

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

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



**ANÁLISIS DE CEPAS DE CLOROFITAS POTENCIALMENTE  
PRODUCTORAS DE PROTEÍNA G DE *Streptococcus sp***

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA  
**RICARDO VALENCIA YÁÑEZ**





Universidad Autónoma de Baja California  
Facultad de Ciencias Marinas



**ANÁLISIS DE CEPAS DE CLOROFITAS POTENCIAMENTE PRODUCTORAS  
DE PROTEÍNA G DE *Streptococcus* sp.**

TESIS

Que para obtener el grado de  
**DOCTOR EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

Presenta

**RICARDO VALENCIA YAÑEZ**

Aprobada por:

Directora de tesis

**Dra. Ivone Giffard Mena**

Dr. José Luis Stephano Hornedo  
Sinodal propietario

Dr. Ricardo Cruz López  
Sinodal propietario

José Martín Hernández Ayón  
Sinodal propietario

Bernardo José Cortina Ceballos  
Sinodal propietario



# ÍNDICE



ÍNDICE .....	I
LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABLAS .....	7
INTRODUCCIÓN .....	12
Aislamiento de nuevas cepas de microalgas para la producción de metabolitos de interés comercial .....	12
Uso de clorofitas como plataformas de producción de proteínas recombinantes .....	13
<i>Dunaliella salina</i> como plataforma de producción de metabolitos y proteínas recombinantes.....	14
JUSTIFICACIÓN .....	15
OBJETIVOS .....	16
HIPÓTESIS .....	17
CAPÍTULO I. Aislamiento, purificación y caracterización de una cepa silvestre de <i>Dunaliella sp</i> .....	22
CAPÍTULO II. Dinámica de crecimiento, composición de nutrientes y análisis de pigmentos de la cepa <i>Dunaliella salina</i> San Quintín (SQ) .....	35
CAPÍTULO III. Análisis de cepas de clorofitas potencialmente productoras de proteína G de <i>Streptococcus sp</i> .....	74

LITERATURA CITADA .....99

## LISTA DE FIGURAS

**CAPÍTULO I. Figura 1.** Mapa regional del punto de muestreo en San Quintín, al Noroeste de México, imagen parcial de la laguna costera y de la toma de muestras.

**CAPÍTULO I. Figura 2.** Análisis de tamaño de tres cepas de *Dunaliella salina* cultivada a 250 mM de NaCl bajo ciclo de luz: oscuridad 18:6 (h) .

**CAPÍTULO I. Figura 3.** Variabilidad temporal en: A temperatura (°C); B pH; y C, saturación de oxígeno disuelto (%) de febrero a diciembre de 2014 según lo registrado por la boya oceanográfica ubicada en la desembocadura de la bahía de San Quintín.

**CAPÍTULO I. Figura 4.** Valores del sistema de CO<sub>2</sub> promedio estacional para las tres áreas de la Bahía de San Quintín durante el período de estudio.

**CAPÍTULO I. Figura 5.** Valores promedio estacionales de carbono inorgánico disuelto normalizado ( $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ).

**CAPÍTULO I. Figura 6.** Variabilidad espacial (A) y temporal (B) de los flujos de CO<sub>2</sub> aire-agua ( $\text{mmol C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ) durante el período de muestreo en la Bahía de San Quintín.

**CAPÍTULO I. Figura 7.** Seasonal average values of aboveground biomass ( $\text{gDW} \cdot \text{m}^{-2}$ ) of seagrass *Zostera marina* in San Quintín Bay during the study period.

**CAPÍTULO I. Figura 8.** Non-conservative DIC fluxes ( $\Delta\text{DIC}$ ) using a 1-box model; and Net Ecosystem Production (NEP) computed from DIC fluxes.  $\Delta\text{DIC}$  and NEP estimates indicate that San Quintín Bay switched between net heterotrophy (organic respiration) and net autotrophy (inorganic uptake), approaching a balance from November 2013 to 2014.

**CAPÍTULO I. Figura 9.**  $p\text{CO}_2$  observada ( $p\text{CO}_2$  obs, círculo negro y línea), temperatura-normalizada  $p\text{CO}_2$  a 20.1 °C ( $p\text{CO}_2@T_{\text{mean}}$ , círculo blanco y línea punteada).

**CAPÍTULO II. Figura 1.** Bahía de San Quintín con la señalización de diferentes áreas.: boca de la bahía, Bahía Falsa y Bahía San Quintín.

**CAPÍTULO II. Figura 2.** Cumulative upwelling index (CUI:  $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot (100 \text{ m})^{-1}$ ) for location off San Quintín Bay ( $30^\circ\text{N}$ ;  $119^\circ\text{W}$ ) in the California Current. Mean and its respective standard deviations are shown for data series of 1967-2015 (black solid curves) and each study year (red curve). The panels below show the annual normalized CUI anomaly for the date of maximum mean upwelling (defined as the maximum slope of the climatological CUI) in each period. The shaded period represents the months of maximum favorable wind upwelling events (upwelling season).

**CAPÍTULO II. Figura 3.** Seasonal vertical distribution average values of the temperature ( $^\circ\text{C}$ ) and salinity diagram for the upper 500 m of the water column off San Quintín Bay (line 107.35, IMECOCAL) in the studied periods (2002, 2004, 2005) and 2015, for Spring (left) and Autumn (right) seasons.

**CAPÍTULO II. Figura 4.** Seasonal average values of temperature ( $^\circ\text{C}$ ) and salinity, from ocean to the inner area of San Quintín Bay (eastern arm, SQb), during the study periods in favored upwelling condition (spring-early summer) and non-favorable upwelling condition (summer-fall).

**CAPÍTULO II. Figura 5.** Seasonal and temporal average values of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), from ocean to the inner area of San Quintín Bay (eastern arm, SQb), during the study periods in favored upwelling condition (spring-early summer) and non-favorable upwelling condition (summer-fall).

**CAPÍTULO II. Figura 6.** Seasonal and temporal average in inorganic carbon dynamic from ocean to the inner area of San Quintín Bay (eastern arm, SQb), during the study periods in favored upwelling condition (spring-early summer) and non-favorable upwelling condition (summer-fall). **DIC**, dissolved inorganic carbon ( $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); **NDIC**, dissolved inorganic carbon normalized ( $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ );  **$p\text{CO}_2$** , partial pressure of  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{atm}$ ).

**CAPÍTULO II. Figura 7.** Spatial and temporal variability of air-water  $\text{CO}_2$  fluxes ( $\text{mmol C} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ) during the sampling periods in San Quintín Bay. The zero line represents the equilibrium value of  $\text{CO}_2$  exchanges and dotted line show the standard error of air-water  $\text{CO}_2$  fluxes for the set data.

**CAPÍTULO II. Figura 8.** Net Ecosystem Production (NEP) computed from non-conservative DIC fluxes ( $\Delta$ DIC) using a 1-box model. NEP estimates indicate that San Quintín Bay switched between net heterotrophy (organic respiration) and net autotrophy (inorganic uptake) in seasonal and interannual scales, apparently approaching to a metabolic balance previous of winter seasons.

**CAPÍTULO II. Figura 9.** Distribution of DIC as functions of salinity for the upwelling seasons (US) and relaxation seasons (NUS) studied periods in San Quintín Bay. The mixing lines were calculated for a hypersaline system with only one end-member referred to the outermost ocean station DIC values in each season.

**CAPÍTULO III. Figura 1.** Localización geográfica de Bahía San Quintín en la costa noroccidental de la Península de Baja California. Los círculos negros indican los puntos de muestreo seleccionados a lo largo de la laguna costera para marzo y Julio de 2014 (modificado de Sandoval-Gil et al. 2015).

**CAPÍTULO III. Figura 2. A)** Variaciones típicas de las concentraciones de carbono inorgánico disuelto (CID) y alcalinidad tota (AT) durante las incubaciones de microcosmos para los núcleos muestreados en áreas sin vegetación (círculos café), en praderas de pastos marinos (círculos verdes) y en el agua de mar de referencia (triángulos celestes). **B)** Diagrama simplificado de las cámaras de incubación de microcosmos utilizadas durante el experimento. **C)** Ejemplo de las condiciones observadas en los núcleos sedimentarios en las distintas estaciones de muestreo para los meses de Marzo (izq.) y Julio (dcha.) de 2014.

**CAPÍTULO III. Figura 3.** Flujos de intercambio de FCID y FAT en la interfase sedimento-agua observadas en Marzo y Julio del 2014, para los núcleos localizados dentro (Pastos) y afuera (Sedimentos) de las praderas de *Zostera marina* en cada una de las estaciones muestreadas durante el periodo de estudio. En la esquina inferior izquierda de cada uno de los gráficos se muestran los promedios ( $\pm$  DS) de las incubaciones de microcosmos en Pastos, Sedimentos y Balance Total de las muestras experimentales estimadas para cada variable y temporada de estudio.

**CAPÍTULO III. Figura 4.** Variaciones relativas de los flujos de intercambio de *FCID\** y *FAT* en la interfase sedimento-agua observadas en Marzo y Julio del 2014, para los núcleos localizados dentro (IN) y afuera (OUT) de las praderas de *Zostera marina* en cada una de las estaciones muestreadas durante el periodo de estudio. Asimismo, se presentan posibles procesos biogeoquímicos involucrados en la liberación o captación de CID y AT entre el sedimento y la columna de agua que afectan directa o indirectamente a estas cantidades.



## LISTA DE TABLAS

**CAPÍTULO I. Tabla 1.** Summary of monthly hydrological observations for anomaly of Upwelling index ( $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}/100\cdot\text{m}^{-1}$ ), monthly wind speed ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), residence time (days), seawater temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and salinity at San Quintín Bay from November 2013 to November 2014.

**CAPÍTULO I. Tabla 2.** Values of observed  $p\text{CO}_2$  ( $p\text{CO}_2$  obs,  $\mu\text{atm}$ ), temperature-normalized  $p\text{CO}_2$  at  $20.1^{\circ}\text{C}$  ( $p\text{CO}_2@T_{\text{mean}}$ ), mean area-averaged  $p\text{CO}_2$  at *in-situ* temperature ( $p\text{CO}_2_{\text{mean}}@T_{\text{obs}}$ ), as well as calculated values of non-conservative DIC fluxes ( $\Delta\text{DIC}$ ,  $\text{mmol m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ), air-water  $\text{CO}_2$  fluxes ( $\text{FCO}_2$ ,  $\text{mmol m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and net ecosystem production (NEP,  $\text{mmol m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ) in San Quintín Bay during the study period.

**CAPÍTULO I. Tabla 3.** Summary of average values of the contribution of macroalgal-derived detritus biomass to ecosystem pool ( $\text{tDW}\cdot\text{km}^{-2}$ ); residual carbon content ( $\text{gC}\cdot\text{km}^{-2}$ ); and inorganic carbon fluxes ( $\text{mmol C}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ) in San Quintín Bay during 2014. Calculations were based on coverage area, carbon content (%C) and biomass difference measurements between the spring maximum (April) and the summer minimum (August) biomass for each species. The carbon content for *Gracilaria* sp. reported by Atkinson et al. (1989) was used for red algae, while field carbon data values for *Ulva* sp. were used for San Quintín Bay (unpublished data).

**CAPÍTULO II. Tabla 1.** Summary of seasonal average ( $\pm$ SD) of hydrological properties: UI, upwelling index ( $m^3:s^{-1}/100\cdot m^{-1}$ ); UIA, upwelling index anomaly ( $m^3:s^{-1}/100\cdot m^{-1}$ ); and W, wind speed ( $m\cdot s^{-1}$ ) in adjacent waters of San Quintín Bay during the different regional events analyzed. The whole system average of: FCO<sub>2</sub>, air-water CO<sub>2</sub> fluxes ( $mmol\ m^{-2}\cdot d^{-1}$ ) ( $\pm$ SD); and NEP, net ecosystem production ( $mmol\ m^{-2}\cdot d^{-1}$ ) ( $\pm$ SE) in each studied period is also presented.

**CAPÍTULO II. Tabla 2.** Summary of temporal average ( $\pm$ DS) of hydrological and chemical properties observed in the outermost stations (oceanic signal) at San Quintín Bay during the studied upwelling condition: T, temperature ( $^{\circ}C$ ); Salinity; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrate ( $\mu M$ ); PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, phosphate ( $\mu M$ ); DIC, dissolved inorganic carbon ( $\mu mol\ kg^{-1}$ ); and  $pCO_2$ , partial pressure of CO<sub>2</sub> ( $\mu atm$ ).

**CAPÍTULO III. Tabla 1.** Características físico-químicas (promedio  $\pm$  DS) (i.e., temperatura, salinidad, CID, AT y pH) observadas en la columna de agua en invierno y verano del 2014 para las diferentes áreas de Bahía San Quintín.

## *Lista de abreviaturas*

ATP	adenosine triphosphate
BLE	bleomycin
bp	basepair(s)
CTAB	cetyl trimethyl ammonium
DCMU	bromide
DEPC	3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-
dH 2 O	Dimethylurea
DIG	diethylpyrocarbonate
DNA	distilled water
dNTPs	digoxigenin
EDTA	deoxyribonucleic acid
FDA	deoxynucleoside
× g	triphosphates
g	ethylene diamine tetra acetic
h	acid
kb	fluorescein diacetate
kDa	G-force
M	gram(s)
mA	hour(s)
mM	kilobase(s)
mg	kilodalton(s)
min	molar
mL	milliampere
mm	millimolar
MOPS	milligram(s)
ng	minute(s)
nt	millilitre(s)
PCR	millimetre(s)
ρmol	3-[N-
RNA	Morpholino]propanesulfonic
rpm	acid
s	nanogram(s)
SDS	nucleotide(s)
spp.	polymerase chain reaction
SSC	picomole(s)
TBS	ribonucleic acid
TE	revolutions per minute
TSP	second(s)
U	sodium dodecyl sulphate
UTR	species
μg	standard saline citrate
μL	tris buffered saline

$\mu\text{m}$   
 $\mu\text{M}$

tris:EDTA  
total soluble protein  
units  
untranslated region  
microgram(s)  
microlitre(s)  
micrometre(s)  
micromolar

# *Declaración*

El trabajo contenido en esta tesis no ha sido previamente sometido a otro posgrado o diplomado de ninguna otra institución de educación superior. Mi firma en este folio constituye una declaración de la originalidad del material contenido en este documento, exceptuando el escrito por otros autores, al cual se hace la debida referencia.

Firma:  \_\_\_\_\_

Fecha: 25/01/2018

# 1. INTRODUCCIÓN

## *I. Aislamiento, purificación y caracterización de una cepa salvaje de Dunaliella sp*

Los fundamentos del aislamiento, purificación y propagación de nuevas cepas de microalgas fueron establecidos desde hace más de un siglo. Sin embargo, la creación de nuevas herramientas tecnológicas ha permitido aumentar la velocidad de estos procesos, hasta ofrecernos la posibilidad de aislar cientos de células por minuto a través de equipos automatizados de clasificación y selección de células. Una limitación a la que se enfrentan este tipo de avances es el mantener por tiempos prolongados un número importante de cultivos simultáneos. Lo cual, se ha venido resolviendo, en parte, a través de la preservación de aislados por criopreservación. Mientras que algunas especies son fáciles de aislar y propagar, otras son difíciles o imposibles de cultivar. Parte importante de esta diferencia, se debe a la diversidad de ambientes en las que las microalgas son capaces de crecer, y a que una parte de ellos son ambientes extremos (Andersen, 2005).

Después del proceso de aislamiento, la purificación de las nuevas cepas o eliminación de contaminantes, puede dificultar mucho el éxito del proceso, sobretodo cuando la especie contaminante, compite con la especie objetivo (Andersen, 2005).

Finalmente, después de haber aislado y purificado una exitosamente una especie o cepa objetivo, la propagación y el subcultivo de éstas para su mantenimiento perpetuo, representa el último reto a lograr, y el cual en ocasiones, puede no alcanzarse porque algunas de las nuevas cepas mueren después de una o más generaciones o transferencias a medios nuevos o subcultivos (Andersen, 2005).

## ***II. Uso de clorofitas como plataformas de producción de proteínas recombinantes***

El cultivo de microalgas como plataforma de producción de diferentes compuestos posee muchas ventajas sobre otros sistemas de expresión, como su relativa facilidad de cultivo, su crecimiento rápido, los bajos costos de producción debido a su metabolismo autótrofo y su crecimiento sin generación de toxinas o patógenos para el ser humano (Griesbeck et al., 2006; Thann et al., 2012).

Las microalgas son organismos eucariontes los cuales sintetizan una gran cantidad de productos naturales y de las que se han obtenido por ingeniería genética muchos compuestos de valor comercial como biocombustibles, carotenoides, vacunas, anticuerpos, etc. (Mayfield et al., 2003; Fletcher et al., 2007; Greenwell et al., 2011). Las especies de microalgas más utilizadas en este campo son las clorofitas: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella kessleri*, *Chorella ellipsoidea* y *Dunaliella salina* (Tang et al., 1995; El-Sheekh 1999; Kim et al., 2002; Tan et al., 2005; Feng et al., 2009).

## ***III. Dunaliella salina como plataforma de producción de metabolitos y proteínas recombinantes***

*D. salina* específicamente, tiene varias ventajas sobre otras especies de microalgas, por ejemplo es halotolerante, no posee pared celular, lo cual la hace capaz de adquirir resistencia a antibióticos, se propaga rápidamente a altas densidades y sin limitación estacional, tiene un gran potencial fotosintético y de producción de moléculas orgánicas a partir de agua y dióxido de carbono como única fuente de carbono en condiciones de poca luz (Jiang *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2007; Kadkhodaei *et al.*, 2011). En particular al ser *D. salina* un organismo eucariota hace posible que las proteínas heterólogas producidas generen las modificaciones postraduccionales (ej.: acetilaciones, glicosilaciones, metilaciones, entre otras) necesarias para que la proteína recombinante lleve a cabo su función naturalmente, ventaja que no tienen los sistemas de producción con procariones (Mayfield *et al.*, 2003).

## ***I.II Métodos de transformación en D. salina***

Para lograr la transferencia de genes a *Dunaliella* se han utilizado diversos métodos de ingeniería genética y microbiología, entre los que destacan: electroporación, transformación por perlas de cristal (glass beads), bombardeo de partículas, transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (para *D. bardawil*), etc. (Ramos *et al.*, 2011). Esta transferencia de genes o transformación ha demostrado ser estable, por lo cual es ideal para la producción de proteínas foráneas en cultivos de esta microalga (Wang *et al.*, 2007).

La transformación de *D. salina* se puede realizar importando genes foráneos al núcleo o al cloroplasto, dependiendo de ello la metodología depende del organelo donde será sintetizada la proteína de interés (Geng *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005).

### ***I. III Proteína de interés***

La proteína G es un antígeno de membrana que lo presenta la bacteria gram positiva *Streptococcus de Lancenfield C y G.*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, etc. Se ha demostrado que la proteína G tiene gran afinidad a varias inmonoglobulinas como una forma de defensa de la bacteria al infectar un vertebrado (Akerstrom *et al.*, 1985). Debido a esta afinidad actualmente se utiliza en varias técnicas de purificación de anticuerpos, detección, cuantificación, entre otros (Kuby *et al.*, 2004; Alegria, 2011).

Actualmente La proteína G se expresa en un sistema procarionte-como es *Escherichia coli*, de la cual se obtienen rendimientos de 12 mg/L. Por otra parte en *D. salina* se ha reportado la expresion de la hormona del crecimiento (GH) de 0.2-0.6 mg/L.. El precio más bajo de la proteína G pura es de 2.4 Dólares Americanos por miligramo y las ventas de las compañías productoras oscilan entre 2.5 a 12 millones de dólares anuales (20).

#### ***Contexto científico en donde se desarrollará este trabajo***

El proyecto aquí propuesto, forma parte de un proyecto mayor, financiado en parte por el Sistema de Fondos de CONACyT: convocatoria S0007-2009-1 en el cual se están desarrollando las tecnologías para la elaboración de Biodisel y para la síntesis de otras proteínas de aplicación Biomédica. La producción de estas proteínas, como la de Hemaglutina A del Virus de la Infleuenza H1N1 son investigaciones paralelas a ésta.



## HIPÓTESIS

*Dunaliella salina* es capaz de expresar de forma constitutiva proteína G de *Streptococcus sp* a través de la transfección del gen al genoma de *D. salina*.

## OBJETIVOS GENERALES

- ☑ Generar una cepa de *Dunaliella salina* que exprese en cultivo una proteína G recombinante de *Streptococcus* sp en concentración superior a 600 ng/mL.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Generar a través de ingeniería genética una cepa de *Dunaliella salina* que exprese de forma constitutiva una proteína G recombinante de *Streptococcus* sp en concentración superior a 600 ng/mL
- ☑ Generar a través de ingeniería una cepa de *Dunaliella salina* que exprese de manera constitutiva en cloroplastos la proteína G recombinante de *Streptococcus* sp en concentración de proteína superior a 600 ng/mL.

# **CAPÍTULO I.**

## ***Aislamiento, purificación y caracterización de una cepa silvestre de Dunaliella sp***

### *Resumen*

*El objetivo de este capítulo es optimizar las condiciones de cultivo de cepas de Dunaliella sp aisladas a partir de una laguna costera ubicada en San Quitín, Baja California, México.*

# Introducción

El género *Dunaliella* fue descrito en la primera década de mil novecientos por Teodoresco (1905) y Hamburger (1905). *Dunaliella* es un género de phytoplankton eucariota, de células móviles, biflageladas que no poseen pared celular y que pueden dividirse por reproducción vegetativa o por reproducción sexual (Oren, 2005). Inicialmente, se describieron dos especies *D. salina* y *D. viridis*. *D. salina* se distingue porque a salinidades altas acumula grandes cantidades de betacaroteno (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Por esta característica y su capacidad para sobrevivir a muy altas concentraciones de sal (hasta 5 M NaCl), *D. salina* fue la primera microalga usada para la producción masiva de productos de alto valor (Borowitzka, 2013). Además de su capacidad para acumular betacaroteno, *D. salina* puede almacenar hasta un 50% de su peso seco en glicerol, abriendo la posibilidad de la obtención de un producto secundario del cultivo de *Dunaliella* (Oren, 2005; Kaçka & Dönmez, 2008). Otra área de oportunidad para las especies halofílicas de *Dunaliella* es la producción de biocombustible. *D. salina* es considerada de las especies más promisorias para por su capacidad para acumular lípidos en condiciones extremas (Tang et al., 2011; Chen et al., 2015).



**Figura 1. Localización geográfica del punto de muestreo, imagen parcial de la laguna y de la toma de muestras.** Sitio de muestreo en La Salina, San Quintín, Baja California, México. **a**, localización geográfica del sitio en el Noroeste de la costa de México. **b**, vista satelital de la costa del punto de muestreo en San Quintín, B. C. **c**, vista lateral de la laguna (ver apuntador rojo en imagen **b**) mostrando el color del agua del sitio de muestreo y **d**, ejemplo de las muestras tomadas.

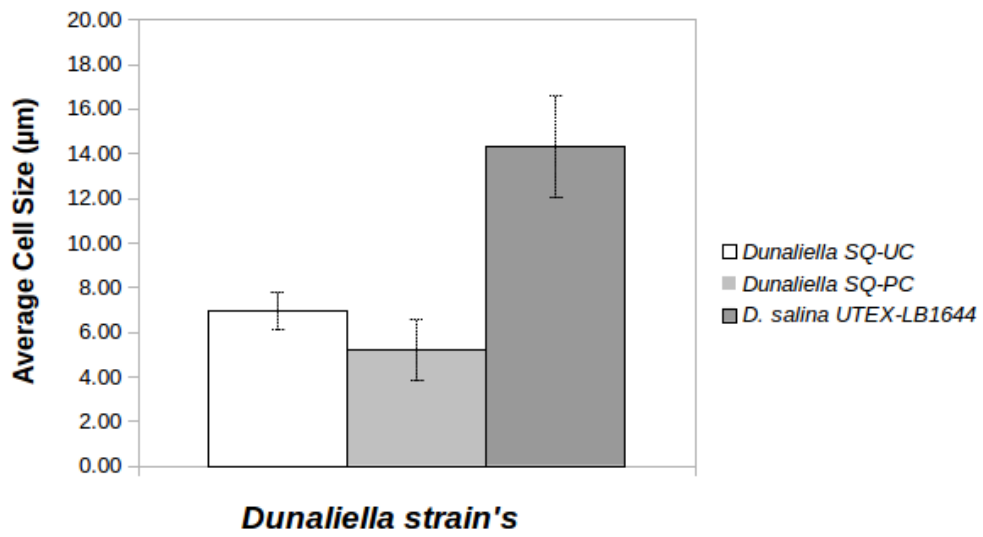


Figura 2. Análisis de tamaño de tres cepas de *Dunaliella salina* cultivada a 250 mM de NaCl bajo ciclo de luz: oscuridad 18:6 (h) .

# **CAPÍTULO II. *Cinética de crecimiento, composición de nutrientes y análisis de pigmentos de la cepa Dunaliella salina San Quintín (SQ)***

## *Resumen*

*Algunas microalgas son reconocidas por su capacidad de producir pigmentos y otros metabolitos de importancia biotecnológica, particularmente, Dunaliella salina es una de las microalgas más reconocidas en este campo por su capacidad para producir betacaroteno. En este estudio se describe la morfología, la indentificación molecular, la dinámica de crecimiento, la composición proximal y el contenido de pigmentos de la cepa D. salina SQ.*

- I. Examinar la variabilidad espacial y temporal de los parámetros del sistema de carbono en Bahía San Quintín a lo largo de un ciclo anual, con la finalidad de estimar los cambios estacionales de los flujos de intercambio de CO<sub>2</sub> aire-agua y del estatus metabólico del sistema durante la anomalía cálida del Pacífico Norte en 2014, e identificar los principales factores y procesos que los controlan.

\* **Trabajo publicado en la revista *Oceánides*:** Valencia-Yáñez *et al.* (2018). *Growth Profiles, Nutrient composition and Pigments Analysis of Dunaliella salina strain SQ*

**Growth Profiles, Nutrient composition and Pigments Analysis of  
*Dunaliella salina* strain San Quintin**

**Authors & affiliations:**

Valencia-Yañez Ricardo<sup>1\*</sup>, Giffard-Mena Ivone<sup>2</sup>, Cruz-López Ricardo<sup>3‡</sup>, García-Mendoza Ernesto<sup>3</sup>, Stephano-Hornedo José Luis<sup>4</sup>

<sup>1</sup>PhD student, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, Programa de Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología.

<sup>2</sup>Professor-Researcher, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, Laboratorio de Ecología Molecular.

<sup>3</sup>Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Departamento de Oceanografía biológica.

<sup>‡</sup>Current address: San Diego State University, Chemistry and Biochemistry Department.

\*Corresponding author: [rvalencia@uabc.edu.mx](mailto:rvalencia@uabc.edu.mx)

Address: Universidad Autónoma de Baja California  
Facultad de Ciencias Marinas  
Carretera Ensenada-Tijuana No. 3917,  
Fraccionamiento Playitas, 22860 Ensenada, B.C.  
Telephone: +52 646 174 4570

**Abstract:**

Some microalgae are recognized for producing pigments and other metabolites with biotechnological importance, particularly, *Dunaliella salina* is a remarkable one. These kind of compounds are used as food and have a great industrial potential. The pigment industry comprises a millionaire market value, being  $\beta$ -carotene one of the most profitable one. In this study we describe the morphology, molecular identification, growth dynamics, proximal composition, nutrients and pigment content of a recently isolated *Dunaliella salina* strain (SQ) under different salinity/light conditions, in order to highlight its remarkable properties for biotech/biomed industry. *D. salina* SQ reached the highest densities ( $1.07\text{-}1.25 \text{ cell mL}^{-1} \times 10^6$ ) at low salinities (100-500 mM NaCl) under continuous light regimen (24:0 h Light:Dark). Neoxanthin (Neo) and violaxanthin (Viol) were the most abundant pigments when exposed to 500 mM NaCl (18:6 h Light:Dark). Neo and Vio are known to induce apoptosis in cancer diseased cells, thus they have a great potential for biomedical applications. Furthermore, this peculiar strain produces other compounds with high industrial value.

**Key words:**

*Dunaliella salina*, green microalgae, pigments, sea salt fields, salinity challenge.

## Introduction

Pigments and other metabolites produced by microalgae are highly common in nature. These compounds are used as a food, feed or to extract bioproducts with high industrial potential (Dufossé *et al.*, 2005). The raw microalgae biomass production in the world has increased in recent years reaching 7500 ton year<sup>-1</sup> mainly in products for aquaculture, pharmaceuticals and as energy feedstock, generating an average annual income of 1.25 billion USD (Pulz & Gross, 2004; Abomohra *et al.*, 2016). However, only a small number of species have been successfully placed in the international market; *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella* and *Synechococcus*. That is why there is international interest in develop and exploit commercially new microalgae such as *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Nannochloropsis*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Spirulina*, *Haematococcus*, and *Dunaliella* species/strains (Richmond & Hu, 2013). The production costs are higher than other vectors such as bacteria, higher plants or fungi (Borowitzka, 2013) due to its lower biomass yields, (Wen & Chen, 2003). Whence, a challenge in this field, is to improve production methods or create new processes to increase biomass yields (Cadoret *et al.*, 2012). To achieve this, many companies screen particular geographic locations searching for specific “high-yielding algae” (Lundquist *et al.*, 2010; Ganesan, 2014). Another frequent alternative are genetically modified strains, but they present translocation risks for the environment. Thus, another advantage of natural selection is the use of different isolation techniques, which allows to obtain species and strains with characteristic features (Connon and Giovannoni, 2002; Goltekar *et al.*, 2006). A new *Dunaliella salina* strain (or *Dunaliella salina* SQ) was isolated in a salt lagoon from San Quintin (SQ), Baja California, Mexico. Its detailed examination may show its potential properties for industrial production.

Important bioproducts from microalgae such as phycobilin, astaxanthin and  $\beta$ -carotene are massively produced by a fully established industry, three genera; *Chlorella*, *Spirulina*, and *Dunaliella* represent 85% of the worldwide production (Pulz & Gross, 2004). More specifically, *Dunaliella salina* produces, among others, large amounts of  $\beta$ -carotene and glycerol under high salinity, high irradiance and nutrient limitation conditions (Ben-Amotz & Avron, 1983; Borowitzka, 1988; Borowitzka, 1990). It was the first commercially cultivated microalgae for production of high-value products (Borowitzka, 2013). Just as an example, the  $\beta$ -carotene market value until 2012 from *D. salina* has a around 261 million dollars (Borowitzka, 2013). It has also been subjected to molecular improvements for production of recombinant proteins and therefore novel compounds and relevant bioproducts (Guo-Zhong *et al*, 2005; Borowitzka *et al.*, 2005; Lamers *et al.*, 2008; Barzegari *et al.*, 2010; Yaakob *et al.*, 2014). A proper characterization is essential in order to establish the performance of new isolated strains and find the most profitable ones for industrial purposes.

The genus *Dunaliella* is very variable in shapes (ovoid, spherical, pyriform, fusiform or ellipsoid) and sizes (between 3 to 13  $\mu\text{m}$  wide and from 5 to 25  $\mu\text{m}$  long). This microalgae lacks its cell wall and belongs to the unicellular eukaryotic group (full lineage from NCBI:Eukaryota; Viridiplantae; Chlorophyta; Chlorophyceae; Chlamydomonadales; Dunaliellaceae; *Dunaliella*). Each cell has two equal size flagella, a central pyrenoid, and a single and large chloroplast (Borowitzka, 1990; Ben-Amotz, 1993; Borowitzka & Siva, 2007). It used to have 0.47 to 1.22 divisions per day under optimal growth conditions (Lerche *et al.*, 1937 in Oren, 2005) at high densities without seasonal limitations (Kadkhodaei *et al.*, 2011). It is motile and able to grow in salt concentrations from 517 mM to 5,344 mM NaCl, at pH from 1 to 11 and a temperature from 0 to 40 °C (Wen & Chen, 2003; Cadoret *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2013; Borowitzka, 2013). Halophilic strains are most widely distributed around the world.

Some authors reported 22 species (Assunção *et al.*, 2013), while others such as Borowitzka, (1990) recognized 29 species. Assunção *et al.* (2013) proposed that probably some previously identified *D. salina* strains were misnamed and the taxa needed revision. According to our own records, there must be around 41 *D. salina* strains, including 6 strains from Thailand (Powtongsook *et al.*, 1995), Kuwait (Kuwait Bay) (Abu-Rezq *et al.*, 2010), and those from Iran (Lake Urmia) (Rad *et al.*, 2011), Turkey (Lake Tuz) (Kaçka & Dönmez, 2008), Vietnam (Binh Thuan) and Mexico (Baja California Sur) (Olmos-Soto *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2013). The total count and the correct identification of these strains are difficult, because their high intra-specific variability (Borowitzka & Siva, 2007; Olmos-Soto *et al.*, 2009; Assunção *et al.*, 2013) and because complete information on every strain not always is available or in the best of cases, done.

In this study we described the growth dynamics, morphology, biochemical content, nutrients and pigment profiles from *D. salina* SQ. Their high lipids, pigments (neoxanthin/violaxanthin) and micronutrients (Ca, Zn and Cu) contents reveals its potential for industrial and pharmaceutical applications.

## Materials and methods

**Cell culture and isolation** Microalga sampling and acclimation process were previously described in Magdaleno *et al.* (2017). Briefly, single-cell isolates were cultivated in parallel in 500  $\mu$ L plate with modified Johnson media (MJM). This Media was prepared with 3.37 M NaCl, 0.51 mM NaHCO<sub>3</sub>, 7 mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 9.9 mM KNO<sub>3</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5  $\mu$ M EDTA, 2  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 185  $\mu$ M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1  $\mu$ M (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 1  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> and 7  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O according to (Johnson *et al.*, 1968). Initially plates were incubated at room temperature (19-22 °C) with a 18:6 (h) dark:light cycle, irradiated with a led lamp (21.6  $\mu$ mol quanta m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) (RGB led 5 mm, Steren). Individual cells were transferred twice to a new plate and incubated under the same conditions. After isolation process, the cell culture were scaled-up to 5, 50 and 500 mL, and then acclimated to grow only in 250 mM of NaCl. Contamination with other microorganisms like bacteria and fungi was avoided using Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) antibiotic mixture: 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> penicillin 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptomycin and 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> neomycin (Gibco, 15640055).

**Cell morphology and quantification** In order to identify the morphometric characteristics, intact cells were harvested with a Pasteur pipette from cell-cultures and processed in two ways: the first one (A- cell series) was fixed with 1% lugol's iodine solution (1 g KI in 10 mL H<sub>2</sub>O, 0.5 g crystalline I<sub>2</sub> and 1 mL glacial acetic acid) and analyzed by confocal microscopy (MRC 600 BIO-RAD) with a 100X objective using immersion oil. Cell morphology, structure, size and presence of other components were recorded. The second cell aliquots were not fixed (B- cell series), instead they were diluted 1:5 and 1:15 to remain into the Scepter cell counter sensor range (Scepter<sup>TM</sup>, Millipore, MD, USA) and quantify with a 40  $\mu$ m scale.

**PCR identification with specific molecular markers** Genomic DNA was isolated and purified using commercial system (Axygen: AP-MN-MS-GDNA50) or CTAB method (Sambrook *et al.*, 1989), followed by PCR amplification and 18S rDNA gene sequencing. The PCR reaction was performed with 50 ng of gDNA, 20 pmol of each primer MA1 [5'-CGG GAT CCG TAG TCA TAT GCT TGT CTC-3'] and MA2 [5'-CGG AAT TCC TTC TGC AGG TTC ACC-3'] (Olmos-Soto *et al.*, 2000) using a PCR master mix system (Qiagen: 201445). Amplification was conducted in a GenAmp-5700 (Applied BioSystems) thermal cycler with the next thermal profile: 1 cycle for 2 min at 94 °C, 35 cycles; 30 s at 94 °C, 30 s at 52 °C, 2 min 72 °C and then 1 last cycle of 10 min at 72 °C. PCR products were resolved in 1 % agarose, run at 4 v/cm during 50 min and purified with Qiakit PCR Purification kit (Qiagen: 28104). DNA quality and quantity were determined in a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific: ND1000). Fragment purification and sequencing were done by Eaton BioSciences (San Diego, CA). Provided sequences were analyzed with blast algorithm in the NCBI web site (Zhang *et al.*, 2000).

**Growth Dynamics** The *D. salina* SQ cells were cultured at room temperature (19-22 °C) in 1000 mL crystal flask with 500 mL of modified Johnson media (see above). Growth kinetics was evaluated on three salinities (100, 500 and 3000 mM NaCl, table 1) and two light conditions (18:6 and 24:0 D:L). Culture was irradiated with a led lamp (21.6  $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), specific conditions are described in table 1. 1 mL samples (three replicates) were collected with micropipette and fixed with 1% of lugol's iodine solution every three days during a 20 day period. Cells were counted in a Neubauer chamber. The cell abundance ( $\delta$ ) and growth rate ( $\mu$ ) were calculated according to (Andersen, 2005) equation 1, which computes the cell divisions average number by day. Data are presented as cell abundance (cells  $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ).

$$\mu = (\ln \delta_2 - \ln \delta_1) / t_2 - t_1 \quad (1)$$

where,

$\delta_n$ , cell abundance on specific time point.

$t_n$ , specific sampling time (days).

**Table 1. Culture conditions summary for growth dynamics analysis.**

**Tabla 1. Resumen de las condiciones de cultivo para el análisis de la dinámica de crecimiento.**

Light:Dark cycle	Salinity NaCl (mM)		
Period (h)	100	500	3000
18:6	C1	C2	C3
24:0	C4	C5	C6

C, Experimental condition.

**Proximate analysis, macro and micro-nutrients content** Fresh samples (50 mL) were taken from cultures at 500 mM NaCl 18:6 D:L (Table 1, C2) and collected by centrifugation (4,300 rpm for 10 min) during early stationary phase (d 15). They were sent to the Research Center and Agricultural Analysis (CINAA, Camalu B.C. Mexico) for 16 macro-nutrients and 4 micro-nutrients examination. Protein levels were quantified by Lowry method (Lowry *et al.*, 1951). Lipids quantity were determined with Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959). Carbohydrates were determined by phenol sulfuric acid method (Dubois *et al.*, 1956). Total phosphorus and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> were estimated by ammonium nitrovanado-molybdate method, total potassium (KT), K<sub>2</sub>O, Mg, MgO, Ca, CaO, Na, Fe, Zn, Mn and Cu by atomic force spectrophotometry (EAA), CO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub> by colorimetric acid method, organic carbon (CO) and organic matter (MO) by Walker and Black combustion method and finally Borum (B) by the Mohr method (REF). The results were expressed in mg/Kg of dried biomass.

**Pigments analysis** Fresh samples (5 to 20 mL) were taken during early stationary phase from cultures at 500 mM NaCl 18:6 D:L (Table 1, C2) for pigments analysis. Culture was filtered through GF/F membrane filters (25 mm diameter, Whatman) applying a <3.3 kPa pressure controlled with manual pump and manometer to avoid cell disintegration. The membranes were covered with aluminum foil and frozen at -20 °C to prevent photobleaching. The pigments were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC), using the standard method (Heukelem & Thomas, 2001) modified by Almazán-Becerril and García-Mendoza (2008), in an Agilent 1260 instrument assembled with a reverse phase-column (150 mm length x 4.6 mm internal diameter) for 3.5 µm size particles (Zorbax Eclipse XDB-C18).

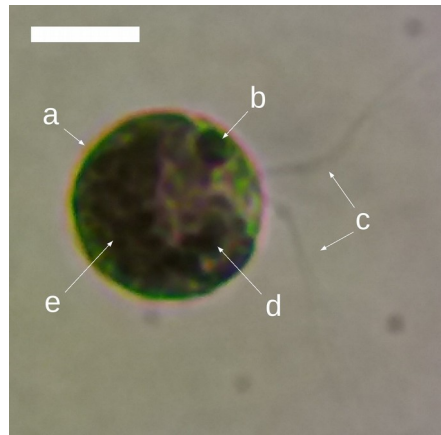
**Data analysis** The effect of the experimental conditions on cell cultures was estimated with one-way ANOVA variance analysis using R commander statistical software (Fox, 2017). The assumptions for the variance analysis were verified for homoscedasticity test f-ratio. The significance level was set at  $P < 0.05$ .

## Results

**Isolation and acclimation** The microalgae cultures were successfully transferred and maintained with synthetic media (MJM) at the same salinity than the original water source (3.37 M NaCl), they recover the green color a week after the incubation time started. The *Dunaliella* typical red color found in wild populations is an indicator of nutrient limitation and usually associated with high light irradiance and salinity. No changes were observed in cell morphology in *D. salina* SQ as a physiological response in the course of the acclimation process, since the natural water source was replaced.

In order to have a monoculture, a single cell from the sample was obtained by single cell isolation technique. Single cells showed positive growth two weeks after inoculation, as indicated by the development of green color and confirmed by microscopic examination. The subsequent culture scale-up showed positive growth in 5 mL twenty days after culture and in 50 mL thirty two days after culture.

**Morphology** In early stationary phase, *D. salina* SQ cells were spherical, ellipsoid or ovoid, with  $7\pm 1$   $\mu\text{m}$  average length size, they have two flagella of similar length 12-16  $\mu\text{m}$ . The flagellated cells keep the motility. The nucleus and vacuole were visible in the anterior region. A large chloroplast can be observed in the posterior region (Fig. 1).



**Figure 1. Cell morphology and structure of *D. salina* SQ in early stationary phase cultured in modified Johnson media (250 mM NaCl, 18:6 h light: dark cycle).** Image analyzed in optical microscope with 100x amplification (scale bar 4  $\mu\text{m}$ ). Main cell structures: **a**, membrane; **b**, nucleus; **c**, flagella pair in anterior region; **d**, vacuole; **e**, large chloroplast.

***Proximate analysis, macro and micro-nutrients quantification*** In the early stationary phase (C2), the cellular dry weight biochemical composition was: protein 27.9%, carbohydrates 6.7% and lipids 21.9%. The complete results for macro and micronutrients analyses are listed in table 2. We included, for comparative purposes, the biochemical composition from published data of other two relevant commercial microalgae species; *Dunaliella salina* D. Gold™ (Plankton Australia Pty Limited) and *Spirulina platensis* (Tokuşoglu & Ünal, 2003).

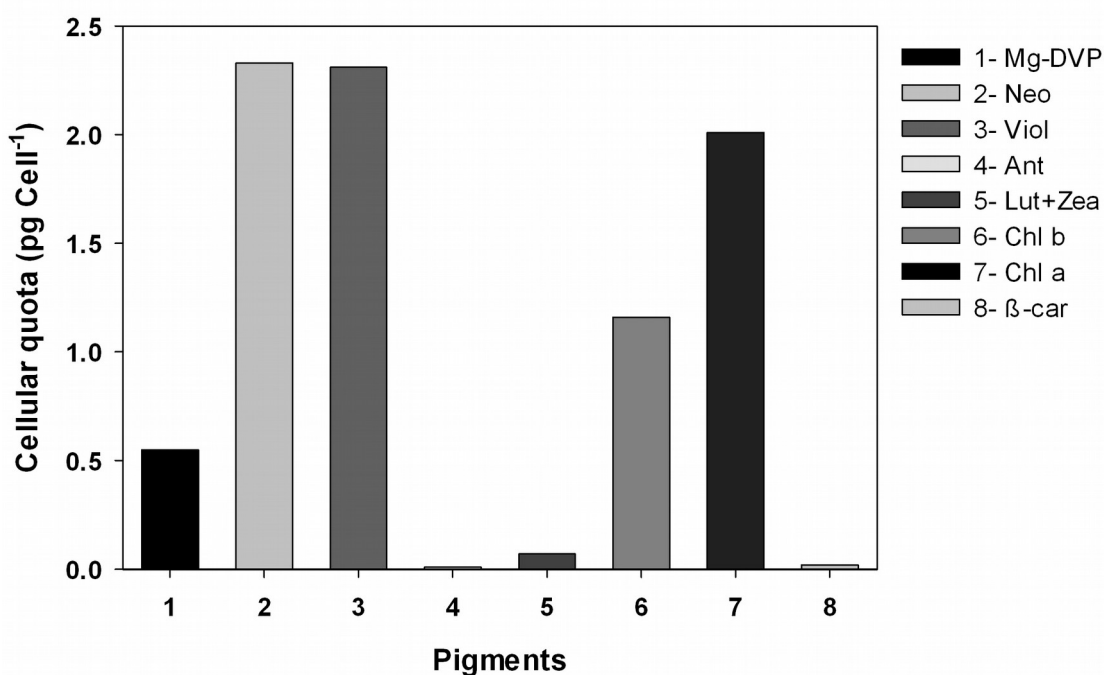
**Table 2. Proximal composition and nutrient profiles of species of industrial importance of microalgae (two chlorophytes and one species of cyanobacteria).**

**Tabla 2. Composición proximal y perfiles de nutrientes de especies de importancia industrial de microalgas (dos clorofitas y una especie de cianobacteria).**

Sources	<i>D. salina</i> SQ (This study)	<i>D. salina</i> (Datasheet, Plankton Australia Pty Limited)	<i>Spirulina platensis</i> (Tokuşoglu & Ünal, 2003)
<b>Nutrient</b>	<b>Concentration</b> % or mg.Kg <sup>-1</sup>		
Carbohydrates	6.7%	29.7%	15%
Lipids	21.9%	7%	7%
Protein	27.9%	7.4%	63%
Total nitrogen	61.35±4.73	n.d	n.d
Total phosphorus	18.07±5.40	n.d	7,503.3
Phosphorus pentoxide (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	41,400±12,374	n.d	n.d
Total potassium	2,400±71	20	14,129.7
Magnesium (Mg)	12,025±247	45,910	3,888.7
Magnesium oxide (MgO)	19,932±400	n.d	n.d
Calcium (Ca)	53,725±813	2,130	8,263.3
Calcium oxide (CaO)	75,150±1,131	n.d	n.d
Sodium (Na)	29,625±1,237	n.d	12,620
Chloride	40,500±3,394	n.d	n.d
Bicarbonate (HCO <sub>3</sub> )	25,625±1,308	n.d	n.d
Organic carbon	303,200±1,131	n.d	n.d
Organic matter	552,700±1,838	n.d	n.d
Iron (Fe)	604±66	403	653.7
Zinc (Zn)	160±14	30	26.8
Manganese (Mn)	149±11	51.3	42.9
Copper (Cu)	88±7	3	3.1
Boron (B)	78±9	140	n.d.

All units are expressed in mg.Kg<sup>-1</sup> of dried biomass. No data available (n.d.).

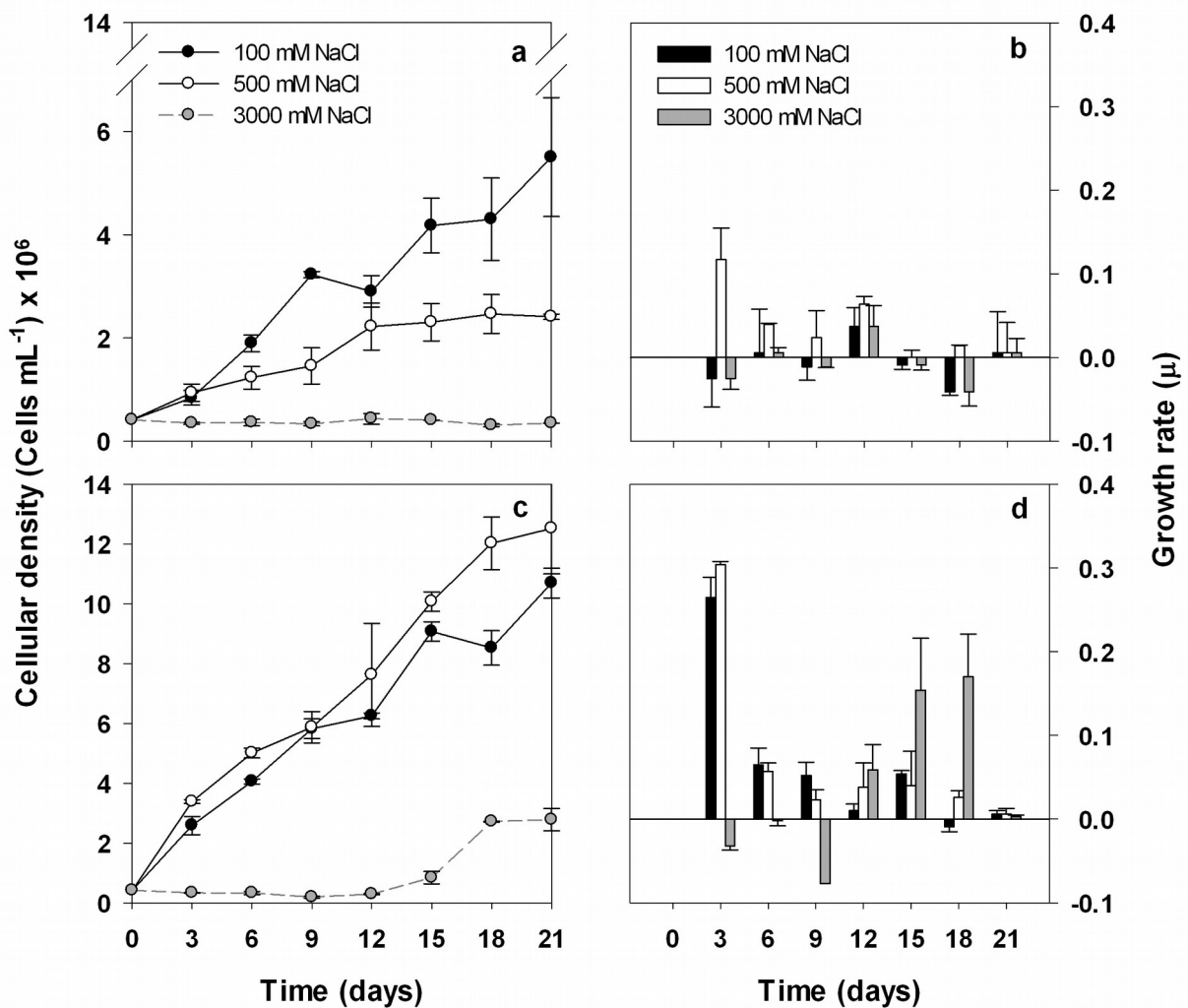
**Pigments analysis** A total of 16 pigments were evaluated in early stationary phase, condition C2. From these, nine photosynthetic and accessory pigment cellular quotas were reported in this work for *D. salina* SQ (Fig. 2). It is remarkable the high neoxanthin (2.33 pg cell<sup>-1</sup>) and violaxanthin (2.31 pg cell<sup>-1</sup>) content, even higher than that of Chl *a* (2.0 pg cell<sup>-1</sup>) or Chl *b* (1.16 pg cell<sup>-1</sup>).  $\beta$ -carotene yield was low (0.019 pg cell<sup>-1</sup>). In addition to these pigments, *D. salina* SQ has divinyl-PChlde *a* (Mg-DVP), lutein+zeaxanthin and traces of antheraxanthin.



**Figure 2. Pigment content as cellular quota from *D. salina* SQ harvested in early stationary phase, incubated with 18:6 (h) light:dark cycle at 500 mM NaCl (C2 condition).**

**Figura 2. Contenido de pigmentos como cuota celular de *D. salina* SQ cosechada en fase estacionaria temprana, incubada en ciclo de luz:oscuridad 18:6 (h) a 500 mM de NaCl (condición C2).**

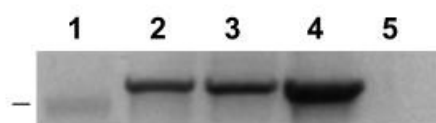
**Growth Dynamics** *D. salina* was able to grow under the three experimental salinities and light conditions tested, showing the highest growth rate ( $\mu=0.3$ ) and cell density ( $\delta=10.7-12.5 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ) in C4 and C5 conditions (low salinities). No significant differences were found between these conditions ( $p=0.55$ ). Only the highest salinity (3000 mM NaCl) negatively affected the growth of *D. salina* SQ (Fig. 3). The lowest values for  $\mu$  (0.1) and  $\delta$  ( $2.8-0.3 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ) were observed at high salinities (C3 and C6 conditions). No significant differences were found ( $p=0.13$ ).



**Figure 3. Growth kinetics and growth rates of *D. salina* SQ cultivated in three NaCl salinities and two light:dark cycles.** The 100 and 500 mM NaCl salinities were considered as low, and 3000 mM NaCl as high. **a** and **b**, at 18:6 (h) light:dark cycle; **c** and **d**, 24:0 (h) light:dark cycle. Each sign (squares and others) or bar represents the mean value with the standard deviation ( $n=3$ ).

**Figura 3. Dinámica y tasas de crecimiento de *D. salina* SQ cultivada en tres salinidades y dos condiciones de luz:oscuridad.** Las salinidades de 100-500 mM de NaCl fueron consideradas bajas y la de 3000 mM NaCl como alta. **a** y **b**, bajo ciclo de luz: oscuridad 18:6 (h); **c** y **d**, bajo régimen de luz: oscuridad 24: 0 (h) (n=3). Cada símbolo (cuadros y otros) o barra representa el valor promedio con su desviación estándar (n=3).

**Molecular identification** The PCR with the set of specific primers MA1 and MA2 for the 18S rDNA tested in *D. salina* SQ produces a fragment of approximate 1770 bp (Fig. 2). This size corresponds to that published by Olmos-Soto *et al.* (2002) for *D. salina* strain. The products of these reactions were sequenced, the analysis (Blast search) indicates a 100% similarity to *D. salina* 18S rDNA sequence EU589199.1 published by Jayappriyan *et al.* (2010).



**Figure 4. *D. salina* SQ identification by PCR amplification using MA1-MA2 primer set of 1,770 bp size fragment. Line 1, molecular marker; lines 2, PCR product from gDNA sample of *D. salina* SQ; line 3, PCR product from 1  $\mu$ L of *D. salina* SQ culture; line 4, PCR products from gDNA reference strain *D. salina* LB1644 and line 5, negative control PCR without DNA. Products from lines 2-3 were sequenced.**

**Figura 4. Identificación de *D. salina* SQ mediante amplificación por PCR usando el set de cebadores MA1-MA2 para un fragmento de 1,770 pb.** Línea 1, marcador molecular; línea 2, producto de PCR a partir de una muestra de DNAg de *D. salina* SQ; línea 3, producto de PCR a partir de 1  $\mu$ L de cultivo de *D. salina*; línea 4, producto de PCR a partir de DNAg de una cepa de referencia de *D. salina* LB1644 y línea 5, control negativo de PCR sin DNA. Los productos de las líneas 2-3 fueron secuenciados.

## Discussion

Nutrients profiles and proximal composition are affected, depending on the strain, stage of culture, light, media composition, initial inoculum, stressors. (Cade-Menun *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Benavente-Valdés *et al.*, 2016). Nevertheless, in average, marine microalgae accumulate 40-50% of carbohydrates, 6-18% of lipids and 50-60% of protein. The *D. salina* SQ cultured in MJM in condition 2 (Table 1: C2) accumulates in the early stationary phase 6.7% carbohydrates, 27.9% proteins and 21.9% in lipids. The high lipid values are consistent with the accumulation of lipids in the stationary and decline phase observed in *D. salina* (Belghith *et al.*, 2015). In comparison with the other *D. salina* (*D. Gold™*) and the *S. platensis* in Table 2, *D. salina* SQ showed a higher percent content of total lipids, Iron, Zinc, Manganese and Copper than *D. salina* (*D. Gold™*) and *S. platensis* (Tokuşoglu & Unal, 2003), as well as a major content of total protein and potassium than *D. salina* (*D. Gold™*). Just in terms of protein and potassium, *D. salina* SQ stored less than *Spirulina*, which had 29.1% in protein content and 10 times lower in respect to potassium (Table 2). We include additional results of nutritional compounds such as phosphorus pentoxide ( $P_2O_5$ ), magnesium oxide (MgO) and bicarbonates ( $HCO_3$ ) (Table 2). These compounds ( $P_2O_5$ ) are used in agriculture as fertilizer component or industry like as desiccator (Widowati & Asnah, 2014), (MgO) in construction and environmental applications due to their physical and chemical properties (Speight, 2013) or ( $HCO_3$  e.g.  $NaHCO_3$ ) in food production industry, in aquaculture as pH buffer or nutritional supplement (Pancha *et al.*, 2015)

As for the analysis of pigments, neoxanthin (Neo) and violaxanthin (Viol) were the most abundant pigments, both being at higher concentrations than Chl *a* or Chl *b*. Neo and Viol play an important role in photoprotection by the development of non-photochemical quenching (NPQ) in response to short-term exposure to excessive irradiance, de-exciting the Chl protein complex and reducing the O<sub>2</sub> production (Frank *et al.*, 1993; Niyogi *et al.*, 1997; Thaipratum *et al.*, 2009).

In biomedicine, carotenoids have great potential, Neo has shown strong anti-proliferative effect *in vitro* on human cancer cells (PC-3) by apoptosis (Kotake-Nara *et al.*, 2005). Violaxanthin from the microalgae *Chlorella ellipsoidea* and *Dunaliella tertiolecta* possess anti-inflammatory activity in mouse macrophage cells (Soontornchaiboon *et al.*, 2012) and anti-proliferative effect against human mammary cancer cell line (Pasquet *et al.*, 2011).

*D. salina* SQ increased cell densities in five of six conditions tested, except in C3 condition in light regime 18:6 h L:D cycle and salinity 3000 mM NaCl. When *D. salina* SQ was subjected to an increased stress, for high salinity, that significantly reduced its growth rate as compared to the obtained in low salinities (three times lower). These profiles of cell density and growth rate were similar to those obtained by Guevara *et al.* (2016) for a *D. salina* strain isolated from Arraya salinas (Venezuela), in which a decrease in both parameters was observed. Likewise, similar to those obtained by Pisal and Lele (2005) for a *D. salina* strain 19.3 (Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Germany). However, Farhat *et al.* (2011) found just the opposite, for a strain of *D. salina* isolated from Tunisia (Laadhibet). At low saline (600 mM), a significant reduction in the density obtained and the growth rate, which is reversed by increasing the salinity (from 1500 to 3000 mM).

The morphological analysis, its physiological response and the taxonomical keys, provided in Borowitzka & Silva, (2007) for marine and halophilic *Dunaliella* species, placed *D. salina* SQ only within the genus. The used keys were: halophilic species (key 1), and yellow or orange color in extreme conditions (key 6). In this context, when comparing the  $\beta$ -carotene cellular quota (0.02 pg cell<sup>-1</sup>) in the studied conditions (early stationary phase, C2 conditions) with other cellular quotas obtained for *D. salina*, 1.03±0.03 (1500 mM NaCl, 25 °C, 32.2  $\mu$ mol quanta m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) (Pisal and Lele, 2005) and 1.7 ± 0.01 (1000 mM NaCl, 20 °C, 382  $\mu$ mol quanta m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), que la cepa produce poco beta.

Further analysis by PCR/sequencing with the molecular markers MA1-MA2 grouped the strain with the 18S DNA (1770 bp) *D. salina* with zero introns (Olmos *et al.*, 2000; Wilcox *et al.*, 1992). This group does not produce  $\beta$ -carotene, except for the reference strain *D. salina* LB1644 (Paniagua-Michel *et al.*, 2009).

Considering PCR/sequencing results with MA1-MA2 molecular markers, it is possible that *D. salina* SQ are not a  $\beta$ -carotene hyperproducer, but a specific analysis will required to prove them.

Genomic identification reported by Lopez *et al.* (2017) and Magdaleno *et al.* (2017) that our isolated *D. salina* SQ strain corresponds to a *Dunaliella salina* species.

These differences could be explained by intraspecific variability promoted, to *D. salina* SQ, by the single-cell selection, supported by our physiological and genetic data.

## Acknowledgements

This project was supported by funds allocated to Pr. JLSH. RVY is very indebted to CONACyT for his PhD grant (No 160078). We appreciate comments

from Pr. María del Pilar Sánchez Savedra. 

## References

- Abomohra, A. E. F., Jin, W., Tu, R., Han, S. F., Eid, M., & Eladel, H. (2016). Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 596–606. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.056>.
- Almazán-Becerril A., García-Mendoza E. (2008). Maximum efficiency of charge separation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific off México : A nutrient stress diagnostic tool ? *Ciencias Marinas*, 34(1), 29–43.
- Abu-Rezq, T., Al-Hooti, S., & Jacob, D. (2010). Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. *J. Algal Biomass Utiln*, 1(July 2004), 12–19. Retrieved from <http://www.jalgalbiomass.com/paper2vol1no2.pdf>
- Assunção, P., Jaén-Molina, R., Caujapé-Castells, J., Wolf, M., Buchheim, M. A., de la Jara, A., ... Mendoza, H. (2013). Phylogenetic analysis of ITS2 sequences suggests the taxonomic re-structuring of *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae, Dunaliellales). *Phycological Research*, 61(2), 81–88. <https://doi.org/10.1111/pre.12003>.

- Barzegari, A., Hejazi, M. A., Hosseinzadeh, N., Eslami, S., Mehdizadeh Aghdam, E., & Hejazi, M. S. (2010). *Dunaliella* as an attractive candidate for molecular farming. *Molecular Biology Reports*, 37(7), 3427–3430. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9933-4>.
- Ben-Amotz, A. (1993). Production of B-Carotene and Vitamins by the Halotolerant Alga *Dunaliella*. In *Marine Biotechnology* (Vol. 1, pp. 411–417). New York.
- Ben-Amotz, a, & Avron, M. (1983). On the Factors Which Determine Massive beta-Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 72(3), 593–597. <https://doi.org/10.1104/pp.72.3.593>.
- Benavente-Valdés, J. R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J. C., Méndez-Zavala, A., & Montañez, J. (2016). Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, 10, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.001>.
- Bligh E. G., Dyer W. J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917.
- Borowitzka, M. A. (1990). *Technical resource papers: The Mass Culture of Dunaliella salina*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab728e/ab728e06.htm>
- Borowitzka, M. A. (1988). Algal Growth Media and Sources. In *Micro-algal Biotechnology* (pp. 456–465). Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab728e/ab728e06.htm>
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>.

- Borowitzka, M. a., & Siva, C. J. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 567–590. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9171-x>.
- Cade-Menun B. J., Paytan A. (2010). Nutrient temperature and light stress alter phosphorus and carbon forms in culture-grown algae. *Mar Chem* 121:27-36.
- Cadoret, J. P., Garnier, M., & Saint-Jean, B. (2012). *Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology. Advances in Botanical Research* (Vol. 64). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391499-6.00008-6>.
- Cai, M., He, L. H., & Yu, T. Y. (2013). Molecular Clone and Expression of a NAD<sup>+</sup>-Dependent Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase Isozyme Gene from the Halotolerant alga *Dunaliella salina*. *PLoS ONE*, 8(4), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062287>.
- Chen, Y., Xu T., Vijay R. K., Xu C. & Vaidyanathan S. (2015). Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*, *Energy Conversion and Management*. Elsevier Ltd, 106, pp. 61–72. doi: 10.1016/j.enconman.2015.09.025.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356.
- Farhat, N., Rabhi, M., Falleh, H., Jouini, J., Abdelly, C., & Smaoui, A. (2011). Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *dunaliella salina* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 47(5), 1072–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01036.x>.

- Fox J. (2017). Using the R Commander. A Point-and-Click Interface for R. CRC Press. CHAPMAN & HALL, USA.
- Frank, H. A. & Cogdell, R. J. (1993) in Carotenoids in Photosynthesis, eds. Young, A. & Britton, G. (Chapman & Hall, London), pp. 252-326.
- Ganesan V, S. H. (2014). Biomass from Microalgae: An Overview. *Oceanography: Open Access*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2332-2632.1000118>.
- Guevara M., Pinto R., Villarroel J., Hernández E., Díaz R., Gotera B. R. C. (2016) Influencia de la salinidad y la irradiancia sobre el crecimiento y composición bioquímica de una nueva cepa de *Dunaliella salina*, proveniente de las salinas de Araya, Venezuela, Saber, Universidad de Oriente, Venezuela., 28, pp. 494–501.
- Gonçalves A. L., Simões M., Pires J. C. M. (2014). The effect of light supply on microalgal growth, CO<sub>2</sub> uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Convers Manage* 85:530-6.
- Griffiths M.J., van Hille R. P., Harrison S. T. (2012). Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J Appl Phycol* 24:989–1001.
- Guo-Zhong, J., Yu-Min, L., Xiang-Li, N., & Le-Xun, X. (2005). The actin gene promoter-driven bar as a dominant selectable marker for nuclear transformation of *Dunaliella salina*. *Acta Genetica Sinica*, 32(4), 424–433.
- Heukelem, L. Van, & Thomas, C. S. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments, *Journal of Chromatography A*, 910, 31–49.

- Jayappriyan, K. R., Rajkumar, R., Kannan, P. R., Divya, S., & Rengasamy, R. (2010). Significance of 18S rDNA specific primers in the identification of genus *Dunaliella*, 1(1), 27–31.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L., & Bruff, B. S. (1968). Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology*, 95(4), 1461–1468.
- Kaçka, A., & Dönmez, G. (2008). Isolation of *Dunaliella* spp. from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol. *Bioresource Technology*, 99(17), 8348–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.042>.
- Kadkhodaei, S., Ariff, A. B., & Memari, H. R. (2011). Construction of an expression vector for production of tissue plasminogen activator ( t-PA ) in a transgenic microalgae bioreactor, 11, 193–196.
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C. H., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2008). Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology*, 26(11), 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.002>.
- Lin, J. J. Wang F. Y., Li W. S., & Wang T. Y. (2017). The rises and falls of opsin genes in 59 ray-finned fish genomes and their implications for environmental adaptation. *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-017-15868-7.
- Lopez, H., Magdaleno, D., & Stephano, J. (2017). The complete chloroplast genome of the green microalgae *Dunaliella salina* strain SQ. *Mitochondrial DNA Part B*, 2(1), 225–226. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1310610>.
- Lowry O. H, Rosebrough H. J., Farr A. L., Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

- Lundquist, T. J., Woertz, I. C., Quinn, N. W. T., & Benemann, J. R. (2010). A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. *Energy*, *October*(October), 1–14. <https://doi.org/10.1556/1848.2015.6.1.6>.
- Magdaleno, D., Lopez H. & Stephano J. (2017). The complete mitochondrial genome of the green microalgae *Dunaliella salina* strain SQ. *Mitochondrial DNA Part B*, *2*(1), 225–226. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1310610>.
- Niyogi, K. K., Bjorkman, O. and Grossman, A. R. (1997). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(25), pp. 14162–14167. doi: 10.1073/pnas.94.25.14162.
- Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J., Contreras, R., & Trujillo, L. (2002). Molecular identification of  $\beta$ -carotene hyper-producing strains of *Dunaliella* from saline environments using species-specific oligonucleotides. *Biotechnology Letters*, *24*(5), 365–369.
- 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. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-5-5>.
- Olmos, J., Paniagua, J., & Contreras, R. (2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology*, *30*(1), 80–84. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00672.x>.
- Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, *1*, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-2>.

- Pancha, I., Chokshi, K., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2015). Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 193, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.107>.
- Paniagua-Michel, J., Capa-Robles, W., Olmos-Soto, J., & Gutierrez-Millan, L. E. (2009). The carotenogenesis pathway via the isoprenoid-beta-carotene interference approach in a new strain of *Dunaliella salina* isolated from Baja California México. *Marine Drugs*, 7(1), 45–56. <https://doi.org/10.3390/md7010045>.
- Pasquet, V., Morisset, P., Ihammouine, S., Chepied, A., Aumailley, L., Berard, J. B., ... Picot, L. (2011). Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. *Marine Drugs*, 9(5), 819–831. <https://doi.org/10.3390/md9050819>.
- Powtongsook, S., Kittakoop, P., Menasveta, P., & Wisessang, S. (1995). Isolation and characterization of *Dunaliella salina* from Thailand. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 75–76. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/103V48214LQ62V81.pdf>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.
- Rad, F. A., Aksoz, N., & Hejazi, M. A. (2011). Effect of salinity on cell growth and  $\beta$  -carotene production in *Dunaliella sp.* isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology*, 10(12), 2282–2289. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1934>.

- Richmond A. & Hu Q. (2013). Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition. Wiley-Blackwell. ISBN 9780470673898, 9781118567166. 726 p.p.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Speight, J. G. (2013). The chemistry and technology of coal. *Fuel and Energy Abstracts*, 36(3), 835. [https://doi.org/10.1016/0140-6701\(95\)80007-7](https://doi.org/10.1016/0140-6701(95)80007-7).
- Thaipraturum R., Melis A., Svasti J., K. Yokthongwattana, Analysis of non-photochemical energy dissipating processes in wild type *Dunaliella salina* (green algae) and in *zea1*, a mutant constitutively accumulating zeaxanthin, *J. Plant Res.* 122 (2009) 465–476.
- Tran D., Trung V., Portilla S., Louime C., Doan N., Mai T., Tran D. and Ho T. (2013). Phylogenetic Study Of Some Strains Of *Dunaliella*. *American Journal of Environmental Sciences*, 9(4), 317–321. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2013.317.321>.
- Tokuşoglu, O., & Uunal, M. K. (2003). Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*, 68(4), 1144–1148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09615.x>.
- Wen, Z. Y., & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21(4), 273–294. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00051-X).
- Wilcox, L. W., Lewis, L. a, Fuerst, P. a, & Floyd, G. L. (1992). Group I introns within the nuclear-encoded small-subunit rRNA gene of three green algae. *Molecular Biology and Evolution*, 9(6), 1103–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1435237>.

Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., & Takriff, M. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), 6.  
<https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-6>.

## **CAPITULO III. *Dunaliella salina* como plataforma de producción de metabolitos y proteínas recombinantes.**

- ✓ **Búsqueda de promotores potenciales para la expresión en proteínas heterólogas en *Dunaliella salina* cepa SQ**
- ✓ **Avances en la construcción de un vector de expresión para la expresión de proteína G de *Streptococcus sp* en *D. salina* cepa SQ**
- ✓ **Transfección de *D. salina* cepa SQ con el vector de expresión pCAMBIA1302-pG**
  - ✓ **Transfección por método de biobalística**
  - ✓ **Transfección mediante electroporación**

## RESUMEN

Resumen: El cultivo de microalgas para la expresión de proteínas recombinantes tiene muchas ventajas sobre otros sistemas no autótrofos. La microalga *Dunaliella salina* posee además, características como el adquirir resistencia a antibióticos y su halotolerancia, que le permiten ser seleccionada en una gran variedad de ambientes. En este trabajo se diseñó una proteína recombinante a partir de la proteína G (pG) de *Streptococcus* sp, optimizada para su expresión en *D. salina*. La pG es un antígeno con una gran afinidad hacia un sinúmero de anticuerpos, lo que la hace tener un alto valor en la industria farmacológica. Se transformó *D. salina*, utilizando tres métodos: a) bombardeo con micropartículas, b) transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y por electroporación. Del método de bombardeo se obtuvieron transformantes con el gen sintético de la pG integrado en núcleo y (o) en cloroplasto. Para el método por electroporación, solamente en núcleo. Por medio de purificación con anticuerpos se recuperó y cuantificó mediante ELISA la pG a partir de un lisado de *D. salina* (1L de cultivo  $7 \times 10^6$  cel/mL). La cuantificación reveló que la expresión en cloroplastos supera a la de núcleo en una relación 3:1. De cloroplastos se obtuvo una producción de 32mg/mL, superando lo que se produce actualmente en otros sistemas.

**Palabras clave:** Microalga, *Dunaliella salina*, composición proximal, pigmentos, proteína G.

## INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *D. salina* POR ZEOCINA

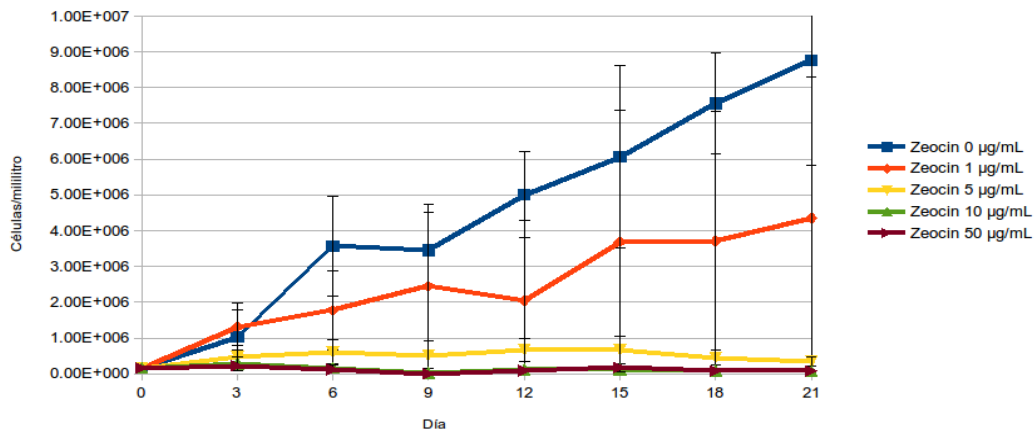


Figura. Dinámica de crecimiento de *D. salina* en MJM a 100 mM de NaCl bajo luz continua a  $\sim 1.64 \times 10^3$  LUX con zeocina de 0-50 µg/mL.

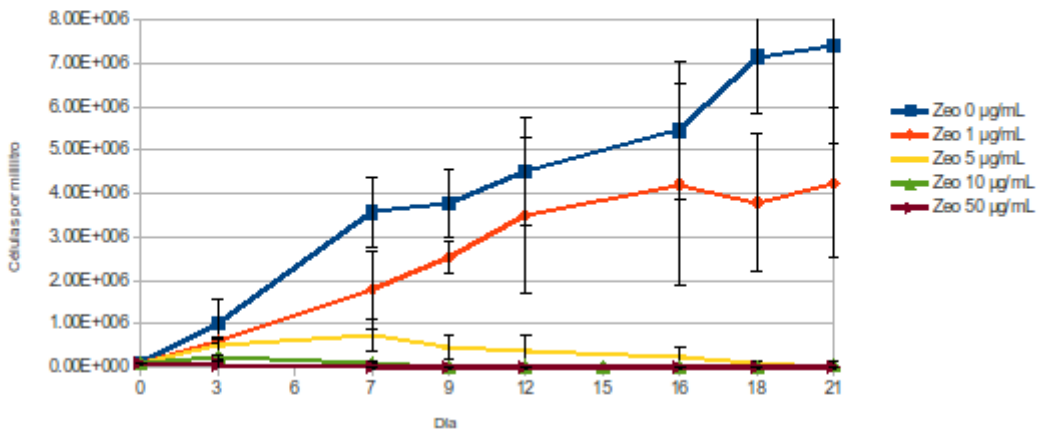


Figura. Dinámica de crecimiento de *D. salina* en MJM a 500 mM de NaCl bajo luz continua a  $\sim 1.64 \times 10^3$  LUX con zeocina de 0-50 µg/mL.

# Identificación molecular de cepa proveniente de San Quintín

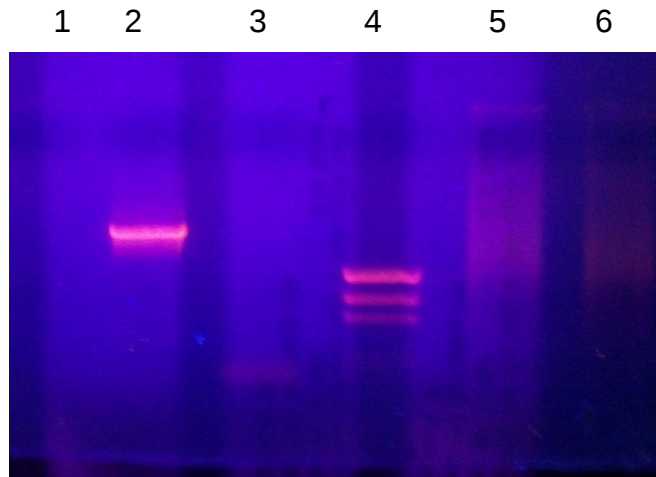
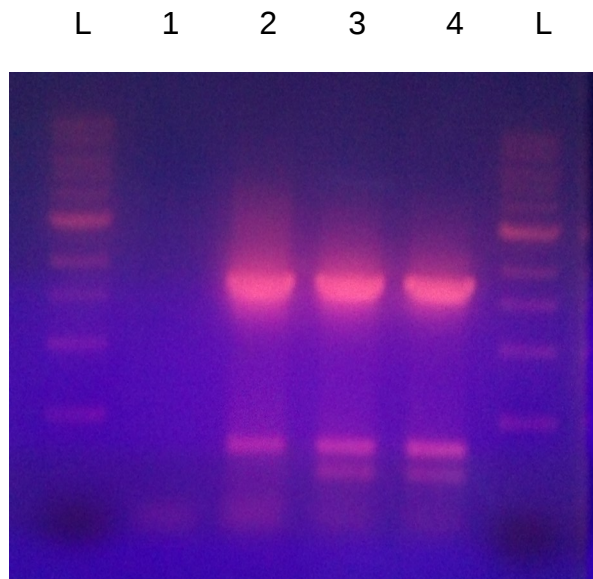
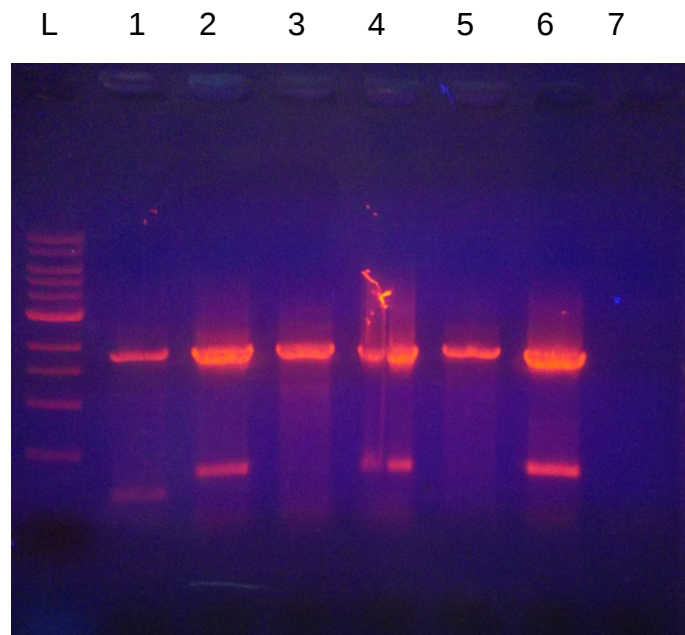


Figura. Identificación molecular de cepa de San Quintín por PCR con cebadores específicos para el género *Dunaliella* a partir de muestras de gDNA. Línea 1, Línea 4, marcador molecular 1000, 700, 500 pb.



**Figura. PCR para corroborar fragmento accesorio encontrados por Haydeé.** Sistema GoTaq, usando la máxima concentración de  $MgCl_2$  recomendada y los primers *MA1*, *MA1* y *MA3*. L es un marcador de peso molecular de 1 kb, 1-4, reacciones descritas en la página 113 de la bitácora. Vol carga: 12  $\mu$ L muestra 90 V por 35 min.



**Figura. PCR para corroborar fragmento accesorio encontrados por Haydeé.** Sistema GoTaq, usando la máxima concentración de  $MgCl_2$  recomendada y los primers *MA1*, *MA1* y *MA3 en pares*. L es un marcador de peso molecular de 1 kb, 1-7, reacciones descritas en la página 114 de la bitácora. Vol carga: 12  $\mu$ L muestra 90 V por 35 min.

Línea	1	2	3	4	5	6	7
Muestra	C7	C7	H	H	WT	WT	(-)
Primer 1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1	MA1
Primer 2	MA2	MA3	MA2	MA3	MA2	MA3	MA2
Resultado	++	+++	+++	+++	++	+++	---
	---	+	---	+	---	+	---
	+	---	---	---	---	---	---

Figura. PCR con cebadores MA1-MA2 que amplifican la región 18S. Electroforesis al 1% teñida con bromuro de etidio. Teórico 2,170 ó 1,770 pb (Olmos *et al*, ). PCR master mix Qiagen, en esta serie de reacciones se utilizaron dos microlitros de templete en lugar de uno.

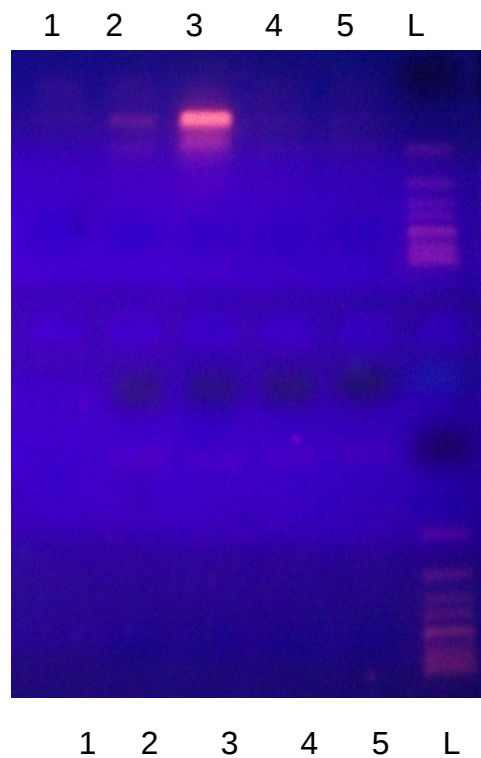
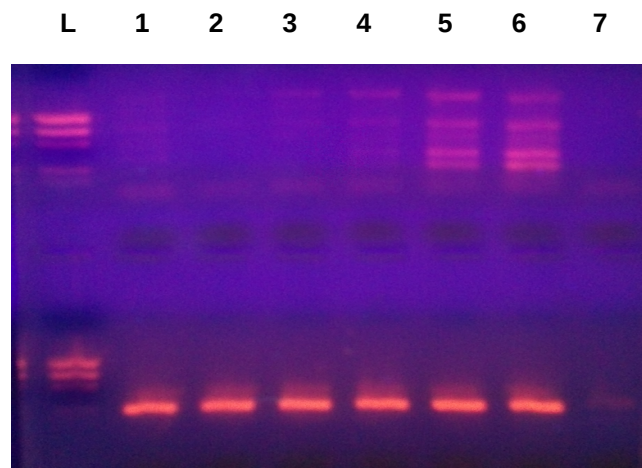


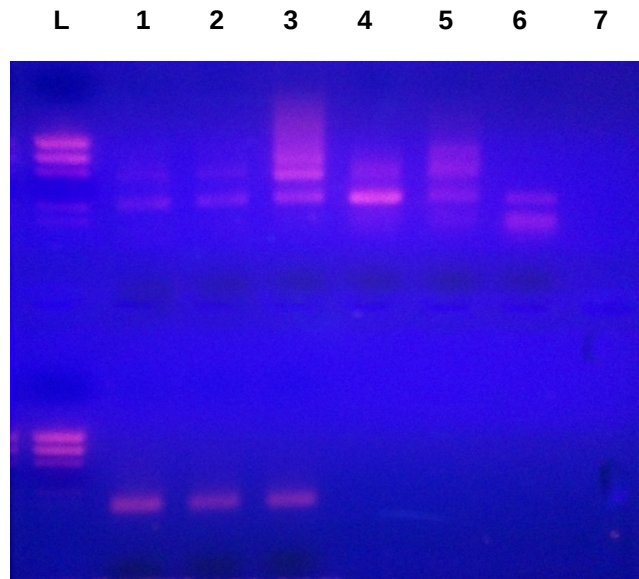
Figura. PCR para estandarizar condiciones con primers DsChl F, DsChl R, 3lgG F y 3lgG R (Termo PE). Sistema GoTaq, usando la máxima concentración de MgCl<sub>2</sub> recomendada. Perfil de reacción en página 115. L es un marcador de peso molecular de 1 kb, 1 Vol carga: 12 µL muestra 90 V por 30 min. En agarosa al 1.2%.

Gradiente °C 59.4 58.3 56.3 53.9 52 50.7 53.9



L	1	2	3	4	5	6	7
	Gradiente °C 59.4 58.3 56.3 53.9 52 50.7 53.9						

**Figura. PCR de gradiente para estandarizar condiciones con primers DsChl F, DsChl R, 3lgG F y 3lgG R (termo LuisE).** Sistema GoTaq, usando la máxima concentración de MgCl<sub>2</sub> recomendada. Perfil de reacción en página 116. L es un marcador precision mass molecular mass standar, Vol carga: 12 µL muestra 90 V por 30 min. En agarosa al 1.2%.



L	1	2	3
---	---	---	---

**Figura. PCR con primers 3lgG F/3lgG R y de cloroplasto (Hayde).** Sistema GoTaq, usando la máxima concentración de MgCl<sub>2</sub> recomendada. Perfil de reacción en página 116, T<sub>m</sub>= 59 °C, en termo PE. L es un marcador precision mass molecular mass standar, Vol carga: 13 µL muestra 90 V por 30 min. En agarosa al 1.2%.

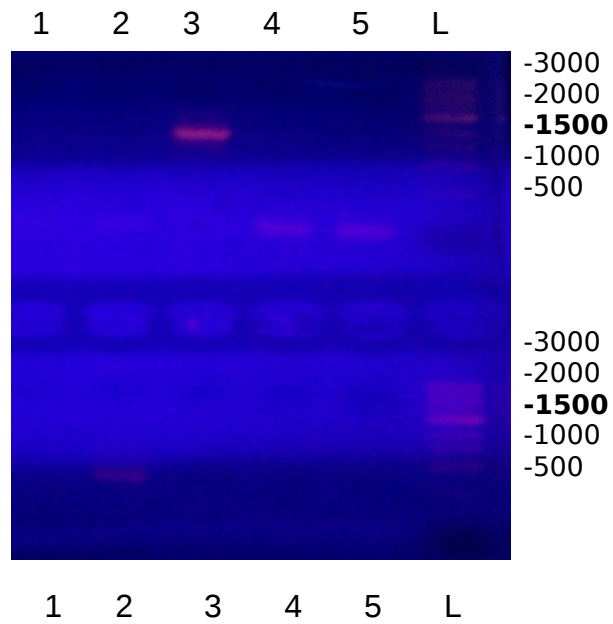


Figura . PCR a partir de gDNA *D. salina*

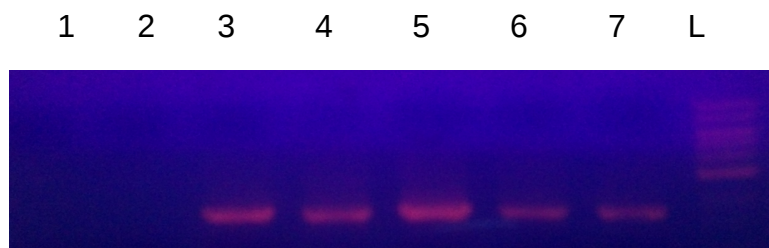


Figura. PCR control, para evaluar el DNAg extraído de diferentes muestras. L marcador de peso molecular de 1 kb, 1-7, reacciones descritas en la página 111 de la bitácora.

**Costrucción de un vector de expresión para proteína G de Streptococcus sp para *Dunaliella salina*.**

## PCR Primers:

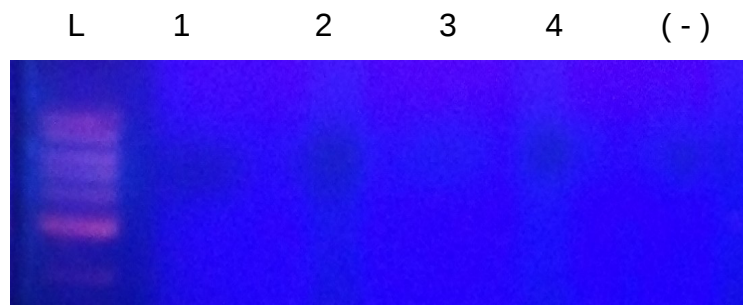
dca1 sense dca1 anti Templetos

1. WT DNA 1 65 ng/μL
2. WT DNA 2 46 ng/μL
3. Dsal WT 43 ng/μL
4. Dsal mix (C7-C8) 59 ng/μL
5. No DNA, control negativo

Prueba a 65 °C para establecer T<sub>m</sub> de trabajo.

Perfil térmico: 95 °C 1 min, 35 (95 °C 30 s, 65 °C 40 s, 72 °C 40 s), 72 °C 10 min, 10 °C α.

Sistema GoTaq con green buffer a 4 mM de MgCl<sub>2</sub>.



Electroforesis de PCR con cebadores dca 1, flanquean el promotor de la anhidrasa carbónica I de *Dunaliella salina*. Agarosa al 1 %, teñida con bromuro de etidio. Corrida a 90 v. Volumen de carga 15 μL.

Resultado: negativo. No se obtuvo ningún producto de amplificación.

Se probará reducir la T<sub>m</sub> a 60 °C.

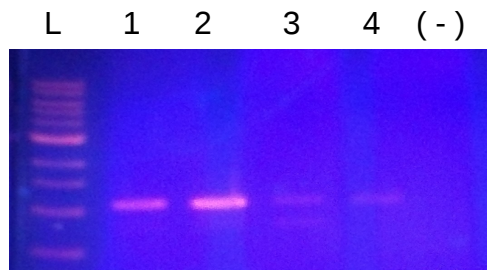
## PCR

Primers:

- Dsal CAII F

- Dsal CAII I
- Dsal CAII R

Templetes, perfil térmico, sistema de PCR y electroforesis: se utilizaron las mismas condiciones descritas en la reacción anterior.



Electroforesis de PCR con cebadores Dsal CAII, flanquean el péptido señal de la anhidrasa carbónica II y el gen de la anhidrasa II de *Dunaliella salina*. Agarosa al 1 %, teñida con bromuro de etidio. Corrida a 90 v. Volumen de carga 15  $\mu$ L.

Resultado: positivo para los cuatro templetes y negativo para el control negativo (sin DNA).

Se realizaron 4 reacciones más bajo las mismas condiciones, incrementando el volumen de reacción a 50  $\mu$ L y el control negativo. Esto con el fin de obtener suficiente producto para purificar y secuenciar.

## PCR

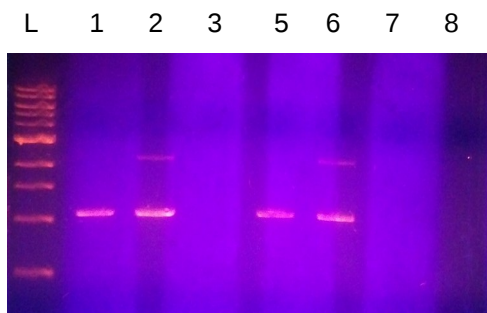
Prueba con el sistema One Taq DNA Polymerase NE BioLabs M0480L Lot 0011101

Las reacciones 1-4 fueron preparadas con 1  $\mu$ L más de H<sub>2</sub>O por reacción (Otaq mix 1), por un error en el preparado del mix.

Las reacciones 5-8 se prepararon con un mix sin el error de volumen (Otaq mix 2).

Reacción	Templete	Primers Mix	
1	Dsal WT 1	Dsal CAII	Otaq mix 1
2	Dsal WT 2	Dsal CAII	Otaq mix 1
3	Control (-)	Dsal CAII	Otaq mix 1
4	Dsa WT1	ca I	Otaq mix 1
5	Dsal WT 1	Dsal CAII	Otaq mix 2
6	Dsal WT 2	Dsal CAII	Otaq mix 2
7	Control (-)	Dsal CAII	Otaq mix 2
8	Dsal WT 1	ca I	Otaq mix 2

Perfil térmico : 94 °C 30 s, 35 (94 °C 30 s, 65 °C 40 s, 72 °C 1 min 2 s), 72 °C 10 min, 10 °C  $\alpha$ .  
9



Electroforesis de PCR con cebadores ca I y Dsal CAII, Agarosa al 1 %, teñida con bromuro de etidio. Línea 3, control negativo. Corrida a 90 v. Volumen de carga 15  $\mu$ L (12  $\mu$ L de muestras y 3  $\mu$ L amortiguador de carga).

**Resultado:** positivo para todas las reacciones con templete y negativo para los controles (libre de DNA). Las reacciones 2 y 6, realizadas con el templete WT 2 generaron un producto adicional de > 2000 pb. La reacción No 4 no se cargó en el gel. Se evaluará posteriormente.

## PCR CAII

Siguiente: se realizaron 4 reacciones de 50 µL en las mismas condiciones para obtener producto para purificar y enviar a secuencia. Además el control negativo.

Continúa de p54, se busca amplificar dca I, prueba de dos reacciones con el sistema One Taq DNA Polymerase NE BioLabs M0480L Lot 0011101. Tm 55 °C.

Resultado: no hay amplificación.

Prueba con sistema Phusion HS II, se busca el mismo objetivo, dca I. Tm 72 °C. PCR de dos pasos, recomendado (por el proveedor) para fragmentos mayores a 1000 pb y longitudes de primers superiores a 25 pb.

Resultado: negativo, no hay amplificación.

-Medir concentración de primers para corroborar concentración de la etiqueta, ya que no se ha obtenido ninguna amplificación.

## PCR

### P55R

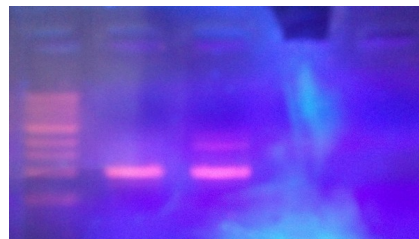
Sistema Phusion HS II, cebadores dca I. Perfil térmico: 35 (98 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s).

Nota: los cebadores dca I generan un producto de 1,352 pb.

Reacción	Templete
1	WT1
2	WT2
3	No DNA
4	???

L	1	2	3	4
---	---	---	---	---



3000  
2000  
1500  
1000  
500

Resultado: positivas las reacciones 1 y 2, esta última con un producto accesorio.

Falta verificar el tamaño, parece haberse contaminado con los cebadores DCAII.

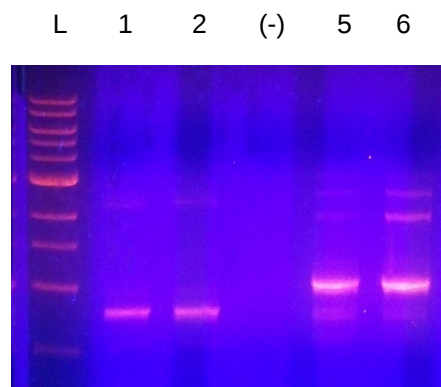
Correr nuevamente las muestras en un mismo gel con los productos de amplificación de CAII.

PCR CAII

02/Ago/2013 P57

El objetivo es comparar los tamaños de los productos que se obtienen con los cebadores DsalCAII y dcal.

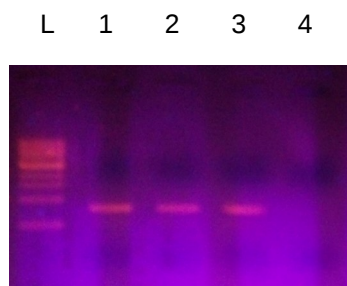
En esta reacción para la amplificar CAII sólo se utilizaron los cebadores DCAII F y R. Los productos se evaluaron por electroforesis con otros productos generados previamente por dcal.



PCR  
05/Ago/2013 P57

CAII

El objetivo es obtener suficiente producto de PCR purificar y mandar secuenciar, utilizando los cebadores DsalCAII F y DsalCAII R, sin usar el cebador interno (DsalCAII I).



Electroforesis a 80 v 30 min, agarosa al 1%. Cargados 4 µl de muestra. 1-3 template DsalWT1, 4 control negativo sin DNA.

Resultado: positivo para muestras 1-3, reacciones 1-2 de 50 µl y 3 de 25.

Los productos 1-3 se mezclaron y se dividieron en dos volúmenes de 40 µl, fueron purificados con el kit Qiaquick de Qiagen (28104), se resuspendieron en 30 µl de amortiguador EB y se evaluaron en un Nanodrop ND1000.

Hace falta evaluar nuevamente en gel y realizar más PCRs para obtener más producto para purificar. Las muestras estuvieron almacenadas por aproximadamente cinco días a 4 °C, antes de ser purificadas.

PCR varios pares de primers

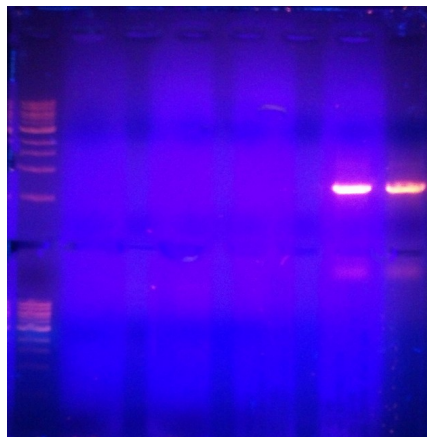
P57

Sistema OneTaq HF

Tm usada 65 °C.

Primers	Template
1 DCAII F y DCAII R	Dsal WT1
2 DCAII F y DCAII R	Dsal WT1
3 DCAII F y DCAII R	Ninguno
4 DCAII I y DCAII R	Dsal WT1
5 DCAII I y DCAII R	Ninguno
6 eGFP F y eGFP R	Plásmido-eGFP
7 eGFP F y eGFP R	Plásmido-eGFP
8 eGFP F y eGFP R	Ninguno
9 PppG f y PppG R	pCAMBIA-pG
10 PppG f y PppG R	pCAMBIA-pG
11 PppG f y PppG R	ninguno

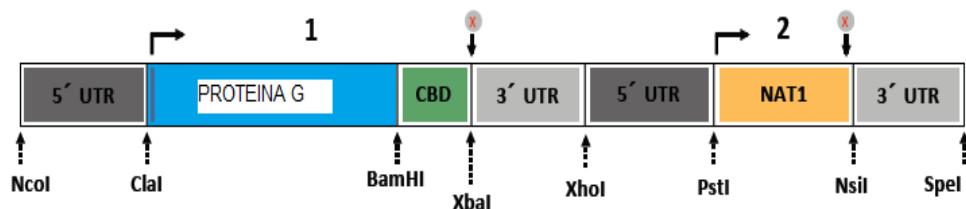
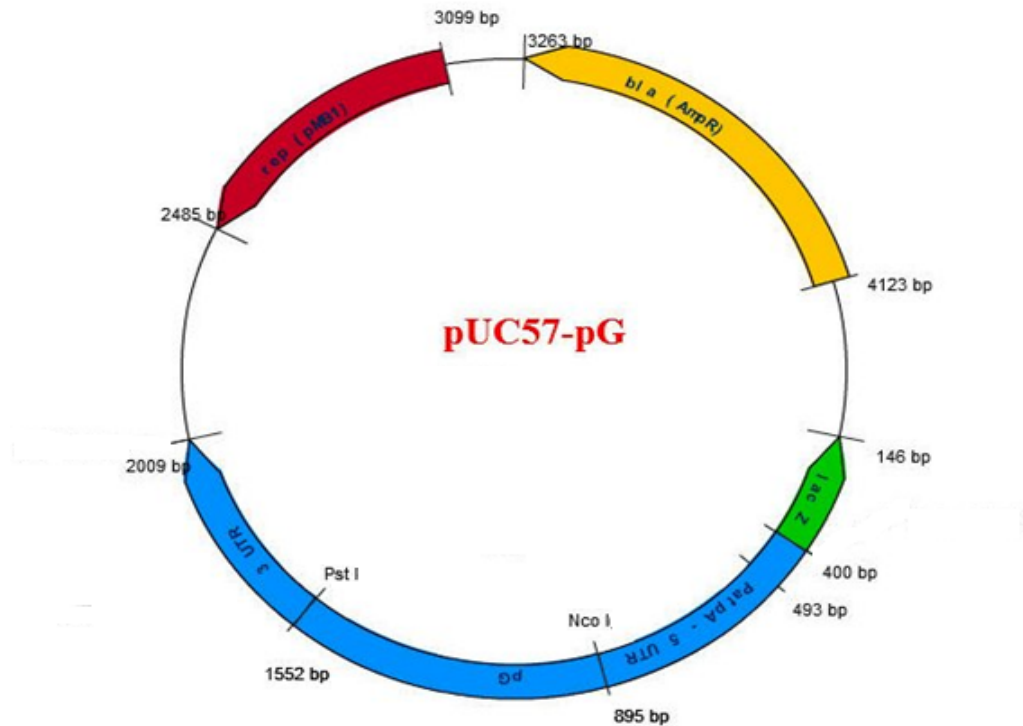
L 1 2 3 4 5 6 7



L 8 9 10 11

# Trabajo previo

El casete de expresión de la proteína G se sintetizó inicialmente en pUC57. El casete (teóricamente) está constituido por el promotor atpA (PatpA) en 5'UTR de 495 pb, el gen de la proteína G de 657 pb y el 3' UTR de 457 pb. A este vector se le nombró pUC57-pG.



Casete en plásmido de con el inserto de proteína G, con sus respectivos cortes.

El plásmido SF pG3 (clona 1) contiene la proteína G clonada del cual se espera un fragmento de 645pb.



ACATCTTAAAATGCTGCAGCATCACCATCACCATCACGATGATGATGATAAAAATGACAGATACATATAAA  
 TTAATTTTAAATGGTAAAACCTTAAAAGGTGAAACAACCACGGAAGCTGTTGATGCGGCGACAGCTGAAA  
 AAGTTTTTAAACAATATGCGAATGACAACGGAGTTGATGGGGAATGGACATATGATGACGCGACGAAAAC  
 CTTTACAGTTACAGAAAAGCCGGAGGTTATTGATGCTTCTGAATTAACGCCTGCTGTTACAACCTATAAA  
 CTTGTTATTAATGGCAAAACATTTAAAAGGGGAAACAACCACGGAAGCGGTTGATGCTGCGACAGCTGAAA  
 AGGTCTTTAAACAATATGCGAATGACAACGGAGTTGATGGTGAATGGACATATGATGACGCTACCAAAAC  
 ATTTACCGTTACAGAAAAACCTGAAGTTATTGATGCGTCTGAGTTAACACCGGCTGTTACGACATATAAA  
 TTAGTTATTAATGGGAAAACATTGAAAGGTGAAACAACGACCAAAGCTGTTGATGCTGAAACAGCGGAAA  
 AGGCGTTTAAACAATATGCTAATGACAACGGAGTTGATGGTGTGGACATATGACGATGCTAC

NNNNNNNNNNN Cebadores 3IgG F y R

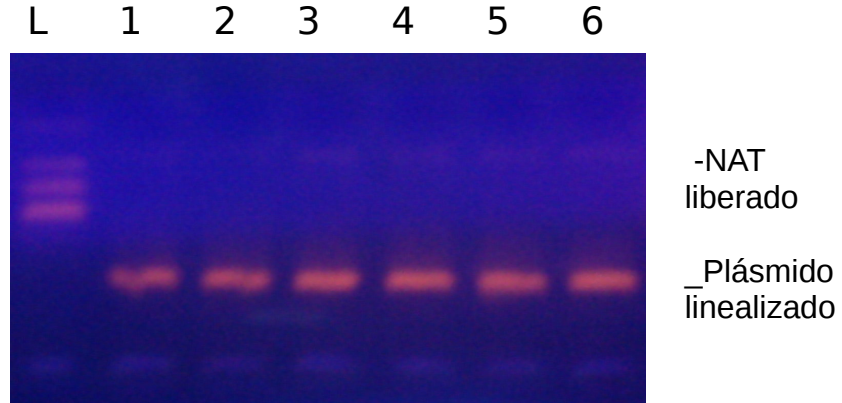
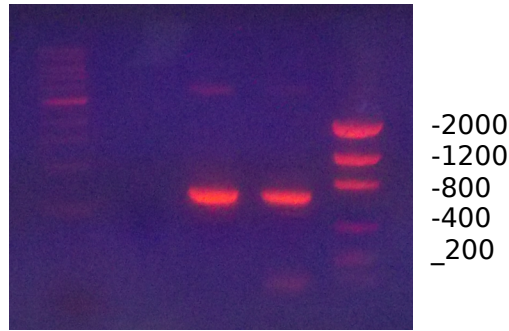


Figura . Doble digestión (Pst I/Sal I) del plásmido de la muestra SF pG3 (clona 1). Plásmido pUC57:RCBS2-NAT.

.

El plásmido SF pG3 (clona 1) contiene la proteína G clonada del cual se espera un fragmento de 645pb.

L1 1 2 3 L2



**Figura 1. Productos de PCR con los cebadores Pst-cam F y Sal-cam R, a partir de la muestra con ADN plasmídico SF pG3 (clona 1).** Electroforesis en gel agarosa al 1%, teñida con bromuro de etidio, corrida durante 25min a 110V. Vol. Carga de L1 4 $\mu$ L+ 2 bromofenol (BromF). 1 y 2: 8 $\mu$ L de muestra +2 BromF. L2 4 $\mu$ L.

De las muestras 2 y 3 (m2 y m1) se obtiene el fragmento de tamaño aproximado al esperado, en m1 se observan dos fragmentos adicionales, uno de bajo peso molecular, menos de 100pb y otro de alto peso, más de 2,000. Y este último se observa también en m2.

## **Comentarios sobre posibles rutas alternativas para la producción de proteína G**

Sobre la producción en microalgas de proteína G, puede explorarse la posibilidad de producirla mediante un virus de microalga que contenga clonada la secuencia de la proteína G con un promotor viral, de alguna de sus proteínas constitutivas.

La infección podría realizarse en la última fase del crecimiento logarítmico

## pGEM-T

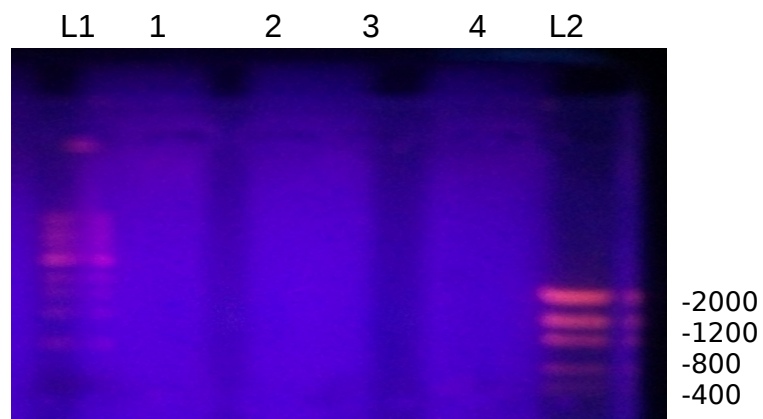
Este vector modificado debe contener la siguiente construcción:

5'*Nco*/ 5' UTR *Cla* / Promotor pG-LMG *Bam* *Hl* *CBD* *Xba* / 3' UTR *Xho* / 5' UTR *Pst* / Promotor NAT1 *Nsi* /  
3' UTR *Spe* /

**Nota:** el subrayado solo fue puesto para distinguir entre regiones. En itálicas se distinguen los sitios de corte con diferentes endonucleasas.

Cuantificación de plasmídico, del grupo de muestras marcadas 1-6.

- Muestra marcada 1: 572 ng/μL
- Muestra marcada 2: 259 ng/μL



**Figura.** Amplificación por PCR del gen pG de *Streptococcus sp.* a partir del plásmido pGEM-pG

# Resultados experimentos de transfección por biobalística en la cepa *Dunaliella salina* SQ

experimento de cuatro muestras

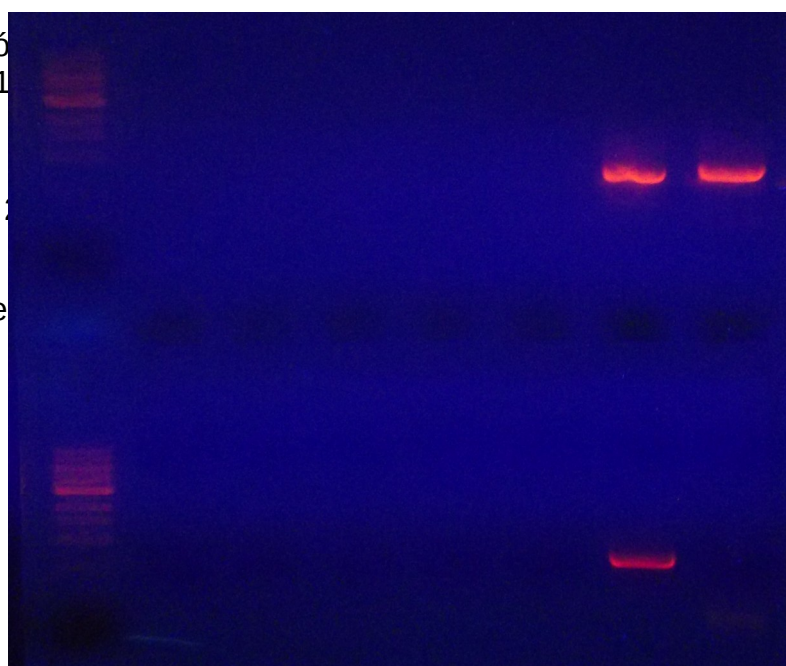
1. **C7 MJM** 100 mM NaCl 500  $\mu$ L + 48 mL MJM 200  $\mu$ g/mL Hyg (18/Nov/12).
2. **C8 MJM** 100 mM NaCl 500  $\mu$ L + 48 mL MJM 200  $\mu$ g/mL Hyg (18/Nov/12).
3. **WTMJM** 100 mM NaCl 500  $\mu$ L + 48 mL MJM 200  $\mu$ g/mL Hyg (18/Nov/12).
4. **WTMJM** 100 mM NaCl 500  $\mu$ L + 48 mL MJM 200 No Hyg (18/Nov/12).

Se realizó un conteo celular con el contador Scepter (Millipore: PHC00000).

Fue verificada la calibración antes de empezar

Muestra	Días	Crecimiento (visual)	No Células cel/mL	Tamaño medio celular	Observaciones en microscopio óptico
1	10	-	$8.69 \times 10^4$		4 campos 0 cel sí se observaron fuera de los campos
2	10	+++	$1.27 \times 10^6$		4 campos $0.902 \times 10^6$
3	10	-	$6.323 \times 10^4$		4 campos 0 cel no se observaron fuera de los campos
4	10	++	$4.831 \times 10^5$		4 campos cel abundantes < M1

Se realizó con Lugo (1000) en esta muestra La muestra densidad ce



las células mL de Hyg. o alcance la

4000  
3000  
2000  
1500  
1000  
500

---

---

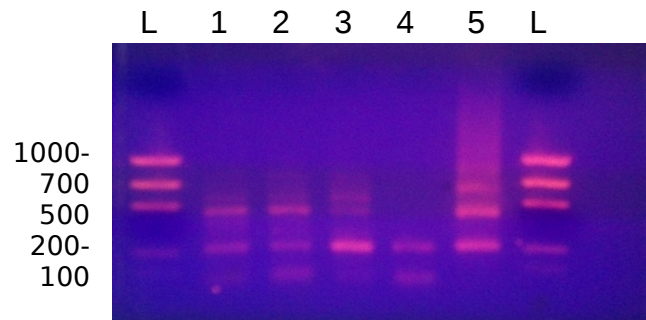
**Figura. PCR control, para evaluar la presencia de proteína G: primers *PstcamF* y *SalcamR*.** L marcador de peso molecular de 1 kb, 1-7, reacciones descritas en la página 112 de la bitácora. Vol carga: 12  $\mu$ L muestra + 3  $\mu$ L buffer de carga. 90 V por 30 min.

- La banda que le aparece es de alrededor de 300 pb.

Se continua con la estandarización de condiciones de PCR en el termociclador PE 5600 para los cebadores 3IgG. En la serie de reacciones que se prueban se utiliza como Tm 60 °C y las siguientes condiciones térmicas de reacción: 2 min 94 °C, 35 ciclos (40 s 94 °C, 40 s 60 °C, 40 s 72 °C), 10 min 72 °C y 10 °C por tiempo indefinido.

Las reacciones se realizaron en el orden siguiente, con los templates descritos a continuación:

Reacción	Template	Volumen
1	DNA7	1 µL
2	DNA8	1 µL
3	WT1	0.8 µL
4	No DNA	
5	pCAMBIA+pG	0.8 µL



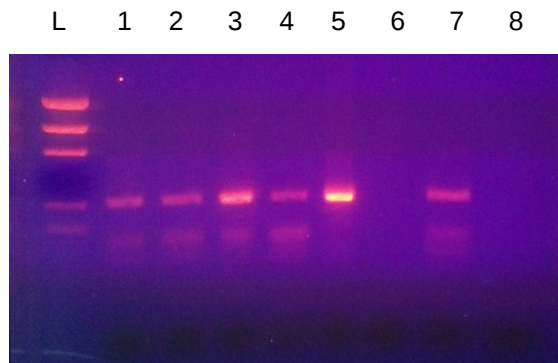
**Figura. PCR con cebadores 3lgG F y R.** Electroforesis a 90 V por 50 min en agarosa al 1.2% (Omnipure PCR Plus).

Las reacciones realizadas denotan contaminación de los reactivos, inclusive el control sin DNA amplificó (línea 4). Sin embargo, en todas las reacciones se obtiene una banda de cerca de 200 pb, lo cual coincide con la banda esperada de 220.

Para identificar la fuente de contaminación, se preparó un nuevo master mix, variando la concentración de  $MgCl_2$  a 1.5 mM, ésto último, para modificar la generación de bandas accesorias observadas en las reacciones anteriores. Se realizaron las mismas reacciones anteriores y adicionalmente se realizaron tres reacciones más. La primera con DNA (pCAMBIA-pG) y sin primers, la segunda sin DNA y con primers y la última sin DNA y sin primers.

El resultado de las reacciones de la tabla y la imagen siguientes muestran que al bajar la concentración de cloruro de magnesio a 1.5 mM y elevar de 59 a 60 °C de temperatura de alineamiento se eliminan los productos inespecíficos de las reacciones.

Reacción	Templete	Primers	Volumen
1	DNA7	+	1 µL
2	DNA8	+	1 µL
3	WT1	+	0.8 µL
4	No DNA	+	
5	pCAMBIA+pG	+	0.8 µL
6	pCAMBIA+pG	-	0.8 µL
7	No DNA	+	
8	No DNA	-	

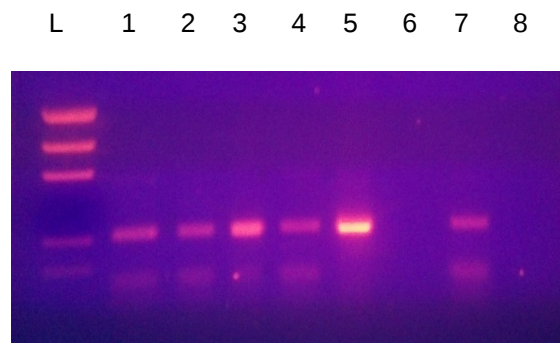


Al considerar los resultados de las reacciones anteriores, determinó que los cebadores estaban contaminados. Por lo anterior, se prepararon nuevas alícuotas (stock de H<sub>2</sub>O) y se realizaron las mismas reacciones de PCR. Las reacciones 6 y 7, probablemente estén mal preparadas. Sin embargo, hasta no ver los resultados, solo es una probabilidad.

Al considerar los resultados de las reacciones anteriores, determinó que los cebadores estaban contaminados. Por lo anterior, se prepararon nuevas alicuotas (stock de H<sub>2</sub>O) y se realizaron las mismas reacciones de PCR. Las reacciones 6 y 7, probablemente estén mal preparadas. Sin embargo, hasta no ver los resultados, solo es una probabilidad.

Las reacciones descritas a continuación se prepararon con alicuotas nuevas de primers y con master mix nuevo. Continúa el problema de contaminación en las reacciones 4 y 7 que no tienen DNA. Por lo anterior se invalida el resto de las reacciones.

Reacción	Template	Primers	Volumen
1	DNA7	+	1 µL
2	DNA8	+	1 µL
3	WT1	+	0.8 µL
4	No DNA	+	
5	pCAMBIA+pG	+	0.8 µL
6	pCAMBIA+pG	-	0.8 µL
7	No DNA	+	
8	No DNA	-	



Para validar el PCR con los primers 3IgG se preparó un mix nuevo, cambiando la marca de la polimerasa por la HF Phusion HS (Thermo Scientific). Se prepararon las mismas reacciones que en la tabla anterior, modificando el perfil térmico para las características de la HF Fusion y las concentraciones de reacción recomendadas por la casa comercial. La T<sub>m</sub> utilizada fue la misma.

Las reacciones descritas fueron realizadas en el termociclador PE de aceite debido a una falla en el equipo PE 9700. Cada reacción fue transferida de tubos de 0.2 a tubos de 0.5 mL. Además de lo anterior, las reacciones permanecieron a 4 °C durante aproximadamente 1 hora entre la preparación y la transferencia de tubos. Finalmente por un error en la programación del termociclador las reacciones fueron sometidas en tres ocasiones por 2 min a 98 °C.

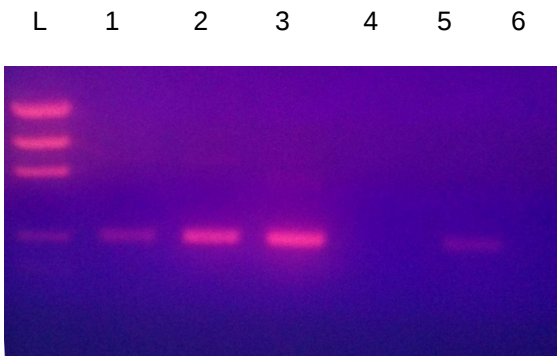
No hubo resultados de la reacción y no puede haber una explicación aceptable debido a todas las variaciones realizadas al método.

### PCR con primers 3Ig F y R, sistema HF Fusion HS II (Thermo Scientific)

Alicuotas nuevas: PCR mix, polimerasa

Alicuotas anteriores: H<sub>2</sub>O, primers, dNTPs

Reacción	Templete	Primers	Volumen
1	DNA7	+	0.5 µL
2	WT1	+	0.5 µL
3	pCAMBIA+pG	+	0.5 µL
4	pCAMBIA+pG	-	0.5 µL
5	No DNA	+	
6	No DNA	-	



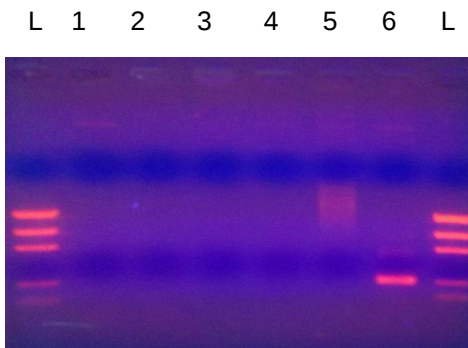
El producto o artefacto de la reacción número 5, sigue evidenciando contaminación o la formación de dímeros de primers. Para corroborar que no se esté dando la formación de dímeros, se realizarán dos grupos de reacciones con el sistema HF Fusion. Las reacciones de prueba serán con todos los componentes de la reacción, salvo la polimerasa.

-Si se da la formación de dímeros se descarta la contaminación de alguno de los stocks restantes y se optará por la utilización de otros pares de cebadores combinados.

### PCR con primers 3IgG F y R, sistema HF Fusion HS II (Thermo Scientific)

Prueba para corroborar la formación de dímeros

Reacción	Templete	Primers A	Primer B	Polimerasa
1	+	+	+	-
2	-	+	+	-
3	+	-	-	+
4	+	-	+	+
5	+	+	-	+
6	+	+	+	+



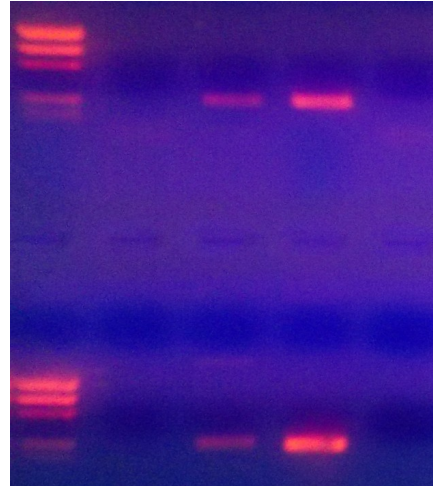
El resultado muestra que no hay formación de dímeros. La reacción No 6 sin embargo, muestra barrido producto de alguna interacción del primer A y el templete, que no se genera con los primers juntos.

La siguiente prueba, se realizará utilizando alícuotas nuevas de todos los reactivos y con nuevos stocks de agua y de dNTPs. Las alícuotas serán preparadas en la campana de flujo laminar, con esterilización del área por UV y descontaminación con alcohol.

PCR con primers 3IgG F y R, sistema Pfu Ultra HF

Reacción	Templete	Resultado
1	DNA7	-
2	WT1	+
3	pCAMBIA+pG	+
4	No DNA	-

L 1 2 3 4



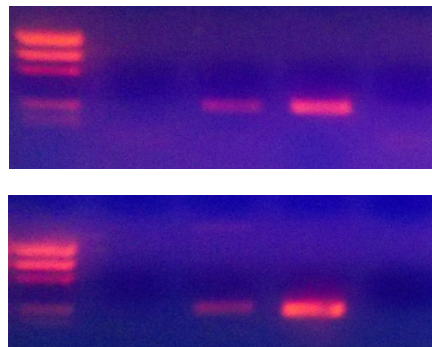
Prueba de Agarosa al 1.2%, 80v, 30 min.

Termo PE GA 5700

PCR con primers 3IgG F y R, sistema HF Fusion HS

Reacción	Templete	Resultado
1	DNA7	-
2	WT1	+
3	pCAMBIA+pG	+
4	No DNA	-

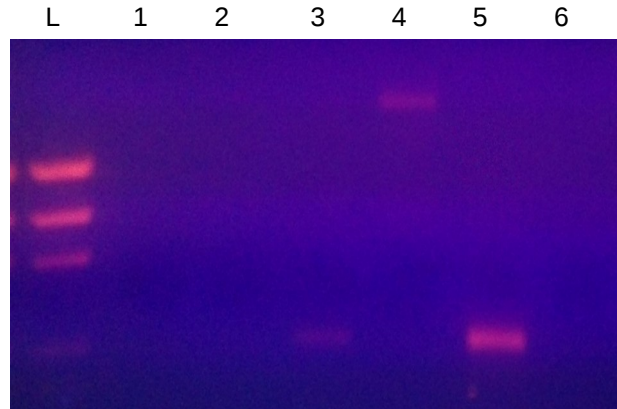
L 1 2 3 4



Los resultados de los controles negativos (líneas 4, superior e inferior) muestran que las master mix nuevas, preparadas con el nuevo Stock de agua y de dNTPs, no están contaminadas. El resultado negativo de las reacciones No 1 indica que el gDNA7 no posee los sitios de reconocimiento para los primers 3IgG. Sin embargo, se debe confirmar la integridad del DNA mediante PCR los cebadores constitutivos. Las reacciones No 2, por su parte, muestran que o bien en la WT hay sitios de unión para con primers 3IgG o que el DNA se contaminó previamente con otro DNA. Se considera contaminación, debido a la baja intensidad del producto y a la especificidad de los primers. Para confirmar que esté contaminado, se repetirá el PCR incluyendo el gDNA8, que se preparó a la par con el gDNA7.

A pesar de los resultados, no se descarta la posibilidad de que la contaminación sea por aire o aerosoles. Las siguientes reacciones serán realizadas con las mismas precauciones, en cuanto a esterilización y descontaminación, que fueron usadas en las reacciones inmediatas anteriores.

Reacción	Templete	Resultado
1	DNA7	-
2	DNA8	-
3	WT1	+
4	WT2	+
5	pCAMBIA+pG	+
6	No DNA	-



Del experimento de biobalística con el plásmido pCAMBIA-pG, en los últimos experimentos, aproximadamente nueve meses después de la tranfección, se crecieron cuatro cultivos (35 y 50 mL) con las muestras C7400Hyg, C8400Hyg, MIX400Hyg(C7-C8) y Dsa1WT. En la fase estacionaria se colectaron las células por centrifugación y se lavaron con el mismo medio de cultivo. De cada muestra, resuspendida en 5 mL de medio, se tomaron 50  $\mu$ L y se inocularon en 5 mL del mismo medio (sin herbicida) en tubos falcon de 50 mL. Al resto de las muestras se les extrajo DNA con el kit de Axygen y se midieron las concentraciones en el Nanodrop. Debido a la baja concentración se liofilizaron las muestras y se resuspendieron en 1/6 del volumen de resuspensión inicial (50)  $\mu$ L y se midió nuevamente la concentración de DNA.

### 3. Transfección mediante electroporación

Basado en los protocolos de Geng *et al* (2003), Li *et al* (2007) y Sun *et al* (2005)

Por cada reacción de electroporación se requieren 15  $\mu$ l de plásmido (200  $\mu$ g/ml).

#### Propagación del plásmido pCAMBIA1302-pG en *E. coli*

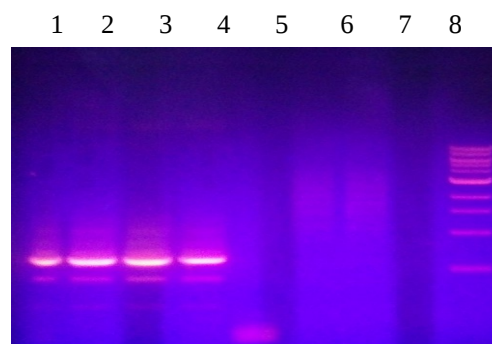
Propagación de pCAMBIA1302-pG en *E. coli* NEB-TURBO en medio LB-kanamicina (30  $\mu$ g/mL)

- El DNA se evaluó en un Nanodrop ND1000. En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de DNA plasmídico obtenidas.

Muestra	Etiqueta	Concentración (ng/ $\mu$ l)
1	pCAMBIA+pG 092013	278
2	pCAMBIA+pG 092013	249
3	pCAMBIA+pG 092013	296

Para comprobar que el plásmido contenga la secuencia de la proteína G se amplificó por PCR con los cebadores Pst cam y Sal cam, realizando las reacciones que se describen a continuación:

Rx	Templete	Resultado
1	NEB-T pCAMBIA+pG	+++
2	pCAMBIA+pG 01	+++
3	pCAMBIA+pG 02	+++
4	pCAMBIA+pG 03	+++
5	Control (-) no DNA	-



Las reacciones 1-4 fueron positivas, con algunas bandas accesorias. El control negativo no generó ningún producto,

Después de corroborar la presencia del gen de la proteína G en los plasmidos propagados se prepararon alicuotas de 50  $\mu$ L con el plásmido 01 (278 ng/ $\mu$ L), para una concentración final de 200 ng/ $\mu$ L.

# Preparación de células para electroporación

P168R, bitácora en físico. 04/09/2013

Se contarán células de distintos cultivos para hacer alicuotas con una densidad celular de 1 millón de células por mililitro.

## Conteo de células

Cultivo	Células/mL
01	$1.9 \times 10^6$
02	$1.9 \times 10^6$
03	$0.8 \times 10^6$
04	$1.2 \times 10^6$

## 4. Transfección mediante perlas de cristal

### Marcaje del DNA plasmídico con SYBR safe

SYBR safe (Molecular Probes, S33102), teñir con 1X de SYBR safe (10,000 X) durante 15-30 minutos.

Precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto y lavar con

### Preparación del plásmido

3 mL de células, precipitadas a 5000 rpm

150 mg glass beads

Protocolo de Feng *et al*, 2009.

300 mg glass beads, 3.5 % PEG y 60  $\mu\text{g}$  de vector en 800  $\mu\text{L}$  de medio en agitación a 2400 rpm.

Kindle *et al*, 1990.

300 mg de glass beads, 5% PEG y 10  $\mu\text{g}$  de vector linealizado

PEG (Mr 6000, SIGMA)

Glass beads 0.45-0.52 mm diameter (SIGMA) lavadas con ácido clorhídrico concentrado, enjuadas con agua destilada y secadas y esterilizadas a 250 °C por 2-3 h.

Solution 20% (w/v) PEG para una concentración final del 5%

300 mg de bolitas de cristal en 400 µL, DNA y agitación al máximo (10-20 s) en tubos cónicos de 15 mL.

2.5-50 µg/mL DNA 1-20 µg de plásmido lineal por transformación. Puede usarse entre 5-10 µg por transformación, sin afectar el número de colonias que se generan.

Se dejan sedimentar las células y éstas se siembran en agar con medio selectivo.

Vórtex

Agitación orbital

Agitación manual

Se dejaron las células en los mismos tubos por 48 h

Se transfectaron dos preparaciones de *D. salina* con el plásmido pCAMBIA-eGFP o pCAMBIA-pG .

Después de la incubación por 48 h

Se escalaron a un volumen de 10 mL de cultivo. Al llegar a una densidad celular superior a  $1 \times 10^6$  cél/mL se escalaron a 200 mL de cultivo.

De manera paralela y en la mismas condiciones se propagó un cultivo de *D. salina wt.*

A partir de 100 mL de los cultivos de 200 mL se extrajo DNA de cada preparación con el sistema AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen AP-MN-MS-GDNA-50), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Los 100 mL restantes se precipitaron y se usaron para transfectar con los plásmidos pChlamy\_GP y pCAMBIA-pG (Proyecto Ébola).

Se recuperaron las siguientes cantidades de DNA genómico

Dsal	wt0	20 ng/μL
Dsal	wt01	21 ng/μL
Dsal	pCAMBIA-eGFP	21 ng/μL
Dsal	pCAMBIA-pG	21 ng/μL

PCR pG (Pst cam F y Sal cam R) Tm probada 60 °C

PCR master mix Qiagen

		5 Rxs 25 μL
12.5	PCR mix 2x	62.5
9.5	H <sub>2</sub> O	47.5
1.0	Primer F	5
1.0	Primer R	5
1.0	Templete	-

Reacciones

1	Dsal Wt01
2	pCAMBIA-eGFP
3	pCAMBIA-pG
4	Negative
5	eGFP-pCAMBIA-pG 40 ng/μL

## PCR pG (Pst cam F y Sal cam R) Tm probada 60 °C

PCR master mix Qiagen, termociclador Primus 96 Plus (MWG BIOTECH)

Reactivo	Cantidad en $\mu\text{L}$	Reacción	Templete
PCR mix 2x	12.5	1	Dsal Wt01
H <sub>2</sub> O	9.5	2	Dsal pCAMBIA-eGFP
Primer F	1.0	3	Dsal pCAMBIA-pG
Primer R	1.0	4	Negative
Templete	1.0	5	GFP-pCAMBIA-pG 40 ng/ $\mu\text{L}$

Dio positiva el control (rx 5) y el resto presentaron una banda muy tenue, del mismo tamaño, inclusive el control negativo (rx 4).

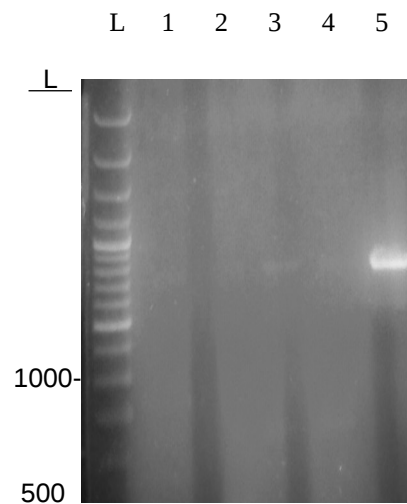


Figura. PCR con cebadores para el gen de la proteína G. Electroforesis al 1% teñida con bromuro de etidio.

**PCR 18S (MA1 y MA2) Tm 52 °C**

**p182**

Se realizaron las mismas reacciones que en el experimento anterior con los cebardoes para *D. salina* MA1-MA2. Las tres reacciones con gDNA de *D. salina* wt o sometida a transfección amplificaron el producto esperado de 2,170 pb (Olmos *et al*, 2010), líneas 1-3, mientras que el control negativo se mantuvo sin amplificar al igual que el control con DNA del plásmido pCAMBIA-pG.

El resultado indica que los DNAs genómicos recuperados están en buen estado para ser usados como templados para amplificar por PCR.

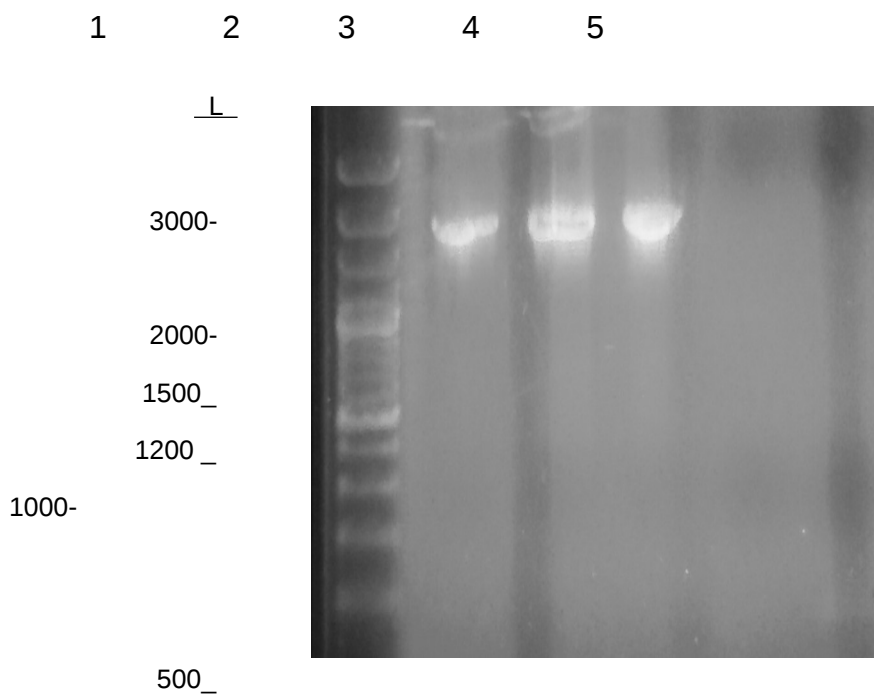


Figura.

## PCR con Pst y Sal, Tm 60 °C

Incremento del template a 2 microlitros, usando stocks nuevos de primers, agua y PCR mastermix.

PCR master mix Qiagen, termociclador Primus 96 Plus (MWG BIOTECH)

Reactivo	Cantidad en $\mu\text{L}$	Reacción	Template	Resultado
PCR mix 2x	12.5	1	Dsal pCAMBIA-eGFP	-
H <sub>2</sub> O	8.5	2	Dsal pCAMBIA-pG	-
Primer F	1.0	3	GFP-pCAMBIA-pG 40 ng/ $\mu\text{L}$	+
Primer R	1.0	4	Negative	- *
Template	2.0			

\*Aunque el resultado no se muestra en la imagen, por un error en el procesamiento, el control negativo no generó ningún producto,

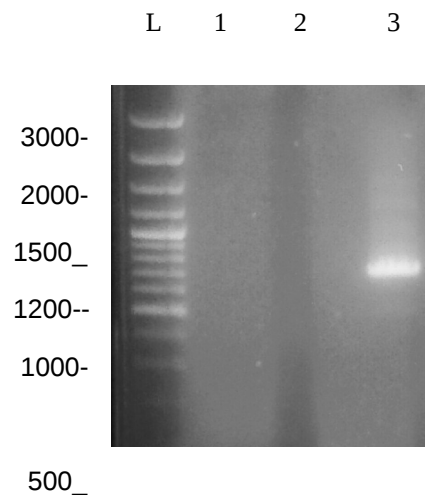


Figura. PCR con cebadores para el gen de la proteína G (p82R). Electroforesis al 1% teñida con bromuro de etidio. PCR master mix Qiagen.

## Digestión de plásmido eGFP-pCAMBIA-pG 418 ng/μL

Enzimas *usb* PstI y Sal I

Pst I 50 u/μL

Sal I 15 u/μL

10X H buffer

La digestión del plásmido eGFP-pCAMBIA-pG, con estas dos enzimas conjuntamente, libera el casete de expresión de la proteína G, linealizando el plásmido eGFP-pCAMBIA.

La digestión con una sola de ellas lineariza el plásmido.

Se probarán tres reacciones:

- A. 34 μL de H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub> + 5 μL buffer + 10 μL de plásmido + 1 μL de Pst I
- B. 34 μL de H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub> + 5 μL buffer + 10 μL de plásmido + 1 μL de Sal I
- C. 33 μL de H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub> + 5 μL buffer + 10 μL de plásmido + 1 μL de Pst I + 1 μL de Sal I

Inicia incubación a 37 °C a las 17:50, termina 19:13

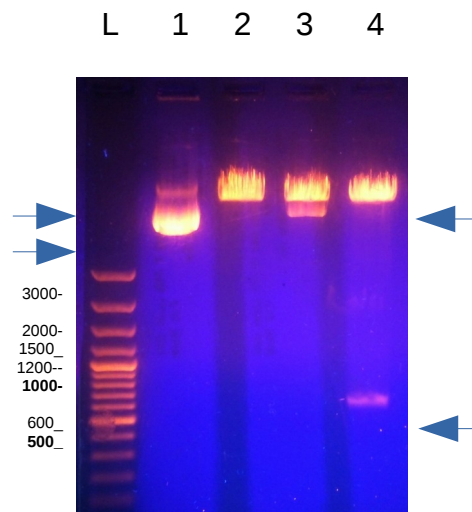


Figura. Digestión del plásmido eGFP-pCAMBIA-pG (418 ng/μL) con las endonucleasas Pst I y Sal I. En la línea 1 se muestra el plásmido migrando en su forma lineal y en forma superenrollada, flechas superior e inferior. En la línea 2 el plásmido digerido con Pst I, en la línea 3 el plásmido cortado con Sal I y en la línea 4 el plásmido lineal y el casete de la proteína G liberado del plásmido migrando entre las bandas 600-700 pb de la escalera.

Actualmente, hay varios stocks de los plásmidos pCAMBIA-pG, pCAMBIA-eGFP, eGFP-pCAMBIA-pG, pChlamy\_4\_GP.

Se probará usar una mezcla de los plásmidos pCAMBIA-pG y pChlamy\_4\_GP en una relación molar 75:25. Esta prueba se realiza con el objetivo de desarrollar clonas con doble resistencia. A higromicina por parte de pCAMBIA-pG y a Zeocina por el vector pChlamy\_4\_GP. Con la proporción planteada y el uso de los dos antibióticos se busca por probabilidad asegurar que las clonas transformantes posean los dos plásmidos, siendo de mayor interés el plásmido pCAMBIA-pG que posee el gen de la proteína G, que es nuestro objetivo principal..

Además de lo anterior, la mezcla de plásmidos será previamente marcada con SYBR green.

Inmediatamente después de la transfección, una alícuota de la muestra será analizada por microscopía.

Cantidad de plásmido requerida para los siguientes experimentos (por triplicado):

Transfección

a) con el plásmido pCAMBIA-pG marcado con SYBR green

b) con los plásmidos pCAMBIA-pG y pChlamy\_4-GP (25:75 de proporción molar) marcados con SYBR green

a) con el plásmido pChlamy\_4-GP marcado con SYBR green

Construcción pCAMBIA-pG-wasabi o pCAMBIA-pG-eGFP?

Plásmido para expresión de Allele wasabi

5'-NdeI----BamHI-wasabi-stop-EcoRI-HindIII

Primers Sal-wasabi KpnI-wasabi



# Literatura citada

- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S., & Jacob, D. A. (2010). Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. *J. Algal Biomass Utiln*, 1(2), 12-19.
- Alizadeh, G., Bashirzadeh, A., Mahmudov, Z., & Hasanov, R. (2011). The productivity and stability of plant cell for biotechnology purposes.
- Alkayal, F., Albion, R. L., Tillett, R. L., Hathwaik, L. T., Lemos, M. S., & Cushman, J. C. (2010). Expressed sequence tag (EST) profiling in hyper saline shocked *Dunaliella salina* reveals high expression of protein synthetic apparatus components. *Plant science*, 179(5), 437-449.
- Almazán-Becerril, A., & García-Mendoza, E. (2008). Maximum efficiency of charge separation of photosystem II of the phytoplankton community in the Eastern Tropical North Pacific off Mexico: A nutrient stress diagnostic tool?. *Ciencias Marinas*, 34(1).
- Alvarez, M. A., & Marconi, P. L. (2011). Genetic transformation for metabolic engineering of tropane alkaloids. In *Genetic transformation*. InTech.
- Andersen, R. A. (Ed.). (2005). *Algal culturing techniques*. Academic press.
- Andrade, R. D., Torres, R., Montes, E. J., & Fernández, A. C. (2007). Obtención de harina a partir del cultivo de *Chlorella vulgaris* y su análisis proteico. *Temas agrarios*, 12(1).
- Anila, N., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2011). Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil*. *European Journal of phycology*, 46(1), 36-44.
- Anila, N., Simon, D. P., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2016). Metabolic engineering of *Dunaliellasalina* for production of ketocarotenoids. *Photosynthesis research*, 127(3), 321-333.
- Assunção, P., Jaén-Molina, R., Caujapé-Castells, J., Wolf, M., Buchheim, M. A., Jara, A., Freijanes, K., Carmona, L., & Mendoza, H. (2013). Phylogenetic analysis of ITS2 sequences suggests the taxonomic re-structuring of *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae, Dunaliellales). *Phycological Research*, 61(2), 81-88.
- Athmaram, T. N., Saraswat, S., Singh, A. K., Rao, M. K., Gopalan, N., Suryanarayana, V. V. S., & Rao, P. V. L. (2012). Influence of copy number on the expression levels of pandemic influenza hemagglutinin recombinant protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Virus genes*, 45(3), 440-451.
- Balbás P., A. Lorence (2004) *Methods in molecular biology, Recombinant gene expression*. Humana Press USA.
- Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M., & Wurm, F. M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology letters*, 29(5), 677-684.
- Bannwarth, M., & Schulz, G. E. (2003). The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1610(1), 37-45.

- Barzegari, A., Hejazi, M. A., Hosseinzadeh, N., Eslami, S., Aghdam, E. M., & Hejazi, M. S. (2010). *Dunaliella* as an attractive candidate for molecular farming. *Molecular biology reports*, 37(7), 3427-3430.
- Becerra-Dórame, M. J., López-Elías, J. A., Enríquez-Ocaña, F., Huerta-Aldaz, N., Voltolina, D., Osuna-López, I., & Izaguirre-Fierro, G. (2010, April). The effect of initial cell and nutrient concentrations on the growth and biomass production of outdoor cultures of *Dunaliella* sp. In *Annales Botanici Fennici* (Vol. 47, No. 2, pp. 109-112). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Becerra-Dórame, M., López-Elías, J. A., & Martínez-Córdova, L. R. (2010). An alternative outdoor production system for the microalgae *Chaetoceros muelleri* and *Dunaliella* sp. during winter and spring in Northwest Mexico. *Aquacultural engineering*, 43(1), 24-28.
- Belghith, T., Athmouni, K., Elloumi, J., Guerhazi, W., Stoeck, T., & Ayadi, H. (2016). Biochemical Biomarkers in the Halophilic Nanophytoplankton: *Dunaliella salina* Isolated from the Saline of Sfax (Tunisia). *Arabian Journal for Science & Engineering* (Springer Science & Business Media BV), 41(1).
- Ben-Amotz, A. (1993). Production of  $\beta$ -carotene and vitamins by the halotolerant alga *Dunaliella*. In *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products* (pp. 411-417). Springer US.
- Ben-Amotz, A., Gressel, J., & Avron, M. (1987). Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *Journal of phycology*, 23(1), 176-181.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A., & Avron, M. (1989). Mode of action of the massively accumulated  $\beta$ -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiology*, 91(3), 1040-1043.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A., & Avron, M. (1991). The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of  $\beta$ -carotene rich algae. *Bioresource technology*, 38(2-3), 233-235.
- Birch, J. R., & Racher, A. J. (2006). Antibody production. *Advanced drug delivery reviews*, 58(5), 671-685.
- Blankenship, J. E., & Kindle, K. L. (1992). Expression of chimeric genes by the light-regulated *cabII-1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*: a *cabII-1/nit1* gene functions as a dominant selectable marker in a *nit1-nit2*-strain. *Molecular and cellular biology*, 12(11), 5268-5279.
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G., & Gellissen, G. (2007). Yeast expression platforms. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(3), 513-523.
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*, 326, 245-254.
- Borowitzka, L. J., Moulton, T. P., & Borowitzka, M. A. (1984). The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. In *Eleventh International Seaweed Symposium* (pp. 115-121). Springer, Dordrecht.
- Borowitzka, M. A. (1990). The mass culture of *Dunaliella salina*. In *Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds*, Cebu City (Philippines), 27-31 Aug 1990.
- Borowitzka, M. A., & Siva, C. J. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 567-590.

- Brown, M. R., & Jeffrey, S. W. (1992). Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 161(1), 91-113.
- Byrd, S. M., & Burkholder, J. M. (2017). Environmental stressors and lipid production in *Dunaliella* spp. II. Nutrients, pH, and light under optimal or low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487, 33-44.
- Cadoret, J. P., Garnier, M., & Saint-Jean, B. (2012). Microalgae, functional genomics and biotechnology. *Advances in Botanical Research*, 64, 285-341.
- Cai, M., He, L. H., & Yu, T. Y. (2013). Molecular clone and expression of a NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme gene from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *PLoS one*, 8(4), e62287.
- Cao, Y., Xu, H., Xie, L., Yi, Y., Yu, Y., Feng, S., Qiao, D., & Cao, Y. (2014). Fluorimetric analysis of the binding characteristics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase with substrates in *Dunaliella salina*. *Journal of basic microbiology*, 54(9), 937-944.
- Capelli, B., & Cysewski, G. R. (2010). Potential health benefits of spirulina microalgae. *Nutrafoods*, 9(2), 19-26.
- Cardi, T., Lenzi, P., & Maliga, P. (2010). Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines. *Expert review of vaccines*, 9(8), 893-911.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22(6), 1490-1506.
- Castro-Ceseña, A. B., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., & Ruíz-Güereca, D. A. (2016). Optimization of entrapment efficiency and evaluation of nutrient removal (N and P) of *Synechococcus elongatus*. *Journal of applied phycology*, 28(4), 2343-2351.
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 329-332.
- Cerutti, H., Ma, X., Msanne, J., & Repas, T. (2011). RNA-mediated silencing in algae: biological roles and tools for analysis of gene function. *Eukaryotic cell*, 10(9), 1164-1172.
- Cha, T. S., Chen, C. F., Yee, W., Aziz, A., & Loh, S. H. (2011). Cinnamic acid, coumarin and vanillin: Alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of microbiological methods*, 84(3), 430-434.
- Chai, Y. R., Sun, Y., Pan, W. D., Jia, Y. L., & Xue, L. X. (2007). Isolation and characterization of *rbcl* gene from *Dunaliella salina*. *Life Science Journal*, 4(1), 6-12.
- Chen, J., Ni, H., Sun, J., & Weng, G. (2003). G protein  $\beta$  1  $\gamma$  2 subunits purification and their interaction with adenylyl cyclase. *Science in China Series C: Life Sciences*, 46(2), 212-223.
- Chen, X. J., Zhang, X. H., Hu, L. D., Zhang, J. Q., Jiang, Y., Yang, Y., & Yan, Y. B. (2016). *DsCaf1* is involved in environmental stress response of *Dunaliella salina*. *International journal of biological macromolecules*, 82, 369-374.

- Chen, Y., Tang, X., Kapoore, R. V., Xu, C., & Vaidyanathan, S. (2015). Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. *Energy Conversion and Management*, 106, 61-72.
- Cheng, R., Ma, R., Li, K., Rong, H., Lin, X., Wang, Z., Yang, S., & Ma, Y. (2012). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiological research*, 167(3), 179-186.
- Chon, J. H., & Zarbis-Papastoitsis, G. (2011). Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New biotechnology*, 28(5), 458-463.
- Chu, L. H., & Jeng, S. T. (2002). Multiple transduction pathways regulate the 35S promoter with an ABA responsive element. *Plant Science*, 163(1), 23-32.
- Combe, C., Hartmann, P., Rabouille, S., Talec, A., Bernard, O., & Sciandra, A. (2015). Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*. *Biotechnology and bioengineering*, 112(6), 1111-1121.
- Cordero, B. F., Couso, I., León, R., Rodríguez, H., & Vargas, M. Á. (2011). Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(2), 341-351.
- Cox, H., Mead, D., Sudbery, P., Eland, R. M., Mannazzu, I., & Evans, L. (2000). Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the PMA1 promoter. *Yeast*, 16(13), 1191-1203.
- Cox, M. M. (2012). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 30(10), 1759-1766.
- Davis, A. K., Hildebrand, M., & Palenik, B. (2006). Gene expression induced by copper stress in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Eukaryotic cell*, 5(7), 1157-1168.
- De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2011). Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 184-188.
- del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Maeda-Martínez, A. N., & Acosta-Galindo, S. (2016). Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*. *Journal of applied phycology*, 28(2), 839-847.
- Demain, A. L. (2007). REVIEWS: The business of biotechnology. *Industrial Biotechnology*, 3(3), 269-283.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306.
- Dragosits, M., Nicklas, D., & Tagkopoulos, I. (2012). A synthetic biology approach to self-regulatory recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of biological engineering*, 6(1), 2.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389-406.
- El Baz, F. K., Aboul-Enein, A. M., El-Baroty, G. S., Youssef, A. M., & Abdel-Baky, H. H. (2002). Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*.

- Emami, K., Hack, E., Nelson, A., Brain, C. M., Lyne, F. M., Mesbahi, E., Day, J. G., & Caldwell, G. S. (2015). Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: an example using *Dunaliella*. *Scientific reports*, 5.
- Farid, S. S., Washbrook, J., & Titchener-Hooker, N. J. (2007). Modelling biopharmaceutical manufacture: Design and implementation of SimBiopharma. *Computers & chemical engineering*, 31(9), 1141-1158.
- Fedorova-Dahms, I., Marone, P. A., Bauter, M., & Ryan, A. S. (2011). Safety evaluation of DHA-rich Algal Oil from *Schizochytrium* sp. *Food and chemical toxicology*, 49(12), 3310-3318.
- Feller, R., Matos, A., Moecke, E., Carvalho Jr, R. M., Lopes, R., Camargo, C., Sant'Anna, E. S., Derner, R. B., Oliveira, J. V., & Furigo Jr, A. (2015). Comparative Study of Biochemical Composition of Five Microalgae for Biodiesel/Bioproducts Application. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(2), 1499-1506.
- Feng, S., Xue, L., Liu, H., & Lu, P. (2009). Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Molecular biology reports*, 36(6), 1433.
- Fey, V., Wagner, R., Bräutigam, K., & Pfannschmidt, T. (2005). Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1491-1498.
- Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U., & Zamir, A. (1996). A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 17718-17723.
- Fisher, M., Pick, U., & Zamir, A. (1994). A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. *Plant physiology*, 106(4), 1359-1365.
- Fletcher, S. P., Muto, M., & Mayfield, S. P. (2007). Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green algae. *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*, 90-98.
- Franklin, S., Ngo, B., Efuet, E., & Mayfield, S. P. (2002). Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal*, 30(6), 733-744.
- Gami, B., Naik, A., & Patel, B. (2011). Cultivation of *Spirulina* species in different liquid media. *J. Algal Biomass Utiln*, 2(3), 15-26.
- Gantner, S., Andersson, A. F., Alonso-Sáez, L., & Bertilsson, S. (2011). Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 12-18.
- García-Fruitós, E. (2012). Lactic acid bacteria: a promising alternative for recombinant protein production. *Microbial cell factories*, 11(1), 157.
- García-González, M., Moreno, J., Canavate, J. P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F. J., & Guerrero, M. G. (2003). Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology*, 15(2), 177-184.
- Geng, D. G., Han, Y., Wang, Y. Q., Wang, P., Zhang, L. M., Li, W. B., & Sun, Y. R. (2004). Construction of a system for the stable expression of foreign genes in *Dunaliella salina*. *Acta Bot Sin*, 46(3), 342-345.
- 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(6), 451-456.

- Georgianna, D. R., Hannon, M. J., Marcuschi, M., Wu, S., Botsch, K., Lewis, A. J., Hyun, J., Mendez, M., & Mayfield, S. P. (2013). Production of recombinant enzymes in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Algal Research*, 2(1), 2-9.
- Gong, W. F., Zhao, L. N., Hu, B., Chen, X. W., Zhang, F., Zhu, Z. M., & Chen, D. F. (2014). Identifying novel salt-tolerant genes from *Dunaliella salina* using a *Haematococcus pluvialis* expression system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(1), 113-124.
- Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X., & Gao, H. (2011). Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(12), 1879-1890.
- González, M. A., Coleman, A. W., Gómez, P. I., & Montoya, R. (2001). Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences. *Journal of Phycology*, 37(4), 604-611.
- Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(6), 1665-1669.
- Gray, J. C., Sullivan, J. A., Wang, J. H., Jerome, C. A., & MacLean, D. (2003). Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 358(1429), 135-145.
- Gregory, J. A., Topol, A. B., Doerner, D. Z., & Mayfield, S. (2013). Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Applied and environmental microbiology*, 79(13), 3917-3925.
- Griesbeck, C., Kobl, I., & Heitzer, M. (2006). *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular biotechnology*, 34(2), 213-223.
- Gu, W., Li, H., Zhao, P., Yu, R., Pan, G., Gao, S., Xie, X., Huang, A., He, L., & Wang, G. (2014). Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-responsive strategies. *Scientific reports*, 4.
- Gülich, S., Linhult, M., Ståhl, S., & Hober, S. (2002). Engineering streptococcal protein G for increased alkaline stability. *Protein engineering*, 15(10), 835-842.
- Guo, S. L., Zhao, X. Q., Tang, Y., Wan, C., Alam, M. A., Ho, S. H., ... & Chang, J. S. (2013). Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *Journal of biotechnology*, 163(1), 61-68.
- Hammond, B. G., Mayhew, D. A., Naylor, M. W., Ruecker, F. A., Mast, R. W., & Sander, W. J. (2001). Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp. *Regul Toxicol Pharmacol*, 33(2), 205-17.
- Hawkins, R. L., & Nakamura, M. (1999). Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Current microbiology*, 38(6), 335-341.
- Healthcare, G. E. (2009). *Recombinant Protein Purification Handbook. Principles and Methods*.
- Heath, D. G., & Cleary, P. P. (1987). Cloning and expression of the gene for an immunoglobulin G Fc receptor protein from a group A streptococcus. *Infection and immunity*, 55(5), 1233-1238.

- Heidari, R., Riahi, H., & Saadatmand, S. (2000). Effects of salt and irradiance stress on photosynthetic pigments and proteins in *Dunaliella salina* teodoresco. *JOURNAL OF SCIENCES ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN*, 11(2), 73-78.
- Hejazi, M. (2003). Milking of microalgae: Production and selective extraction of Beta-carotene in two-phase bioreactors.
- Hempel, F., Lau, J., Klingl, A., & Maier, U. G. (2011). Algae as protein factories: expression of a human antibody and the respective antigen in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS one*, 6(12), e28424.
- Herrera-Valencia, V. A., Macario-González, L. A., Casais-Molina, M. L., Beltran-Aguilar, A. G., & Peraza-Echeverría, S. (2012). In silico cloning and characterization of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current microbiology*, 64(5), 477-485.
- Höfgen, R., & Willmitzer, L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic acids research*, 16(20), 9877.
- Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of applied microbiology*, 107(1), 14-35.
- Hosseinzadeh Gharajeh, N., Hejazi, M. A., Nazeri, S., & Barzegari, A. (2012). Characterization of an indigenous isolate, *Dunaliella tertiolecta* ABR11NW-G3, from Gavkhooni Salt Marsh in Iran based on molecular and some morpho-physiological attributes. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14, 1579-1590.
- Hwangbo, K., Ahn, J. W., Lim, J. M., Park, Y. I., Liu, J. R., & Jeong, W. J. (2014). Overexpression of stearoyl-ACP desaturase enhances accumulations of oleic acid in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant biotechnology reports*, 8(2), 135-142.
- Hyka, P., Lickova, S., Pribyl, P., Melzoch, K., & Kovar, K. (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology advances*, 31(1), 2-16.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., & Takegawa, K. (2010). Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(2), 403-417.
- Jahic, M. (2011) *Pichia Pastoris*: a platform organism to produce proteins. *Encyclopedia of Life Support Systems*.
- JAIN, P., KOTAK, S., AGARWAL, S., & DUBEY, H. (2001). Experimentation in biology of plant abiotic stress responses. *Proc. Indian Acad. Sci.* (P1NSA) B67 N0, 5, 189-214.
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., & Wijffels, R. H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and bioengineering*, 81(2), 193-210.
- Jen, G. C., & Chilton, M. D. (1986). The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 3895-3899.
- Jeng, S. T., & Yen, C. Y. (2000). Effects of rho-independent terminators on the expression of the prokaryotic  $\beta$ -glucuronidase gene in tobacco. *Physiologia Plantarum*, 108(2), 171-179.
- Jeong, J. Y., Yim, H. S., Ryu, J. Y., Lee, H. S., Lee, J. H., Seen, D. S., & Kang, S. G. (2012). One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Applied and environmental microbiology*, 78(15), 5440-5443.

- Jesus, S. S., & Maciel Filho, R. (2010). Modeling growth of microalgae *Dunaliella salina* under different nutritional conditions. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(4), 279-283.
- Jia, Y., Li, S., Allen, G., Feng, S., & Xue, L. (2012). A novel glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) promoter for expressing transgenes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Current microbiology*, 64(5), 506-513.
- Jia, Y., Xue, L., Liu, H., & Li, J. (2009). Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene from the halotolerant alga *Dunaliella salina* and inhibition of its expression by RNAi. *Current microbiology*, 58(5), 426-431.
- Jiang, G. Z., Lu, Y. M., Niu, X. L., & Xue, L. X. (2005). The actin gene promoter-driven bar as a dominant selectable marker for nuclear transformation of *Dunaliella salina*. *Acta Genet Sin*, 32(4), 424-433.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L., & Bruff, B. S. (1968). Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology*, 95(4), 1461-1468.
- Kaçka, A., & Dönmez, G. (2008). Isolation of *Dunaliella* spp. from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol. *Bioresource technology*, 99(17), 8348-8352.
- Kadkhodaei, S., Abbasiliasi, S., Shun, T. J., Masoumi, H. F., Mohamed, M. S., Movahedi, A., Rahim, R., & Ariff, A. B. (2015). Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic conditions using response surface methodology. *RSC Advances*, 5(48), 38141-38151.
- Kadkhodaei, S., Ariff, A. B., Memari, H. R., Ramakrishnan, N. R., & Ebrahimi, M. Construction of an expression vector for production of tissue plasminogen activator (t-PA) in a transgenic microalgae bioreactor.
- Kathiresan, S., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2009). *Agrobacterium*-Mediated Transformation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *Journal of Phycology*, 45(3), 642-649.
- Kawata, Y., Yano, S. I., Kojima, H., & Toyomizu, M. (2004). Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC9438) with Tn5 transposase-transposon DNA-cation liposome complex. *Marine Biotechnology*, 6(4), 355-363.
- Kim, D. H., Kim, Y. T., Cho, J. J., Bae, J. H., Hur, S. B., Hwang, I., & Choi, T. J. (2002). Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Marine Biotechnology*, 4(1), 63-73.
- Kim, M., Park, S., Polle, J. E., & Jin, E. (2010). Gene expression profiling of *Dunaliella* sp. acclimated to different salinities. *Phycological research*, 58(1), 17-28.
- Kindle, K. L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(3), 1228-1232.
- Kleinegris, D. M., van Es, M. A., Janssen, M., Brandenburg, W. A., & Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *Journal of applied phycology*, 22(5), 645-649.

- Kumar, S., Hablot, E., Moscoso, J. L. G., Obeid, W., Hatcher, P. G., Duquette, B. M., Gaiver, D., Narayan, R., & Balan, V. (2014). Polyurethanes preparation using proteins obtained from microalgae. *Journal of materials science*, 49(22), 7824-7833.
- Kumudha, A., & Sarada, R. (2016). Characterization of vitamin B12 in *Dunaliella salina*. *Journal of food science and technology*, 53(1), 888-894.
- Kuo, Y. C., Tan, C. C., Ku, J. T., Hsu, W. C., Su, S. C., Lu, C. A., & Huang, L. F. (2013). Improving pharmaceutical protein production in *Oryza sativa*. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 8719-8739.
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2008). Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in biotechnology*, 26(11), 631-638.
- Latowski, D., Grzyb, J., & Strzałka, K. (2004). The xanthophyll cycle-molecular mechanism and physiological significance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26(2), 197.
- Leon, R., & Fernández, E. (2007). Nuclear transformation of eukaryotic microalgae. *Transgenic microalgae as green cell factories*, 1-11.
- Levy, H., Gokhman, I., & Zamir, A. (1992). Regulation and light-harvesting complex II association of a *Dunaliella* protein homologous to early light-induced proteins in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, 267(26), 18831-18836.
- Li, D., Han, X., Zuo, J., Xie, L., He, R., Gao, J., Chang, L., Yuan, L., & Cao, M. (2011). Construction of rice site-specific chloroplast transformation vector and transient expression of EGFP gene in *Dunaliella salina*. *Journal of biomedical nanotechnology*, 7(6), 801-806.
- Li, J., Lu, Y., Xue, L., & Xie, H. (2010). A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Molecular biology reports*, 37(2), 1143.
- Li, J., Xue, L., Yan, H., Liu, H., & Liang, J. (2008). Inducible EGFP expression under the control of the nitrate reductase gene promoter in transgenic *Dunaliella salina*. *Journal of applied phycology*, 20(2), 137-145.
- Li, J., Xue, L., Yan, H., Wang, L., Liu, L., Lu, Y., & Xie, H. (2007). The nitrate reductase gene-switch: a system for regulated expression in transformed cells of *Dunaliella salina*. *Gene*, 403(1), 132-142.
- Liu, J., Zhang, D., & Hong, L. (2015). Isolation, characterization and functional annotation of the salt tolerance genes through screening the high-quality cDNA library of the halophytic green alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Annals of Microbiology*, 65(3), 1293-1302.
- LIU, X. D., HU, F. H., & SHEN, Y. G. (2006). Transient Decrease of Light-harvesting Complex II Phosphorylation Level by Hypoosmotic Shock in Dark-adapted *Dunaliella salina*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 38(2), 104-109.
- Loizou, N. C. (2009). U.S. Patent Application No. 12/288,679.
- Lopes dos Santos, A., Gourvil, P., Rodríguez, F., Garrido, J. L., & Vaultot, D. (2016). Photosynthetic pigments of oceanic Chlorophyta belonging to prasinophytes clade VII. *Journal of phycology*, 52(1), 148-155.
- Lü, Y. M., Jiang, G. Z., Niu, X. L., Hou, G. Q., Zhang, G. X., & Xue, L. X. (2004). Cloning and functional analyses of promoters of two carbonic anhydrase genes from *Dunaliella salina*. *Yi chuan xue bao= Acta genetica Sinica*, 31(10), 1157-1166.

- Lv, H., Qu, G., Qi, X., Lu, L., Tian, C., & Ma, Y. (2013). Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation. *Genomics*, 101(4), 229-237.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270.
- Manuell, A. L., Beligni, M. V., Elder, J. H., Siefker, D. T., Tran, M., Weber, A., McDonald, T. L., & Mayfield, S. P. (2007). Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant biotechnology journal*, 5(3), 402-412.
- Martínez-Alonso, M., García-Fruitós, E., Ferrer-Miralles, N., Rinas, U., & Villaverde, A. (2010). Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. *Microbial cell factories*, 9(1), 64.
- Massa, S., Simeone, P., Muller, A., Benvenuto, E., Venuti, A., & Franconi, R. (2008). Antitumor activity of DNA vaccines based on the human papillomavirus-16 E7 protein genetically fused to a plant virus coat protein. *Human gene therapy*, 19(4), 354-364.
- Matasci, M., Bachmann, V., Baldi, L., Hacker, D. L., De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2011, November). Rapid recombinant protein production from pools of transposon-generated CHO cells. In *BMC proceedings* (Vol. 5, No. 8, p. P34). BioMed Central.
- Mayfield, S. P., Franklin, S. E., & Lerner, R. A. (2003). Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), 438-442.
- Maynell, L. A., Kirkegaard, K., & Klymkowsky, M. W. (1992). Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *Journal of virology*, 66(4), 1985-1994.
- McDonald, K. A., Hong, L. M., Trombly, D. M., Xie, Q., & Jackman, A. P. (2005). Production of human  $\alpha$ -1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor. *Biotechnology progress*, 21(3), 728-734.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., & Marshall, W. F. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848), 245-250.
- Mikami, K., Hirata, R., Takahashi, M., Uji, T., & Saga, N. (2011). Transient transformation of red algal cells: breakthrough toward genetic transformation of marine crop *Porphyra* species. In *Genetic Transformation*. InTech.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Sashidhar, B., & Adholeya, A. (2016). The isolation and identification of new microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential. *Bioresource technology*, 211, 556-565.
- Molina-Cárdenas, C. A., Sánchez-Saavedra, M., & Licea-Navarro, A. F. (2016). Decreasing of bacterial content in *Isochrysis galbana* cultures by using some antibiotics. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(1).
- Muhaemin, M. M. M., & Kaswadji, R. F. (2010). Biomass nutrient profiles of marine microalgae *Dunaliella salina*. *Jurnal Penelitian Sains*, 13(3).
- Namciu, S. J., Blochlinger, K. B., & Fournier, R. E. K. (1998). Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology*, 18(4), 2382-2391.

- Neupert, J., Karcher, D., & Bock, R. (2009). Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal*, 57(6), 1140-1150.
- Nishigaki, A., Ohshima, S., & Nakayama, K. (2000). Characterization of Three Forms of Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein Complexes of Photosystem II Isolated from the Green Alga, *Dunaliella salina*. *Plant and Cell Physiology*, 41(5), 591-599.
- Nitsche-Schmitz, D. P., Johansson, H. M., Sastalla, I., Reissmann, S., Frick, I. M., & Chhatwal, G. S. (2007). Group G streptococcal IgG binding molecules FOG and protein G have different impacts on opsonization by C1q. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17530-17536.
- Oey, M., Lohse, M., Kreikemeyer, B., & Bock, R. (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *The plant journal*, 57(3), 436-445.
- O'Kelly, C. J. (1982). Chloroplast pigments in selected marine Chaetophoraceae and Chaetosiphonaceae (Chlorophyta): the occurrence and significance of siphonaxanthin. *Botanica Marina*, 25(3), 133-138.
- 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(1), 5.
- Olmos, J., Paniagua, J., & Contreras, R. (2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in applied microbiology*, 30(1), 80-84.
- Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J., Contreras, R., & Trujillo, L. (2002). Molecular identification of  $\beta$ -carotene hyper-producing strains of *Dunaliella* from saline environments using species-specific oligonucleotides. *Biotechnology letters*, 24(5), 365-369.
- Ou, L., Zhuang, H. R., Chen, R., Lei, J. P., Liao, X. H., & Lin, W. S. (2008, January). Methods on observation of fluorescence micro-imaging for microalgae. In *Optics in Health Care and Biomedical Optics III* (Vol. 6826, p. 68262P). International Society for Optics and Photonics.
- Ou-Lee, T. M., Turgeon, R., & Wu, R. (1986). Expression of a foreign gene linked to either a plant-virus or a *Drosophila* promoter, after electroporation of protoplasts of rice, wheat, and sorghum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(18), 6815-6819.
- Page R. (2007) *Strategies for Maximizing Heterologous Protein Expression in E. coli with Minimal Cost*.
- Palomares, L. A., Estrada-Moncada, S., & Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Recombinant gene expression: reviews and protocols*, 15-51.
- Park, S., Lee, Y., Lee, J. H., & Jin, E. (2013). Expression of the high light-inducible *Dunaliella* LIP promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 238(6), 1147-1156.
- Park, S., Polle, J. E., Melis, A., Lee, T. K., & Jin, E. (2006). Up-regulation of photoprotection and PSII-repair gene expression by irradiance in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology*, 8(2), 120-128.
- Pasquet, V., Chérouvrier, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J.-P., & Picot, L. (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46(1), 59-67.

- Patel, A., Noble, R. T., Steele, J. A., Schwalbach, M. S., Hewson, I., & Fuhrman, J. A. (2007). Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I. *Nature protocols*, 2(2), 269-276.
- Pérez-Morales, A., Martínez-López, A., & Camalich-Carpizo, J. M. (2015). Dry weight, carbon, C/N ratio, hydrogen, and chlorophyll variation during exponential growth of selected microalgae species used in aquaculture. *Cicimar Oceánides*, 30(1), 33-34.
- Pisal, D. S., & Lele, S. S. (2005). Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*.
- Polle, J. E., Kanakagiri, S., Jin, E., Masuda, T., & Melis, A. (2002). Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems—a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11), 1257-1264.
- Polle, J. E., Struwe, L., & Jin, E. (2008). Identification and characterization of a new strain of the unicellular green alga *Dunaliella salina* (Teod.) from Korea. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 821-827.
- Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M., & Mattanovich, D. (2011). Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(4), 939-948.
- Potvin, G., & Zhang, Z. (2010). Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 910-918.
- Powtongsook, S., Kittakoop, P., Menasveta, P., & Wisessang, S. (1995). Isolation and characterization of *Dunaliella salina* from Thailand. *Journal of applied phycology*, 7(1), 75.
- Premkumar, L., Greenblatt, H. M., Bageshwar, U. K., Savchenko, T., Gokhman, I., Sussman, J. L., & Zamir, A. (2005). Three-dimensional structure of a halotolerant algal carbonic anhydrase predicts halotolerance of a mammalian homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21), 7493-7498.
- Premkumar, L., Greenblatt, H. M., Bageshwar, U. K., Savchenko, T., Gokhman, I., Zamir, A., & Sussman, J. L. (2003). Identification, cDNA cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of an exceptionally halotolerant carbonic anhydrase from *Dunaliella salina*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(6), 1084-1086.
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of applied phycology*, 26(3), 1359-1377.
- Qiao, H., Wang, G., & Zhang, X. (2009). Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth. *Journal of phycology*, 45(5), 1153-1162.
- Qin, S., Lin, H., & Jiang, P. (2012). Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnology advances*, 30(6), 1602-1613.
- Quiblier, C., Bourdier, G., Amblard, C., & Pepin, D. (1994). Separation of phytoplanktonic pigments by HPLC for the study of phyto-zooplankton trophic relationships. *Aquatic Sciences-Research Across Boundaries*, 56(1), 29-39.

- Rad, F. A., Aksoz, N., & Hejazi, M. A. (2011). Effect of salinity on cell growth and  $\beta$ -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology*, 10(12), 2282-2289.
- Raja, R., Iswarya, S. H., Balasubramanyam, D., & Rengasamy, R. (2007). PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiological Research*, 162(2), 168-176.
- Ramos, A. A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J. C., Jin, E., & Varela, J. 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.
- Rasala, B. A., Barrera, D. J., Ng, J., Plucinak, T. M., Rosenberg, J. N., Weeks, D. P., Oyler, G. A., Peterson, T. C., Haerizadeh, F., & Mayfield, S. P. (2013). Expanding the spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 74(4), 545-556.
- Rasala, B. A., Lee, P. A., Shen, Z., Briggs, S. P., Mendez, M., & Mayfield, S. P. (2012). Robust expression and secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS one*, 7(8), e43349.
- Rasala, B. A., Muto, M., Sullivan, J., & Mayfield, S. P. (2011). Improved heterologous protein expression in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* through promoter and 5' untranslated region optimization. *Plant biotechnology journal*, 9(6), 674-683.
- Rismani-Yazdi, H., Haznedaroglu, B. Z., Bibby, K., & Peccia, J. (2011). Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. *BMC genomics*, 12(1), 148.
- Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L. M. T., & Soria-Guerra, R. E. (2012). *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant cell reports*, 31(3), 479-494.
- Ruottinen, M., Bollok, M., Kögler, M., Neubauer, A., Krause, M., Hämäläinen, E. R., Myllyharju, J., Vasala, A., & Neubauer, P. (2008). Improved production of human type II procollagen in the yeast *Pichia pastoris* in shake flasks by a wireless-controlled fed-batch system. *BMC biotechnology*, 8(1), 33.
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(2), 189-198.
- Sánchez-Alejandro, F., & del Pilar Sánchez-Saavedra, M. (2015). Characterization of the growth, biochemical composition, and nutrient utilization of the cyanobacterium *Geitlerinema lemmermannii*. *Journal of applied phycology*, 27(3), 1177-1184.
- Schroda, M. (2006). RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Current genetics*, 49(2), 69-84.
- Searle, D., Sible, E., Cooper, A., & Putonti, C. (2016). 18S rDNA dataset profiling microeukaryotic populations within Chicago area nearshore waters. *Data in brief*, 6, 526-529.
- Sheu, M. J., Huang, G. J., Wu, C. H., Chen, J. S., Chang, H. Y., Chang, S. J., & Chung, J. G. (2008). Ethanol extract of *Dunaliella salina* induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. *in vivo*, 22(3), 369-378.

- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., & Usuda, H. (1998). High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*, 148(4), 1821-1828.
- Shukla, A. A., & Thömmes, J. (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in biotechnology*, 28(5), 253-261.
- Simon, D. P., Narayanan, A., Gouda, K. M., & Sarada, R. (2015). Vir gene inducers in *Dunaliella salina*; an insight in to the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of microalgae. *Algal Research*, 11, 121-124.
- Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science*, 18(5), 936-948.
- Smith, D. R., Lee, R. W., Cushman, J. C., Magnuson, J. K., Tran, D., & Polle, J. E. (2010). The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. *BMC plant biology*, 10(1), 83.
- Sojikul, P., Buehner, N., & Mason, H. S. (2003). A plant signal peptide–hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2209-2214.
- Sun, G., Zhang, X., Sui, Z., & Mao, Y. (2008). Inhibition of pds gene expression via the RNA interference approach in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Marine biotechnology*, 10(3), 219-226.
- Sun, X. M., Tang, Y. P., Meng, X. Z., Zhang, W. W., Li, S., Deng, Z. R., Xu, Z.-K., & Song, R. T. (2006). Sequencing and analysis of a genomic fragment provide an insight into the *Dunaliella viridis* genomic sequence. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 38(11), 812-820.
- Sun, Y., Yang, Z., Gao, X., Li, Q., Zhang, Q., & Xu, Z. (2005). Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. *Molecular biotechnology*, 30(3), 185-192.
- Surpin, M., Larkin, R. M., & Chory, J. (2002). Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S327-S338.
- Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J. D., Ajam, T., & Surzycki, S. (2009). Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals*, 37(3), 133-138.
- Tammam, A. A., Allam, M. M., & Osman, M. (2005). Mutagenesis of *Dunaliella salina*. *Int J Agric Biol*, 7, 477-481.
- 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*, 43(4), 361-365.
- Tang, G., & Suter, P. M. (2011). Vitamin A, nutrition, and health values of algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 1(2).
- Teodoresco, E. C. (1905). Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée. *Beih z Bot Centralbl*, 18, 215-232.
- Thanh, T., Chi, V. T. Q., Omar, H., Abdullah, M. P., & Napis, S. (2012). Sequence analysis and potentials of the native RbcS promoter in the development of an alternative eukaryotic expression system using green microalga *Ankistrodesmus convolutus*. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 2676-2691.

- Tokuşoglu, Ö., & Ünal, M. K. (2003). Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of food science*, 68(4), 1144-1148.
- Tran, D., Doan, N., Louime, C., Giordano, M., & Portilla, S. (2014). Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 317-322.
- Tran, D., Trung, V., Portilla, S., Louime, C., Nguyen, D., Truc, M., Tran, D., & Trang, H. (2013). Phylogenetic study of some strains of *Dunaliella*. *American Journal of Environmental Sciences*, 9(4), 317-321.
- Tripathi, N. K. (2009). High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. *Defence Science Journal*, 59(2), 137.
- van Dijk, K., & Sarkar, N. (2011). Selectable and inheritable gene silencing through RNA interference in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Strain Engineering: Methods and Protocols*, 457-476.
- Van Heukelem, L., & Thomas, C. S. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A*, 910(1), 31-49.
- Vermasvuori, R. (2009). Production of recombinant proteins and monoclonal antibodies-Techno-economical evaluation of the production methods.
- Vieira, H. L., Pereira, A. C., Peixoto, C. C., Moraes, R. H., Alves, P. M., & Mendonça, R. Z. (2010). Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. *Cytotechnology*, 62(6), 547-555.
- von Gromoff, E. D., Schroda, M., Oster, U., & Beck, C. F. (2006). Identification of a plastid response element that acts as an enhancer within the *Chlamydomonas* HSP70A promoter. *Nucleic acids research*, 34(17), 4767-4779.
- Waegeman, H., & De Mey, M. (2012). Increasing recombinant protein production in *E. coli* by an alternative method to reduce acetate. In *Advances in Applied Biotechnology*. InTech.
- Walker, T. L., Becker, D. K., & Collet, C. (2005). Characterisation of the *Dunaliella tertiolecta* RbcS genes and their promoter activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant cell reports*, 23(10-11), 727-735.
- Walker, T. L., Becker, D. K., Dale, J. L., & Collet, C. (2005). Towards the development of a nuclear transformation system for *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of applied phycology*, 17(4), 363-368.
- Walker, T. L., Black, D., Becker, D. K., Dale, J. L., & Collet, C. (2005). Isolation and characterisation of components of the *Dunaliella tertiolecta* chloroplast genome. *Journal of applied phycology*, 17(6), 495-508.
- Walker, T. L., Purton, S., Becker, D. K., & Collet, C. (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant cell reports*, 24(11), 629-641.
- Wang, K. (Ed.). (2006). *Agrobacterium protocols* (Vol. 1). Humana Press.
- Wang, T., Xue, L., Hou, W., Yang, B., Chai, Y., Ji, X., & Wang, Y. (2007). Increased expression of transgene in stably transformed cells of *Dunaliella salina* by matrix attachment regions. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(3), 651-657.
- Wasanasathian, A., & Peng, C. A. (2007). Algal photobioreactor for production of lutein and zeaxanthin. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 491-505).

- Wilcox, L. W., Lewis, L. A., Fuerst, P. A., & Floyd, G. L. (1992). Group I introns within the nuclear-encoded small-subunit rRNA gene of three green algae. *Molecular biology and evolution*, 9(6), 1103-1118.
- Wiltshire, K. H., Boersma, M., Möller, A., & Buhtz, H. (2000). Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology*, 34(2), 119-126.
- Wirshing, A. (2012). Genetic engineering of *Dunaliella*: potential for improved biofuel production.
- Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Llewellyn, C. A., Bjørnland, T., Repeta, D., & Welschmeyer, N. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine ecology progress series*, 183-196.
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N., & Ma, C. (2016). The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur journal of microbiology*, 9(1).
- Wulfetange, K., Saenger, W., Schmülling, T., & Heyl, A. (2011). E. coli-based cell-free expression, purification and characterization of the membrane-bound ligand-binding CHASE-TM domain of the cytokinin receptor CRE1/AHK4 of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular biotechnology*, 47(3), 211-219.
- Xu, H., Vavilin, D., & Vermaas, W. (2001). Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 14168-14173.
- Xue, L. X., Pan, W. D., Jiang, G. Z., & Wang, J. R. (2006). Patent No: US 7081567 B2: Transgenic *Dunaliella salina*.
- Xue, Z., Sharpe, P. L., Hong, S. P., Yadav, N. S., Xie, D., Short, D. R., Damude, H. G., Rupert, R. A., Seip, J. E., Wang, J., & Pollak, D. W. (2013). Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nature biotechnology*, 31(8), 734-740.
- Yadavalli, R., Ledger, C., & Sam-Yellowe, T. Y. (2012). In vitro human cell-free expression system for synthesis of malaria proteins. *Parasitology research*, 111(6), 2461-2465.
- Ye, Z. W., Jiang, J. G., & Wu, G. H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects. *Biotechnology advances*, 26(4), 352-360.
- Yi, Y., Qiao, D., Bai, L., Xu, H., Li, Y., Wang, X., & Cao, Y. (2007). Cloning, expression, and functional characterization of the *Dunaliella salina* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene in *Escherichia coli*. *The Journal of Microbiology*, 45(2), 153-157.
- Zayadan, B. K., Purton, S., Sadvakasova, A. K., Userbaeva, A. A., & Bolatkhan, K. (2014). Isolation, mutagenesis, and optimization of cultivation conditions of microalgal strains for biodiesel production. *Russian journal of plant physiology*, 61(1), 124-130.
- Zhang, J., Fu, D., & Wu, J. (2012). Photodegradation of Norfloxacin in aqueous solution containing algae. *Journal of Environmental Sciences*, 24(4), 743-749.
- Zhang, J., Hao, Q., Bai, L., Xu, J., Yin, W., Song, L., ... & Ruan, J. (2014). Overexpression of the soybean transcription factor GmDof4 significantly enhances the lipid content of *Chlorella ellipsoidea*. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 128.

- Zhang, S., Li, X. R., Xu, H., Cao, Y., Ma, S. H., Cao, Y., & Qiao, D. (2014). Molecular cloning and functional characterization of MnSOD from *Dunaliella salina*. *Journal of basic microbiology*, 54(5), 438-447.
- Zhang, X., Tang, X., Zhou, B., Hu, S., & Wang, Y. (2015). Effect of enhanced UV-B radiation on photosynthetic characteristics of marine microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 469, 27-35.

# ANEXO

## 1. Preparation of Competent *E. coli* Cells – Calcium Chloride Method

This method is for batch preparation and frozen storage of competent cells. This is the most convenient method for making competent cells. It's also the least rigorous and consequently transformation frequencies are relatively low, usually around  $10^6$  colonies per  $\mu\text{g}$  of circular DNA. One can obtain much higher frequencies ( $10^7$ - $10^9$  per  $\mu\text{g}$ ) by using cells prepared by the Hanahan method or by electroporation. However, for most purposes, like introducing plasmid DNA into cells for stocks or most cloning applications, calcium-treated cells are fine. The higher transformation frequencies are usually needed only for introducing precious library DNA or recovering very rare clones in a mixture.

Note: It is very important that sterile technique be strictly observed through the prep. All centrifuge bottles, tubes, solutions, pipets, etc. must be sterile. Any contamination during the prep will result in problems for everyone in the lab who uses the competent cells for cloning, thereby probably decreasing your popularity.

1. Inoculate 1mL of LB with cells from a frozen glycerol stock and grow overnight at 37 °C.
2. Inoculate 500 mL of LB with the entire overnight culture.
3. Grow at 37 °C until OD<sub>550</sub>= 0.45 to 0.6, approx 4 hours. Cells overgrown will have significantly lower transformation efficiency than those in log phase growth.
4. Harvest cells on ice. Spin for 5k for 5 min at 4°C using a JA10 or GS3 rotor. It's convenient to split the prep into 2 500mL centrifuge bottles at this point.

5. Resuspend in a total of 250mL of cold 50mM CaCl<sub>2</sub>.
6. Incubate on ice for 15 min.
7. Combine in one 500 mL bottle and spin 5k for 5 min at 4 °C.
8. Resuspend in 21.5mL of cold 50mM CaCl<sub>2</sub>.
9. Add 3.5mL of sterile 100% glycerol. Mix gently.
10. Aliquot 500uL to 1mL portions into sterile eppendorf tubes on ice.
11. Flash freeze tubes in liquid nitrogen and store at -70 °C.

Cell aliquots should be used within 6 months of preparation to ensure transformation frequency.

## **Propagación del plásmido pCAMBIA1302-pG en *E. coli***

Propagación de pCAMBIA1302-pG en *E. coli* NEB-TURBO en medio LB-kanamicina (30 µg/mL)

- Se tomarón 50 µl de una cepa almacenada a -80 °C (etiquetada NEB-T pCAMBIA+pG) y se inocularon por triplicado en 5 ml de medio LB 30 µg/ml de kamamicina. Se incubarón por 8h a 37 °C en agitación y se colectaron para extracción de plásmido.
- El DNA plasmídico se extrajo con el sistema GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones de sistema.
- El DNA se evaluó en un Nanodrop ND1000. En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de DNA plasmídico obtenidas.

## 2. Extracción de DNA total

### 2.1 Axygen, AxyPrep Multisource gDNA MiniPrep Kit

#### *Protocolo para cultivos de células de plantas*

#### Lísis y homogenización

1. Centrifugar por 1 min a 5000 g (no especifica que volumen, la velocidad es adaptada para *D. salina*) un cultivo a una densidad de  $2 \times 10^3$ - $1 \times 10^7$  cél/ml.
2. Resuspender en 150  $\mu$ L de PBS e incubar 65-75 °C por 15 min (adaptado para *D. salina*).
3. Agregar 350  $\mu$ L de PBS con 1  $\mu$ L de RNAsa A e incubar por 15 min a 37 °C (adaptado).
4. Agregar 20  $\mu$ L de proteinasa K y 150  $\mu$ L de buffer C-L y mezclar inmediatamente por vórtex durante 1 min.
5. Incubar durante 10 min a 56 °C.
6. Agregar 350  $\mu$ L de buffer P-D y mezclar por vórtex 30 s.
7. Centrifugar por 10 min a 12,000 g a TA.

#### *Adhesión, lavado y elusión*

8. Transferir el sobrenadante en una columna (se terminaron, se está, usando columnas NucleoSpin, Tissue Columns de Macherey-Nagel) y centrifugar por 1 min a 12,000 g, descartando el filtrado.
9. Lavar con 500  $\mu$ L de buffer W1 y centrifugar por 1 min a 12,000 g, descartando el filtrado.
10. Lavar con 700  $\mu$ L de buffer W2 y centrifugar por 1 min a 12,000 g, descartando el filtrado.
11. Centrifugar por 1 min a 12,000 g y transferir la columna a un tubo nuevo.
12. Agregar 100  $\mu$ L de eluyente e incubar 1 min a TA.
13. Centrifugar 1 min a 12,000 g.

### 3. Extracción de plásmido

**Extracción de plásmido (Borowitzka, Borowitzka, & Moulton, 1984) en maxiprep con Compact Prep Plasmid Purification (Qiagen)**

1. **Centrifugar a 6,000 xg durante 15 min** 100 mL de cultivo para plásmidos de alto número de copia ó 250 mL para plásmidos de bajo número de copia.
2. Descartar el sobrenadante y **resuspender en 5 mL de buffer P1**.
3. **Añadir 5 mL de buffer P2** y mezclar invirtiendo el tubo de 6 veces.
4. **Incubar 3 min** a temperatura ambiente.
5. **Añadir 5 mL de buffer S3** y mezclar vigorosamente invirtiendo el tubo de 6 veces.
6. **Transferir** el lisado a un cartucho e insertar la jeringa para recuperar el filtrado.
7. **Agregar al filtrado 5 mL de buffer BB** y transferir a una columna (CompaqPrep, azul) acoplada a la extensor.
8. **Filtrar** por vacío.
9. **Lavar con 0.7 mL de buffer PE** aplicando vacío o por centrifugación a 10,000 g por 1 min.
10. **Pasar** la columna a un tubo nuevo y **eluir el DNA con 200 µL de buffer EB**.

## 4. Digestiones con endonucleasas

### PstI y Sall (BioLabs)

Reactivo/Concentración	Cantidad	Concentración final
H <sub>2</sub> O <sub>dde</sub>	23.9	-
CutSmart Buffer 10X	5	1X
DNA (418 ng/μL )	19.1	
PstI HF 20 U/ μL (BioLabs)	1	
Sall HF 20 U/ μL (BioLabs)	1	

---

418 ng	-	1 μL
8,000 ng	-	19.1 μL

Incubación a 37 °C durante 1 h.

### BamHI y NotI (BioLabs)

Reactivo/Concentración	Cantidad	Concentración final
H <sub>2</sub> O <sub>dde</sub>	23.9	-
CutSmart Buffer 10X	5	1X
DNA ( ng/μL )	19.1	
Bam HF 20 U/ μL (BioLabs)	1	
NotI HF 20 U/ μL (BioLabs)	1	

---

ng	-	1 μL
----	---	------

5,000 ng                    –            19.1  $\mu$ L

## Endonucleasas **usb**

### Pvu I (usb)

Reactivo/Concentración	Cantidad	Concentración final
H <sub>2</sub> O <sub>dde</sub>	5	-
CutSmart Buffer 10X	2	1X
BSA 0.1%	2	0.01%
DNA ( 100 ng/ $\mu$ L )	10	
Enzyme 10 U/ $\mu$ L	1	

Incubar a 37 °C

Inactivar a 60 °C por 15 min

ng                    –            1  $\mu$ L

5,000 ng                    –            19.1  $\mu$ L

## 5. PCR

### 3.1

#### 3.1.1 PCR de colonias de *C. reinhardtii*

##### Preparación de lisado

1. Picar media colonia con una punta de micropipeta de 20  $\mu$ L y disolverla en un tubo de PCR con 10  $\mu$ L de agua. Repetir para al menos 20 colonias. Nota: recuerde picar en una placa nueva para experimentos posteriores.

2. Calentar los tubos a 95 °C por 10 min.

3. Resuspender el contenido de cada tubo con la micropipeta, subiendo y bajando el volumen. Este lisado será usado como templete en el PCR.

##### PCR

Usar 1  $\mu$ L del lisado por una reacción de PCR de 50  $\mu$ L.

PCR One Taq DNA Polymerase (BioLabs M0480L)

Reacciones de 50  $\mu$ L de volumen

Reactivo	Cantidades para diferente No de reacciones				
	1 Rx	3 Rx	5 Rx	10 Rx	15
One Taq standar buffer 5x	10	30	50	100	75
H <sub>2</sub> O	36	108	180	370	270
dNTPs mix (10 mM)	1	3	5	10	7.5
F (10 $\mu$ M)	1	3	5	10	7.5
R (10 $\mu$ M)	1	3	5	10	7.5
One Taq DNA Pol	0.25	0.75	1.25	2.5	1.9
Templete: cellular lysate	1	-	-	-	-
<b>Vol</b>	<b>50</b>				<b>25</b>

Perfil térmico recomendado:

94 °C 30 s

30 (94 °C 15-30 s, 45-68 °C 15-60 s, 68 °C 1 min/kb)

68 °C 5 min.

## 6. Tranfección de células

### 3.1 Bolitas de cristal

#### 3.1.1 *D. salina*

3 mL de células, precipitadas a 5000 rpm

150 mg glass beads

Protocolo (Feng, Xue, Liu, & Lu, 2009).

300 mg glass beads, 3.5 % PEG y 60 µg de vector en 800 µL de medio en agitación a 2400 rpm.

Protocolo (Kindle, 1990) para *Chlamydomonas reinhardtii*.

1. 300 mg de glass beads, 5% PEG (Mr 6000, SIGMA) y 10 µg de vector linealizado
  2. Glass beads 0.45-0.52 mm diameter (SIGMA) lavadas con ácido clorhídrico concentrado, enjuadas con agua destilada y secadas y esterilizadas a 250 °C por 2-3 h.
  3. Solution 20% (w/v) PEG para una concentración final del 5%
  4. 300 mg de bolitas de cristal en 400 µL de cultivo ( $\leq 3 \times 10^6$  cél/mL), DNA y agitación al máximo (10-20 s) en tubos cónicos de 15 mL.
  5. 2.5-50 µg/mL DNA 1-20 µg de plásmido lineal por transformación. Puede usarse entre 5-10 µg por transformación, sin afectar el número de colonias que se generan.
  6. Se dejan sedimentar las células y éstas se siembran en agar con medio selectivo.
- Vórtex, agitación orbital, agitación manual
  - Se dejaron las células en los mismos tubos por 48 h

**Protocolo utilizado para *D. salina***

Se transfectaron dos preparaciones de *D. salina* con el plásmido pCAMBIA-eGFP o pCAMBIA-pG .

1. Cosechar 200 mL de células de un cultivo reciente a una densidad celular no mayor de  $3 \times 10^6$  cél/mL.

2. Precipitar por centrifugación a 2500 rpm por 5 min, descartando el sobrenadante tanto como sea posible.

3. Resuspender en 10 mL de Reactivo de Transformación (TR)<sup>1</sup> y centrifugar nuevamente, descartando el sobrenadante.

4. Repetir el paso anterior.

5. Resuspender en RT para una concentración final de  $2-3 \times 10^8$  cél/mL.

6. Agregar de 5 µg de plásmido linealizado por cada 250 µL de células e incubar de 2-8 °C por 5 min.

7.

2. Después de la incubación por 48 h se escalaron a un volumen de 10 mL de cultivo.

3. Al llegar a una densidad celular superior a  $1 \times 10^6$  cél/mL se escalaron a 200 mL de cultivo.

4. A partir de 100 mL de los cultivos de 200 mL se extrajo DNA de cada preparación con el sistema AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen AP-MN-MS-GDNA-50), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

### 3.1.2 *C. reinhardtii*

δ culture	δ electro	Vol	Plasmid	Cuvette	Pulse dinamycs	Volts	Time	Ω	Ref
	$1-4 \times 10^8$ cél/ml	250 µl	10 µg	4 mm	exponencial	1900- 2400 v	10 µF	-	1
$3-6 \times 10^6$ cél/ml	$3-6 \times 10^8$ cél/ml	250 µl	0.3-1 µg			2000 v	25 µF		2
$1-2 \times 10^6$ cél/ml		250 µl	2-4 µg	4 mm		500 v	30 ms 50 µF	800 Ω	3

1GeneArt MAX Efficiency Transformation Reagent

1. (Shimogawara et al. 1998): 10 µg de plásmido lineal, 1-4x10<sup>8</sup> cél/ml, 250 µl células en cuvetta de 4 mm, pulso exponencial 1900-2400 v, 10 µF, sin resistencia de derivación.

2. (Rasala et al. 2012):

3. (Gen Art, Life Technologies n.d.)

Protocolo de Rasala et al, 2012.

1. Propagar células de *C. reinhardtii*-cc1690 hasta obtener una densidad celular 3–6x10<sup>6</sup> cells/ml en TAP a 23 °C bajo iluminación constante a 5000 lux en un agitador orbital.

2. Cosechar células por centrifugación y resuspender en TAP-40 mM de sucrosa con una densidad celular de 3x10<sup>8</sup> cells/ml.

3. Mezclar 250 µL de células con 300–1000 ng de plásmido por 5–10 min en hielo.

4. Electroporar con un pulso exponencial de 2000 V/cm, 25 µF de capacitancia.

5. Dejar que las células se recobren durante 18 h en 10 mL de TAP-40 mM de sucrosa y plaquear en TAP-zeocin (15 µg/mL).

Kit de transfección GenArt

1. Cosechar 200 mL de células a 1-2x10<sup>6</sup> cel/mL y centrifugar a 2,500 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante y eliminar la mayor cantidad de medio posible sin perturbar el precipitado.

2. Resuspender el pellet en 10 mL de MAX-ETR y centrifugar nuevamente (2,500/5). Descartar el sobrenadante como en el paso anterior.

3, Repetir el paso anterior.

4. Resuspender en MAX-ETR para una densidad de 2-3x10<sup>8</sup> cel/mL.

5. Tomar una alícuota de 250 µL de células y agregar 2-4 µg de plásmido linealizado e incubar a 2-8 °C por 5 min.

6. Transferir la mezcla a una cubeta de electroporación pre-enfriada y electroporar a 500 V, 50  $\mu$ F y 800  $\Omega$  por 30 ms.
7. Dejar que las células se recobren por 15 min.
8. Transferir las células a un tubo falcón de 50 mL con 10 mL de TAP-40 mM sucrosa a TA.
9. Incubar las células con iluminación (50  $\mu$ E/ m<sup>2</sup>s ) 26 °C por 14-16 h.
10. Centrifugar las células, descartar el sobrenadante y resuspender en 200  $\mu$ L de TAP a TA.
11. Plaquear los 200  $\mu$ L de células en cajas TAP-zeocin (5  $\mu$ g/mL) e incubar a 26 °C bajo iluminación.
12. Incubar 5-7 días o hasta que las colonias sean visibles.

# IV. MEDIOS DE CULTIVO

## 4.1 MJM

### 1. Solución I

- Pesar NaCl (14.6 g - 250 mM, 196.81 g – 3.37 M).
- Pesar 43 mg de NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonato de sodio).
- Disolver en 900 mL H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub>.

### 2. Solución II

- Disolver 1 mL de cada solución stock (10, trace elements) en 80 mL H<sub>2</sub>O<sub>dde</sub>.
- Pesar 1.73 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y disolverlos en la solución.
- Pesar 1.0 g de KNO<sub>3</sub> y disolverlo en la solución.

### 3. Mezclar las soluciones I y II, ajustando el pH entre 7-7.4.

### 4. Aforar a 1 L.

## Modified MJM (Borowitzka, 1990)

Component	Final Concentration	Our work	
NaCl	As needed		As needed
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1.5 g	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g		1.73 g
KCl	0.2 g	-	-
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 g		0.028 g
KNO <sub>3</sub>	1.0 g		1.0 g
NaHCO <sub>3</sub>	43 mg		43 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.035		54.4 mg
<b>Fe solution (for 1 litre)</b>			
Na <sub>2</sub> EDTA	189 mg	EDTA	1.5 mg
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	244 mg	FeCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1.6 mg
<b>Trace element solution (for 1 litre)</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61 mg		11.5 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	38 mg		1.2 mg
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	6 mg	CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.17 mg
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5.1 mg		0.3 mg
ZnCl <sub>2</sub>	4.1 mg		0.1 mg
MnCl <sub>2</sub>	4.1 mg	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.4 mg

## 4.2 Erdschreiber's Medium 2X

Component		Stock Solution	Final Concentration	Johnson	Relation
<b>Supplemented Seawater</b>	1 L			-	
<b>P-IV Metal Solution</b>	12 mL			-	
NaNO <sub>3</sub>	3.33 mL	0.7 M	2.3 mM	KNO <sub>3</sub> 10 mM NaCl 0.1-5 M	++++
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O	3.33 mL	0.02 M	0.067 mM	NaHCO <sub>3</sub> 0.51 mM	
Soilwater: GR+Medium	50 mL				
<b>Vitamin B<sub>12</sub></b>	1 mL	140 µg/mL	140 ng/mL	-	-

#### Supplemented Seawater to 1 L

Component		Final Concentration	Johnson
Pasteurized Seawater	900 mL		
NaCl	23 g/L	393.8 mM	0.1-5 M
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	5 g/L	24.6 mM	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 7 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 g/L	28 mM	

#### P-IV Metal Solution to 120 mL

Component	Amount	Final Concentration	Johnson
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	0.09 g	2 mM	EDTA 5 μM
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.0116 g	0.36 mM	2 μM
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.005 g	0.21 mM	7 μM
ZnCl <sub>2</sub>	0.0006 g	0.037 mM	1 μM
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.00024 g	0.0084	CoCl <sub>2</sub> 1 μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.00048	0.017 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 1 μM

#### Vitamin B12 to 50 mL

Component	Amount	Final Concentration
HEPES buffer pH 7.8*	0.6 g	
Vitamin B <sub>12</sub>	0.007 g	140 μg/mL

\*Preparar el HEPES y ajustar el pH

**(Wang et al., 2007) utiliza el medio publicado por Ben-Amozt para cultivar *D. salina* strain (UTEX1644)**

Component	Final Concentration	Li <i>et al</i> , 2010	Johnson	
NaCl	2 M	2 M	0.1-5 M	
NaHCO <sub>3</sub>	50 mM	50 mM	0.51 mM	
KNO <sub>3</sub>	5 mM	2.5 mM NaNO <sub>3</sub>	10 mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12 mM	0.2 mM	0.4 mM	
EDTA	6 μM	6 μM	5 μM	
FeCl <sub>3</sub>	2 μM	2 μM	2 μM	FeCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
MgSO <sub>4</sub>	5 mM	5 mM	7 mM	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub>	0.12 mM	0.2 mM	0.2 mM	CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O
MnCl <sub>2</sub>	7 μM	7 μM	7 μM	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
ZnSO <sub>4</sub>	1 μM	1 μM	1 μM	ZnCl <sub>2</sub>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 μM	1 μM	1 μM	CoCl <sub>2</sub>
CuSO <sub>4</sub>	1 μM	1 μM	1 μM	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	1 μM		1 μM	
			185 μM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>

12 h light (45 lux)/12 h dark cycle.

## 4.2 TAP

Gorman, D.S., and R.P. Levine (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1665-1669.

Stock solutions:

### 1. TAP salts

Compound

NH <sub>4</sub> Cl	15.0 g	0.75 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.0 g	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.0 g	0.1 g
water	to 1 liter	To 50 mL

### 2. phosphate solution

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.4 g
water	to 100 ml

### 3. Hutner's trace elements (follow this link)

To make the final medium, mix the following:

- 2.42 g Tris
- 25 ml solution #1 (salts)
- 0.375 ml solution #2 (phosphate)
- 1.0 ml solution #3 (trace elements)
- 1.0 ml glacial acetic acid
- water to 1 liter

For solid medium, add 15 g agar per liter

Autoclave.

For Tris-minimal medium omit the acetic acid and titrate the final solution to pH 7.0 with HCl

## 1X PBS

Component	g to 1L	G to 50 ml
NaCl	8	0.4
KCl	0.2	0.01
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44	0.072
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	0.012

Adjust pH to 7.4

Sterilize if is necessary

## PURIFICACIÓN DE DNA/PROTEÍNA

illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare: 28-9034-70), usando en lugar del Capture buffer type 3, el buffer QX1 Solubilization buffer (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen).

### 5.3 Protocol

1. Add 500 µl QX1 solubilization buffer/ 100 µl sample
2. Load the sample mix onto GFX column and centrifuge 30 s at 16,000 g, discard the flow through.
3. Wash with 300 µl wash buffer type 1 and centrifuge 30 s at 16,000 g, discard the flow through.
4. Centrifuge 1 min at 16,000 g, discard the flow through and put the column into new tube.
5. Add 10-50 µl elution buffer, incubate 1 min RT and centrifuge 1 min at 16,000 g.

## Anexo 2. Secuencias de genes, plásmidos y construcciones.

```

5'ccatggGGGTCCGTTAAAATAAAAAATTTTAGCGGAAACCCCGTCCCCTGAGAGA GGGCACCAAA
GAAATTTTTTTAGAAATTTAGAGAATAAATTTCTAACGAATTTTCTTTCCTTTATAATAATTTATA
AAGGTTTTGTGCGAGGTGAGCTTCCGTACGATGCTGTTTGGGATGCTCTTACGGGCTTAAACA
CATGTATCTTGTATAGACCTATTTGTTTATATCATTATCTTAAAAAACAAAAAATAATTTATC
g3'CCATGGCATCACCATCACCATCAGCATGATGATGATAAATGACAGATACATATAAATTAAT
AAATGGTAAAACCTTAAAAGGTGAAAC AACCCACGGGAGGCTGTTGATGCGGGCACAGCTGAA
AAAGTTTTAAACAATATGCGAATGACAAACGGAGTTGATGGGGAAATGGACATATGATGACCGG
ACGAAAACCTTTACAGTTACAGAAAAGCCGGAGGTTATTGATGCTTCTGAAATTAACGGCTGCTG
TTACAACCTATAAATTTGTTATTAATGGCAAAACATTAAGAGGGGAAACAACCCACGGAAAGCGGT
TGATGCTGCGACAGCTGAAAAGGCTTTAAACAATATGCGAATGACAAACGGAGTTGATGGTGA
ATGGACATATGATGACGCTACCAAAACATTTACCGTTACAGAAAAACCTGGAAGTTATTGATGCG
TCTGAGTTAACACCCGGCTGTTACGACATATAAATTAAGTTATTAATGGGAAAACATTTGAAAAGTG
AAACAACGACCAAAAGCTGTTGATGCTGAAACAGCGGAAAAGCGGTTAAACAAATGATGATTAATGA
CAACCGAGTTGATGGTGTGGACATATGACGATGCTACAAAACATTTACAGTTACAGAAATG
5'ATACAGAACTTTAACTGCAGGCTCAACCTTGTATTACAGGTGATGCTTTAGTTGCTTTACCTG
AAGGTGAATCTGTTAGAATTTGCTGATATTGTTCTGGTCTAGACCTAATTTCTGATTAATGCTATT
GATTTAAAAGTTTTAGATAGACATGGTAATCCTGTTTTAGCTATAGATTTTTCATTCTGGTGAA
CCTCCTGTTTTACAGTTAGAACAGTTGAAGGTTTTAAGAGTTACA GGTACA GCTAATCATCCTTT
ATTATGTTTAGTTGATGTTGCTGGTTCCCTACATTATTATGAAAATTAATCC
TGGTGATTATGCTGTTATTTCAAGATCTGCTTTTTCTGTTGATTGCTGCTGGTTGCTAGAGGTA
AACCTGAATTTGCTCCTACAACATATACAGTTGGTGTTCCTGGTTTAGTTATTTTAGAAAGCT
CATCATAGAGATCCTGATGCTCAAGCTATTGCTGATGAATTAACAGATGGTAGATTTTATTATGC
TAAAGTTGCTTCTGTTACAGATGCTGGTGTTCACCTGTTTATTCTTTAAGAGTTGATACAGCTG
ATCATGCTTTTATCAAAATGGTTTTCTCATGCTACAGGTTTAAACAGTTTAAATTTCTGGTT
TAaggatccACACAATCACACTGGSSSTCAATGTGGTGTATTGGTTATTCAAGTCCCAAGAGTATG
GCTTCAGGTACAACATGTCAAGTATTAACCCCATATTATTCACAATGTTTATAAActag3'AAATTTATA
ATTTTTTATAATTTTTGATTTTTCTCCGAAAAAAGTTAAAAATAACTTTTTTATTTTTTATTATTC
AGCTTTTTTCATTAACCTGGTATTATATAATACCAGATAATTTATCAAAAAGCAAGAGCATCCCTT
TTTTTAAACAACAACCTTTTTATATAATTTTTTATTGTACCGGACAAAACAACCTTTGTTATTTCTCT
CACCGGACGGACAACAACGCCCCCGCCCTTAAGGGCTAGGACTTTGTGCGTCCGCTAAGGGCT
AGGATCAAGATCCGTCGCGGTGAGGGGCCCTTAGGGGATGGATTTCCGCTAAAAAAGAGAAAAAT
TTTTCTTTAGTCTGTGCTATATAATCTTATGAATATCATTGTTGGCAATATAAGTCATAAAAAA
ACTTAAATATTCTAATCCGTctgagGGGTCCGTTAAAATAAAAAATTTTAGCGGAAACCCCGTCCC
TGGAGAGAGGGCACCAAAAGAAATTTTTTAGAATTTAGA GAAT AAATTTAAGCAATTTTCTTTG
CTTTATAATAATTTATAAAGGTTTTGTGTCGAGGTCAGCTCCGTCAGCATGCTGTTTTGCGAT
GCTCTTACGGGCTTAACACATGTATCTTGTATAGACCTATTTGTTTATATCATTATCTTAAAAAA
ACAAAAAATAAATTTctgca3'ATGACAACTTAGATGATACAGCTTATAGATATAGAACTCTGT
TCCTGGTGTGCTGAAGCTATTGAAGCATTAGATGGTCTTTTACAACAGATACAGTTTTTAGA
GTTACAGCTACAGGTGATGGTTTTACATTAAGAGAAAGTTCCCTGTTGATCCTCCTTTAACAAAAG
TTTTCTCTGATGATGAATCTGATGATGAATCTGATGCTGGTGAAGATGGTGTGCTGATCTCGC
ACATTTGTTGCTTATGGTGTGATGGTGTATTAAGCTGGTTTTGTTGTTCTTATTCTGGTTG
GAATAGAAATTAACAGTTGAAGATATTGAA GTTGTCTCCTGAAGATAGAGGTGATGGTGTG
AGAGCTTTAATGGGTTAGCTACAGAAATTTGCTAGAGAAAGAGGTGCTGCTCATTATGGTTAG
AAGTTACAAATGTTAATGCTCCTGCTATTGATGCTTATAGAAAGATGSGTTTTACATTTATGCT
TTAGATACAGCTTTTATGATGGTACAGCTTCTGATGGTGAACAA GCATTATATGCTCTATGG
TTGTCCCTAA3'ctgca3'AAATTTATAATTTTTTATTAATTTTTGATTTTTCTCCSAAAAAAGTAAAAAATAA
CTTTTTATTTTTTTATTATTCAAGCTTTTTTCATTAACCTGGTATTATTATAATACCAGATAATTT
TATCAAAAAGCAAGACCATCCTTTTTTA
TAAACAACAACCTTTTTATATAATTTTTTATTGTACCGGACAAAACAACCTTTGTTATTTCTCTCAG
CGGACGSAACAACGCCCCCGCCCTAAGGGCTAGGACTTTGTGCGTCCGCTAAGGGCTAG
GATCAAGATCCGTCGCGGTGAGGGGCCCTTAGGGGATGGATTTCCGCTAAAAAAGAGAAAATTT
CTTTTAGTCTGTGCTATATAATCTTATGAATATCATTGTTGGCAATATAAGTCATAAAAAAATAA
TTAAATATTCTAATCCGT3'ctg3'

```

Figura. Construcción en plásmido con el inserto de proteína G de *Streptococcus* sp. con sus respectivos cortes.