

Análisis de la expresión del gen *KLHIS4* mediante genes reporteros en condiciones de limitación de nitrógeno

Análise da expresión do xene *KLHIS4* mediante xenes reporteiros en condicións de limitación de nitróxeno

Analysis of *KLHIS4* gene expression by reporter genes in nitrogen limitation conditions

Trabajo Final de Grado en Biología. Curso 2014-2015
Fecha de defensa: 29/06/2015

Belén Moreira Cribeiro

Tutora: Dra. Mónica Lamas Maceiras
Facultad de Ciencias - Departamento de Biología Celular y Molecular.



INDICE

RESUMEN/ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	
1. Diferencias metabólicas entre <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i>	5
2. Regulación de la expresión génica.....	5
3. Regulación transcripcional de <i>HIS4</i> en <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i>	6
OBJETIVO	8
MATERIALES y MÉTODOS	
1. Cepa.....	8
2. Plásmidos.....	8
3. Medios de cultivo.....	8
4. Transformación de levaduras.....	9
5. Ensayo de actividad de la β -galactosidasa	
5.1-Condiciónes de cultivo.....	10
5.2-Disrupción celular.....	11
5.3-Medida de actividad de la β -galactosidasa.....	11
5.4-Determinación de la concentración proteica del extracto.....	11
5.5-Análisis estadísticos.....	11
RESULTADOS	
1. Ensayo de actividad de la β -galactosidasa.....	12
2. Cálculo de la concentración de proteínas.....	13
3. Análisis estadístico.....	14
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIÓN/ CONCLUSION	16
BIBLIOGRAFÍA	17
RECURSOS WEB	18
ANEXO I	19
ANEXO II	20
ABREVIATURAS	21

RESUMEN

La regulación transcripcional de *HIS4* en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* presenta importantes diferencias; entre ellas, la regulación en condiciones de limitación de nitrógeno, relacionada con el factor **Nit2**. En el promotor del gen de *K. lactis*, *KIHIS4*, se han identificado dos secuencias de unión para dicho factor; por lo que, en el presente trabajo se analiza si estas secuencias son responsables de la regulación del gen, en estas condiciones. Para ello, se realizó la transformación de la cepa MW190-9B de *K. lactis* con vectores con diferentes longitudes del promotor de *KIHIS4*, fusionados al gen reportero *lacZ* de *E. coli*. Se determinó la actividad específica de la β -galactosidasa y se analizó estadísticamente, si existían diferencias significativas según el medio de cultivo y según la longitud de los promotores del gen *KIHIS4*.

Los resultados obtenidos mostraron, en condiciones de limitación de nitrógeno, un aumento de la actividad β -galactosidasa en la cepa **C2** (que presenta un plásmido con un promotor de 447 pb, que incluye las dos secuencias *cis* para **Nit2**); comparándolo con la cepa **C1** (que no posee la secuencia para **Nit2** en posición -339). Por lo que la secuencia *cis* para **Nit2** en posición -339 podría ser la responsable en la regulación de *KIHIS4*. Aunque, debido a los datos obtenidos, no se puede descartar la participación de otras secuencias.

Palabras clave: *KIHIS4*, **Nit2**, *Kluyveromyces lactis*, β -galactosidasa, limitación de nitrógeno.

ABSTRACT

The transcriptional regulation of *HIS4* in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* has important differences; between them, the regulation in conditions of nitrogen limitation, related to the **Nit2** factor. Two consensus sequences have been identified in the promoter of *K. lactis* gene, *KIHIS4*. So in this work, it is analyzed if these sequences are responsible of the gene regulation in these conditions. For this reason, the *K. lactis* strain MW190-9B was transformed with two vectors including different *HIS4* promoter length of *K. lactis*, fused to the reporter gene *lacZ* of *E. coli*. The specific activity of the β -galactosidase was measured and analyzed statistically to determinate if significant differences exist according to the culture medium and/or the *KIHIS4* promoters length.

The results showed, in conditions of nitrogen limitation, an increment of the β -galactosidase activity in **C2** strain (it has a plasmid with a 447 pb promoter; which includes both **Nit2** *cis* sequences); comparing it with **C1** strain (without the **Nit2** sequence located in position -339). So the **Nit2** *cis* sequence in position -339 could be the responsible for the regulation of *KIHIS4*. However, the participation of other sequences could not be refused.

Key words: *KIHIS4*, **Nit2**, *Kluyveromyces lactis*, β -galactosidase, nitrogen limitation.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son organismos eucariotas unicelulares, que constituyen los microorganismos de elección en muchas industrias biotecnológicas. Ya que combinan algunas ventajas típicas de procariotas como: su alta velocidad de crecimiento, facilidad de manipulación, alta producción de biomasa y utilización en sustratos de bajo coste; con ventajas propias de ser un organismo eucariota como: los mecanismos de expresión genética, las modificaciones postraduccionales y la secreción de proteínas (Walker, 1998).

Saccharomyces cerevisiae es el organismo modelo en levaduras, su metabolismo está muy estudiado y ha sido el primer eucariota en conocerse su genoma completo, en 1996. A nivel industrial, *S. cerevisiae* también adquiere gran importancia, ya que se emplea en la producción de bebidas alcohólicas, pan... Sin embargo, actualmente existen otras levaduras “no convencionales” que presentan un gran interés para la biotecnología, como *Kluyveromyces lactis*. Su capacidad de producir *lactosa permeasa* y *β -galactosidasa* (enzimas encargadas del transporte de la lactosa y la hidrólisis del enlace O-glucosídico entre la glucosa y la galactosa, respectivamente) la ha convertido en un microorganismo de gran importancia en la industria láctica, para el tratamiento del suero de leche, evitándose problemas medioambientales y obteniendo glucosa y galactosa para la elaboración de distintos productos (González-Siso, 1996). Esta propiedad de metabolizar la lactosa, es inexistente en *S. cerevisiae* debido a que carece de estas enzimas.

Tanto *S. cerevisiae* como *K. lactis* son consideradas organismos GRAS (*Generally Recognized As Safe*), por la FDA (*American Food and Drug Administration*), por lo que pueden utilizarse en la industria alimentaria, sin riesgos para la salud humana.

1. Diferencias metabólicas entre *S. cerevisiae* y *K. lactis*

Estas dos levaduras presentan metabolismo respiro-fermentativo. Pero *K. lactis* es una levadura cuyo metabolismo es, preferentemente, respirativo. Sin embargo, en condiciones de baja concentración de oxígeno (hipoxia) puede tener metabolismo fermentativo; por lo que, no es una levadura aerobia estricta. *S. cerevisiae* presenta un metabolismo fermentador y se caracteriza por ser *Cabtree* positiva, es decir, tiene la capacidad de mantener el metabolismo fermentativo en condiciones aerobias (Alexander *et al.*, 1990). Mientras que la preferencia respiratoria de *K. lactis*, permite que se considere *Cabtree* negativa. (González-Siso *et al.*, 1996).

Además *K. lactis*, es capaz de utilizar como fuente de carbono sustratos no fermentables como: etanol, glicerol o lactato (Rodicio *et al.*, 2013) y muestra el efecto *Kluyver*, es decir, incapacidad de fermentar otro glúcido distinto de glucosa en condiciones anaerobias, crece en azúcares como la galactosa, sacarosa o maltosa en condiciones aerobias; pero no, en condiciones de limitación de oxígeno.

2. Regulación de la expresión génica

La expresión de los genes de un organismo eucariota se regula a distintos niveles: pretranscripcional, transcripcional, postranscripcional, transporte del ARN, traduccional y postraduccionales. Dentro de estos puntos de regulación, el proceso de la transcripción se regula a través de la interacción de determinadas secuencias localizadas en los promotores de los genes, con factores, generalmente de origen proteico; es decir, las secuencias *cis* y los factores *trans*.

En la regulación de los genes de clase II (los transcritos por la ARNpol-II, que sintetiza los ARNm que darán lugar a la síntesis de proteínas) intervienen:

1. Las secuencias (o elementos) *cis* II: regiones de ADN que regulan la transcripción génica y se dividen en:
 - **Basales:** definen el punto de inicio de la transcripción y son imprescindibles para que esta comience, son la caja TATA, y las secuencias Inr, MTE y DPE.

- **Proximales:** determinan la frecuencia con la que se produce el inicio de la transcripción, las más frecuentes la caja CAAT y la caja GC.
 - **Distales:** actúan en respuesta a distintas señales, pueden ser potenciadoras aumentando la velocidad de inicio de la transcripción UAS (*Upstream Activating Sequences*), o inhibidoras URS (*Upstream Represor Sequences*), disminuyendo dicha velocidad. Además, se han localizado ciertas secuencias denominadas aisladoras, que impiden que la acción de las dos anteriores se extienda, formando lazos en la secuencia de la cromatina (Herráez, 2012).
2. Los factores *trans* II: elementos proteicos que interaccionan con los elementos *cis* anteriores; lo que determina su clasificación.
- **Basales o generales:** interaccionan con secuencias *cis* basales. Son el factor TFIID, formado por TBP que interacciona con la caja TATA y varias moléculas de TAFII que pueden interaccionar con las secuencias Inr, MTE y DPE y el factor TFIIH (helicasa y quinasa).
 - **Proximales:** interaccionan con secuencias *cis* proximales como CTF, que interacciona con la caja CAAT o SP1, con la caja GC.
 - **Distales o inducibles:** aumentan (activador) o disminuyen (inhibidor) la velocidad del inicio de la transcripción.
 - **Coactivadores:** proteínas o complejos proteicos que no interaccionan directamente con una secuencia *cis*, sino que sirven de puente entre distintos factores *trans* o de éstos con la ARNpol II. Por ejemplo el complejo mediador conecta distintos factores activadores con la secuencia CTD de la ARNpol-II. También pueden ayudar a eliminar la represión transcripcional ejercida por las histonas (Herráez, 2012).

Una transcripción eficaz requiere la acción combinada y regulada de diversas secuencias *cis* y factores *trans* (Guarente, 1995), los cuales actúan mediante diversos mecanismos: actuando sobre la ARNpol-II, causando cambios en la estructura de la cromatina o por competición entre activadores/represores mediante la unión a sitios coincidentes en el ADN, que no pueden ser ocupados de forma simultánea (McKnight *et al.*, 1992; Struhl, 1993).

3. Regulación transcripcional de *HIS4* en *S. cerevisiae* y *K. lactis*

En *S. cerevisiae* el gen *HIS4* codifica para una proteína de 795 aminoácidos, una enzima multifuncional con tres funciones situadas en tres dominios distintos:

HIS4A (1-229) con actividad fosforribosil-AMP-ciclohidrolasa, *HIS4B* (230-313) fosforribosil-ATP-pirofosfohidrolasa y *HIS4C* (314-799) histidinol deshidrogenasa, que intervienen en el segundo, tercero y los dos últimos pasos de la ruta de biosíntesis del aminoácido L-histidina (Donahue *et al.*, 1982).

Este gen presenta dos vías principales de regulación transcripcional: el **Control General**, que se produce en condiciones de limitación de aminoácidos donde **Gcn4** actúa como activador transcripcional (Hinnebusch, 1992); y el **Control Basal** en el que los factores **Bas1** y **Bas2** regulan la transcripción si no existe tal limitación (Arndt *et al.*, 1987; Pinson *et al.*, 2000). Además en la transcripción de *HIS4* intervienen otros factores como, **Rap1**, que es necesario para una transcripción eficiente a través del Control Basal y el Control General. Su función está relacionada con cambios en la topología del ADN que permiten una mayor accesibilidad de los diversos factores transcripcionales a sus respectivas secuencias de unión. (Buchman *et al.*, 1988; Devlin *et al.*, 1991).

El gen *KIHIS4* fue clonado por complementación de la mutación *his-539* de la cepa MCY1093 de *S. cerevisiae*. Codifica para una proteína de 796 aminoácidos y por análisis de *Northern blot* se comprobó que el gen se transcribe en un único ARNm de 2,5 kb, similar en tamaño al de *S. cerevisiae* y concordante con el tamaño de un mensajero que codifica para una proteína multifuncional. Comparando la secuencia de aminoácidos de las proteínas de ambas levaduras, *K. lactis* y *S. cerevisiae*, se observa un 69% de identidad y un 81% de similitud, la mayor identidad corresponde a la región *HIS4C* responsable de la actividad histidinol deshidrogenasa (Freire-Picos *et al.*, 1998).

Al analizar la secuencia de los promotores de ambos genes se apreciaron importantes diferencias. En el promotor de *KIHIS4* se localizaron: sólo tres secuencias consenso de unión para **Gen4**, (en vez de las cinco descritas en el promotor *S. cerevisiae*), dos secuencias para la unión de **Nit2** (en *HIS4* se localizó sólo una) y ninguna para **Rap1** (Figura 1) (Lamas-Maceiras *et al.*, 1999). Además, los experimentos de *Northern blot* realizados determinaron que *KIHIS4* no está regulado ni en condiciones de limitación de aminoácidos, control general (en el que interviene **Gen4**); ni en condiciones basales, en ausencia de dicha limitación (factores **Bas1** y **Bas2**) al contrario de lo descrito en *S. cerevisiae* (Lamas-Maceiras *et al.*, 1999). Todo esto indica que las secuencias de unión para **Gen4**, **Bas1** y **Bas2**, localizadas en el promotor de *KIHIS4* no son funcionales.

A)

```

-447                               CTGCAGGGCGCTCGTTGTGGTGTG
-423 CTCTTTGCGAAAAAGACGGTCATGAATCAGTAGATTGCCATACGACGACAAATTCCTTTT
-363 AGAGTCAAAAATTCGTCCCTTTTAAATATCCAATTGTTGTACTTGCATCATATATATAGCATA
-303 CTTAGCGCATCATCATATAATGAATCATCTTATAATGAATTACCTACAGTCCATCAATCG
-243 CATCCGGACTTCTTCTTCGAGTTTTCATTGGCTTCTCTGTGTTTTTTTCATCATAATGACT
-183 CATGTAATTCAGTGCATATGCGTTCATCATATTTTACAAATCCACTGCAAAAATCAAGC
-123 CTCCTGGTATATAAAAATGAAAATATGAAATATGAAAAAATAAGTTAGTCGTCATGC
-63  TTTATCAAATTTTCGTTACATTCAGGACTGTCCACCTAAGACAAGAAGTCATAAAGCCCCA
-3   GAA  ATG
  
```

B)

```

-265 GCAGTCGAACTGACTCTAATAGTACTCCGGTAAATTAGTTAATTAATTTGCTAAACCCAT
-205 GCACAGTACTCACGTTTTTTTATCAGTCATTCGATATAGAAGGTAAGAAAAGGATATGA
-145 CTATGAACAGTAGTATACTGTGTATATAATAGATATGGAACGTTATATTCACCTCCGATG
-85  TGTGTTGTACATACATAAAAATATCATAGCACAACTGCGCTGTGTAATAGTAATACAATA
-25  GTTTACAAAATTTTTTTCTGAATA  ATG
  
```

Figura 1: A) Secuencia del promotor de *KIHIS4*. B) Secuencia del promotor de *HIS4* de *S. cerevisiae*. En ambos casos se señalan las secuencias *cis* encontradas para los factores: —**Gen4**, —**Bas1**, —**Bas2**, —**Rap1**, —**Nit2** y — la caja TATA (Modificado de Lamas-Maceiras *et al.*, 1999).

Por otro lado, los experimentos de *Northern blot* en condiciones de limitación de nitrógeno, limitación de fosfato, presencia de metales pesados y estrés oxidativo, mostraron claramente, regulación de la expresión de *KIHIS4* en todas estas condiciones (Figura 2) mientras que el gen de *S. cerevisiae* solo mostró regulación transcripcional en condiciones de limitación de nitrógeno y de fosfato. En el caso de la limitación de nitrógeno, la regulación es claramente contraria ya que los niveles de ARNm del gen de *K. lactis* aumentan mientras que en los del gen *S. cerevisiae* disminuyen (Lamas-Maceiras *et al.*, 1999).

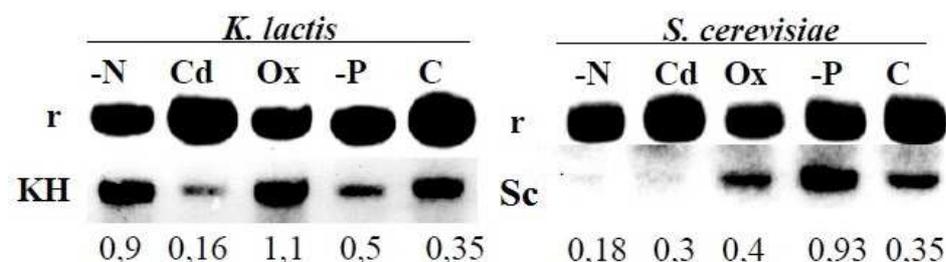


Figura 2: Análisis *Northern blot* mostrando la regulación de *KIHIS4* y *HIS4* bajo distintas condiciones. [C = medio control (CM: medio completo); Ox = CM + H₂O₂; Cd = CM + Cd; y -P = CM sin fosfato. -N=CM con limitación de nitrógeno. Sondas: r: ribosomal 25S; KH: *KIHIS4*; Sc:*HIS4*]. (Tomado de Lamas-Maceiras *et al.*, 1999).

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es determinar si la regulación de la transcripción del gen *HIS4* de *Kluyveromyces lactis*, en condiciones de limitación de nitrógeno (observada previamente mediante análisis de *Northern blot*), se debe a una o las dos secuencias *cis* para **Nit2**, localizadas en su promotor.

MATERIALES y MÉTODOS

1. Cepa

Para este trabajo se utilizó la cepa de *K. lactis* MW190-9B con el genotipo *MATa*, *lac4-8*, *uraA*, *Rag+* (Wésolowki-Louvel). Esta cepa es *lacZ⁻* y *ura⁻* lo que significa que no posee actividad β -galactosidasa, ni biosintetiza uracilo; lo que implica que necesariamente ha de obtenerlo del medio de cultivo.

2. Plásmidos

pXW1: plásmido para el análisis de promotores fusionados al gen *lacZ* de la β -galactosidasa. En el sitio de clonaje múltiple (m.c.s.) existen secuencias de corte únicas para las enzimas *Bam*HI, *Sal*I *Pst*I y *Hind*III. Como genes marcadores de selección posee: para bacterias, el gen de resistencia a la ampicilina, *Amp*, y para levaduras, el gen *URA3* (Chen *et al.*, 1992).

pML6: plásmido pXW1 en el que se ha clonado, (en el m.c.s. utilizando *Bam*HI y *Hind*III) el promotor completo de *KIHIS4* (447 pb), que contiene las dos secuencias *cis* para el factor **Nit2**.

pML11: plásmido pXW1 en el que se ha clonado (en el m.c.s., utilizando *Bam*HI y *Hind*III), un fragmento de 139 pb del promotor de *KIHIS4* que contiene una secuencia *cis* para el factor **Nit2** (Figura 3).

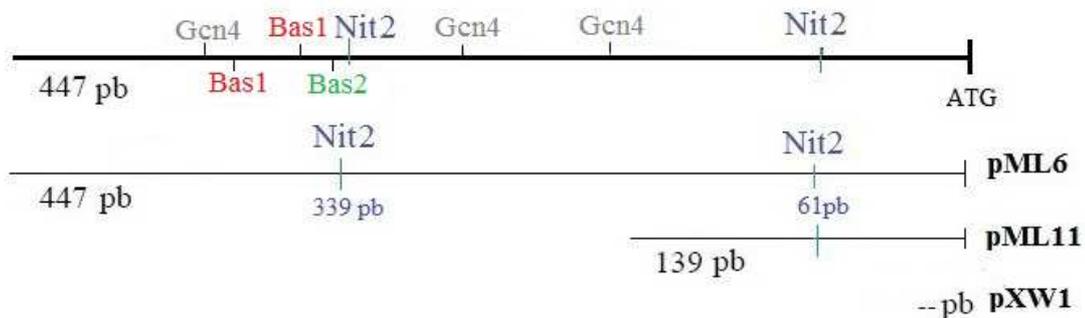


Figura 3: Esquema de los distintos tamaños del promotor de *KIHIS4* presentes en los plásmidos utilizados en este trabajo.

3. Medios de cultivo

YPD: Medio rico utilizado para el cultivo de levaduras, compuesto por:

- Bacto peptona 2%
- Extracto de levaduras 1%
- Dextrosa 2%

CM-URA: Medio sintético utilizado para el cultivo de levaduras, compuesto por:

- Dextrosa 2%
- 5 ml de la mezcla de aminoácidos 200x
- 40 mg/l Histidina, Leucina, Adenina y Tirosina
- 30 mg/l Triptófano
- 12 g/l Fenil-alanina
- Aminoácidos 200x
- 2 g/l Arginina

12 g/l Isoleucina
8 g/l Lisina
2 g/l Metionina
2 g/l Treonina

Se le añade a una concentración del 0,67 %, la mezcla **YNB**, que contiene:

50 ml/l Vitaminas 300x
100 ml/l Sales traza 150x
15 g/l Fosfato de potasio
7,5 g/l Sulfato de magnesio
1,5 g/l Cloruro sódico
1,5 g/l Cloruro cálcico
75 g/l Sulfato amónico

Vitaminas 300x
0,6 mg/l Biotina
120 mg/l Pantotenato cálcico
0,6 mg/l Ácido fólico
600 mg/l Inositol
120 mg/l Niacina
60 mg/l p-Aminobenzoico
120 mg/l Piridoxina
60 mg/l Riboflavina
120 mg/l Tiamina

Sales traza 150x
75 mg/l Ácido bórico
6 mg/l Sulfato cúprico
15 mg/l Ioduro potásico
30 mg/l Cloruro férrico
30 mg/l Molibdato sódico
60 mg/l Sulfato de Zinc

CM-URA-N: La composición es igual a la del medio **CM-URA**, pero en el **YNB** se ha eliminado el sulfato amónico.

Para la preparación de medios sólidos (placas), se adicionó 1,5% de Bacto-Agar al correspondiente medio líquido. Las soluciones se esterilizaron en un autoclave durante 20 min a 121°C y una atmósfera de presión.

4. Transformación de levaduras

La línea de *K. lactis* MW190-9B se transformó con los 3 plásmidos descritos anteriormente: pXW1, pML6 y pML11 utilizando el protocolo descrito por Chen y colaboradores (1992).

Una colonia aislada de MW190-9B crecida a 30°C durante 48 h en placas YPD, se inoculó en 5 ml de YPD líquido y se incubó a 30° C y con agitación de 250 r.p.m. durante 16-20 h. A continuación, se inocularon 10 ml de YPD líquido con la cantidad necesaria del pre-cultivo, para obtener una A_{600} de 0,15 y se dejó crecer a 30°C y con agitación de 250 r.p.m. hasta una A_{600} de 0,8 (5-6 h).

Para cada transformación se utilizaron 250 µl de cultivo de la cepa MW190-9B, que se centrifugaron 5 min a 5000 r.p.m., se eliminó el medio de cultivo y las células se resuspendieron en 100 µl de tampón T (acetato de litio 0,2 M, PEG 3500 al 40 % y DTT 100 mM). Se añadieron 5 µg de ADN de salmón sonicado, que facilita la transformación; y 1 µg de ADN plasmídico. Se incubaron a 45°C durante 30 min. Por último, se centrifugaron 5 min a 10000 r.p.m., se eliminó el tampón, las células se resuspendieron en 100 µl de medio CM-URA y se sembraron en placas con el mismo medio. Las placas

se incubaron 2-3 días a 30°C. Se realizaron cuatro transformaciones, una con cada uno de los plásmidos y otra sin ADN (control de contaminación). Todo el proceso se realizó en esterilidad.

Cepa transformada	C2	C1	C0
Plásmido	pML6	pML11	pXW1
Promotor <i>KIHIS4</i> (pb)	447	139	0

Tabla 1: Cepas transformadas, indicando que plásmidos y, por lo tanto, que tamaño de promotor de *KIHIS4* posee cada una.

5. Ensayo de actividad de la β -galactosidasa

5.1-Condicionales de cultivo

De cada cepa transformada, se eligieron 3 colonias aisladas, que fueron inoculadas por separado en 5 ml de CM-URA líquido (réplicas biológicas: A, B y C) y se incubaron a 30°C, con agitación de 250 r.p.m. durante 16-20 h. Posteriormente, se calculó la cantidad de pre-inóculo necesario para conseguir una A_{600} de 0,2 en 50 ml de cultivo en medio CM-URA y se incubaron a 30°C, con agitación de 250 r.p.m.

Al cabo de varias horas, cuando los cultivos alcanzaron una A_{600} de 0,5, se recogió de cada cultivo, 2 tubos de 20 ml; se centrifugaron durante 5 min a 5000 r.p.m. para precipitar las células. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado de un tubo, en 20 ml de **CM-URA**, medio de control; y el del otro, en 20 ml **CM-URA-N**, medio con limitación de nitrógeno. Estos cultivos se dejaron en agitación a 30°C, hasta que las cepas alcanzaron una A_{600} de 0,8-1. (Para asegurarnos de que las cepas se adaptasen a las condiciones del medio).

Al final se obtuvieron 18 cultivos: 3 cepas distintas (C2, C1, C0) por 3 réplicas biológicas (A, B, C) en 2 medios de cultivo CM-URA y CM-URA-N (*Figura 4*).

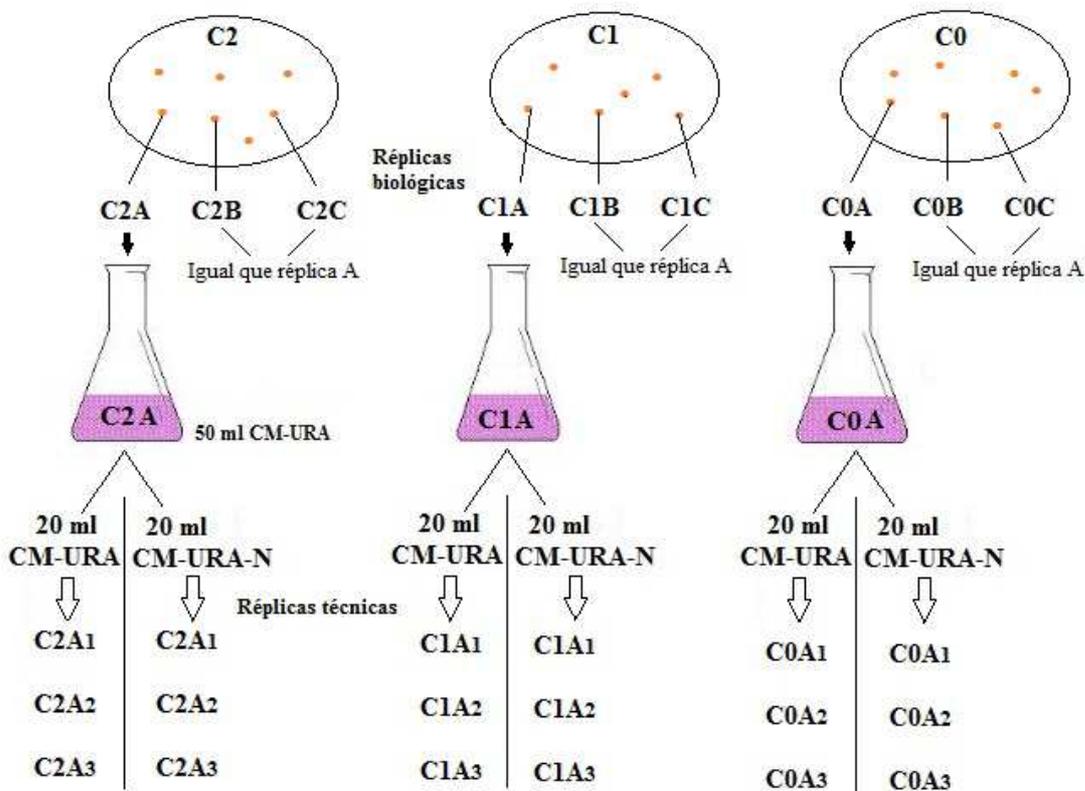


Figura 4: Esquema de los cultivos.

5.2-Disrupción celular

Los 18 cultivos se centrifugaron 5 min a 5000 r.p.m. y se resuspendieron, cada uno de ellos, en 2,5 ml de tampón Z (Na_2HPO_4 30mM; NaH_2PO_4 20 mM; KCl 10 mM; MgSO_4 1mM), al que se le añadieron 25 μl de PMSF y 10 μl de β -mercaptoetanol (inhibidores de proteasas).

Para la disrupción celular se aplicó un procedimiento mecánico, que consistía en añadirle a cada muestra *Glass beads* (lascas de vidrio con 400-500 micras de diámetro) y realizar 8 pulsos de agitación de 20s, en un vórtex, con intervalos de 20s en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 5 min, a 4°C y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos. Estos extractos proteicos se conservaron a -20°C.

5.3-Medida de actividad de la β -galactosidasa

El ensayo de β -galactosidasa se realizó mediante el método de Rose y Botstein (1983), que se basa en añadir el sustrato sintético ONPG al extracto proteico, donde la β -galactosidasa lo degrada y produce un compuesto coloreado, O-nitrofenol, cuya concentración se puede medir en el espectrofotómetro.

Para ello, se tomaron 150 μl de cada extracto proteico mezclado con 850 μl de tampón Z. Se incubaron 5 minutos a 28°C y se le añadieron 200 μl de ONPG (concentración inicial 4 mg/ml en tampón Z). Al observar el cambio de color, la reacción se paró añadiendo 500 μl de Na_2CO_3 y se anotó el tiempo de reacción. Finalmente, se midió la A_{420} .

La actividad específica, **AE** de la β -galactosidasa se expresa en nmoles/min/mg de proteína y se calcula con la siguiente fórmula:

$$A_{420} \times 1,7$$

$$0,0045 \times \text{concentración de proteína} \times \text{volumen del extracto ensayado} \times \text{tiempo}$$

Donde:

A_{420} es la densidad óptica del producto final de la reacción, el O-nitrofenol a 420 nm.

El factor 1,7 corrige el volumen de la reacción.

El factor 0,0045 es la densidad óptica de 1 nmol/ml de O-nitrofenol.

La concentración de proteína en mg/ml.

El volumen del extracto ensayado en ml.

El tiempo en min.

5.4-Determinación de la concentración proteica del extracto

Se realizó mediante el método de Bradford (1976) que consiste en hacer una recta de calibrado utilizando concentraciones crecientes, conocidas, de BSA mezclados con reactivo de Bradford (*Biorad*) diluido 1:5 en agua, hasta un volumen final de 1ml.

Por otro lado se utilizaron 10 μl de cada extracto proteico, mezclados con 990 μl de reactivo de Bradford diluido 1:5 en agua (volumen final de 1 ml). Todas las muestras, incluidas las de la recta de calibrado se incubaron a temperatura ambiente 10 min antes de medir su A_{595} ; utilizando como blanco Bradford diluido sin proteínas.

5.5-Análisis estadísticos

Se empleó el test estadístico *t* de *Student* mediante el programa *Excel* para realizar el estudio de si existen diferencias significativas en la regulación transcripcional teniendo en cuenta dos hipótesis:

1. Si hay diferencias debido a la limitación, o no, de nitrógeno en el medio de cultivo.
2. Si hay diferencias debido a la presencia o ausencia, de las secuencias *cis* para el factor **Nit2** del promotor *KlHIS4*.

Para poder utilizar el análisis estadístico *t* de *Student*, se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de *Fisher* (test F) con el programa *Excel* (*Anexo I*). Con el objetivo de realizar la prueba *t* suponiendo varianzas iguales o desiguales y dar mayor rigor a los resultados.

RESULTADOS

Para estudiar si la regulación de la transcripción del gen *KIHIS4*, en condiciones de limitación de nitrógeno, se debe a una o las dos secuencias *cis* para **Nit2** localizadas en su promotor, se comenzó transformando la cepa MW190-9B con los plásmidos pXW1, pML11 y pML6; obteniendo las cepas C0, C1 y C2, respectivamente. Posteriormente, utilizando 3 colonias independientes de cada cepa, se realizaron las medidas de actividad β -galactosidasa, según los protocolos descritos en el apartado de materiales y métodos.

1. Ensayo de actividad de la β -galactosidasa

Para calcular la AE de la β -galactosidasa, en cada uno de los cultivos, utilizando la fórmula descrita por Rose y Botstein, fue necesario determinar las variables: A₄₂₀, volumen de extracto ensayado, tiempo de ensayo y concentración de proteínas. Los valores obtenidos para las 3 primeras variables se resumen en la *tabla 2* donde: A, B y C indican réplicas biológicas (cultivos independientes) y 1, 2 y 3 réplicas técnicas (distintas medidas de un mismo cultivo).

CM-URA	A ₄₂₀	Volumen (ml)	ΔT (min)	CM-URA-N	A ₄₂₀	Volumen (ml)	ΔT (min)
C2A1	0,220	0,15	3	C2A1	0,255	0,15	2,2
C2A2	0,253	0,15	3,2	C2A2	0,280	0,15	2
C2A3	0,202	0,15	3,3	C2A3	0,311	0,15	2,2
C2B1	0,198	0,15	2,5	C2B1	0,380	0,15	2,5
C2B2	0,220	0,15	2,5	C2B2	0,321	0,15	2,2
C2B3	0,191	0,15	2,2	C2B3	0,352	0,15	2,4
C2C1	0,190	0,15	2,3	C2C1	0,298	0,15	2
C2C2	0,165	0,15	2,2	C2C2	0,285	0,15	1,8
C2C3	0,150	0,15	2,3	C2C3	0,278	0,15	1,8
C1A1	0,160	0,15	4,2	C1A1	0,100	0,15	3,5
C1A2	0,140	0,15	4	C1A2	0,120	0,15	3,5
C1A3	0,111	0,15	3,2	C1A3	0,121	0,15	3,2
C1B1	0,097	0,15	4	C1B1	0,101	0,15	3,2
C1B2	0,130	0,15	4,2	C1B2	0,082	0,15	3
C1B3	0,141	0,15	4,5	C1B3	0,092	0,15	3
C1C1	0,142	0,15	4,5	C1C1	0,112	0,15	3,2
C1C2	0,078	0,15	4	C1C2	0,125	0,15	3,5
C1C3	0,129	0,15	4,2	C1C3	0,098	0,15	3,2
C0A	0	0,15	5	C0A	0	0,15	5
C0B	0	0,15	5	C0B	0	0,15	5
C0C	0	0,15	5	C0C	0	0,15	5

Tabla 2: Datos de algunas variables para la determinación de la AE de la β -galactosidasa.

Tal y como esperábamos, la cepa C0 no mostró actividad enzimática (la A₄₂₀ es 0) debido a su transformación con el vector vacío, es decir, sin promotor de *KIHIS4* (control negativo del experimento). Por ello, en la tabla ya no hemos incluido los valores obtenidos de las correspondientes réplicas técnicas de esta cepa.

2. Cálculo de la concentración de proteínas

Para calcular la concentración proteica de cada extracto, se realizó una recta de calibrado con concentraciones crecientes de BSA y se calculó su ecuación con el programa *Excel* (*Gráfico 1*), mediante la cual se determinó la concentración de proteínas (mg/ml) de cada extracto. Los datos obtenidos se muestran en la *tabla 3*.

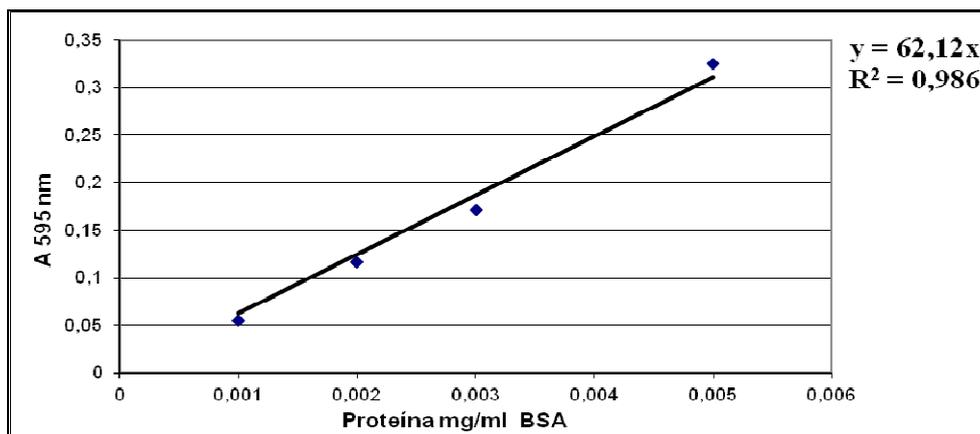


Gráfico 1: Recta de calibrado y su ecuación.

CM-URA	A ₅₉₅	Proteínas mg/ml	CM-URA-N	A ₅₉₅	Proteínas mg/ml
C2A	0,102	0,1642	C2A	0,085	0,1368
C2B	0,185	0,2978	C2B	0,101	0,1626
C2C	0,095	0,1529	C2C	0,152	0,2447
C1A	0,201	0,3236	C1A	0,152	0,2447
C1B	0,112	0,1803	C1B	0,112	0,1803
C1C	0,210	0,3381	C1C	0,114	0,1835
C0A	0,230	0,3703	C0A	0,260	0,4185
C0B	0,290	0,4668	C0B	0,196	0,3155
C0C	0,280	0,4507	C0C	0,159	0,2560

Tabla 3: Absorbancia y concentración proteica de cada muestra.

Con los valores de la *tabla 2* y los valores de concentración proteica de la *tabla 3* se calculó la actividad específica de la β -galactosidasa (*Tabla 4*) siguiendo la ecuación:

$$A_{420} \times 1,7$$

$$0,0045 \times \text{concentración de proteína} \times \text{volumen del extracto ensayado} \times \text{tiempo}$$

CM-URA	Proteínas (mg/ml)	AE (nM/min/mg)	CM-URA-N	Proteínas (mg/ml)	AE (nM/min/mg)
C2A1	0,1642	1124,8066	C2A1	0,1368	2133,4141
C2A2	0,1642	1212,6821	C2A2	0,1368	2576,8296
C2A3	0,1642	938,8881	C2A3	0,1368	2601,9286
C2B1	0,2978	669,7767	C2B1	0,1626	2354,5006
C2B2	0,2978	744,1964	C2B2	0,1626	2260,1516
C2B3	0,2978	734,202	C2B3	0,1626	2271,8866
C2C1	0,1529	1360,438	C2C1	0,2447	1533,6253
C2C2	0,1529	1235,1345	C2C2	0,2447	1629,6914
C2C3	0,1529	1074,0300	C2C3	0,2447	1589,6639
C1A1	0,3236	296,5181	C1A1	0,2447	294,0796
C1A2	0,3236	272,4260	C1A2	0,2447	352,8956
C1A3	0,3236	269,9936	C1A3	0,2447	389,196
C1B1	0,1803	338,7430	C1B1	0,1803	440,8897
C1B2	0,1803	432,3671	C1B2	0,1803	381,8134
C1B3	0,1803	437,6885	C1B3	0,1803	428,3760
C1C1	0,3381	235,0894	C1C1	0,1835	480,3301
C1C2	0,3381	145,2753	C1C2	0,1835	490,1327
C1C3	0,3381	228,8220	C1C3	0,1835	420,2888
C0A	0,3703	0	C0A	0,4185	0
C0B	0,4668	0	C0B	0,3155	0
C0C	0,4507	0	C0C	0,2560	0

Tabla 4: Actividad específica de la β -galactosidasa.

La concentración de proteínas es la misma en las réplicas técnicas (1, 2 y 3), ya que son medidas que corresponden al mismo extracto proteico.

3. Análisis estadístico

En primer lugar se calculó la media y la desviación típica de la actividad específica de β -galactosidasa de cada cepa: C2, C1 y C0, según el medio de cultivo en el que habían crecido: CM-URA (control) y CM-URA-N (Gráfico 2). Se observaron diferencias en la actividad específica, dependiendo del tamaño del promotor, y por lo tanto, de la presencia de una o las dos secuencias *cis* para *Nit2* y también dependiendo del medio de cultivo utilizado.

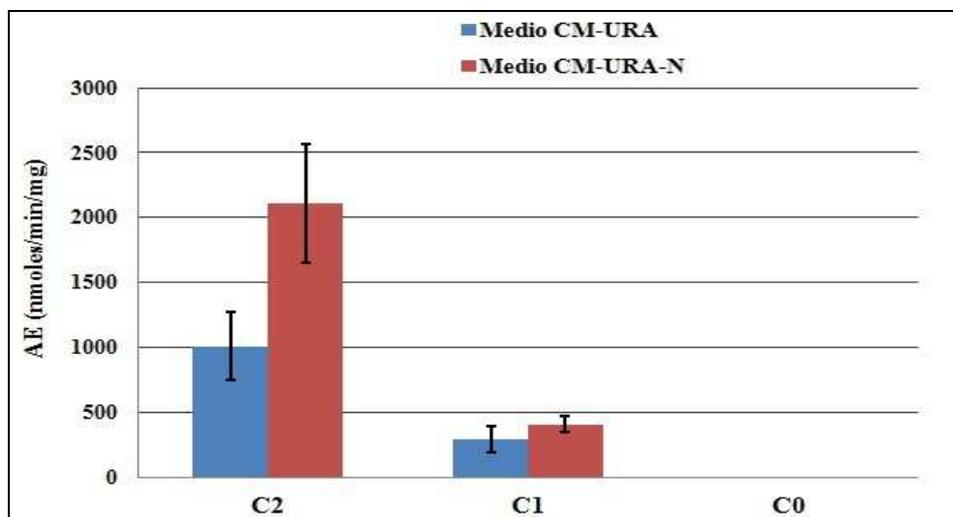


Gráfico 2: Actividad específica de β -galactosidasa.

El siguiente paso fue determinar si estas diferencias observadas eran significativas, por ello se realizó el análisis estadístico *t* de *Student*, teniendo en cuenta las hipótesis:

1. Si hay diferencias debido a la limitación o no, de nitrógeno en el medio de cultivo (*Tabla 5*).
2. Si hay diferencias debido a la presencia o ausencia de las secuencias *cis* para el factor **Nit2** en el promotor de *KIHIS4* (*Tabla 6*).

<i>Tabla 5a</i>	C2	C2-N
Media	1010,4616	2105,7435
Varianza	69300,1321	208938,8454
Observaciones	3	3
Grados de libertad	4	
Estadístico <i>t</i>	-3,5965	
P(T<=t) dos colas	0,0228	SI signific.
Valor crítico de <i>t</i> (2 colas)	2,7764	Rechazo Ho

<i>Tabla 5b</i>	C1	C1-N
Media	295,2137	408,6669
Varianza	10168,8326	3544,8347
Observaciones	3	3
Grados de libertad	4	
Estadístico <i>t</i>	-1,6780	
P(T<=t) dos colas	0,1686	NO signific.
Valor crítico de <i>t</i> (2 colas)	2,7764	

Tabla 5: Resultados de la hipótesis: hay diferencias entre el medio CM-URA y CM-URA-N.

<i>Tabla 6a</i>	C2	C1
Media	1010,4616	295,2137
Varianza	69300,1321	10168,8326
Observaciones	3	3
Grados de libertad	4	
Estadístico <i>t</i>	4,3946	
P(T<=t) dos colas	0,0117	SI signific.
Valor crítico de <i>t</i> (2 colas)	2,7764	Rechazo Ho

Test *t* para dos variables con varianzas desiguales

<i>Tabla 6b</i>	C2-N	C1-N
Media	2105,7435	408,6669
Varianza	208938,8454	3544,8347
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	
Estadístico <i>t</i>	6,3767	
P(T<=t) dos colas	0,0237	SI signific.
Valor crítico de <i>t</i> (2colas)	4,3027	Rechazo Ho

Tabla 6: Resultados de la hipótesis: hay diferencias entre en la presencia o ausencia de las secuencias *cis* para el factor **Nit2** en el promotor de *KIHIS4*.

DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos del análisis estadístico, nuestros datos corroboraron de forma significativa que existen diferencias en la actividad β -galactosidasa; y por tanto, en la regulación del gen *KIHIS4*, dependiendo del medio en el que se realizase el cultivo (CM-URA, CM-URA-N) para la cepa **C2** (plásmido **pML6**; promotor de 447 pb). Incrementándose la actividad específica cuando se encontraba en un medio con limitación de nitrógeno (valores **1010,46** y **2105,74**, *Tabla 5a*). Lo que concuerda con los experimentos de *Northern blot* realizados por Lamas-Maceiras y colaboradores en 1999; en los que se apreciaba un incremento de más del doble de los niveles transcripcionales del gen *KIHIS4* en limitación de nitrógeno (*Figura 2*).

Sin embargo, no es significativa la diferencia de la actividad β -galactosidasa en el caso de la cepa **C1** (plásmido **pML11**; promotor de 139 pb), en condiciones limitantes de nitrógeno (valores **295,21** y **408,67** *Tabla 5b*). Por lo que, la secuencia para **Nit2** localizada en posición -339 (presente sólo en **C2**) parece ser la principal responsable de la regulación en limitación de nitrógeno.

No obstante, al analizar si existen diferencias significativas entre las delecciones del promotor de *KIHIS4*, independientemente del medio de cultivo utilizado, el resultado fue positivo (valores **1010,46** y **295,21**; **2105,74** y **408,67** *Tabla 6*). Por lo que la menor actividad β -galactosidasa en la cepa **C1**, puede deberse a que el pequeño tamaño del promotor afecte gravemente a la regulación del gen. Puesto que, además de suprimirse la secuencia de unión para **Nit2** en posición -339, se han eliminado otras regiones reguladoras.

También se ha realizado el análisis estadístico, teniendo en cuenta las réplicas técnicas como muestras independientes (*Anexo II*), en las que sí resultan significativas las diferencias de **C1** en los diferentes medios.

Debido a todos estos inconvenientes sería necesario continuar la investigación de estas secuencias, mediante variaciones del método aquí empleado, por ejemplo, repetir el experimento comparando la AE de la β -galactosidasa de la cepa **C2** con:

- La obtenida en una cepa transformada con un plásmido que contenga el mismo tamaño de promotor donde únicamente se haya mutado la secuencia *cis* para **Nit2** en posición -339.
- O la obtenida en una cepa transformada con un plásmido en el que se haya fusionado un promotor de 320 pb, que excluye la secuencia para **Nit2** en posición -339, pero que incluye más secuencias *cis* reguladoras importantes para otros factores.

CONCLUSIÓN

Las secuencias *cis* para **Nit2** presentes en el promotor del gen *KIHIS4* de la construcción **pML6**, están posiblemente relacionadas con la regulación de la transcripción del gen en condiciones de limitación de nitrógeno; debido a la existencia de diferencias significativas en la actividad específica de la β -galactosidasa de la cepa **C2** en dichas condiciones de cultivo.

Es más probable que la secuencia para **Nit2** localizada en posición -339 sea la principal responsable de dicha regulación; ya que, en las mismas condiciones de cultivo, no existen diferencias significativas en la actividad β -galactosidasa en la cepa **C1**, que posee el plásmido **pML11** cuyo promotor carece de esta secuencia.

No podemos descartar que la ausencia de regulación transcripcional detectada en **pML11** dependiendo de la limitación de nitrógeno en el medio, se deba al pequeño tamaño del promotor de *KIHIS4* incluido en dicha construcción. Puesto que hemos detectado diferencias significativas en la actividad β -galactosidasa entre **pML6** (con un promotor de 447 pb) y **pML11** (promotor de 139 pb) independientemente del medio de cultivo utilizado.

CONCLUSION

The **Nit2** *cis* sequences located in the promoter of *KIHIS4* gene, cloned in **pML6** plasmid, are possibly related to the transcriptional regulation of this gene in conditions of nitrogen limitation; because significant differences of β -galactosidase activity were detected in **C2** strain, in these conditions

It is more likely that the **Nit2** sequence, located at position -339, could be the main responsible of this regulation; since, in the same conditions of culture, it does not exist significant differences of the β -galactosidase activity, in the **C1** strain that includes the **pML11** plasmid whose promoter lacks this sequence.

We can not reject that, the absence of transcriptional regulation, detected in **pML11** depending of nitrogen limitation in the medium, could be due to the small size promoter of *KIHIS4* included in this plasmid. Since we detected significant differences in the β -galactosidase activity between **pML6** (447 pb promoter) and **pML11** (139 pb promoter) independently of the culture medium used.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M.A. & Jeffries T.W. (1990) Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*. 12: 2-19.
- Arndt, K.T., Styles, C.A. & Fink, G.R. (1987) Multiple global regulators control *HIS4* transcription in yeast. *Science*. 237: 874-880.
- Bradford, M.M. (1976) A dye binding assay for protein. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Buchman, A.R., Lue, N.F. & Kornberg, R.D. (1988) Connections between transcriptional activators, silencers and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Molecular Cell Biology*. 8: 5086-5099.
- Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M. & Fukuhara, H (1992) Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis* II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. *Molecular and General Genetics*. 233: 97-105.
- Devlin, C., Tice-Baldwin, K., Shore, D. & Arndt, K.T. (1991) RAP1 is required for BAS1/BAS2- and GCN4-dependent transcription of the yeast *HIS4* gene. *Molecular Cell Biology*. 11: 3642-3651.
- Donahue, T.F., Farabaugh, P.J. & Fink, G.R. (1982) The nucleotide sequence of the *HIS4* region of yeast. *Gene* 18: 47-59.
- Freire-Picos, M.A., Hampsey, M. & Cerdán, M.E. (1998) The *HIS4* gene from the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 14: 687-691.
- González-Siso, M.I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. 57: 1-11.
- González-Siso, M.I., Ramil, E., Cerdán, M.E. & Freire-Picos, M.A. (1996) Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: ethanol production and the Cabtree effect. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 585-591.
- Guarente, L. (1995) Transcriptional coactivators in the yeast and beyond. *Trends in Biochemistry Science* 6: 1820-1829.
- Herráez, S.A. (2012) *Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. *Biología molecular e ingeniería genética*. Ed.: Elsevier, Ámsterdam. Pág. 261-309
- Hinnebusch, A. (1992). General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. Pág. 319-414. En *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Jones, E., Pringle, J. & Broach, J. Ed.: Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Lamas-Maceiras, M., Cerdán, M.E. & Freire-Picos, M.A. (1999) *Kluyveromyces lactis HIS4* transcriptional regulation: similarities and differences to *Saccharomyces cerevisiae HIS4* gene. *FEBS Letters* 458: 72-76.
- McKnight, S.L. & Yamamoto, K.R. (1992) *Transcriptional Regulation*. Ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Pinson, B., Kongsrud, T.L., Ording, E., Johansen, L., Daignan-Fornier, B. & Gabrielsen, O.S. (2000) Signaling through regulated transcription factor interaction: mapping of a regulatory interaction domain in the Myb-related Bas1p. *Nucleic Acids Research*. 28: 4665-4673.

- Rodicio, R. & Heinisch, J.J (2013) Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 30: 165-177. DOI: 10.1002/yea.2954
- Rose, M. & Botstein, D. (1983) Construction and use of gene fusions *lacZ* (β -galactosidase) which are expressed in yeast. *Methods in Enzymology*. 101: 167-180.
- Struhl, K. (1993) Yeast transcription factors. *Current Opinion in Cell Biology*. 5: 513-520
- Walker, M.G. (1998) *Yeast: Physiology and Biotechnology*. Ed.: Wiley, Chichester.

RECURSOS WEB

Saccharomyces Genome Database. *HIS4*. Consulta el 26/12/2014

<<http://www.yeastgenome.org/locus/S000000535/overview>>

Seres modélicos: Levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Consulta el 15/12/2014

<<http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>>

ANEXO I

Test de Fisher

H₀: Varianzas homogéneas

	C2	C2-N
Media	1010,4616	2105,7435
Varianza	69300,1321	208938,8454
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	0,3317	
P(F<=f) una cola	0,2491	
Valor crítico para F (1 cola)	0,0526	

	C2	C1
Media	1010,4616	295,2137
Varianza	69300,1321	10168,8326
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	6,8150	
P(F<=f) una cola	0,1280	
Valor crítico para F (1 cola)	19	

	C1	C1-N
Media	295,2137	408,6669
Varianza	10168,8326	3544,8347
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	2,8686	
P(F<=f) una cola	0,2585	
Valor crítico para F (1 cola)	19	

	C2-N	C1-N
Media	2105,7435	408,6669
Varianza	208938,8454	3544,8347
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	58,9418	
P(F<=f) una cola	0,0167	SI signific.
Valor crítico para F (1 cola)	19	Rechazo H ₀

Varianzas NO Homogéneas

ANEXO II

Análisis estadístico de las réplicas técnicas

Test de Fisher

	C2	C2-N
Media	1010,4616	2105,7435
Varianza	62421,9683	175312,0004
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	8
F	0,3561	
P(F<=f) una cola	0,0827	
Valor crítico para F (1 cola)	0,2909	

	C2	C1
Media	1010,4616	295,2137
Varianza	62421,9683	9083,2827
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	8
F	6,8722	
P(F<=f) una cola	0,0066	SI signific.
Valor crítico para F (1 cola)	3,4381	Rechazo Ho

Varianzas NO Homogéneas

	C1	C1-N
Media	295,2137	408,6669
Varianza	9083,2827	3834,3786
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	8
F	2,3689	
P(F<=f) una cola	0,1220	
Valor crítico para F (1 cola)	3,4381	

	C2-N	C1-N
Media	2105,7435	408,6669
Varianza	175312,0004	3834,3786
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	8
F	45,7211	
P(F<=f) una cola	0,0000	SI signific.
Valor crítico para F (1 cola)	3,4381	Rechazo Ho

Varianzas NO Homogéneas

Test t de Student

Ho: No hay diferencias entre el medio CM y el limitante en Nitrógeno

	C2	C2-N
Media	1010,4616	2105,7435
Varianza	62421,9683	175312
Observaciones	9	9
Varianza agrupada	118866,9843	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-6,7391	
P(T<=t) dos colas	0,0000	SI signific.
Valor crítico de t (2 colas)	2,1199	

	C1	C1-N
Media	295,2137	408,6669
Varianza	9083,2827	3834,3786
Observaciones	9	9
Varianza agrupada	6458,8306	
Grados de libertad	16	
Estadístico t	-2,9947	
P(T<=t) dos colas	0,0086	SI signific.
Valor crítico de t (2 colas)	2,1199	

Ho: No hay diferencias entre las delecciones del promotor de *KIHIS4*

Test t para dos variables con varianzas desiguales

	C2	C1
Media	1010,4616	295,2137
Varianza	62421,9683	9083,2827
Observaciones	9	9
Grados de libertad	10	
Estadístico t	8,0243	
P(T<=t) dos colas	0,0000	SI signific.
Valor crítico de t (2 colas)	2,2281	

	C2-N	C1-N
Media	2105,7435	408,6669
Varianza	175312,0004	3834,3786
Observaciones	9	9
Grados de libertad	8	
Estadístico t	12,0287	
P(T<=t) dos colas	0,0000	SI signific.
Valor crítico de t (2 colas)	2,3060	

ABREVIATURAS

A: absorbancia

ADN: ácido desoxirribonucleico

AE: actividad específica

AMP: adenosín-monofosfato

ATP: adenosín-trifosfato

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNpol-II: Polimerasa II del ARN

BSA: seroalbúmina bovina

°C: grados centígrados

CM-URA: Medio de cultivo completo sin uracilo

CM-URA-N: CM-URA sin sulfato amónico

DTT: ditioneitol

h: hora

kb: kilobases

l: litro

M: molar

m.c.s.: sitio de clonaje múltiple

min: minuto

mg: miligramo

ml: mililitro

µg: microgramo

µl: microlitro

nM: nanomolar

nm: nanómetro

nmol: nanomoles

ONPG: o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

pb: pares de bases

PEG: polietilenglicol

PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluorídrico

r.p.m.: revoluciones por minuto

s: segundos

YNB: base nitrogenada para levaduras (*yeast nitrogen base*)

YPD: extracto de levadura con peptona y dextrosa (*yeast extract peptone dextrose*)

