



UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

GENERACIÓN DE MUTANTES DE LOS  
RESIDUOS D308 Y D310 DEL MOTIVO  
DTD DEL TRANSPORTADOR DE  
SACAROSA StSUT1 PARA INVESTIGAR  
POSIBLES SENSORES DE pH.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNA: LILIBETH BELÉN DÍAZ PACHECO  
PROFESORA GUÍA: PH.D. JANIN RIEDELSBERGER

TALCA-CHILE

2019

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019



## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	Pág.5
2. INTRODUCCIÓN.....	Pág.7
3. MARCO TEÓRICO.....	Pág.9
3.1. La sacarosa en las plantas.....	Pág.9
3.2. Tipos de transportadores de sacarosa.....	Pág.10
3.3. Funcionamiento de los transportadores SUT.....	Pág.10
3.4. Regulación de los transportadores SUT.....	Pág.11
4. HIPÓTESIS.....	Pág.14
5. OBJETIVOS.....	Pág.14
5.1. Objetivo general.....	Pág.14
5.2. Objetivos específicos.....	Pág.15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	Pág.16
6.1. Generación de mutantes.....	Pág.16
6.2. Proceso Clonación USER.....	Pág.18
6.2.1. PCR.....	Pág.18
6.2.1.1. PCR en donde solo hay que cambiar el vector.....	Pág.21
6.2.1.2. PCR en donde hay que introducir la mutación y cambiar el vector...Pág.22	
6.2.2. Purificación y extracción de fragmentos de PCR.....	Pág.24
6.2.2.1. Electroforesis en gel de agarosa.....	Pág.24
6.2.2.2. Protocolo de extracción de DNA en gel.....	Pág.26
6.2.3. Reacción USER.....	Pág.27
6.2.4. Transformación por el método de golpe de calor.....	Pág.29
6.2.5. Colony PCR.....	Pág.30
6.2.6. Amplificación de colonias.....	Pág.31
6.2.6.1. Protocolo de extracción del plasmido del medio LB líquido.....	Pág.31
6.2.7. Ensayo de restricción.....	Pág.32
6.2.8. Secuenciación.....	Pág.33
6.3. Generación de cRNA mediante transcripción in vitro.....	Pág.33
6.3.1. Linealización de plásmido.....	Pág.33

6.3.2 Transcripción in vitro.....	Pág.34
6.3.3 Purificación RNA.....	Pág.35
6.3.4 Gel de RNA.....	Pág.35
6.3.5 Electroforesis RNA.....	Pág.36
7. RESULTADOS.....	Pág.37
7.1 Generación de mutantes mediante el método de PCR.....	Pág.37
7.1.1 Ejemplo PCR II.....	Pág.37
7.1.2 Ejemplo PCR IXa, IXb y IXc.....	Pág.41
7.2 Generación de cRNA mediante transcripción in vitro.....	Pág.45
7.2.1 Ejemplo StSUT1 (wild-type).....	Pág.45
8. DISCUSIÓN.....	Pág.48
9. CONCLUSIÓN.....	Pág.51
10. REFERENCIAS.....	Pág.52

## 1. RESUMEN

El azúcar más importante en el metabolismo de los hidratos de carbono de las plantas es la sacarosa, que se encuentra en todas las plantas vasculares superiores. Este metabolito no se genera directamente de la fotosíntesis. Después de producirse los azúcares de tres carbonos en la fotosíntesis, estos azúcares son convertidos en hexosas como glucosa y fructosa en donde posteriormente estos monosacáridos son convertidos en disacáridos como la sacarosa y deben ser transportados a otras partes de la planta para usarse en el metabolismo. El movimiento de la sacarosa a corta y larga distancia en las plantas está íntimamente relacionado con la actividad de las proteínas transportadoras de sacarosa. Tanto la entrada de la sacarosa al floema en la fuente (denominada carga del floema) como la salida del floema hacia los sumideros (descarga del floema) pueden ocurrir por dos vías: simplástica y apoplástica. En todos los casos en que la sacarosa salga al apoplasto esta debe ser incorporada de nuevo al simplasto por una proteína transportadora (SUT o SUC, Sucrose Transporter o Carrier). En este estudio se trabajó con el transportador de sacarosa SUT1 de *Solanum tuberosum* (papa) StSUT1.

Se sabe según estudios anteriores realizados en levadura que en mutantes dobles del motivo DTD del transportador de sacarosa StSUT1 la capacidad de detectar el pH está afectada. Estos estudios solo fueron realizados en mutantes dobles pero todavía no se sabe cuál es la contribución individual de los residuos D308 y D310. La mutagénesis dirigida al sitio D308 y D310 del motivo DTD del transportador de sacarosa StSUT1 proporciona información sobre los aminoácidos funcionales, que son altamente conservados y responsables de este aumento extraordinario en la capacidad de transporte bajo condiciones de pH extremos.

Este trabajo tiene por objetivo la generación de mutantes simples y cRNA en donde queremos investigar la contribución individual de cada aminoácido que estarían modificando la actividad del transportador de sacarosa StSUT1 según un posterior

análisis del efecto del pH en la regulación de dicho transportador mediante electrofisiología, ya que según evidencia experimental se sabe que la actividad de transportador es en el rango de pH ácido. La generación de mutantes se realizó mediante técnicas de biología molecular por el método USER clonning para que la actividad del transportador se mida posteriormente mediante la técnica de electrofisiología.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos autótrofos, porque fabrican sus nutrientes mediante el proceso de fotosíntesis, convirtiendo el dióxido de carbono y el agua, con la adición de la energía del sol, en compuestos orgánicos que contienen gran energía como lo son los azúcares. En la fotosíntesis, el producto principal es la glucosa que es un monosacárido, en donde por lo general se convierte en sacarosa (glucosa + fructosa), un azúcar disacárido.

Después de producirse los azúcares en la fotosíntesis, estos azúcares deben ser transportados a otras partes de la planta para usarse en el metabolismo. La selección de sacarosa como el principal azúcar de transporte en la planta se ha relacionado con su naturaleza no reductora y su insensibilidad relativa al metabolismo. Esto representa una ventaja para un sustrato trasladado a larga distancia en la planta, permitiendo el transporte sin problema del metabolito.

En las plantas, la sacarosa se transporta desde los órganos que sintetizan (fuente) hasta los órganos donde se almacena (como sacarosa o, por ejemplo, como almidón) o se metaboliza. La sacarosa es por lo tanto una fuente de moléculas de carbono, pero también un vector de energía.

En las plantas, la sacarosa se transporta a larga distancia en solución en la savia del floema. Este flujo de savia ocurre en una red especializada de células, llamadas elementos de tamizado. Los elementos del tamiz pierden su núcleo y muchos orgánulos durante la diferenciación, pero permanecen conectados a células acompañantes, células con una alta actividad metabólica. Los elementos de tamiz están conectados para formar tubos de tamiz que se oponen a una resistencia muy pequeña al flujo de savia. El movimiento de la savia en el floema se produce a través del flujo másico, la fuerza motriz de este movimiento es la entrada de sacarosa y, posteriormente, agua en los tubos

del tamiz en el órgano fuente mientras que, en el otro extremo del conducto en los órganos del sumidero, la descarga continua de solutos y agua mantendría el flujo.

La carga y descarga de sacarosa en el tubo del tamiz requiere la presencia de transportadores de sacarosa. Esto apunta a la importancia de un sistema transportador para la translocación de solutos de los órganos fuente a los receptores. En muchas plantas se han encontrado familias de transportadores, uno de ellos es la proteína StSUT1. En este trabajo se van a generar distintos mutantes del transportador de sacarosa StSUT1 para su posterior análisis en electrofisiología.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 *La sacarosa en las plantas*

La sacarosa ocupa una posición central en el metabolismo de todas las plantas, es sintetizada con los principales productos de la fotosíntesis en la mayoría de estas plantas. Una vez formada la sacarosa, ésta es transportada de los tejidos fotosintéticos por el tejido conductor de las plantas (el floema) hacia las diferentes partes de la planta, ya sea moviéndose entre las paredes celulares (transporte apoplástico) o por alrededor del citoplasma de las células (transporte simplástico). El transporte activo de azúcar podría desempeñar un papel importante en el mecanismo por el cual las plantas modularían la tasa de exportación de azúcar hasta las hojas.

El floema se compone de células vivas que transportan una solución acuosa de azúcares, que comúnmente llamamos savia. Este movimiento está modelado por la teoría de presión-flujo, una parte de la cual dice que el fluido que contiene el azúcar, se mueve a través de tubos cribosos por la presión de fluido. Por este medio, los nutrientes se pueden mover desde el lugar de la fotosíntesis (la fuente), al lugar donde se utiliza el azúcar (el sumidero), ya sea hacia arriba o hacia abajo del tallo de la planta. <sup>(1)</sup>

### *3.2 Tipos de transportadores de sacarosa*

Los transportadores de sacarosa en las plantas pueden ser de tres tipos: portadores de afluencia de membrana plasmática responsables de la entrada de sacarosa en células que son del tipo simportador de protones / sacarosa; se ha propuesto que los portadores tonoplast actúen como antiportadores de sacarosa / protón ya que la vacuola es ácida en comparación con el citoplasma; y finalmente, portadores de flujo de salida de la membrana plasmática responsables, por ejemplo, de la descarga de sacarosa en los órganos receptores o de la salida de sacarosa de las células del mesófilo en estrecha proximidad al floema. Los portadores de efluvo podrían, en teoría, ser facilitadores o antiportadores. <sup>(2)</sup>

Los transportadores SUT están localizados en la membrana y son responsables de la carga de sacarosa en las células de las plantas, para mantener la alta concentración de sacarosa dentro del floema y probablemente también para la liberación de sacarosa en el apoplasto para alimentar ciertas células y tejidos receptores (= sumideros apoplásticos, como células protectoras, granos de polen en desarrollo, tubos polínicos, el integumento interno de la cubierta de la semilla o el embrión en desarrollo). <sup>(3)</sup>

### *3.3 Funcionamiento de los transportadores SUT*

Los transportadores de sacarosa (SUT) pertenecen a la superfamilia principal del facilitador. Estas proteínas contienen varias regiones hidrofóbicas que se pueden asignar a 12 regiones que abarcan la membrana. <sup>(4)</sup>

Los transportadores median el transporte del sustrato a un simportamiento o antiporte de iones termodinámicamente favorable (generalmente  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$ ). La utilización de energía libre almacenada en gradientes de iones electroquímicos para la translocación del sustrato ya fue hipotetizada por Mitchell en 1963. Las bombas activas primarias ATPasas tipo P en el caso de las plantas establecen estos gradientes electroquímicos a través de membranas biológicas impulsadas por la hidrólisis del ATP.<sup>(5)</sup>

Lo anterior es importante, especialmente el sim-/antiporte de protones ya que la ATPasa genera un gradiente de protones sobre la membrana que se puede usar como fuente de energía para realizar el transporte de por ejemplo sacarosa.

### 3.4 Regulación de los transportadores SUT

Un paso importante hacia el descubrimiento de la función de los transportadores de sacarosa en las plantas superiores se realizó cuando los primeros genes que codificaban los transportadores de sacarosa de las plantas se clonaron a partir de espinacas y patatas. Los estudios *in situ* muestran que el transportador de sacarosa de la patata, StSUT1, está altamente expresado en el floema de las venas menores de la hoja, el principal sitio de carga del floema. StSUT1 también se expresa, aunque en menor medida, en los tallos y los tejidos del sumidero, donde la recuperación de sacarosa que se escapa del floema y la captación de sacarosa en el sumidero, respectivamente, se han propuesto como posibles funciones del transportador.<sup>(6)</sup>

Se encuentran cada vez más interacciones proteína-proteína cruciales para la regulación de la actividad del transportador de membrana. El transportador de sacarosa StSUT1 es esencial para la asignación y la partición de sacarosa en plantas superiores.<sup>(7)</sup>

Durante mucho tiempo se ha sabido a partir de datos fisiológicos que el transporte a larga distancia está controlado por parámetros ambientales como la luz, la temperatura, las condiciones osmóticas. Los cambios en la partición de asimilación se deben a modificaciones del pH, metabolismo y / o asimilación del transporte.<sup>(8)</sup>

Los transportadores de sacarosa (SUT) están estrechamente controlados a nivel transcripcional y postranscripcional. En la levadura, los transportadores de sacarosa de *Arabidopsis* y el tomate mostraron formar complejos homoméricos y heteroméricos. El comportamiento de dimerización del transportador de sacarosa StSUT1 está relacionado con el estado rédox celular como lo demuestran las herramientas bioquímicas.<sup>(9)</sup>

Los transportadores de sacarosa en plantas (SUT) son funcionales como cotransportadores de sacarosa-protón con una actividad de transporte óptimo en el rango de pH ácido. Recientemente, se determinó experimentalmente que el pH óptimo del transportador de sacarosa de *Solanum tuberosum* StSUT1 se encuentra a un pH inesperadamente de 3 o incluso inferior. Varios grupos de investigación han confirmado estos hallazgos sorprendentes de forma independiente y en diferentes organismos.<sup>(10)</sup>

Usando métodos de análisis de expresión, se ha examinado en estudios anteriores en detalle el papel del transportador de sacarosa OsSUT1 durante la germinación y el crecimiento temprano de las plantas de arroz. Se ha demostrado que

cinco aminoácidos cargados dentro de los intervalos de membrana de este transportador son esenciales para la actividad de transporte. Entre ellos se encuentran dos residuos de ácido aspártico en la posición D117 y D331 que se mostraron esenciales para la captación de sacarosa y la translocación de protones, respectivamente. D<sub>331</sub> pertenece a un motivo diácido DTD altamente conservado que se puede encontrar en la mayoría de los transportadores de sacarosa como en el StSUT1 presente en la papa.<sup>(11)</sup>

En estudios anteriores se ha trabajado con mutantes dobles, StSUT1-D308N-D310N, StSUT1-D308E-D310E y StSUT1-D308G-D310G en la región DTD donde analizando éstos mutantes en sistema de levaduras se ha visto que los residuos D308 y D310 del doble mutante se comportan diferente comparando el wild-type bajo diferentes condiciones de pH.

El wild-type demostró tener una actividad óptima a pH 3 pero no tener actividad a pH 5 en cambio en los mutantes el pH óptimo se describe alrededor de pH 5 y no a pH 3.

Éstas observaciones han sido la base para la realización del presente trabajo ya que, se generarán mutantes simples de los residuos D308 y D310 del motivo DTD del transportador de sacarosa StSUT1 para su posterior análisis en electrofisiología y así estudiar la contribución de cada aspártico a detección del pH.<sup>(10)</sup>

#### 4. HIPÓTESIS

Los residuos D308 y D310 del motivo DTD de StSUT1 contribuyen en diferente magnitud al aumento en la capacidad de transporte bajo condiciones ácidas de pH.

#### 5. OBJETIVOS

##### *5.1 Objetivo general:*

- Generar mutantes simples y dobles del motivo DTD del transportador de sacarosa StSUT1 para posterior análisis con electrofisiología.

## 5.2 *Objetivos específicos:*

- Generar sub clonación de los mutantes dobles y simples (wild-type, D308N-D310N, D308E- D310E, D308G- D310G, D308N y D310N) ya disponibles por colaboradores para cambio del vector pDR196 al pNB1u.
- Generar mutantes faltantes (StSUT1-D308E, StSUT1-D310E, StSUT1-D308G y StSUT1-D310G) en la región DTD del transportador de sacarosa StSUT1.
- Generación de cRNA de los mutantes mediante transcripción in vitro.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 *Generación de Mutantes*

El vector pDR196 se utilizó para la expresión de StSUT1 en levadura por colaboradores de Alemania, quienes enviaron los mutantes después de realizar experimentos de ingreso de sacarosa con StSUT1 en levaduras. Se va a cambiar StSUT1 al nuevo vector pNB1u que es un vector compatible del sistema USER clonng que se muestra más abajo en la figura 1y sirve para la expresión de StSUT1 en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los mutantes que están disponibles como lo muestra la tabla 1, son los que ya han utilizado nuestros colaboradores en Alemania en sistema de levadura, pero contienen el vector pDR196 que es para expresión de StSUT1 en levaduras, por lo tanto, se debe cambiar el gen al vector pNB1u que es un vector compatible con el sistema USER y sirve para la expresión de StSUT1 en ovocitos de *Xenopus laevis*; lo que hay que generar son las mutaciones en los motivos D308E, D310E, D308G y D310G.

<b>StSUT1-</b>	<b>Disponible</b>	<b>Tarea</b>
wild-type	si, en vector pDR196	cambiar a vector pNB1u
D308N-D310N	si, en vector pDR196	cambiar a vector pNB1u
D308N	si, en vector pDR196	cambiar a vector pNB1u
D310N	si, en vector pDR196	cambiar a vector pNB1u
D308E-D310E	si, en vector pDR196	cambiar a vector pNB1u
D308G-D310G	si, en vector pDR196	cambiar a vector pNB1u
D308E	no	introducir mutación y cambiar a vector pNB1u
D310E	no	introducir mutación y cambiar a vector pNB1u
D308G	no	introducir mutación y cambiar a vector pNB1u
D310G	no	introducir mutación y cambiar a vector pNB1u

**Tabla 1:** Listado de mutantes que están disponibles para cambiar de vector y mutantes en los que hay que introducir mutaciones además de cambiar el vector.

Los primers que se van a utilizar para el cambio de vector, que contienen el uracilo, son:

StSUT1-USER-fwd: **GGCTTAAU**ATGGAGAATGGTACAAAAAG

StSUT1-USER-rev: **GGTTTAAU**TTAATGGAAACCGCCC

Siendo la secuencia subrayada específica para el vector y termina con el uracilo y la secuencia siguiente específica para el inicio y fin del gen StSUT1.

Los primers para introducir las mutaciones son los siguientes. Estos se usan en conjunto con los dos primers USER mencionados arriba.

StSUT1_D308E_fwd:	GGTTTCCCTTTTTCTTATACGAAAC
StSUT1_D308E_rev:	GCCATCCAATCTGTTTCGTATAA
StSUT1_D310E_fwd:	ACAGAATGGATGGCTAAGGAGG
StSUT1_D310E_rev:	GCCATCCATTCTGTATCGTATAA
StSUT1_D308G_fwd:	GGTTTCCCTTTTTCTTATACGGTAC
StSUT1_D308G_rev:	TTAGCCATCCAATCTGTACCGTA
StSUT1_D310G_fwd:	ACAGGTTGGATGGCTAAGGAGG
StSUT1_D310G_rev:	GCCATCCAACCTGTATCGTATAA

## 6.2 *Proceso de clonación USER*

### 6.2.1 PCR

Técnica que permite amplificar pequeñas regiones específicas de ADN mediante básicamente tres pasos detallados a continuación:

Desnaturalización (96°C): la reacción se calienta a 96°C para separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.

Templado (55 - 65°C): la reacción se enfría para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.

Extensión (72°C): la temperatura de la reacción se eleva para que la enzima PfuCx extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.

Este ciclo se repite según el programa a utilizar en el termociclador. El detalle de los ciclos que se realizaron en este trabajo se detalla a continuación en la tabla 2.

Paso	Temperatura	Tiempo	Cantidad de ciclos
1	95°C	5 min	
2	95°C	30 s	10 ciclos (-1°C/ciclo)
3	66°C	30 s	
4	72°C	75 s	
5	95°C	30 s	

6	55°C	30 s	20 ciclos
7	72°C	75 s	
8	72°C	10 min	
9	4°C	∞	Pausa

**Tabla 2:** Programa a utilizar en el termociclador para las PCR.

En este caso se utiliza PCR para extraer y amplificar el gen StSUT1 del vector pDR196 y prepararlo para la introducción al nuevo vector pNB1u, o sea para cambiar el vector y también para introducir las diferentes mutaciones.

El templado (DNA) y los primers correspondientes a cada PCR se encuentran descritos en la siguiente tabla 3.

PCR					
	Para	Templado	Primer 1	Primer 2	Tamaño
I	StSUT1-wt	StSUT1-wt in pDR196	StSUT1-USER-fwd	StSUT1-USER-rev	1564 pb
II	StSUT1-D308N	StSUT1-D308N in pDR196	StSUT1-USER-fwd	StSUT1-USER-rev	1564 pb
III	StSUT1- D310N	StSUT1-D310N in pDR196	StSUT1-USER-fwd	StSUT1-USER-rev	1564 pb
IV	StSUT1-D308N/D310N	StSUT1-NTN in pDR196	StSUT1-USER-fwd	StSUT1-USER-rev	1564 pb
V	StSUT1-D308E/D310E	StSUT1-ETE in pDR196	StSUT1-USER-fwd	StSUT1-USER-rev	1564 pb
VI	StSUT1-D308G/D310G	StSUT1-GTG in pDR196	StSUT1-USER-fwd	StSUT1-USER-rev	1564 pb
VIIa	StSUT1- D308E	StSUT1-wt	StSUT1-USER-fwd	StSUT1-D308E_rev	946 pb
VIIb	StSUT1- D308E	StSUT1-wt	StSUT1-D308E_fwd	StSUT1-USER-rev	655 pb

VIIIa	StSUT1- D310E	StSUT1-wt	StSUT1- USER-fwd	StSUT1- D310E_rev	946 pb
VIIIb	StSUT1- D310E	StSUT1-wt	StSUT1- D310E_fwd	StSUT1- USER-rev	632 pb
IXa	StSUT1- D308G	StSUT1-wt	StSUT1- USER-fwd	StSUT1- D308G_rev	949 pb
IXb	StSUT1- D308G	StSUT1-wt	StSUT1- D308G_fwd	StSUT1- USER-rev	655 pb
Xa	StSUT1- D310G	StSUT1-wt	StSUT1- USER-fwd	StSUT1- D310G	946 pb
Xb	StSUT1- D310G	StSUT1-wt	StSUT1- D310G_fwd	StSUT1- USER-rev	632 pb
Purificación en gel					
VIIc	StSUT1- D308E	VIIa + VIIb	StSUT1- USER-fwd	StSUT1- USER-rev	1564 pb
VIIIc	StSUT1- D310E	VIIIa + VIIIb	StSUT1- USER-fwd	StSUT1- USER-rev	1564 pb
IXc	StSUT1- D308G	IXa + IXb	StSUT1- USER-fwd	StSUT1- USER-rev	1564 pb
Xc	StSUT1- D310G	Xa + Xb	StSUT1- USER-fwd	StSUT1- USER-rev	1564 pb
Purificación en gel					

**Tabla 3:** Listado de todas las PCR con los distintos templados y primers necesarios para las amplificaciones de los fragmentos de DNA

#### 6.2.1.1. PCR en donde sólo hay que cambiar el vector.

Corresponden a las PCR I a VI descritas anteriormente en la tabla 3.

Protocolo PCR:

1,5  $\mu$ l DNA

1  $\mu$ l dNTPs

10  $\mu$ l Buffer

1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>,

2,5  $\mu$ l primer 1

2,5  $\mu$ l primer 2

0,2  $\mu$ l enzima polimerasa Pfu

31,3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

50  $\mu$ l. volumen final

Nota: el templado (DNA) y los primers correspondientes a cada PCR se encuentran descritos en la tabla 3.

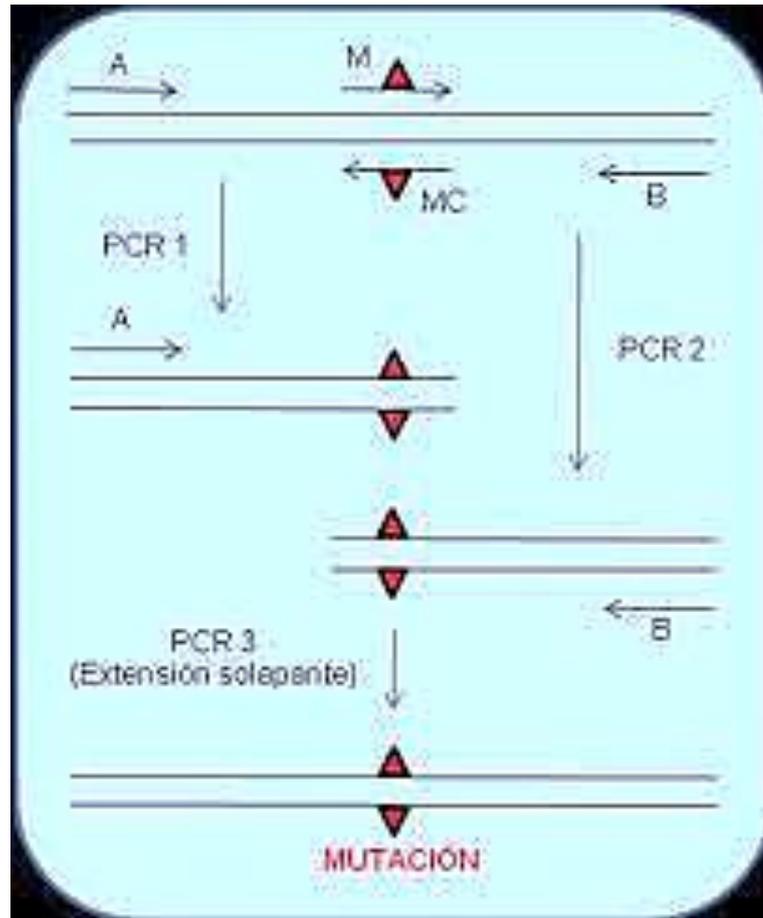
Los tubos se dejan en el termociclador hasta que termine el programa descrito en la tabla 2 y finalmente realizar electroforesis en gel de agarosa al 1% descrito en la sección 6.2.2.1

6.2.1.2 PCR en donde hay que introducir la mutación y cambiar el vector.

Corresponden a las PCR VIIa a la Xc descritas anteriormente en la tabla 3. Se utiliza el mismo protocolo de PCR descrito en el punto anterior.

La generación de mutantes es un proceso que consta de dos partes, en primer lugar la PCR 1 y 2 para introducir la mutación y por otro lado la PCR 3 para amplificar el gen entero.

Como se muestra en la figura 1 a modo de ejemplo, se debe realizar PCR1 y PCR2 para generar dos fragmentos que contienen las mutaciones en sus extremos (M + MC), posteriormente se realiza la revisión en gel de agarosa para verificar el éxito del PCR descrito en la sección 6.2.2.1 y se procede a la purificación de los fragmentos PCR con el kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup. Micro Kit. Finalmente, se ocupan los dos fragmentos juntos en un 3 PCR con los primers USER (StSUT1-USER-fwd + StSUT1-USER-rev) que corresponden a A y B respectivamente en la figura, para amplificar el mutante StSUT1 completo. En el caso del punto anterior 6.2.1.1 donde solo se cambia el vector (sin introducir la mutación) se comienza directamente con PCR 3 con el plásmido que se tiene de Alemania como templado en donde también con PCR3 se revisa en un gel agarosa descrito anteriormente en la misma sección ya mencionada para verificar el éxito del PCR. Después se purifica con el mismo kit mencionado anteriormente.



**Figura 1:** Esquema a modo de ejemplo que muestra el acoplamiento de PCR 1, 2 y 3 para introducir a la mutación.

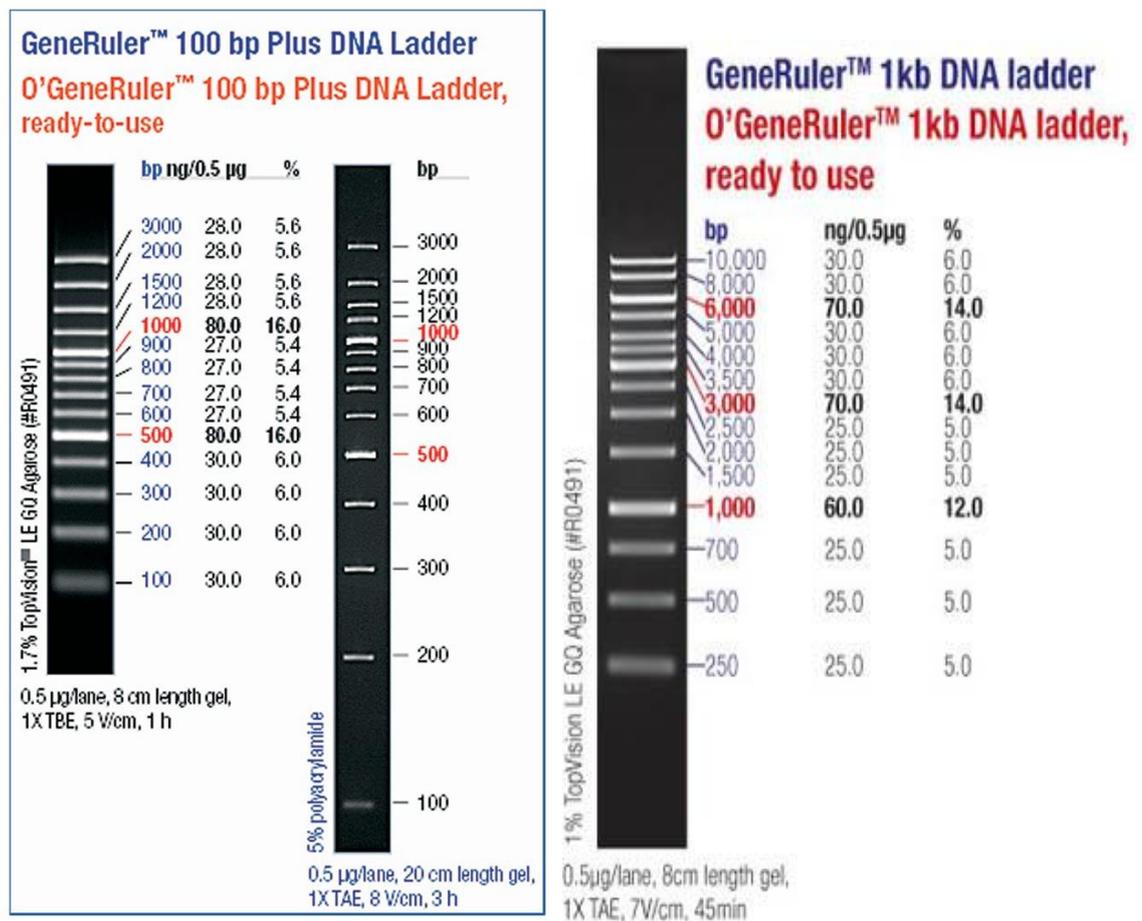
## 6.2.2 Purificación y extracción de fragmentos de PCR

### 6.2.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en ácidos nucleicos permite una observación directa de cada fragmento directamente en el gel, ya que, por medio de una tinción llamada GelRed hace visible al DNA o RNA mediante la emisión de luz ultravioleta. Cuando una

corriente eléctrica se aplica sobre el gel de agarosa el DNA tiene una carga negativa y migra hacia el ánodo (polo positivo). Éste es un método de separación de biomoléculas de acuerdo a su tamaño, permitiendo además su aislamiento cortando la zona de interés.

Como patrones de DNA se utilizaron los siguientes, GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder, como se muestra en la figura 2 y GeneRuler 1 kb DNA ladder como se muestra en la figura 3.



**Figura 2 y 3:** Patrón de DNA GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder y GeneRuler 1 kb DNA ladder respectivamente.

Electroforesis después de realizar PCR 1,2 y 3: Se prepara el gel de agarosa al 1% en buffer TAE al 1x y se carga el estándar que se prepara con: 1 µl de buffer de carga, 4,4 µl de H<sub>2</sub>O, 0,6 µl de patrón 100 bp DNA ladder. 6 µl Volumen total. La muestra se prepara con: 5 µl del PCR ,1 µl de buffer de carga, 6 µl Volumen total. Se corre el gel a 90 Volts, por 30 minutos. Visualizar DNA bajo luz UV.

Posteriormente para extraer el DNA del gel en este caso se procede a realizar un corte de las bandas de DNA y posteriormente una purificación del gel mediante Kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup. Micro Kit.

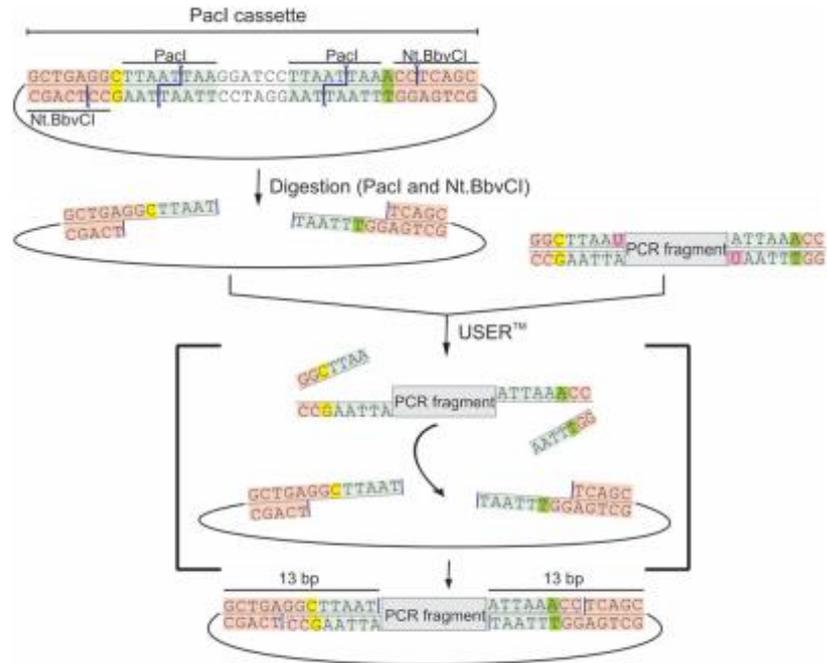
#### 6.2.2.2 Protocolo de extracción de DNA en gel

Kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup. Micro Kit: Se corta el fragmento de DNA del gel (200 mg) y se agrega a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se añade 200 µl de Buffer de extracción, esto se incuba a 55°C por 10 min agitando por inversión cada un minuto hasta que el gel de agarosa esté completamente disuelto en el tubo, añadir etanol (96-100%), transferir la mezcla a una micro columna de purificación de DNA presente en el kit, centrifugar la columna por 60 segundos a 14000 g, añadir 200 µl de buffer de pre lavado y centrifugar por 60 segundos a 14000 g, posteriormente descartar el sobrenadante, añadir 700 µl de buffer de lavado y centrifugar por 60 segundos a 14000 g, posteriormente descartar el sobrenadante y repetir el paso anterior, centrifugar la micro columna un minuto adicional a 14000 g para remover completamente los residuos del buffer de lavado, transferir la purificación de DNA de la micro columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml y añadir 10 µl de H<sub>2</sub>O precalentada a 50°C, incubar 2 minutos a 50°C y finalmente centrifugar por 60 segundos a 14000 g, descartar la columna de purificación y guardar el DNA purificado a -20°C. El DNA purificado es el que se usará posteriormente en la reacción de clonación USER.

### 6.2.3 Reacción de USER

Insertaremos los fragmentos de PCR amplificados anteriormente mediante las PCR mencionadas en la sección 6.2.1.1. o 6.2.1.2. que posteriormente fueron purificados según procedimientos descritos en la sección 6.2.2. en el vector pNB1u mediante el método de clonación USER.

Descripción general de la técnica de clonación de USER según la figura 4: Se digiere el vector pNB1u con PacI y Nt.BbvCI para eliminar el cassette PacI que contiene el vector USER que se muestra en la esquina superior izquierda de la imagen para generar 8 voladizos monocables de 8 nt. Un fragmento de PCR amplificado con primers (StSUT1-USER-fwd + StSUT1-USER-rev) que contienen uracilo compatibles por la polimerasa PfuTurbo Cx. Una mezcla de enzimas van eliminando uracilos, color rosa en la imagen y se genera extremos romos en el fragmento PCR. La mezcla se incuba 20 min a 37°C y 20 minutos a 25°C, y el producto hibridado está listo para ser transformado en *E. coli* sin ligadura previa. Los sitios de reconocimiento Nt.BbvCI están marcados en color canela en la imagen, los sitios de reconocimiento de PacI están marcados en azul claro. Amarillo y verde las diferencias base única entre los voladizos generados, que son responsables de la inserción direccional del fragmento de PCR.



**Figura 4:** Esquema de la reacción USER.

Para la reacción de clonación USER se necesita el fragmento de PCR purificado (PCR 6.2.1.1 o 6.2.1.2 y purificación 6.2.2) y el vector pNB1u cortado con dos enzimas de restricción específicas: PacI y NtBbvCI.

Protocolo reacción de USER:

- 1 - 3,5 µl fragmento PCR
  - 0,5 µl vector pNB1u (PacI-NtBbvCI.)
  - 0,5 µl buffer Cut Smart
  - 0,5 µl enzima USER
-

completar con H<sub>2</sub>O hasta 5 µl.

La reacción se incuba 20 minutos a 37°C y 20 minutos a 25°C. Después se transforma 2,5 µl a células competentes con el siguiente protocolo de transformación.

#### 6.2.4 Transformación por el método de golpe de calor.

La transformación se utiliza para que las células bacterianas (*E. coli*) pueden hacerse competentes introduciendo DNA del ambiente por un procedimiento llamado el método de golpe de calor haciendo cambios repentinos de temperatura.

Protocolo transformación:

Mezclar 2,5 µl de la reacción con células competentes DH5α (*E. coli*)

Dejar 30 minutos de incubación en hielo

Inmediatamente dejar 30 segundos a 42°C

Dejar de vuelta en el hielo por 5 minutos

Añadir 950 µl de medio de cultivo para bacterias SOC

Agitar 1 hora a 37°C (250 rpm)

Distribuir 100µl en placa LB con antibiótico ampicilina

Incubar la placa durante toda la noche a 37°C

### 6.2.5 Colony PCR

Para la identificación de colonias que contienen el plásmido correcto se realiza PCR a colonias elegidas al azar. Se usan primers que se unen en el vector y en el gen para verificar la presencia de ambos fragmentos (fragmento PCR y vector).

Protocolo Colony PCR:

12,32  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$

Con una punta de micropipeta pinchar la colonia seleccionada de la placa

Con la misma punta con la colonia pinchar una placa nueva de agar LB más ampicilina

Agregar la colonia al tubo

1  $\mu\text{l}$  primer 1 (M13-fwd)

1  $\mu\text{l}$  primer 2 (StSUT1-D308G-rev)

0,4  $\mu\text{l}$  dNTP's

1,2  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$

4  $\mu\text{l}$  Buffer

0,08  $\mu\text{l}$  Pfu enzima polimerasa.

---

20  $\mu\text{l}$  Volumen final.

Se ponen los tubos en el termociclador según el programa descrito en la tabla 2 y se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% para ver que colonias fueron

transformadas. La electroforesis, el estándar y las muestras se preparan igual que en el punto 6.2.2.1.

#### 6.2.6 Amplificación de colonias

Con las colonias que identificamos con plásmidos correctos (gen + vector) según electroforesis en gel de agarosa, se inocula un medio LB líquido con ampicilina. Se incuba durante la noche a 37°C agitando. Al día siguiente se realiza extracción de plásmido con el kit Gene JET Plasmid. Miniprep Kit.

##### 6.2.6.1 Protocolo de extracción del plasmido del medio LB líquido

kit Gene JET Plasmid. Miniprep Kit: Traspasar medio líquido de LB con ampicilina a tubos eppendorf de 1,5 ml, centrifugar los tubos a 6800 g por 2 minutos y descartar el sobrenadante, re suspender el pelet en 250 µl de solución de re suspensión, añadir 250 µl de solución de lisis y mezclar por inversión, añadir 350 µl de solución de neutralización y mezclar por inversión, centrifugar por 5 minutos a 14000 g, transferir el sobrenadante a una columna GeneJET inserta en el kit, centrifugar por 60 segundos a 14000 g y descartar el sobrenadante, añadir 500 µl de solución de lavado, centrifugar por 60 segundos a 14000 g, repetir el paso anterior, descartar el sobrenadante y centrifugar por 60 segundos a 14000 g para remover los residuos de la solución de lavado, transferir la columna GeneJET a un tubo eppendorf de 1,5 ml, añadir 50 µl de H<sub>2</sub>O precalentada a 50°C, incubar 2 minutos a 50°C y centrifugar por dos minutos a 14000 g. Descartar la columna, medir la concentración (Nanodrop) y guardar el plásmido DNA a -20°C.

### 6.2.7 Ensayo de restricción

El DNA purificado se prepara con una enzima de restricción, estas enzimas reconocen y cortan las moléculas de DNA por secuencias nucleotídicas específicas, en este caso se utiliza la enzima Sac I que corta el DNA dejando una secuencia de 3,8 kb y otra de 835 pb pudiéndose así comprobar si obtenemos el patrón de bandas esperadas mediante electroforesis.

Protocolo ensayo de restricción:

0,5 µl DNA

0,5 µl enzima Sac I

1,5 µl Buffer Cut Smast

12,5 µl H<sub>2</sub>O

---

15 µl de volumen total.

Dejar a 37°C por 1 hora.

Realizar electroforesis en gel de agarosa al 1% al igual que en la sección descrita en 6.2.2.1 con la única modificación en la preparación de la muestra ya que en este caso se prepara con 15µl del resultado del ensayo de restricción y 3 µl del buffer de carga. 18 µl en total que se cargan en el pocillo.

### 6.2.8 Secuenciación

Se envían los plásmidos purificados a secuenciar a la empresa Macrogen para confirmar que la secuencia del gen StSUT1 esta correcta y que no se hayan introducido mutaciones al azar.

## 6.3 *Generación de cRNA mediante transcripción in vitro*

### 6.3.1 Linealización de plasmido

Para poder observar el DNA mediante electroforesis en el gel de agarosa es necesario añadir una enzima de restricción, en este caso NotI que corta el plásmido justo después de la cola poli A para así generar RNA que solo contiene la parte del gen y no del vector.

Protocolo Linealización de plásmidos: Digestión de 3 µg de ADN plasmídico StSUT1 con enzima NotI al menos 3 horas a 37°C, añadir más enzima de restricción a la reacción después de la mitad del tiempo. Realizar electroforesis gel de prueba descrito anteriormente en el punto 6.2.2.1 pero la muestra se prepara con 0,5 µl de la reacción. Si al momento de visualizar el gel se observa el patrón de bandas esperadas, se hace la purificación en gel con elución en 10µl de H<sub>2</sub>O precalentada a 50 ° C, medir la

concentración (Nanodrop) del eluado. Finalmente realizar electroforesis en gel descrito en el punto 6.2.2.1. pero con 0.5-1µl de la muestra (depende de la concentración después de la purificación) y si se observa el patrón de bandas esperadas se comienza la reacción de transcripción in vitro descrita a continuación.

### 6.3.2 Transcripción in vitro

Se utiliza este método para sintetizar RNA a partir del plásmido linealizado generado en punto 6.3.1.

Protocolo Transcripción in vitro (kit mMESSAGE mMACHINE): Descongelar agua libre de nucleasas, T7 2x NTP / ARCA y 10x T7 Tampón de reacción, almacenar los ribonucleótidos (T7 2x NTP / ARCA) en hielo, almacenar 10x T7 Buffer de reacción a temperatura ambiente, ensamblar la reacción de transcripción a temperatura ambiente y en este orden:

x µl (1 µg) de ADN (máx. 6 µl)

6-x µl de H<sub>2</sub>O sin nucleasas

10 µl de T7 2x NTP / ARCA

2 µl de tampón de reacción T7 10x

2 µl de mezcla de enzimas T7

---

20 µl volumen total

Incubar 2h a 37 ° C

Agregar 1µl de TURBO DNasa

Mezclar bien e incubar por 15min a 37 ° C.

### 6.3.3 Purificación RNA

Protocolo purificación de RNA: kit MEGAclean. Para la recuperación de RNA, precalentar agua sin nucleasas del kit mMACHINE a 50 ° C, añadir a la muestra de ARN 79 µl de solución de elución, se mezcla suavemente pipeteando, se añade 350 µl de solución aglutinante, se mezcla suavemente pipeteando, añadir 250 µl de etanol al 100%, se mezcla suavemente pipeteando, colocar el cartucho de filtro en el tubo de recogida suministrado por el kit, transferir el volumen al cartucho de filtro, centrifugar 1 min a 12.000 rpm, descartar el sobrenadante, lavar el filtro, añadir 500 µl de solución de lavado al filtro, centrifugar 1 min a 12.000 rpm y desechar el sobrenadante, repetir el paso de lavado, centrifugar la columna vacía durante 2 minutos más, eluir el RNA del filtro, colocar el cartucho de filtro en un nuevo tubo de recogida proporcionado por el kit, añadir 30 µl de agua sin nucleasas precalentada a 50 ° C del kit mMACHINE en el centro del filtro, cerrar la tapa del tubo e incubar a 65 ° C durante 10 min, centrifugar 2 min a 12.000 rpm, a partir de ahora, mantener el RNA en el hielo en todo momento (descongelar en hielo, si está congelado), medir la concentración de 1 µl con Nanodrop, guardar este 1 µl en un tubo de PCR y utilizarlo para ejecutar un gel de RNA.

### 6.3.4 Gel de RNA

Protocolo: Preparar gel de agarosa al 1% en TAE 1x (como para gel de ADN), añadir 1% de cloro, incubar 5 minutos a temperatura ambiente y mezclar

ocasionalmente, disolver la agarosa en microondas, enfriar y verter el gel en el molde.  
Realizar electroforesis.

### 6.3.5 Electroforesis RNA

Preparación del patrón de RNA (RiboRuler): 2,5 µl del patrón RNA, 2,5 µl Buffer de carga (del kit del patrón) y 1 µl buffer de carga (con GelRed). Preparación de la muestra: 1µl RNA, 1µl de buffer de carga (con GelRed) y 4 µl de H<sub>2</sub>O. se incuba la muestra más el patrón durante 10 minutos a 70°C. Se cargan las muestras en el gel y se corre a 70 volt durante 45-60 minutos. Visualizar RNA bajo luz UV.

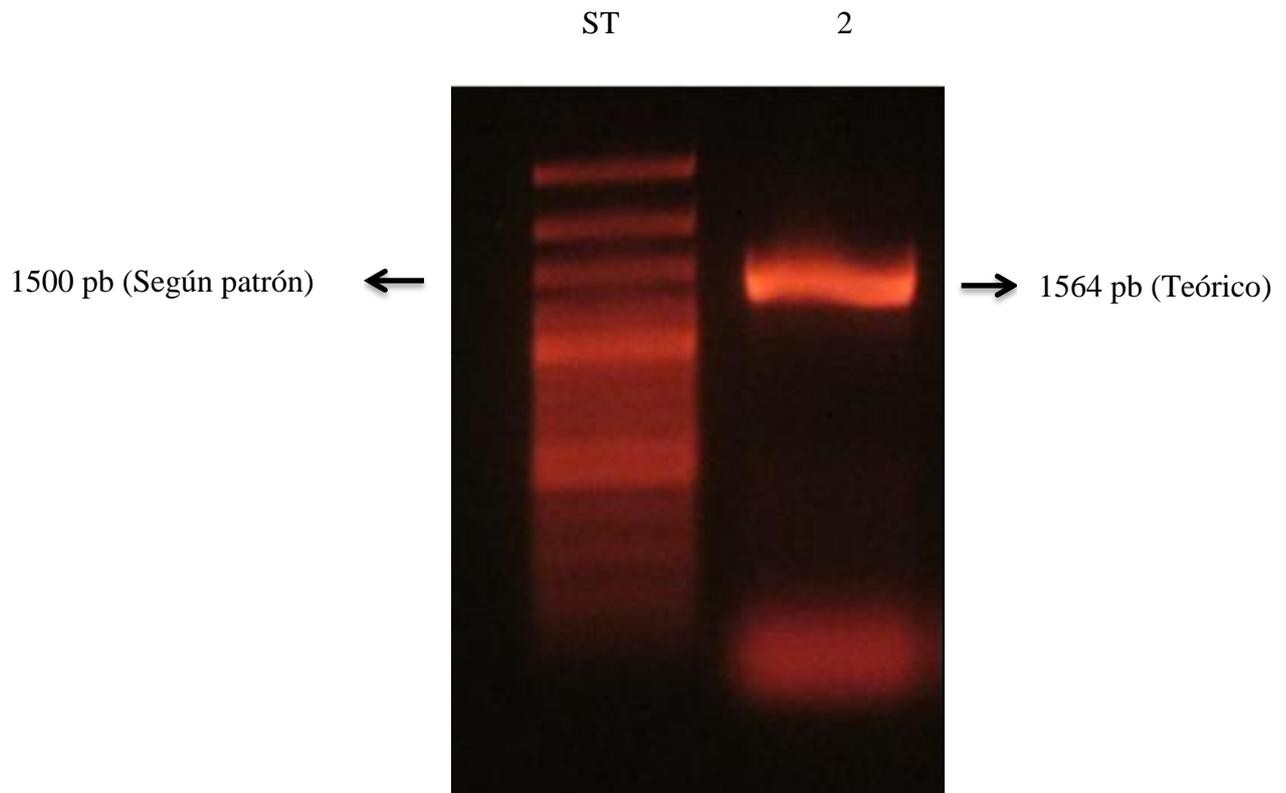
## 7. RESULTADOS

### *7.1 Generación de mutantes mediante el método de PCR*

Se obtuvieron los distintos templados para generar los mutantes mediante amplificaciones de DNA por el método de PCR y posterior análisis electroforético en gel de agarosa al 1%. Las muestras de PCR se preparan con el templado de DNA, los dos primers, dNTPs, buffer, cloruro de magnesio y la enzima polimerasa. Solo se mostrarán algunos ejemplos de la generación de los mutantes.

7.1.1 Ejemplo: PCR II (Numeración según la tabla 3) en donde solo hay que cambiar el vector por lo que solo se realiza la PCR3.

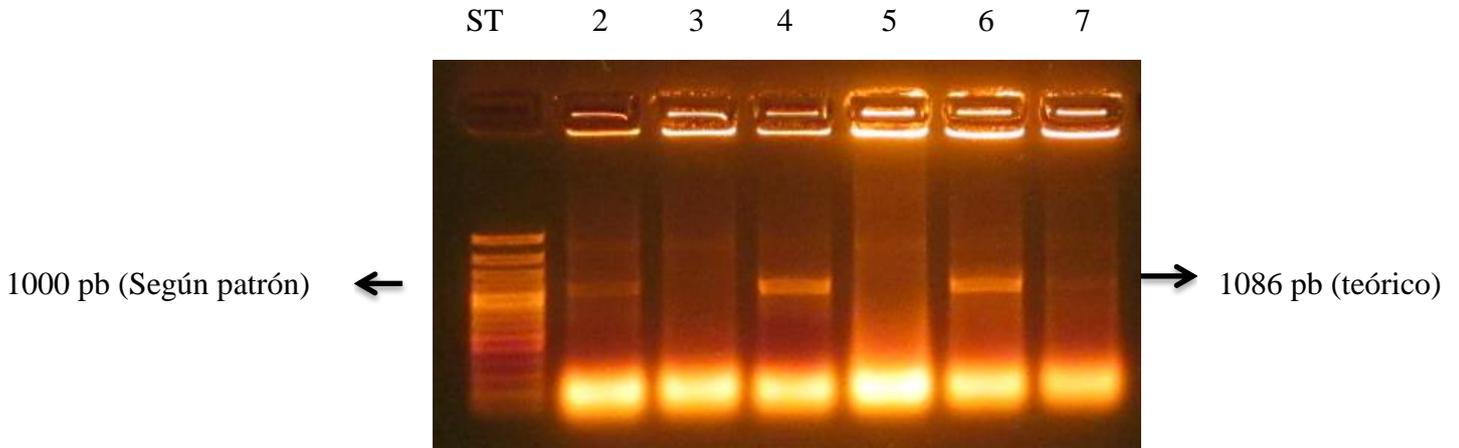
PCR con partidores USER (StSUT1-USER-fwd + StSUT1-USER-rev) para amplificar StSUT1. La prueba del éxito de la PCR se encuentra mas adelante en la figura 5.



**Figura 5:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% y buffer TAE al 1X de la PCR II. ST: Estándar de 100 pb DNA, 2: fragmento PCR II. Se observa la presencia de una banda que correspondería a 1564 pb que se espera teóricamente por lo que dicha banda se encuentra según el patrón de DNA que se muestra en la figura 2 al lado de la tercera banda (desde arriba hacia abajo) que correspondería a la de 1500 pb.

Después de la obtención de la banda esperada (PCR exitoso 6.2.1.1), se procede a realizar la purificación (6.2.2), posteriormente la reacción USER (6.2.3) y luego la transformación con el resultado de la obtención de varias colonias en una placa de medio LB con ampicilina a las que al azar se les realiza colony PCR (6.2.4).

Colony PCR de colonias elegidas aleatoriamente.

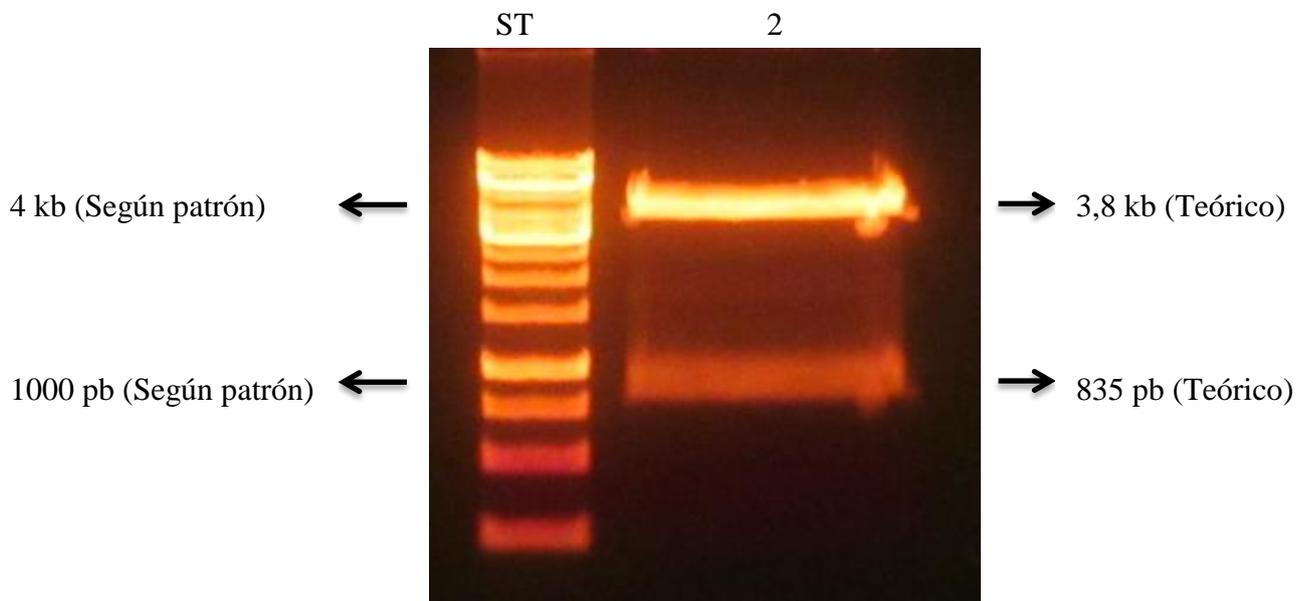


**Figura 6:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% y buffer TAE al 1X de la colony PCR Xc. ST: Estándar de 100 pb; se puede observar en pocillos 4 y 6 la presencia de bandas de DNA que correspondería a las colonias que dieron positivas al contener el fragmento de DNA esperado ya que se espera una banda de 1086 pb teóricamente y dichas bandas según el patrón de DNA en la figura 2 se encuentran más o menos en el cuarta banda (desde arriba hacia abajo) que correspondería a un valor de 1000 pb, las demás colonias se encuentran negativas ya que no contienen el fragmento de DNA por lo que no hay aparición de bandas.

Una vez seleccionadas las colonias que contienen el plásmido, se inocula el medio líquido de LB con ampicilina y luego del crecimiento bacteriano se realiza la extracción de plásmido con el kit. (6.2.6.1 y 6.2.6.2)

## Ensayo de restricción con la enzima Sac I

Se sabe que la enzima SacI corta el DNA de forma específica se utiliza como método de control para saber si los procedimientos anteriores se han realizado de forma correcta visualizando dos bandas de 3,8 kb y 835 pb respectivamente como se muestra en la figura 7.

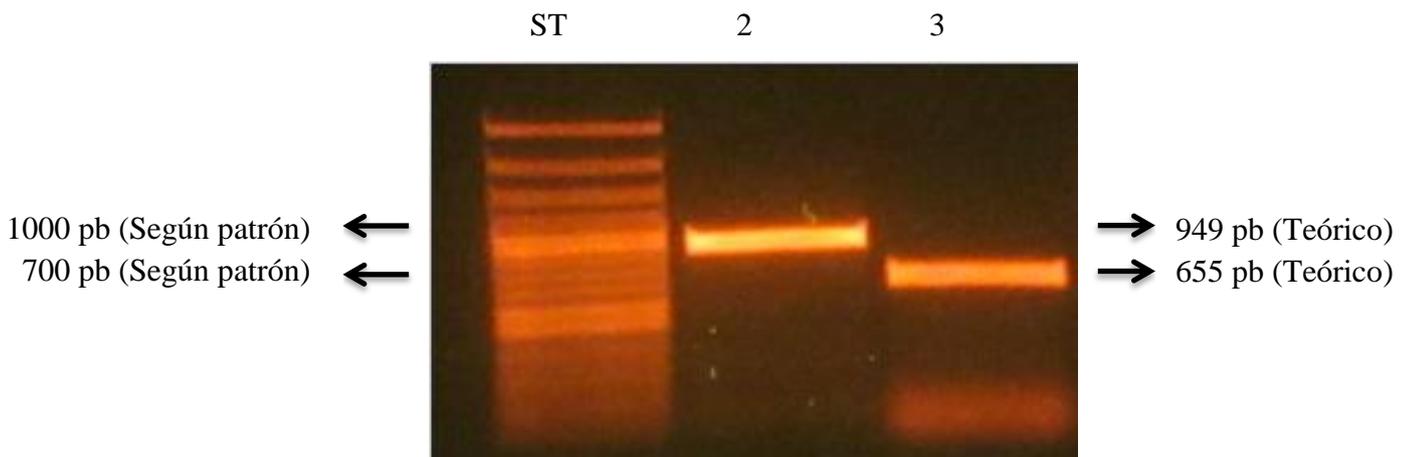


**Figura 7:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE al 1X del ensayo de restricción con enzima SacI. ST: Estándar de 1 kb, 2: se observa la presencia de las dos bandas que corresponderían a las esperadas ya que esta enzima corta el DNA por lo que se debería apreciar la presencia de dos bandas en el gel de agarosa como se observa en la imagen una de 3,8 kb y otra de 835 pb teóricamente y se compara con la figura 3 del patrón de DNA se puede ver que la primera banda se acerca a la quinta banda (de arriba hacia abajo) y corresponde a 4000 kb y la segunda banda se acerca a la onceava banda (de arriba hacia abajo) que corresponde a la de 1000 pb aproximadamente.

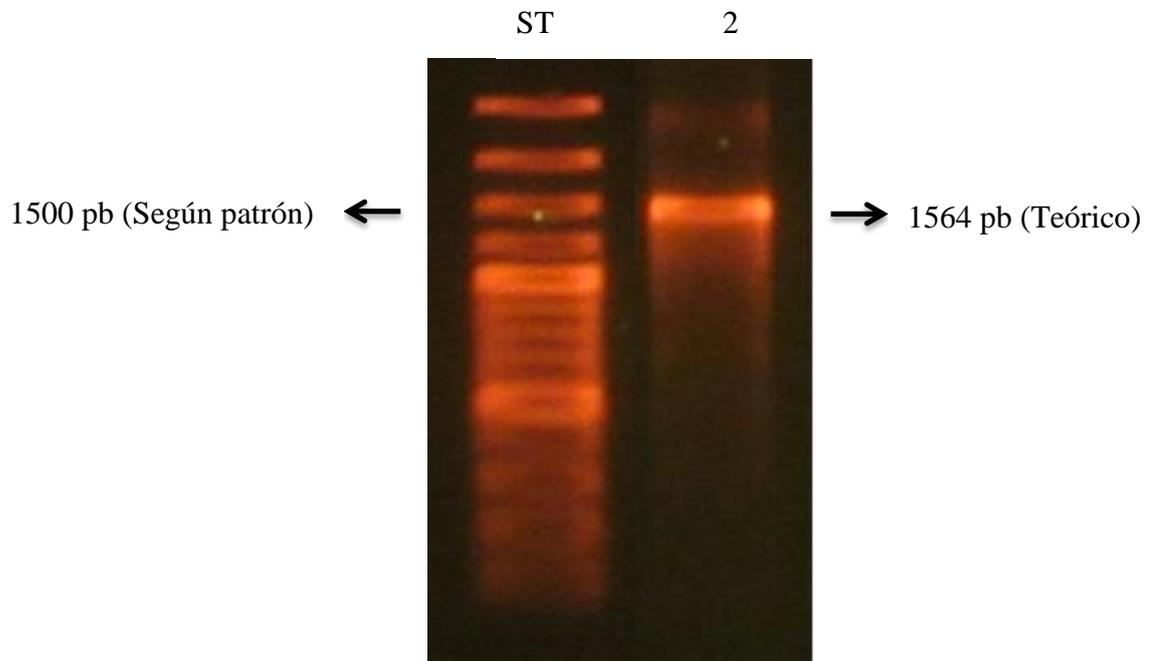
7.1.2 Ejemplo: PCR IXa, IXb y IXc (Numeración según la tabla 3) en donde hay que introducir la mutación y cambiar el vector, por lo que se deben realizar las PCR1, 2 y 3.

Se ocuparon los templados y primers descritos en la tabla 3 correspondientes a la PCR IXa (PCR1), IXb (PCR2) y IXc (PCR3), que se observan en las imágenes a) y b) respectivamente.

a) PCR IXa y IXb



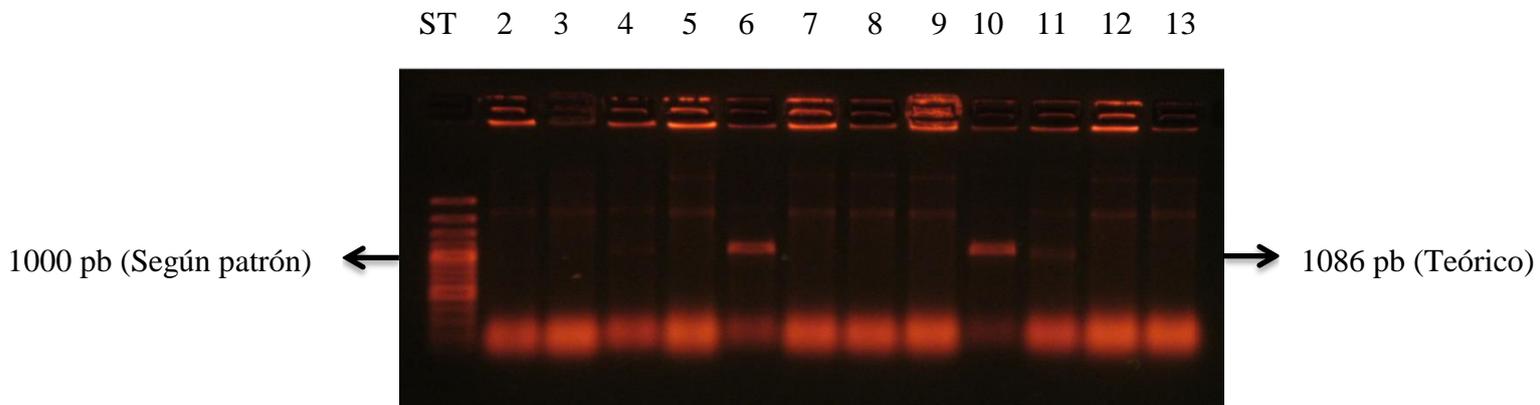
b) PCR IXc



**Figura 8 a) y b):** Electroforesis en gel de agarosa al 1% y buffer TAE al 1X de la PCR IXa, IXb (Figura a) y IXc (figura b). Figura a) ST: Estándar de DNA 100 pb, 2: PCR IXa, 3: PCR IXb. Se observa la presencia de bandas que corresponderían a las correctas ya que teóricamente IXa tiene un tamaño de 949 pb que comparada con la figura 2 del patrón de DNA se observa que se encuentra al lado de la quinta banda (de arriba hacia abajo) de 1000 pb, por otro lado IXb tiene un valor teórico de 655 pb y en comparación con el patrón de DNA se puede decir que está cercana a la octava banda (de arriba hacia abajo) de 700 pb. Figura b) ST: Estándar de DNA 100 pb, 2: PCR IXc. IXc tiene un valor teórico de 1564 pb se puede decir según la figura 2 del patrón de DNA que se encuentra cercana a la tercera banda que correspondería a la de 1500 pb.

Después de la obtención de la banda esperada (PCR 1,2 3 exitosos 6.2.1.2), se procede a realizar la purificación (6.2.2), posteriormente la reacción USER (6.2.3) y luego la transformación con el resultado de la obtención de varias colonias en una placa de medio LB con ampicilina a las que al azar se les realiza colony PCR (6.2.4) como se muestra en la figura 9.

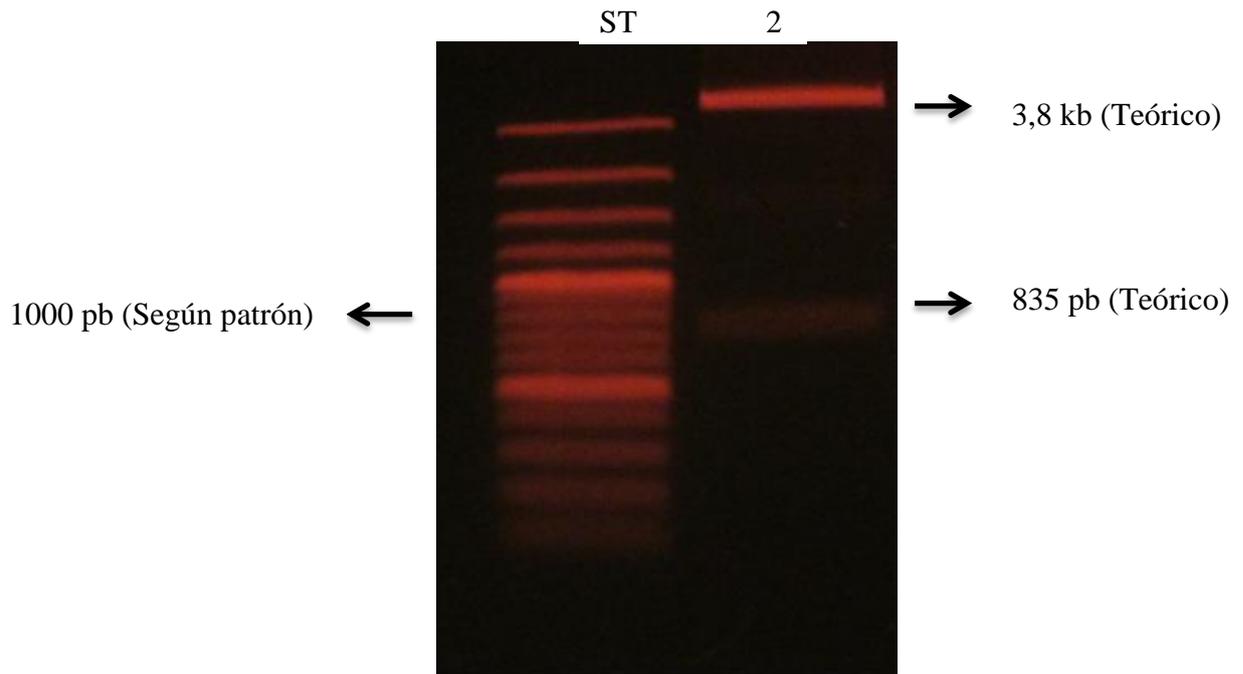
## Colony PCR de colonias elegidas aleatoriamente



**Figura 9:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% y buffer TAE al 1X de la colony PCR Xc. ST: Estándar de 100 pb DNA; se puede observar en pocillos 6 y 10 la presencia de bandas de DNA que correspondería a colonias que incorporaron el fragmento de DNA esperado, ya que se espera una banda de 1086 pb teóricamente y dichas bandas según el patrón de DNA en la figura 2 se encuentran más o menos en el cuarta banda (de arriba hacia abajo) que correspondería a un valor de 1000 pb, las demás colonias están negativas ya que no contienen el fragmento de DNA por lo que no hay aparición de bandas.

## Ensayo de restricción con la enzima Sac I

Se sabe que la enzima SacI corta el DNA de forma específica se utiliza como método de control para saber si los procedimientos anteriores se han realizado de forma correcta visualizando dos bandas de 3,8 kb y 835 pb respectivamente como se muestra en la figura 10.



**Figura 10:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE al 1X del ensayo de restricción con enzima SacI. ST: Estándar de 1 kb, 2: se observa la presencia de las dos bandas que corresponderían a las esperadas ya que esta enzima corta el DNA por lo que se debería apreciar la presencia de dos bandas en el gel de agarosa como se observa en la imagen una de 3,8 kb y otra de 835 pb teóricamente y se compara con la figura 3 del patrón de DNA, no se ve la primera banda pero debería corresponder a 4000 kb y la segunda se encuentra cercana a la onceava banda de 1000 pb aproximadamente.

Finalmente resultaron 9 mutantes de un total de 10 que en el ensayo de restricción salieron positivos y que se mandaron a secuenciar conteniendo de forma correcta la mutación, el otro mutante por razones desconocidas no contenía la mutación correcta.

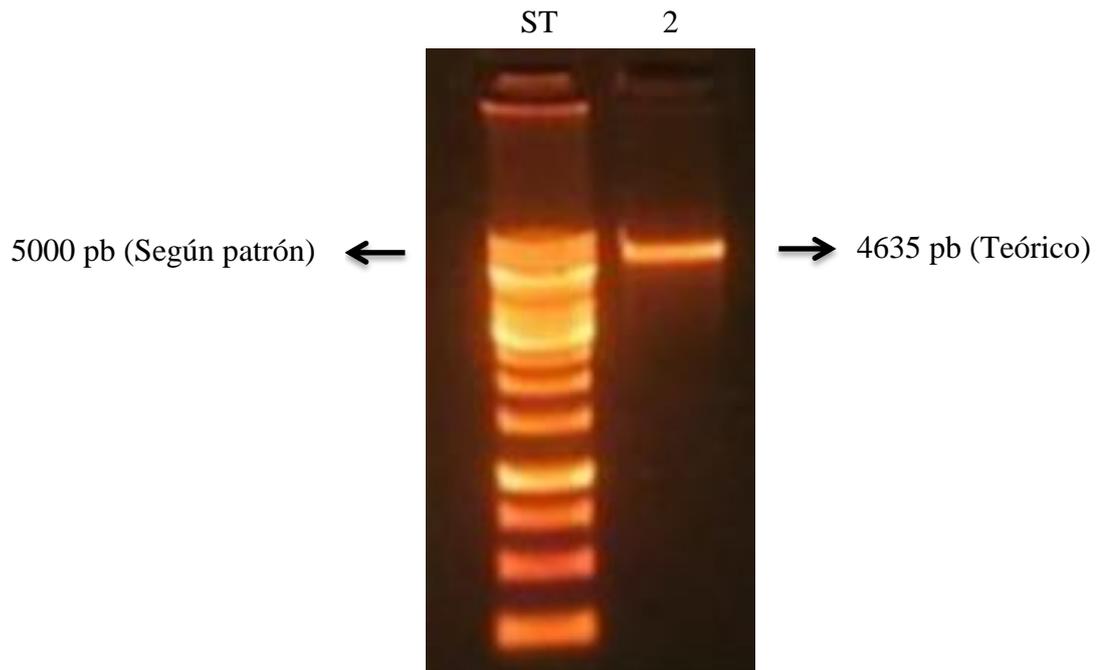
## *7.2 Generación de cRNA mediante transcripción in vitro*

Según lo descrito anteriormente en la parte de materiales y métodos (6.3), se procedió a hacer la generación de cRNA de StSUT1.

### 7.2.1 Ejemplo: StSUT1 (wild-type)

Con una enzima de restricción se debe cambiar la forma de la molécula de DNA desde una forma circular a una lineal para poder visualizar la banda completamente en el gel como lo muestra la figura 11. (6.3.2)

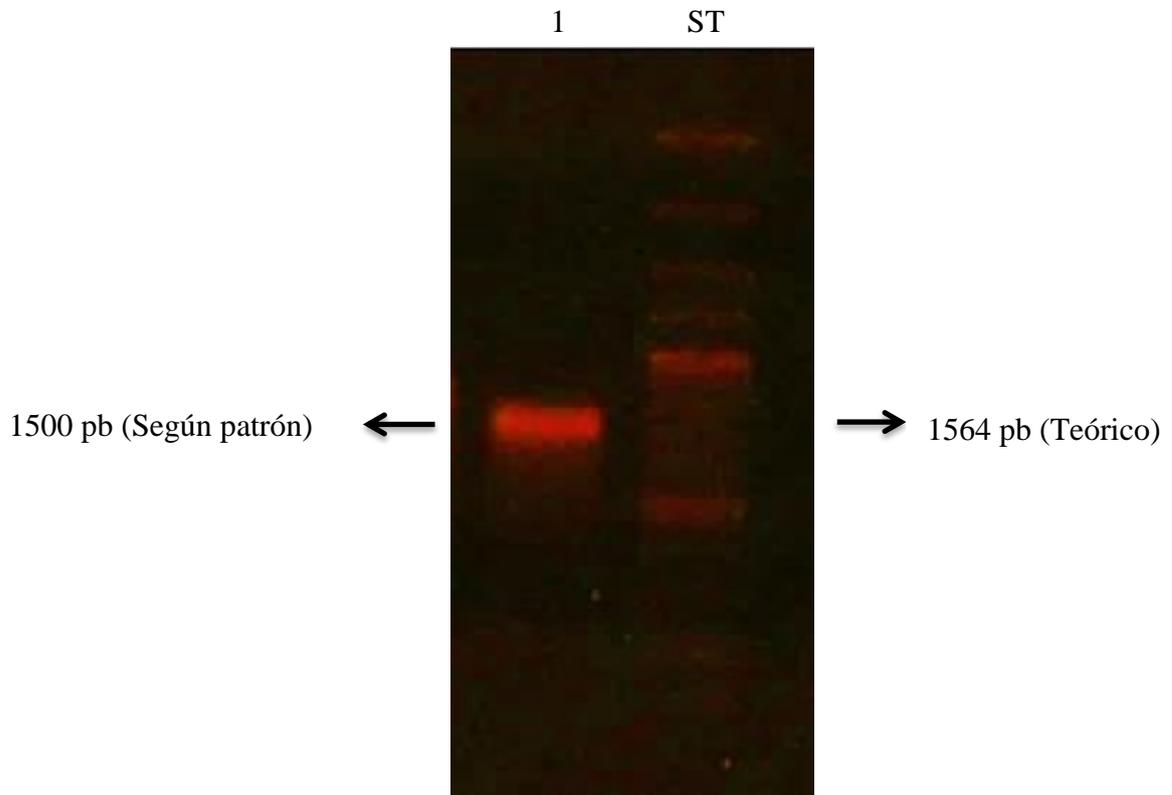
#### Linealización del ADN StSUT1 con la enzima NotI



**Figura11:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE al 1X de la linealización de StSUT1. ST: Estándar de 100 pb DNA, 2: se observa la presencia de banda de 4635 pb teóricamente y según patrón de DNA en la figura 3 se observa que se encuentra cercana a la cuarta banda que corresponde a 5000 pb.

Después de la realización de la transcripción in vitro (6.3.2) y de la purificación del RNA (6.3.3) se realiza el gel para RNA y la electroforesis correspondiente a la figura 12. (6.3.4 y 6.3.5)

Gel ARN StSUT1



**Figura12:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% con Cloro y buffer TAE al 1X del ARN de StSUT1. 1: se observa la presencia una banda de 1564 pb teóricamente que comparada con el patrón de RNA de 1 Kb (igual que el de DNA de 1 kb) se puede decir que se encuentra cercana a la décima banda que corresponde a 1500 pb. ST: Estándar de RNA 1 kb.

## 8. DISCUSIÓN

Este trabajo está basado en estudios anteriores que han indicado que la mayoría de los transportadores de sacarosa de plantas caracterizados han mostrado tener una actividad de transporte de sacarosa óptima a pH 4.5 y al reducir el pH bajo este óptimo se conduce a capacidades de transporte reducidas como lo demuestra la captación respectiva de sacarosa empleando los experimentos en *Arabidopsis* con AtSUT4, zanahoria con DcSUT1, DcSUT2 o AtSUT2. Sin embargo, en el caso de StSUT1 de papa y ZmSUT1 de maíz, se logra una enorme estimulación en la actividad de transporte mediante una mayor acidificación del medio, tanto en levadura como en ovocitos de *Xenopus*.

Estos estudios se realizaron en el transportador de sacarosa OsSUT1 de plantas de arroz mediante mutaciones que se realizaron en el motivo DTD que se conserva en la mayoría de los transportadores de sacarosa y contiene cinco aminoácidos cargados dentro de la extensión de la membrana de este transportador y son esenciales para la actividad de transportador ya que están involucrados en el aumento de la actividad en condiciones extremas de pH. Entre ellos se encuentran dos residuos de ácido aspártico en la posición Asp177 y Asp331 que se mostró esencial para la absorción de sacarosa y translocación de protones, respectivamente. El reemplazo de Asp310 en StSUT1 (correspondiente a Asp331 en OsSUT1) se hizo por glicina (G), asparagina (N) o ácido glutámico (E) de la región DTD en donde se ha basado este trabajo.

Para probar si las cargas negativas de estos dos residuos de ácido aspártico dentro del motivo diacídico desempeñan un papel en la regulación de StSUT1 en la acidificación o adición de divalente de cationes, se reemplazaron Asp308 y Asp310 por

residuos de glicina, asparagina y ácido glutámico y fue medida la actividad de captación de sacarosa en la levadura. En primer lugar, se midió la estabilidad y el comportamiento de focalización de este en donde la proteína mutante D308T309D310 / G308T309G310 se probó en levadura y en plantas revelando finalmente la capacidad de la proteína mutada para ser dirigida eficientemente a la membrana plasmática de células vegetales, además las proteínas mutantes StSUT1 con reemplazo del motivo DTD reveló que los dos aminoácidos cargados mutados no afectan la estabilidad de la proteína en la levadura. Curiosamente, la acidificación del medio a pH 3, donde el tipo StSUT1 wild-type mostró la actividad más alta, en cambio la proteína mutada con la acidificación del medio de captación a pH 3.0 se abolió completamente la capacidad de absorción de sacarosa de las proteínas mutantes GTG, NTN y ETE. Se observó también que cuando el motivo DTD se reemplazó por NTN o ETE la captación de sacarosa a pH 5.0 aumenta considerablemente en ambas formas mutadas de StSUT1 en comparación al wild-type. Lo que ocurre con la mutante GTG es que a pH 5.0 baja la captación de sacarosa en comparación al wild-type.

Estas investigaciones han confirmado que todos los transportadores SUT se expresaron con éxito en levadura y muestran que la actividad del transportador StSUT1 de forma salvaje es óptima en pH ácido 3 no así en los mutantes NTN y ETE que se observa una actividad optima a pH 5, Sin embargo, datos más precisos sobre la cinética y estequiometría del cotransporte solo se pueden obtener mediante la expresión de ovocitos ya que la levadura no es adecuada para mediciones electrofisiológicas.<sup>(10)</sup>

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se quería demostrar que con mutaciones simples de los residuos D308 y D310 del motivo DTD de StSUT1 se contribuye en diferente magnitud al aumento en la capacidad de transporte bajo distintas condiciones de pH mediante técnicas de electrofisiología a lo que por motivos de tiempo solo se llegó a concretar la generación de mutantes y la generación de RNA de los mutantes, quedando listos para ser utilizados ovocitos y posterior análisis con electrofisiología.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten inferir la importancia de utilizar técnicas seguras para obtener los mutantes. Es importante destacar que en este trabajo se pudieron estandarizar las técnicas de PCR ya que es necesario ir evaluando las concentraciones de los reactivos como el programa y las temperaturas del termociclador, además ir asegurándose de mantener un ambiente y reactivos limpios como por ejemplo el agua, para que así no exista algún tipo de contaminación que pueda afectar la técnica. También ir realizando las distintas electroforesis en gel de agarosa como método de verificación y control para saber si se está trabajando correctamente mediante el patrón de bandas esperadas, al igual que la realización de ensayos de restricción ya que también vendría siendo un paso importante en el control de las técnicas antes de mandar a secuenciar los mutantes.

## 9. CONCLUSIÓN

El presente trabajo demuestra la generación de nueve mutantes de un total de diez del transportador de sacarosa StSUT1 ya sea cambiando solamente el vector o generando las distintas mutaciones.

Posteriormente se convirtieron en cRNA listos para introducirlos en ovocitos de *Xenopus laevis* y posterior análisis del transportador wild-type versus las mutantes mediante electrofisiología.

Éste trabajo se ha convertido en el punto de partida para realizar más investigaciones y profundizar en el comportamiento y análisis de dicho transportador en distintas condiciones de pH mediante electrofisiología ya que en estudios anteriores solo se tiene referencia de comportamientos del transportador en levadura.

## 10. REFERENCIAS

1. Liesche J. Sucrose transporters and plasmodesmal regulation in passive phloem loading. *J Integr Plant Biol.* 2017;59(5):311-21.
2. Lemoine R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *ELSEVIER.* 1 May 2000;1465(1-2):246-62.
3. Sauer N. - Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. - *Plant Transporters and Channels.* (- 12):- 2309.
4. Yuanyuan L, Xin Y, Ya Y, Chuntao W, Yongping Y, - Molecular cloning and expression analysis of turnip (*Brassica rapa* var. *rapa*) sucrose transporter gene family. (- 3):- 123.
5. Dietmar G. - Plant Sucrose Transporters from a Biophysical Point of View. (- 3):- 395.
6. Truernit E. *Plant physiology: The importance of sucrose transporters.* Elsevier. 6 March 2001;11(5):R169-R71.
7. Krügel U, He H-X, Gier K, Reins J, Chincins KI, Grimm B, et al. The Potato Sucrose Transporter StSUT1 Interacts with a DRM-Associated Protein Disulfide Isomerase. Elsevier. January 2012;5(1):43-62.
8. Delrot S, Atanassova R, Maurousset L. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2000;1465(1):281-306.
9. Doidy J. The *Medicago truncatula* sucrose transporter family : sugar transport from plant source leaves towards the arbuscular mycorrhizal fungus. *Agricultural sciences.* Université de Bourgogne, 2012. English. ffNNT : 2012DIJOS020ff.
10. Krügel U, Wiederhold E, Pustogowa J, Hackel A, Grimm B, Kühn C. Site directed mutagenesis of StSUT1 reveals target amino acids of regulation and stability. *Biochimie.* 2013;95(11):2132-44.
11. Sun Y, Lin Z, Reinders A, Ward J M. Functionally Important Amino Acids in Rice Sucrose Transporter OsSUT1. *Biochemistry* 2012; (51):3284–3291.