

Anexo I. Tampones (*buffers*).

Medio LB (Luria Bertani)

Tryptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Cloruro sódico	5 g/l

*Sólido: añadir Agar al 1,5 %

TBE para electroforesis de DNA

TRIS-HCl	90 mM pH 8
H ₃ BO ₃	90 mM
EDTA	2 mM

Tampón 1 Células competentes

CaCl ₂	0,13 M
MgCl ₂	0,15 M
NaAc	0,04 M

Tampón de conservación células competentes

CaCl ₂	0,13 M
Glicerol	15 %

Tampón de carga 2x (SB2x) para electroforesis de proteína

TRIS-HCl	10 mM pH 6,8
SDS	1,6 %
Glicerol	7 %
Azul de Bromofenol	0,01 %
B-mercaptoetanol	5 %

Solución de tinción para gel SDS-PAGE

Azul Coomassie	0,25 %
Metanol	45 %
Ácido acético glacial	10 %

Solución de destinción para gel de SDS-PAGE

Metanol	45 %
Ácido acético glacial	10 %

Tampón de electroforesis (SDS-PAGE)

TRIS-HCl	25 mM pH 8,3
Glicina	192 mM
SDS	0,1 %

Tampones para la purificación de FurB de *Anabaena* sp. PCC 7120

- Tampón A:

Cloruro de Guanidinio	2M pH 8
TRIS	0,01M
NaH ₂ PO ₄	0,1 M

- Tampón de equilibrado: KCl 0,4M en Buffer A.
- Tampón de lavado 1: NaH₂PO₄ 0,5M en Buffer A.
- Tampón de lavado 2: Glicina 35 mM en Buffer A.
- Tampón de elución: Imidazol 1M en Buffer A
- Tampón de diálisis: Ácido acético/Acetato 10 mM pH 5,5.

Tampón de tinción PAR

TRIS-HCl	20 mM pH8
NaCl	100 mM
Glicerol	5 %
PAR	500 µM

Tampón de unión para EMSA

TRIS-HCl	50 mM pH8
KCl	50 mM
MgCl ₂	1 mM
Glicerol	5 %

Tampón de carga 6X (EMSA)

TRIS-HCl	20 mM pH8
Glicerol	5 %
Azul de Bromofenol	0,0025 % p/v
Xilenocianol	0,05 %

Tampón de unión 1X (EMSA)

Bis-TRIS	10 mM pH7,5
KCl	40 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2 mM
Glicerol	5 %

Anexo II. Procedimientos.

Figura A1. Plásmido pET28a(+). Representación esquemática del plásmido pET28a(+). Fuente: Novagen. Los plásmidos pET28a(a) son vectores que poseen en su extremo N-terminal la siguiente configuración: Cola de Histidinas/Trombina/Cola T7; seguida de una secuencia opcional de cola de histidinas (His-Tag) en el extremo C-terminal. Los sitios de corte únicos se muestran en el mapa circular. Debajo de éste, se muestra la región de clonación/expresión de la cadena codificante transcrita por la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Posee un origen f1 para la producción de DNA de cadena sencilla. Como marcador de selección posee el gen de resistencia a kanamicina. Posee además el operón Lac y su represor, además del promotor del bacteriófago T7.

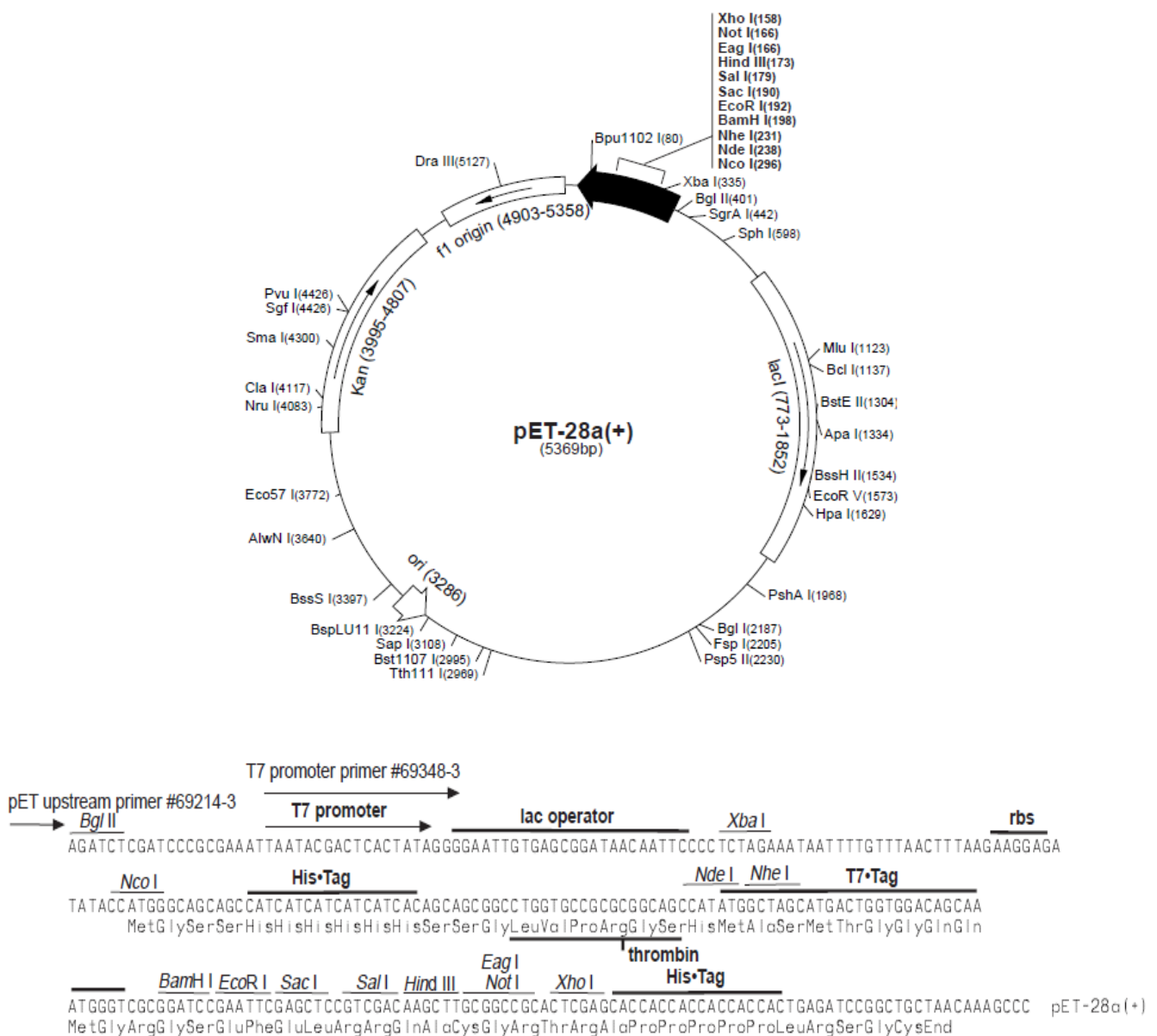


Figura A2. Proceso de inducción con IPTG en plásmidos pET28a(+). Los plásmidos pET28a(+) poseen el operón Lac y su represor. La expresión del gen clonado en este tipo de plásmidos está bajo el control del promotor lac, el cual es inducido por la presencia de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). El IPTG es un análogo de la alolactosa, un metabolito isómero de la lactosa que se une a la proteína represora de LacI, provocando un cambio de conformación en ésta que disminuye su afinidad por la región operadora del operón lac. De esta manera posibilita la unión de la RNA polimerasa y el comienzo de la transcripción. Tras la inducción con IPTG se expresará la proteína clonada.

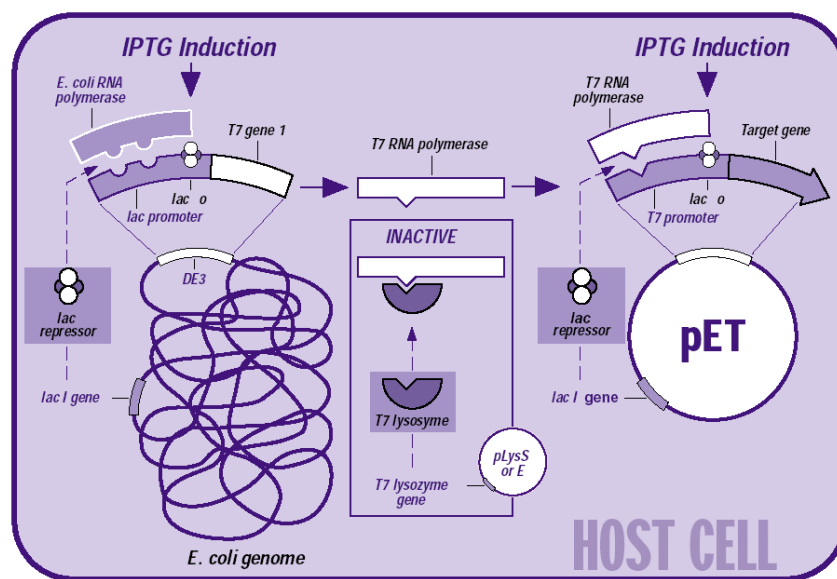


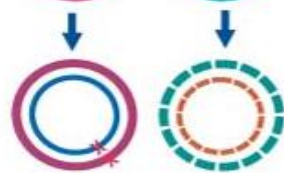
Figura A3. Quick-change PCR. Se presenta el esquema de mutagénesis dirigida utilizada para crear el mutante C93A. Adaptado de Agilent. El método de Quick-change PCR permite realizar mutagénesis dirigida en un plásmido de hasta 10 kb. Es un método sencillo y rápido, que emplea la base de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usaron cebadores de oligonucleótidos que contenían la mutación de intrín (Cys93→Ala). Se estableció el programa de PCR (apartado 3.2.1) y se realizó la síntesis del plásmido conteniendo dicha mutación. El DNA metilado parental se puede eliminar mediante digestión con la enzima de restricción Dnpi, que no digiere el plásmido con mutación (no metilado).



PLÁSMIDO ORIGINAL



1. Síntesis del plásmido
conteniendo la mutación



2. Digestión con DpnI del
plásmido original (metilado)



PLÁSMIDO MUTADO