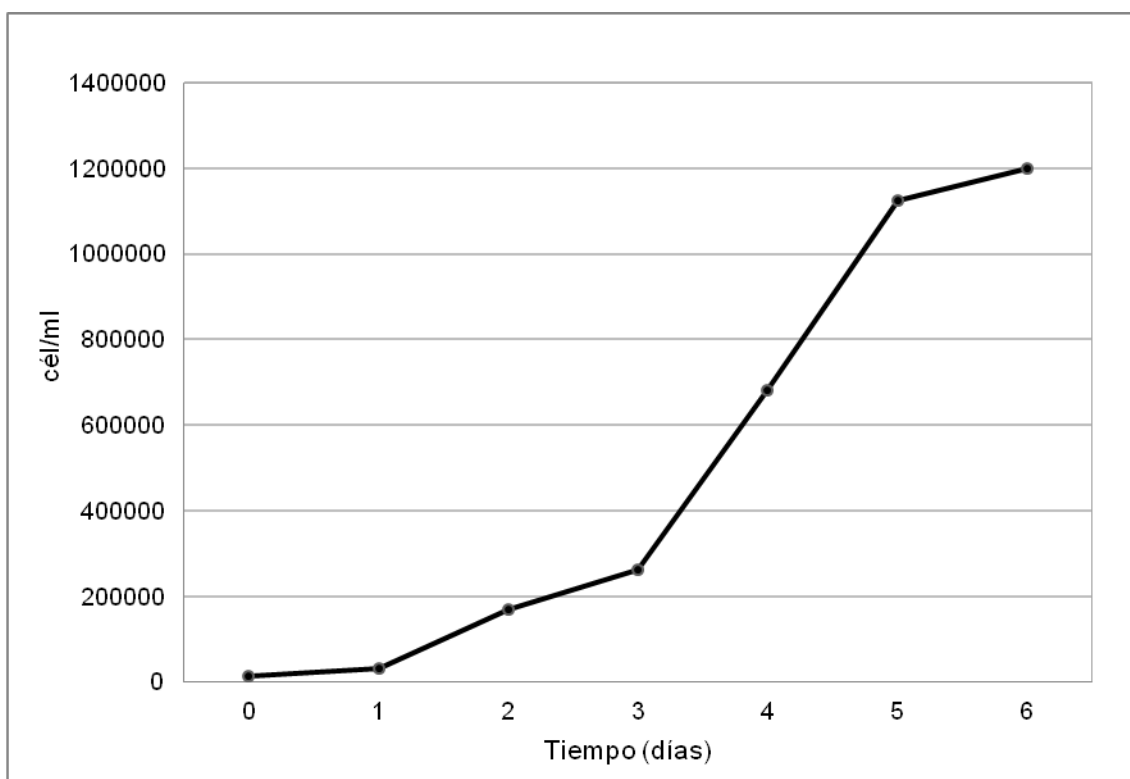


Fig 17. Curva de crecimiento de *Dunaliella salina* cultivada en Johnson Modificado 1.5 M.

**Tabla 13 . Recuento celular.** Concentración celular,  $\ln$  y tasa de crecimiento ( $\mu_2$ ), de un cultivo de *Dunaliella salina* en medio Johnson Modificado a 1.5M

Día	N (cél/ml)	Ln N	Tasa de crecimiento ( $\mu_2$ )
0	14950	9.612	--
1	33400	10.416	1.597
2	171200	12.05	2.3577
3	262550	12.478	0.6169
4	681850	13.432	1.3768
5	1123750	13.932	1.3494
6	1198720	13.996	1.3287

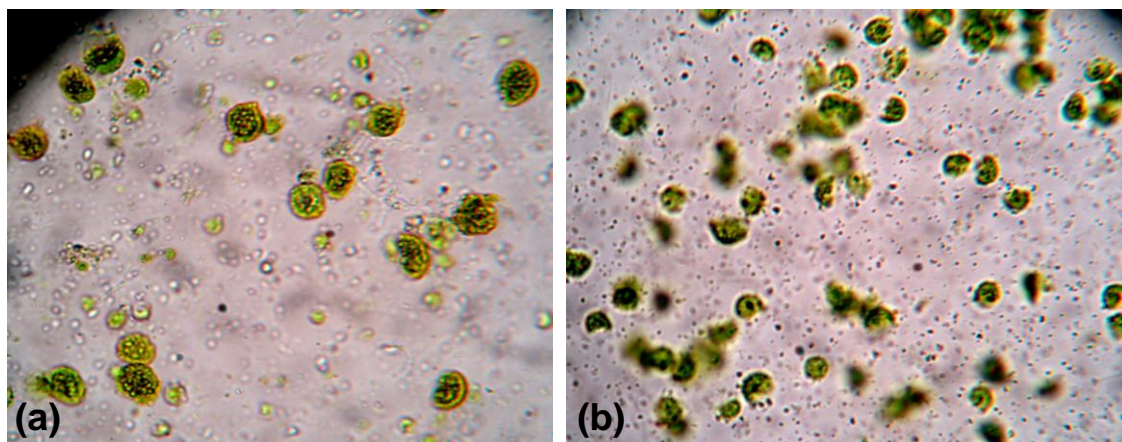
## 2. Extracción de DNA total de *Dunaliella*

De los tres métodos probados para obtener DNA de *Dunaliella*, que nos permitiera amplificar regiones del genoma del cloroplasto, los resultados del aislamiento de cloroplastos no fueron los esperados, ya que no se logró extraer DNA eficientemente (Fig.18). Además, estas técnicas son más costosas y meticulosas por los reactivos que se utilizan. Con la extracción de DNA total por medio de CTAB, se lograron amplificar regiones del genoma del cloroplasto eficientemente. Por lo tanto, se decidió utilizar este método para realizar todas las extracciones de DNA requeridas.

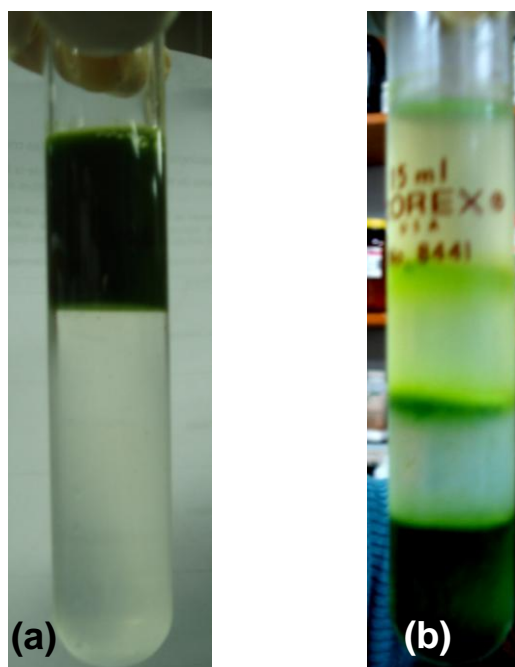
### 2.1 Aislamiento de cloroplastos por gradiente de Percoll

Para lisar a las microalgas por ósmosis, se lavaron con buffer de sucrosa a 0.1 M y después en un buffer sin sucrosa. Como se observa en la Fig.19 las células no se lograron romper completamente. Después del lisado, las células se colocaron en un gradiente de Percoll (60/40/20%) y se centrifugaron a 4,200g, después de la centrifugación fue difícil la recuperación de los

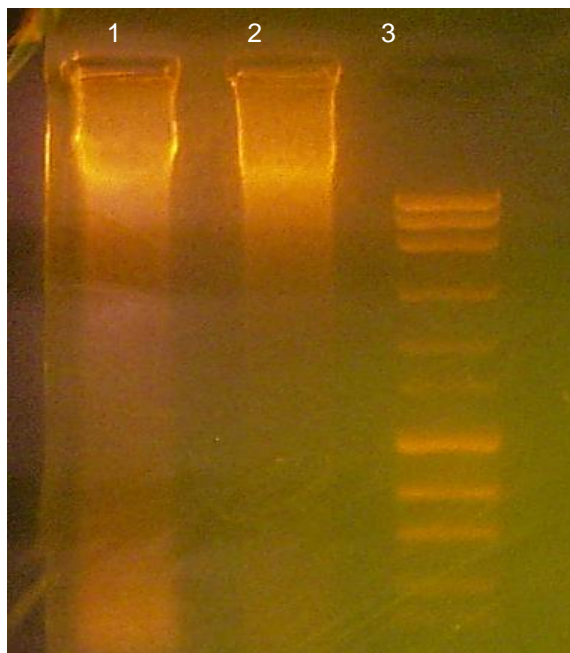
cloroplastos (interfase entre 40-60%), utilizando con una pipeta de punta fina (Fig. 20)



**Fig. 19 Rompimiento de microalgas por ósmosis con sucrosa.** (a) Células enteras, al primer lavado de buffer con sucrosa. (b) Apenas se observa lisis celular, después de la incubación con buffer sin sucrosa.



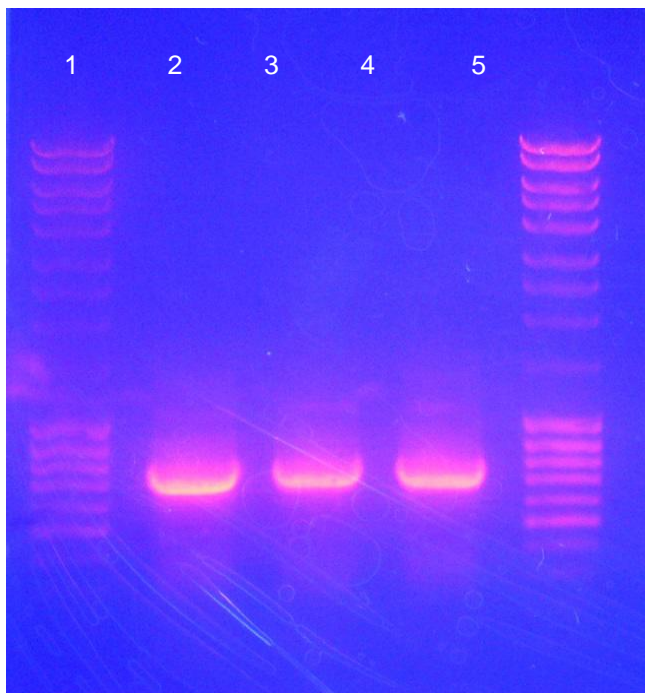
**Fig.20 Gradiente de Percoll (60/40/20%)**  
 (a) Suspensión de microalgas lisadas con sucrosa colocadas en el gradiente de Percoll. (b) Después de la centrifugación se observa la separación de cloroplastos (interfase 40-60%) y tilacoides (interfase 20-40%).



**Fig.21** Extracción de DNA de cloroplasto de *D. salina* por el método de sucrosa y Percoll. (1-2) DNA cloroplasto. (3) Marcador de peso molecular de 1 Kb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

### **3. Extracción de DNA total de *Dunaliella salina***

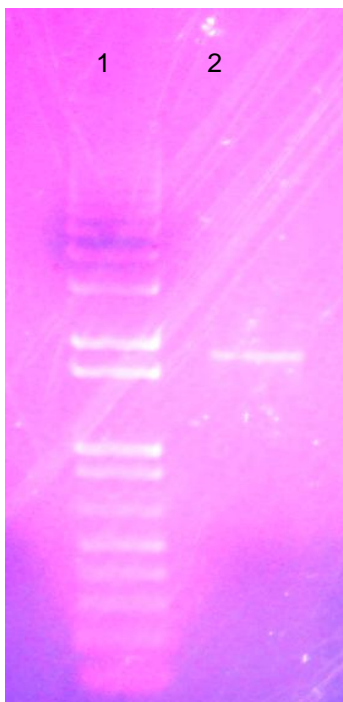
Para conocer la calidad del DNA total extraído, se amplificó una región del genoma del cloroplasto de la región intergénica *psaA-psbA* de 680 pb (Fig. 22)



**Fig.22** Amplificación la región intergénica *psaA-psbA* a partir del DNA total de *D. salina* extraído con CTAB. (1 y 5) Marcador de peso molecular de 10Kb. (2-4), fragmento de RI de 680pb. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

#### 4. Identificación molecular de *Dunaliella salina* de San Quintín B. C

Para la identificación, se utilizaron los primers conservados MA1 y MA2, los cuales se sabe que para la especie *D. salina*, amplifican un tamaño de 1,770pb. El tamaño obtenido corresponde al reportado para la especie (Fig.23)



**Fig.23** Identificación del 18s rDNA de *D. salina*. (1) Marcador de peso molecular de 1 Kb. (2), Amplificación con los primers MA1 y MA2 (1,770 pb). Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

## 5. Secuenciación de la región 18S rDNA

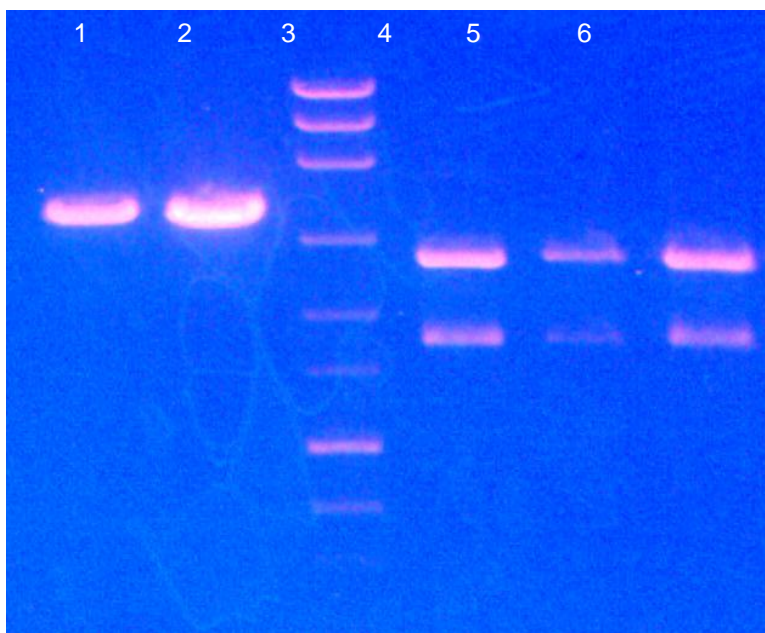
Se secuenció (Eton Bioscience) el producto de PCR obtenido de la amplificación del 18S rDNA de la cepa de San Quintín, con los primers MA1 y MA2. La secuencia enviada se comparó con la de *D. salina* (M84320), la cual fue una de las secuencias de *Dunaliella* sp. con la cual se basaron para el diseño de los primers. (Fig. 24).





## 6. Transformación del vector pUC57-HA en DH5 $\alpha$

Para comprobar la transformación del vector pUC57-HA en células DH5 $\alpha$ , se realizó una digestión con las enzimas NcoI y PstI, las cuales flanquean la secuencia de la proteína HA y que se utilizaron para insertar HA al vector pUC57 que contiene el promotor *atpA* y los UTRs. La digestión fue observada en un gel de agarosa al 1% (Fig. 27)



**Fig. 27 Digestión enzimática de pUC57-HA con NcoI y PstI.** (1-2) pUC57-HA sin cortar. (3) Marcador de peso molecular de 1Kb. (4-6) Fragmento de HA (1754) y pUC57 (2,710 pb). Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

## 7. Ligación de HA con promotor *atpA* y UTRs

Se probó la integración de HA al vector pUC57 que contiene el promotor *atpA* y los UTRs, en *E. coli* DH5 $\alpha$ , la cual se realizó por medio de una digestión con las enzimas de restricción NcoI y PstI, observando el peso molecular en un gel de agarosa al 1%. Se obtuvieron dos fragmentos, uno de 1,754 pb correspondientes a HA y otro de 3,666 pb correspondientes al vector pUC57 (Fig.28 ).



## 8. Obtención de la secuencia homóloga *psbA*

La secuencia homóloga basada en el gen *psbA*, se obtuvo con los primers FD1EcoRI y RD1XbaI, a partir de DNA total de *D. salina*. Se obtuvo el tamaño esperado de 838 pb (Fig. 30)

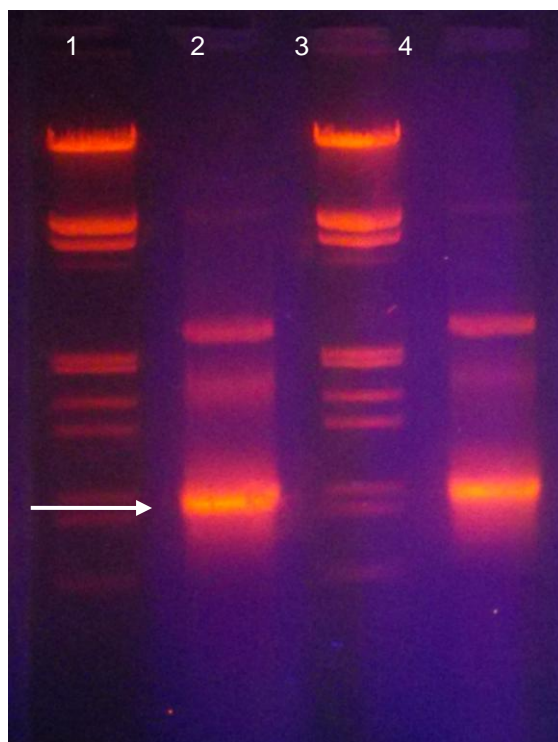
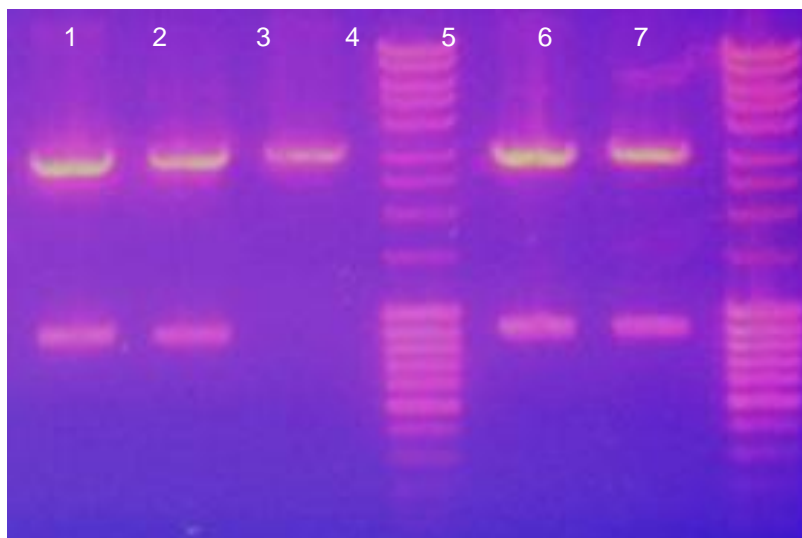


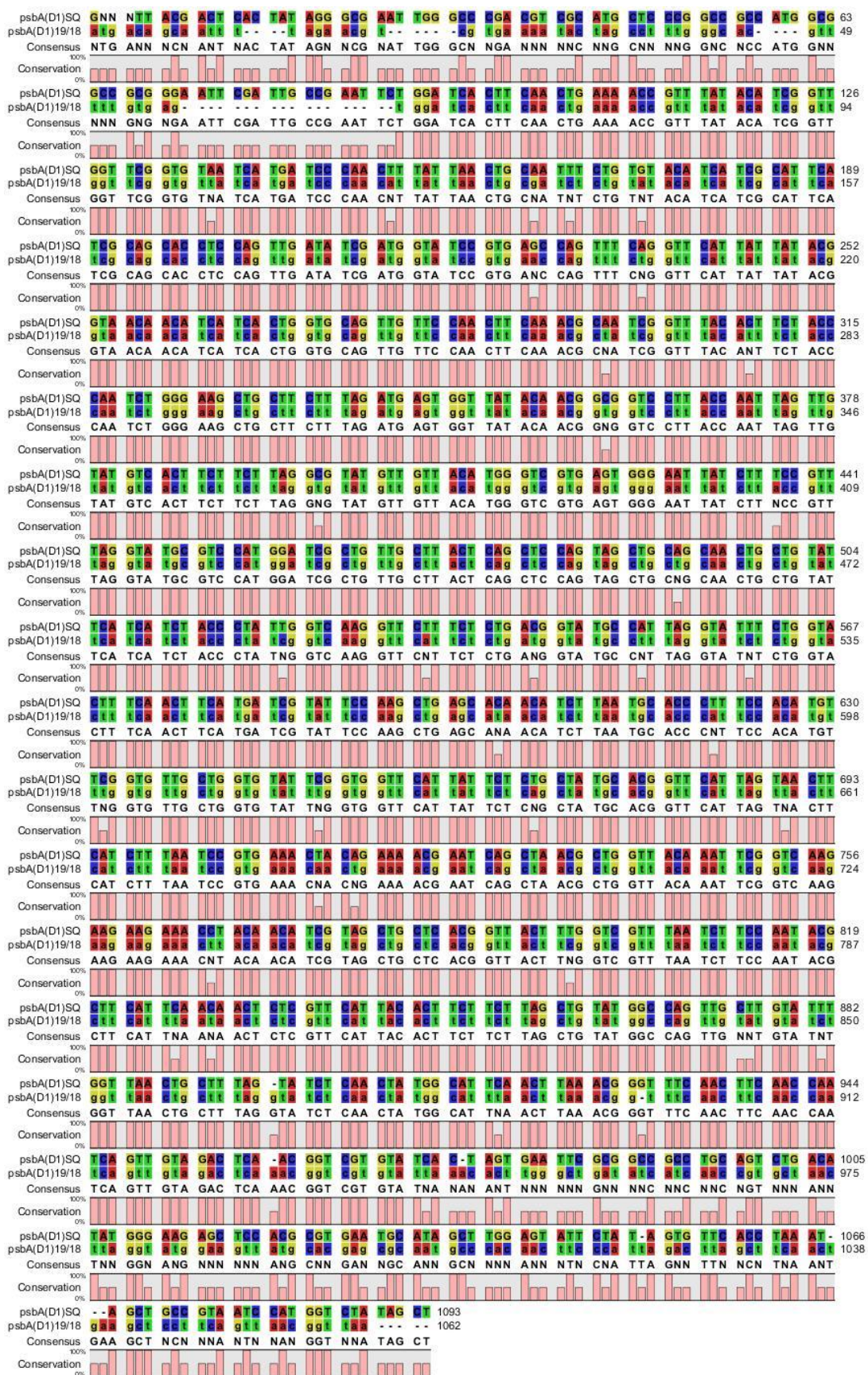
Fig.30 Amplificación de la secuencia homóloga *psbA*, con los primers FD1EcoRI y RD1XbaI. (1 y 3). Marcador molecular 1Kb. (2 y 4) Fragmento de 838 pb (flecha) correspondiente a la región de *psbA*. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.



**Fig.31** Digestión del vector pGEM-T easy-*psbA* con *EcoRI* y *XbaI*. (1, 2, 5 y 6) Clonas de bacterias que contienen el vector pGEM T-easy (3015pb) y *psbA* (838pb). (3) Muestra clona negativa a la ligación. (4 y 7). Marcador de peso molecular de 1Kb. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

### 7.1 Secuenciación de pGEM-T easy-*psbA*

Una de las clonas que contenían la ligación de pGEM-T easy-*psbA*, se envió a secuenciar a Eton Bioscience con los primers estándares M13 F y M13 R. La secuencia enviada se alineó con la secuencia de *psbA* (proteína D1) de *D. salina* 19/18 (GQ250046.1) (Fig. 32). Al hacer la traducción a proteína, se observó que la secuencia de aminoácidos se conserva.



## 9. Obtención de la secuencia homóloga *psaA*

La secuencia homóloga basada en la región intergénica de *psaA* y *psbA*, se obtuvo mediante la amplificación con los primers rrfwd28 y rrrev28, usando como template DNA total. El fragmento que se obtuvo fue de 1,017 pb (Fig. 34), el cual se ligó al vector pGEM T-easy. Para comprobar la ligación, se hizo una digestión con la enzima PstI (Fig. 35)

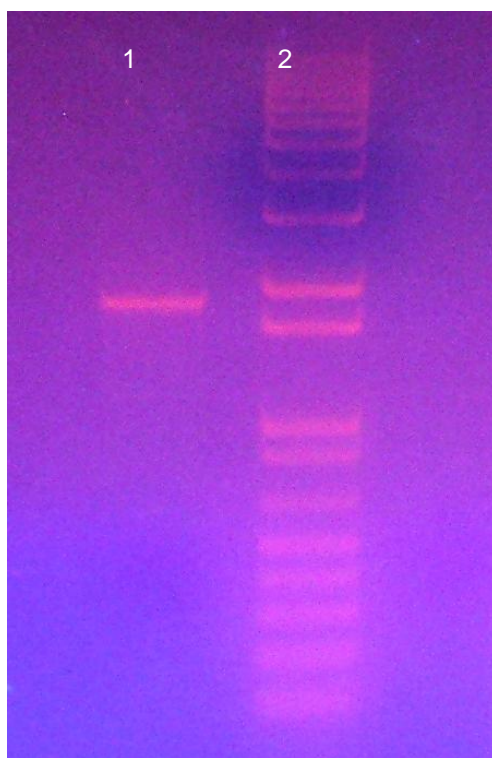
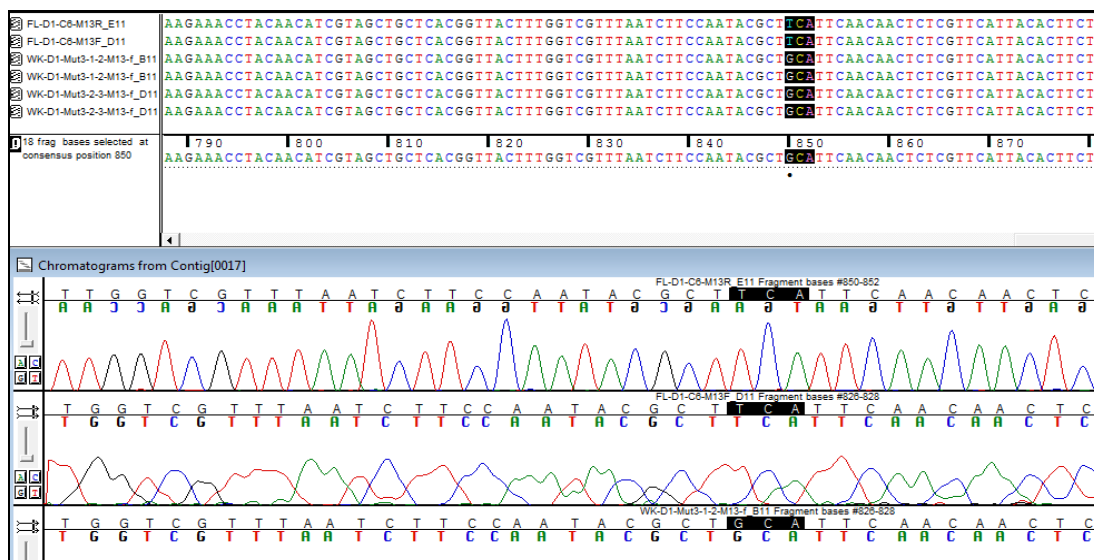


Fig.34 Amplificación de la secuencia homóloga *psaA*, con los primers rrfwd28 y rrrev28. (1) Fragmento de 1,070 pb correspondiente a la región de *psaA*. (2) Marcador molecular 1Kb. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

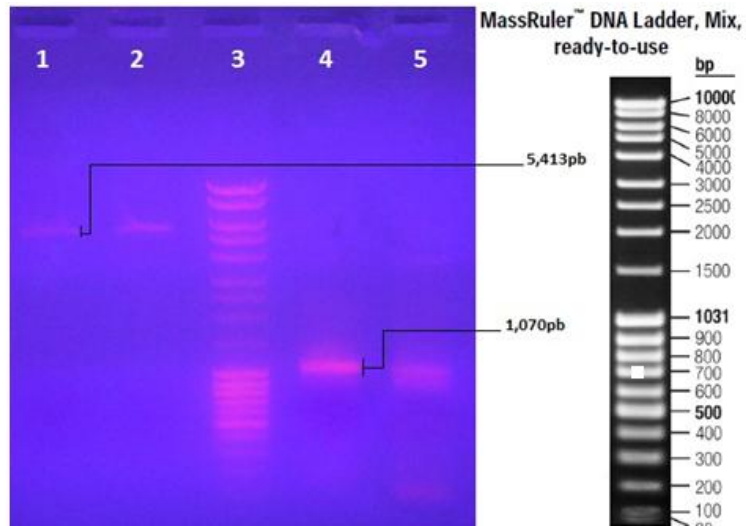
## 10. Mutación puntual S264A en el gen *psbA* para resistencia a atrazina

Se hizo una mutación puntual mediante PCR, en el aminoácido Serina, posición 264, y se sustituyó por Alanina utilizando los primers D1fwd y D1rev en la secuencia del gen *psbA* (D1). Las bacterias que crecieron, después de la transformación con el vector mutado, se secuenciaron para comprobar la mutación (Fig. 36)



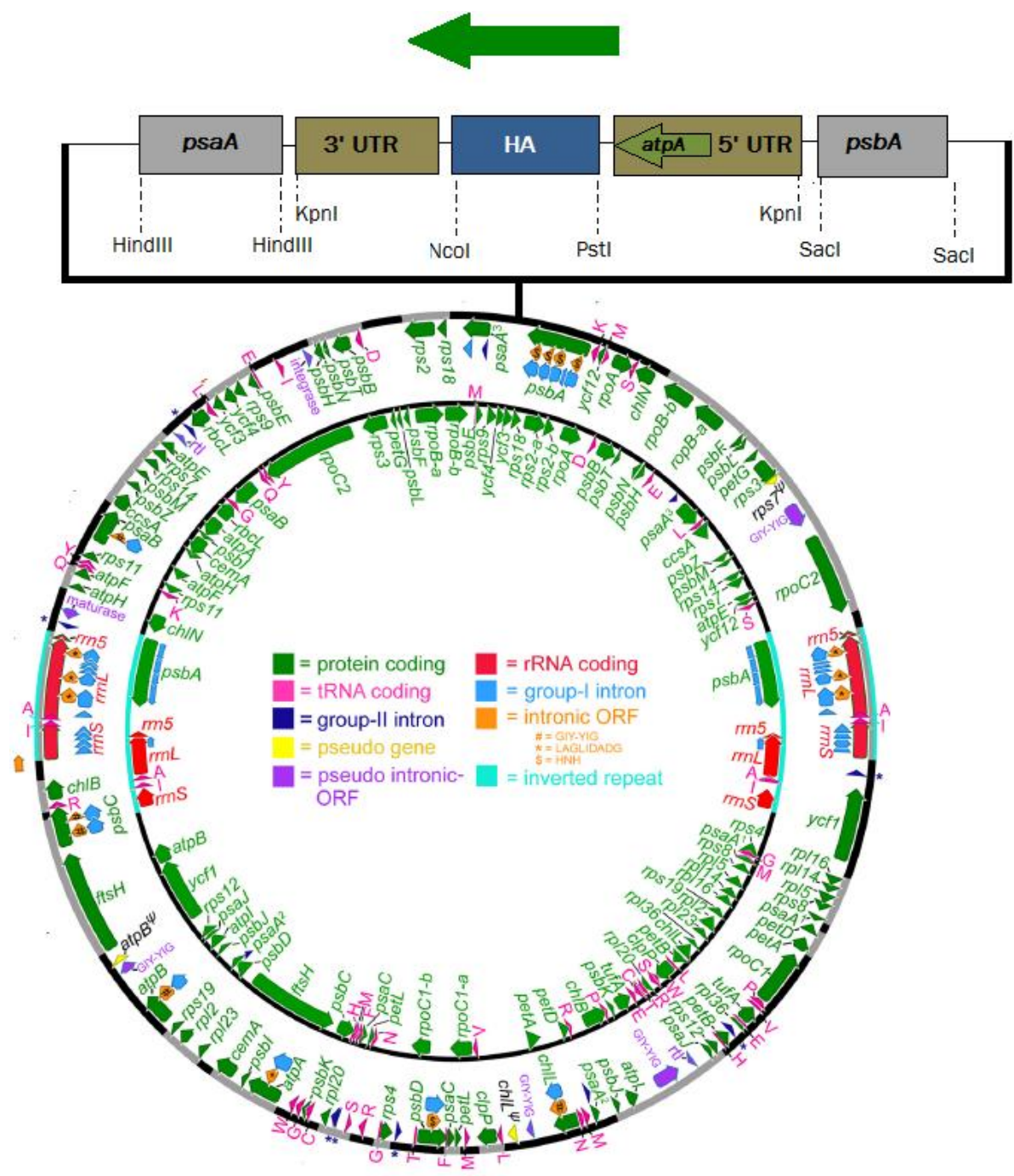
**Fig.36** Cromatograma que muestra la secuenciación doble hebra de *psbA* (renglones 1 y 2) comparada con las secuencias mutadas (renglones 3-6). Subrayado en negro, se indica la mutación (cambio de TCA a GCA).





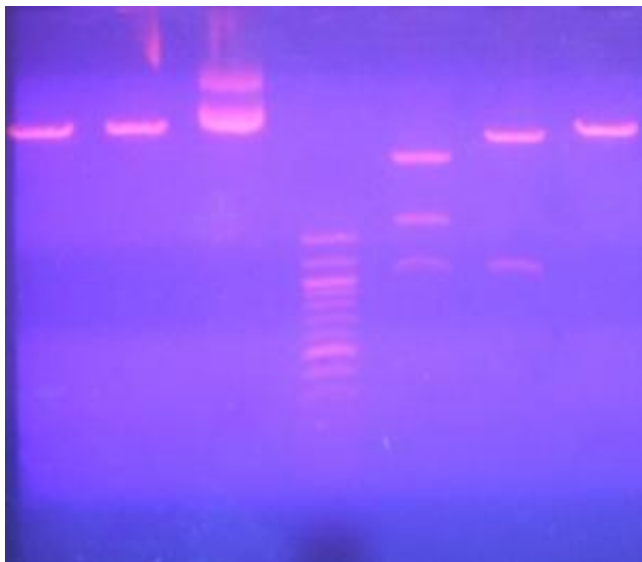
**Fig. 38** Se muestra la linealización del vector pUC57-HA UTRs con HindIII. Marcador molecular. 4-5 Amplificación de *psaA*

**11. Ligación de secuencias homólogas al vector *puc57-atpA-HA*: *Construcción del cassette de expresión de HA***



**Fig. 39** Genoma del cloroplasto de *Dunaliella salina*. Dentro del triángulo se observan los genes *psaA* y *psbA*. Imagen tomada de Fuente original: Smith et al, 2010.

Se logró la transformación, crecieron aproximadamente 100 colonias en LB con ampicilina. De las colonias que crecieron se rastrearon primero 10 colonias, a las cuales se les extrajo DNA y se realizó una digestión con HindIII para liberar el inserto (Fig. 40). Aunado a esto, se envió a secuenciar el fragmento ligado con los primers M13 R y rrfwd28. Estos primers se unen al vector en el sitio de clonación y a la región 5' de *psaA*, respectivamente.



**Fig. 40** Digestión del vector *atpA-HA* completo. (1 y 2) Digestión con *Scal* (lineariza al vector), enzima interna del *psbA*. (3) Vector sin digerir. (4) Marcador molecular de 100pb. (5) Digestión con *PstI* y *NcoI*, se observa la HA (1,744), UTRs y pUC57. (6) Digestión con *HindIII*, se observa *psaA* (1,071 pb). (7) Digestión con *SacI* (lineariza el vector).

## 12. Ensayo de sensibilidad de *Dunaliella salina* a atrazina

Los resultados mostraron que a partir de una concentración de 200µg/L de atrazina, el número de células disminuye drásticamente comparado con el control sin atrazina y el control con acetona al 0.1%. Ambos controles presentaron un patrón de crecimiento muy similar entre sí. (Fig. 41). Lo cual nos indica que *D. salina* es sensible al herbicida y que puede ser utilizado como un medio de selección para microalgas transformadas.



**Fig.** Cultivo de *D. salina* al primer día de exposición a atrazina. De izquierda a derecha: Control con acetona a 0.1%, control sin acetona,  $50\mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $100\mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $200\mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $400\mu\text{g.L}^{-1}$  y  $800\mu\text{g.L}^{-1}$ .



**Fig. 41** Cultivo de *D. salina* a las 120 de exposición a atrazina. De izquierda a derecha: Control con acetona a 0.1%, control sin acetona,  $50\mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $100\mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $200\mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $400\mu\text{g.L}^{-1}$  y  $800\mu\text{g.L}^{-1}$ .

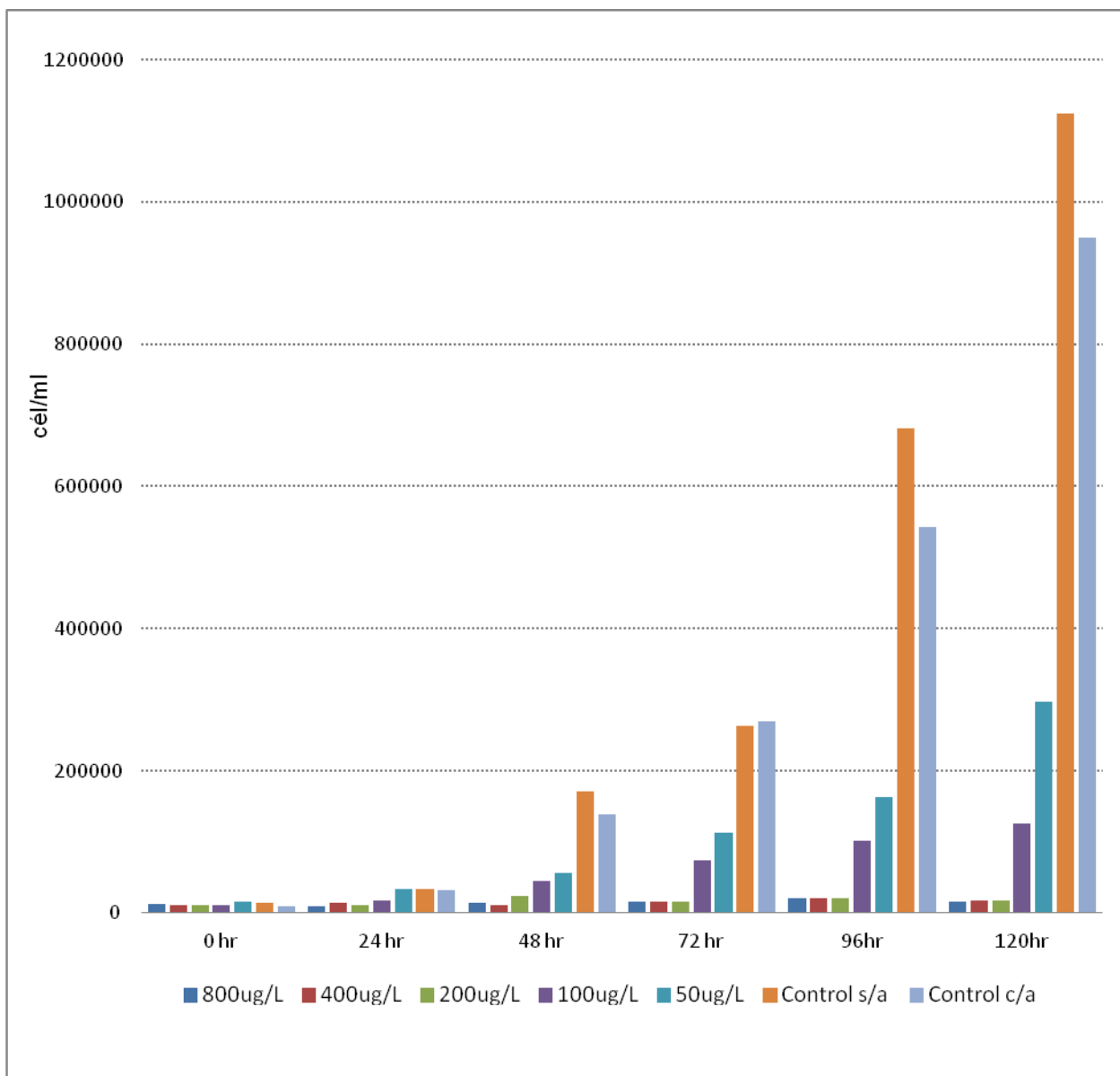


Fig. 42 Crecimiento (cél/ml) de *Dunaliella salina* a diferentes concentraciones de atrazina (50-800 µg/L) en medio Johnson Modificado a 1.5M, en un periodo de 120 horas.

## LITERATURA CITADA

1. **Aguilar-Yáñez JM**, Portillo-Lara R, Mendoza-Ochoa GI, Garcia-Echauri SA, López-Pacheco F, Bulnes-Abundis D, Salgado-Gallegos J, Lara-Mayorga I, Webb-Vargas Y, León-Angel F, Rivero-Aranda R, Oropeza-Almazán Y, Ruiz-Palacios G, Zertuche-Guerra M, DuBois R, White S, Schultz S, Russell C, Alvarez M. 2010. **An Influenza A/H1N1/2009 Hemagglutinin Vaccine Produced in *Escherichia coli***. PLoS ONE 5(7): e11694.
2. **Athmaram T.**, Saraswat S, Santhosh S, Singh A, Suryanarayana W., Priya R, Gopalan N, Parida M, Lakshmana P, Vijayaraghavan R. 2011. **Yeast expressed recombinant Hemagglutinin protein of Novel H1N1 elicits neutralizing antibodies in rabbits and mice**. Virology Journal 8:524.
3. **Barnes D**, Franklin S, Schultz J, Henry R, Brown E, Coragliotti S, Mayfield S. P. 2005. **Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast Genes**. Molecular Genetics and Genomics. 274:625-636.
4. **Bañares LR**, Ballester DG., Galván A. y Fernández E. 2004. **Transgenic microalgae as green cell-factories**. TRENDS in Biotechnology. 22 (1): 45-52.
5. **Bommakanti G**, Citron MP, Hepler RW, Callahan C, Heidecker GJ, Najjar TA, Lu X, Joyce JG, Shiver JW, Casimiro DR, Meulen J, Liang X, Varadarajan R. 2010. **Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge**. PNAS. 107(31):13701-6.
6. **Borowitzka MA y Borowitzka LJ**. 1988. ***Dunaliella***. Borowitzka MA y Borowitzka LJ (Ed.). Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 27-58.
7. **Chai XJ**, Chen HX, Xu WQ, Xu YW. 2011. **Expression of soybean Kunitz trypsin inhibitor gene SKTI in *Dunaliella salina***. Journal of Applied Phycology.
8. **Chai Y**, Lu Y, Wang T, Hou W, Xue L. 2006. **Heterologous gene expression driven by carbonic anhydrase gene promoter in *Dunaliella salina***. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 24(4):352-357.

9. **Chen H**, Jian JG. 2009. **Osmotic responses of Dunaliella to the changes of salinity**. Journal of Cellular Physiology. 219(2):251-8.
10. **Chen Y**, Wang Y, Sun Y, Zhang L, Li W. 2001. **Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells**. Current Genetics 39:365-370.
11. **Chow KC** y Tung WL. 1999. **Electrotransformation of *Chlorella vulgaris***. Plant Cell Reports. 18:778-780.
12. **Cifuentes AS**, Gonzalez M, Parra O, Zuñiga M. 1996. **Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio**. Revista Chilena de Historia Natural. 69:105-112.
13. **Coll JM**. 2006. **Review. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae**. Spanish Journal of Agricultural Research. 4(4):316-330.
14. **Dae-Hyun K**, Young TK, Jung JC, Jin-Hee B, Sung-Bum H, Inhwan H, Tae-Jin C. 2002. **Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea***. Marine Biotechnology. 4:63-73.
15. **DasSarma S**, Arora P. 2001. **Halophiles**. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing. 1-9.
16. **Dawood FS**, Iulinano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, Bandaranayake D, Breinman RF, Brooks WA, Buchy P, Feikin DR, Fowler KB. 2012. **Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study**. The Lancet Infectious Diseases. 12(9):687-95.
17. **Ekiert DC**, Bhabha G, Elsliger M, Friesen RH, Jongeneelen M, Throsby M, Goudsmit J, Wilson IA. 2009. **Antibody Recognition of a Highly Conserved Influenza Virus Epitope**. Science. 324:246-251.
18. **Erickson JM**, Rahire M, Bennoun P, Delepelaire P, Diner B, Rochaix JD. 1984. **Herbicide resistance in *Chlamydomonas reinhardtii* results from a mutation in the chloroplast gene for the 32-kilodalton protein of photosystem II**. Proceedings of the National Academy of Sciences. 81:3617-3621.
19. **Feng S**, Xue L, Liu H, Lu P. 2009. **Improvement of efficiency of genetic transformation *Dunaliella salina* by glass beads method**. 36:1433-1439.

20. **Fletcher F**, Muto M, Mayfield S, 2007. **Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green algae**. León, R, Galván A. y Fernández E. (ed). Advances in Experimental Medicine and Biology, Volume 616. Transgenic Microalgae as Green Cell Factories. Springer Science +Business Media. New York; 90-98.
21. **Franklin S**, Ngo B, Efué E, Mayfield SP. 2002. **Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast**. The Plant Journal. 30(6): 733-744.
22. **Geng D**, Ha Y, Wang YQ, Wang P, Zhang LM, Li WB, Sun YR. 2004. **Construction of a system for the stable expression of foreign genes in *Dunaliella salina***. Acta Botanica Sinica. 46 (3): 342-346.
23. **Geng D**, Wang Y, Wang P, Li W, Sun Y. 2003. **Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta)**. Journal of Applied Phycology. 15: 451-456.
24. **Griesbeck C**, Kirchmayr A. 2012. **Algae: an alternative to the higher plant system in gene farming**. Wang A y Ma S (Ed). Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects. Springer Netherlands. 125-143 pp.
25. **Hawkins RL**, Nakamura M. 1999. **Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella***. Current Microbiology. 38:335-341.
26. **Hejazi MA**, Barzegari A, Gharajeh NH, Hejazi MS. 2010. **Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella***. Saline Systems. 6:4.
27. **Johanningmeier U** y Heiss S. 1993. **Construction of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant with an intronless psbA gene**. Plant Molecular Biology. 22:91-99.
28. **Khurana S**, Verma S, Verma N, Crevar CJ, Carter DM, Manischewitz J, King LR, Ross TM, Golding H. 2010. **Properly folded bacterially expressed H1N1 hemagglutinin globular head and ectodomain vaccines protect ferrets against H1N1 pandemic influenza virus**. Plos One. 5 (7):e11548.
29. **Lapidot M**, Raveh D, Sivan A, Arad S, Shapira M. 2002. **Stable chloroplast transformation of the unicellular red alga *Porphyridium* species**. Plant Physiology. 129:7-12.

30. **Manuell AL**, Beligni MV, Elder JH, Siefker DT, Tran M, Weber A, McDonald TL, Mayfield SP. 2007. **Robust expression of a bioactive mammalian protein in Chlamydomonas chloroplast.** Plant Biotechnology Journal 3:402-412.
31. **Marín-Navarro J**, Manuell AL, Wu J, Mayfield SP. 2007. **Chloroplast translation regulation.** Photosynthesis Research 94:359-374.
32. **Mason CB**, Bricker TM, Moroney JV. 2006. **A rapid method for chloroplast isolation from the green alga Chlamydomonas reinhardtii.** Nature Protocols. 1 (5):2227-30
33. **Mayfield SP**, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Muto M, Marin-Navarro J. 2007. **Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts as protein factories.** Current Opinion in Biotechnology. 18:1–8
34. **Mayfield SP** y Franklin S. 2005. **Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae.** Vaccine. 23:1828-1832.
35. **Medina R**, Manicassamy B, Stertz S, Seibert C. W, Hai R, Belshe RB, Frey SE, Basler CF, Palese P, García-Sastre A. 2010. **Pandemic 2009 H1N1 vaccine protects against 1918 Spanish influenza virus.** Nature Communications. 1(3): 1-6.
36. **Nakamura Y**, Gojobori T, Ikemure T. 1999. **Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000.** Nucleic Acids Research. 28 (1): 292.
37. **Neumann G**, Noda T, Kawaoka Y. 2009. **Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus.** Nature. 459(7249):931-9.
38. **Ohad N** y **Hirschberg J**. 1990. **A similar structure of the herbicide binding site in photosystem II of plants and cyanobacteria is demonstrated by site mutagenesis of the psbA gene.** Photosynthesis Research. 23:73-79.
39. **Olmos J**, Ochoa L, Paniagua-Michel J, Contreras R. 2009. **DNA fingerprinting differentiation between  $\beta$ -carotene hyperproducer strains of Dunaliella from around the world.** Saline Systems. 5:5.
40. **Olmos J**, Paniagua J, Contreras R. 2000. **Molecular identification of Dunaliella sp. utilizing the 18S rDNA gene.** Letters in Applied Microbiology. 30:80-84.
41. **Oren A**. 2005. **A hundred years of Dunaliella research: 1905-2005.** Saline Systems. 1:2.

42. **Potvin G**, Zhang Z. 2010. **Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review**. *Biotechnology advances*. 28(6):910-918.
43. **Powles SB** y Yu Q. 2010. **Evolution in action: plants resistant to herbicides**. *Annual Review of Plant Biology*. 61:317-47.
44. **Przibilla E**, Heiss S, Johanningmeier U Trebst A. 1991. **Site-specific mutagenesis of the D1 subunit of photosystem II in wild-type Chlamydomonas**. *The Plant Cell*. 3:169-174.
45. **Purton S**. 2007. **Tools and techniques for chloroplast transformation of Chlamydomonas**. León, R, Galván A, Fernández E. (Ed). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 616. *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. Springer Science +Business Media. New York.
46. **Ramos A**, Polle J, Tran D, Cushman J, EonSeon J, Varela C. 2011. **The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives**. *Algae*. 26(1):3-20.
47. **Rasala BA**, Muto M, Lee PA, Jager M, Cardoso RM, Behnke CA, Kirk P, Hokanson CA, Crea R, Mendez M, Mayfield SP. 2010. **Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii***. *Plant Biotechnology*. 8(6):719-733.
48. **Rodríguez-Valero M**, Prado-Calleros H, bravo-escobar GA, Valdéz-Vázquez RR, Figueroa-Moreno R. **Características clínicas de la nueva epidemia de influenza A (H1N1)**. *An Orl Mex* 2011;56(2):82-89.
49. **Rosales-Mendoza S**, Paz-Madonado LM, Soria-Guerra RE. 2012. ***Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins**. *Plant Cell Reports* 31(3): 479-494.
50. **Schnitzler S**, Schnitzler P. 2009. **An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review**. *Virus Genes*. 39:279-292.
51. **Shariati M**, Hadi MR. 2011. **Microalgal biotechnology and bioenergy in *Dunaliella***. Carpi A (Ed). *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech. 646 pp.

52. **Shoji Y**, Chichester JA, Jones M, Manceva SD, Damon E, Mett V, Musiychuk K, Bi H, Farrance C, Shamloul M, Kushnir N, Sharma S, Yusibov V. 2011. **Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza.** Human Vaccines. 7:41-50.
53. **Shuying F**, Lexun X, Hongtao L, Pengju L. 2009. **Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method.** Molecular Biology Reports. 36: 1433-1439.
54. **Smith DR**, Lee RW, Cushman JC, Magnuson JK, Tran D & Polle JEW. 2010. **The *Dunaliella salina* organelle genomes: Large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA.** BMC Plant Biology 10: 83.
55. **Specht E**, Miyake-Stoner S, Mayfield S. 2010. **Micro-algae come of age as platform for recombinant protein production.** Biotechnology Letters. 32:1373-1383.
56. **Surzycki R**, Greenham K, Kitayama K, Dibal F, Wagner R, Rochaix J, Ajam T, Surzycki S. 2009. **Factors effecting expression of vaccines in microalgae.** Biologicals. 37:133-138.
57. **Tan C**, Qin S, Zhang Q, Jiang P, Zhao F. 2005. **Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for *Dunaliella salina*.** The Journal of Microbiology. 363:365.
58. **Tawfiq S**, Suad AH y Dangly AJ. 2010. **Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*.** Journal of algal biomass utilization. 1(2):12-19.
59. **Yoshida R**, Igarashi M, Ozaki H, Kishida N, Tomabechei D, Kida H, Takada A. 2009. **Cross-protective Potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of Influenza A viruses.** PLoS Pathogens. 5(3).
60. **Zhang Y**, Yu Z, Xin L, Chen Y, Tang Q, Chen Q, Shu Y. 2010. **Expression of the hemagglutinin and neuraminidase gene of influenza A virus H1N1 in *Pichia methanolica*.** Chinese Journal of Biotechnology. 26(8):1068-73
61. **Zachleder V**, Kuptsova ES, Los DA, Cepak V, Kubin S, Shapizugov JM, Semenenko E. 1989. **Division of chloroplast nucleoids and replication of chloroplast DNA during the cell cycle of *Dunaliella salina* grown under blue and red light.** Protoplasma. 150:160-167.

**Referencias en Internet**

1. World Health Organization. FluNet, Influenza virus detections:  
[http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/flunet/charts/en/index.html](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/charts/en/index.html)
2. Influenza Update No 66. World Health Organization. 17 August 2012:  
[http://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/updates/2012\\_08\\_17\\_surveillance\\_update\\_166.pdf](http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2012_08_17_surveillance_update_166.pdf)
3. Codon Usage Database: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>
4. Influenza virus A: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/6.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/6.html)

## Anexo I

### Medio de cultivo Johnson Modificado

1. Para preparar medio Johnson Modificado a 1.5M, se pesaron 87.66 gr de NaCl y 4.35 gr NaHCO<sub>3</sub> de acuerdo a su concentración final en la Tabla I y se disolvieron en un volumen de 800ml. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos.
2. Al enfriar, se agregaron las soluciones stock de acuerdo a la Tabla I y se aforó a 200 ml.
3. La solución se hizo pasar en una jeringa ensamblada a un filtro PVDF Millipore® de 0.22µM y se agregaron al medio previamente estéril aforando a 1 litro.

Compuesto	Solución stock	Concentración final
NaCl	-	1.5M
NaHCO <sub>3</sub>	-	50mM
KNO <sub>3</sub>	100mM	10mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50mM	5mM
CaCl <sub>2</sub>	100mM	0.2mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50mM	0.4mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100mM	185µM
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	100mM	7µM
Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8)	10mM	5µM
FeCl <sub>3</sub>	36mM	2µM
ZnCl <sub>2</sub>	37mM	1µM
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8.4mM	1µM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	1mM	1µM
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100mM	1 µM

Tabla I. Composición del medio Johnson Modificado (Borowitzka, 1988)



### Anexo 3

Secuencia de Hemaglutinina (segmento 4) de A/Mexico/ A/Mexico/4486/2009(H1N1) (GQ149623.1) en donde se muestran las secuencias del péptido señal, HA1 y HA2.

MKAILVLLYTFATANADTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLEDKHNGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAGW  
ILGNPECESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVTAACP  
HAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEI  
AIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPKGAINSTLP  
FQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNVPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADLKST  
QNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNL  
YEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVAS  
SLVLVSLGAISFWMCSNGSLQCRICI

Péptido señal

HA1

HA2

## Anexo 4

TCG CGC GTT TCG GTG ATG ACG GTG AAA ACC TCT GAC ACA TGC AGC TCC CGG AGA CGG TCA CAG CTT GTC TGT AAG CGG  
 80 100 120 140  
 ATG CCG GGA GCA GAC AAG CCC GTC AGG GCG CGT CAG CGG GTG TTG GCG GGT GTC GGG GCT GGC TTA ACT ATG CGG CAT  
 160 180 200 220  
 CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAG TGC ACC ATA TGC GGT GTG AAA TAC CGC ACA GAT GCG TAA GGA GAA AAT ACC GCA TCA  
 240 260 280 300  
 GGC GCC ATT CGC CAT TCA GGC TGC GCA ACT GTT GGG AAG GGC GAT CGG TGC GGG CCT CTT CGC TAT TAC GCC AGC TGG  
 320 340 360 380  
 CGA AAG GGG GAT GTG CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGG  
 400 420 440 460  
 CCA GTG AAT TCG AGC TGT GGA TCA CTT CAA CTG AAA ACC GTT TAT ACA TCG GTT GGT TCG GTG TAA TCA TGA TCC CAA  
 480 500 520 540  
 CTT TAT TAA CTG CAA TTT CTG TGT ACA TCA TCG CAT TCA TCG CAG CAC CTC CAG TTG ATA TCG ATG GTA TCC GTG AGC  
 560 580 600 620  
 CAG TTT CAG GTT CAT TAT TAT ACG GTA ACg ACA TCA CTG GTG CAG TTG TTC CAA CTT CAA ACG CAA TCG GTT TAC  
 640 660 680 700  
 ACT TCT ACC CAA TCT GGG AAG CTG CTT CTT TAG ATG AGT GGT TAT ACA ACG GCG GTC CTT ACC AAT TAG TTG TAT GTC  
 720 740 760 780  
 ACT TCT TCT TAG GCG TAT GTT GTT ACA TGG GTC GTG AGT GGG AAT TAT CTT TCC GTT TAG GTA TGC GTC CAT GGA TCG  
 800 820 840  
 CTG TTG CTT ACT CAG CTC CAG TAG CTG CAG CAA CTG CTG TAT TCA TCA TCT ACC CTA TTG GTC AAG GTT CTT TCT CTG  
 860 880 900 920  
 ACG GTA TGC CAT TAG GTA TTT CTG GTA CTT TCA ACT TCA TGA TCG TAT TCC AAG CTG AGC ACA ACA TCT TAA TGC ACC  
 940 960 980 1,000  
 CTT TCC ACA TGT TCG GTG TTG CTG GTG TAT TCG GTG GTT CAT TAT TCT CTG CTA TGC ACG GTT CAT TAG TAA CTT CAT  
 1,020 1,040 1,060 1,080  
 CTT TAA TCC GTG AAA CTA CAG AAA ACG AAT CAG CTA ACG CTG GTT ACA AAT TCG GTC AAG AAG AAA CCT ACA ACA  
 1,100 1,120 1,140 1,160  
 TCG TAG CTG CTC ACG GTT ACT TTG GTC GTT TAA TCT TCC AAT ACG CTG CAT TCA ACA ACT CTC GTT CAT TAC ACT TCT  
 1,180 1,200 1,220 1,240  
 TCT TAG CTG TAT GGC CAG TTG CTT GTA TTT GGT TAA CTG CTT TAG GTA TCT CAA CTA TGG CAT TCA ACT TAA ACG GTT  
 1,260 1,280 1,300 1,320  
 TCA ACT TCA ACC AAT CAG ttg tag act caa acg gtc gtc tat taa aca ctt gGA GCT GGG TAC CCC AAT CCA ATG GTA  
 1,340 1,360 1,380 1,400  
 CCA ATA TTA ATT TAA ATA ATA TTG TTA TTT ATT AAT AGG TGG TGT CAA TTT ACG CCA CCA AAG CGC GCA CAA GCG CGG  
 1,420 1,440 1,460 1,480  
 AAA AAA AAA AAA AAA AAT TTA ATA ATA AAT TTT TAA TGA TCT CTC CGG AAT ATA TAG ATA ATA ACA AAT TCA GAA  
 1,500 1,520 1,540 1,560  
 GAA ATT TTT AGA AGT TTT AAA TAT CCT AAA GAA TAT TTA AAA TCT TCT AAA ATT TGT TAT CTA TTT ATA ACA ATT TTA  
 1,580 1,600 1,620  
 TCG GTT TTT TAG AAA AAA AAA AAA GTA TCT CCT AAA TTA AAA TGA AAA ATT CTT AGA TAA GGG TAT GAA TGA CGA CCT  
 1,640 1,660 1,680 1,700  
 TAC TTA TTT TTT CCT TAG GTC GTT AAA AAT ACA GCA AAT AGA ATA ATA TAT TTA AAA ATA TAA AGT GTT TCG TTT ACG  
 1,720 1,740 1,760 1,780  
 ACG GAA AGT ATA AAT TTT AAA TAT ATT ATT AAA CAA TAG TTT ATA AGT TAT AAA CTA TTT GTT TCT ATC ATA TCC CTT  
 1,800 1,820 1,840 1,860  
 TAA CAA GAA AAA AAA TTT TTT TCC ATG GAT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GAT GAT GAT GAT AAA ATG AAA GCT ATT TTA

1,880 | 1,900 | 1,920 | 1,940  
 GTT GTT TTA TTA TAT ACA TTT GCT ACA GCT AAC GCT GAT ACA TTA TGT ATT GGT TAT CAT GCT AAC AAC TCA ACA GAT  
 1,960 | 1,980 | 2,000 | 2,020  
 ACA GTT GAT ACA GTT TTA GAA AAA AAC GTT ACA GTT ACA CAT TCA GTT AAC TTA TTA GAA GAT AAA CAT AAC GGT AAA  
 2,040 | 2,060 | 2,080 | 2,100  
 TTA TGT AAA TTA CGT GGT GTT GCT CCA TTA CAT TTA GGT AAA TGT AAC ATT GCT GGT TGG ATT TTA GGT AAC CCA GAA  
 2,120 | 2,140 | 2,160 | 2,180  
 TGT GAA TCA TTA TCA ACA GCT TCA TCA TGG TCA TAT ATT GTT GAA ACA TCA TCA TCA GAT AAC GGT ACA TGT TAT CCA  
 2,200 | 2,220 | 2,240 | 2,260  
 GGT GAT TTT ATT GAT TAT GAA GAA TTA CGT GAA CAA TTA TCA TCA GTT TCA TCA TTT GAA CGT TTT GAA ATT TTT CCA  
 2,280 | 2,300 | 2,320 | 2,340  
 AAA ACA TCA TCA TGG CCA AAC CAT GAT TCA AAC AAA GGT GTT ACA GCT GCT TGT CCA CAT GCT GGT GCT AAA TCA TTT  
 2,360 | 2,380 | 2,400 | 2,420  
 TAT AAA AAC TTA ATT TGG TTA GTT AAA AAA GGT AAC TCA TAT CCA AAA TTA TCA AAA TCA TAT ATT AAC GAT AAA GGT  
 2,440 | 2,460 | 2,480 | 2,500  
 AAA GAA GTT TTA GTT TTA TGG GGT ATT CAT CAT CCA TCA ACA TCA GCT GAT CAA CAA TCA TTA TAT CAA AAC GCT GAT  
 2,520 | 2,540 | 2,560 | 2,580  
 GCT TAT GTT TTT GTT GGT TCA TCA CGT TAT TCA AAA AAA TTT AAA CCA GAA ATT GCT ATT CGT CCA AAA GTT CGT GAT  
 2,600 | 2,620 | 2,640 | 2,660  
 CAA GAA GGT CGT ATG AAC TAT TAT TGG ACA TTA GTT GAA CCA GGT GAT AAA ATT ACA TTT GAA GCT ACA GGT AAC TTA  
 2,680 | 2,700 | 2,720 | 2,740  
 GTT GTT CCA CGT TAT GCT TTT GCT ATG GAA CGT AAC GCT GGT TCA GGT ATT ATT ATT TCA GAT ACA CCA GTT CAT GAT  
 2,760 | 2,780 | 2,800 | 2,820  
 TGT AAC ACA ACA TGT CAA ACA CCA AAA GGT GCT ATT AAC ACA TCA TTA CCA TTT CAA AAC ATT CAT CCA ATT ACA ATT  
 2,840 | 2,860 | 2,880 | 2,900  
 GGT AAA TGT CCA AAA TAT GTT AAA TCA ACA AAA TTA CGT TTA GCT ACA GGT TTA CGT AAC GTT CCA TCA ATT CAA TCA  
 2,920 | 2,940 | 2,960 | 2,980  
 CGT GGT TTA TTT GGT GCT ATT GCT GGT TTT ATT GAA GGT GGT TGG ACA GGT ATG GTT GAT GGT TGG TAT GGT TAT CAT  
 3,000 | 3,020 | 3,040 | 3,060  
 CAT CAA AAC GAA CAA GGT TCA GGT TAT GCT GCT GAT TTA AAA TCA ACA CAA AAC GCT ATT GAT GAA ATT ACA AAC AAA  
 3,080 | 3,100 | 3,120 | 3,140  
 GTT AAC TCA GTT ATT GAA AAA ATG AAC ACA CAA TTT ACA GCT GTT GGT AAA GAA TTT AAC CAT TTA GAA AAA CGT ATT  
 3,160 | 3,180 | 3,200 | 3,220  
 GAA AAC TTA AAC AAA AAA GTT GAT GAT GGT TTT TTA GAT ATT TGG ACA TAT AAC GCT GAA TTA TTA GTT TTA TTA GAA  
 3,240 | 3,260 | 3,280 | 3,300  
 AAC GAA CGT ACA TTA GAT TAT CAT GAT TCA AAC GTT AAA AAC TTA TAT GAA AAA GTT CGT TCA CAA TTA AAA AAC AAC  
 3,320 | 3,340 | 3,360 | 3,380  
 GCT AAA GAA ATT GGT AAC GGT TGT TTT GAA TTT TAT CAT AAA TGT GAT AAC ACA TGT ATG GAA TCA GTT AAA AAC GGT  
 3,400 | 3,420 | 3,440 | 3,460  
 ACA TAT GAT TAT CCA AAA TAT TCA GAA GAA GCT AAA TTA AAC CGT GAA GAA ATT GAT GGT GTT AAA TTA GAA TCA ACA  
 3,480 | 3,500 | 3,520 | 3,540  
 CGT ATT TAT CAA ATT TTA GCT ATT TAT TCA ACA GTT GCT TCA TCA TTA GTT TTA GTT GTT TCA TTA GGT GCT ATT TCA  
 3,560 | 3,580 | 3,600 | 3,620  
 TTT TGG ATG TGT TCA AAC GGT TCA TTA CAA TGT CGT ATT TGT ATT TAA TGA TAA **PstI** CTG CAG TAA TTC TTT ATA CTT AAG  
 3,640 | 3,660 | 3,680 | 3,700  
 AAT TAA GTA GAC TTG TCT ACT TAA TTC TTT TTA ATA GCA TGG ATG GAG TAA ACT CCA TCC ATG CTA TTA TCT CTA ACA  
 3,720 | 3,740 | 3,760 | 3,780  
 ACC CCA AAA ACC AAA GGT TTT TGT GAA GGA AAA AAT AGA ATA TTT TTT CCG CTA CGA GCG GGC GAT ATA AAA AAA TAA



