

NOTA: en cada PCR antes de la inserción de dichos genes en el vector, se llevó a cabo un gradiente de temperatura, para ver cuál de todas las temperaturas amplifican bien el gen; hasta ahora, entre el gradiente de 65°C y 55°C, los genes CAR0, CAR1 y CAR2 amplifican en cada gradiente (gradiente: diferentes temperaturas dadas en un rango específico; en este caso, 65°C y 55°C; donde A es la temperatura más alta de gradiente, y H la más baja)

A = R4.1		65°C
B = R4.2	control -	64.3°C
C = R4.3		63°C
D = R4.4		61.1°C
E = R4.5		58.8°C
F = R4.6	control -	56.9°C
G = R4.8		55.7°C
H = R4.8		55°C

NOTA:

En el termociclador se colocaron las muestras así en cada PCR (la lista está de forma descendente; es decir el A era la celda más arriba del termociclador, y el H la más baja):

JUNIO 8/23

Se hizo electroforesis de gen CAR1 (primer gel)

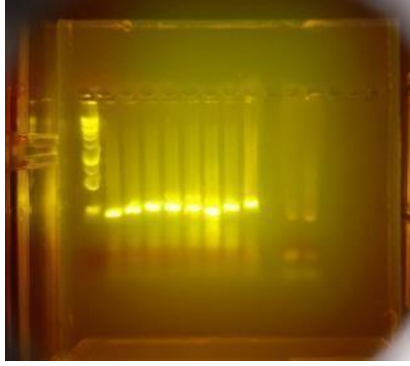
Se hizo PCR para gen CAR0

Se hizo electroforesis de gen CAR0(segundo gel)

Gel de electroforesis CAR1



Gel de electroforesis CAR0



JUNIO 13/2023

Se hizo PCR para gen CAR2, HMGR1, ERG12

Se hizo gel de electroforesis para el gen CAR2

* Cada gen tiene 8 muestras y 2 controles negativos, teniendo así un total de 10 muestras por cada gen

* Se usó el ADN de R4 de las muestras R4.1(CAR2) hasta R4.6 (CAR2). Para el resto de los genes se usó la muestra R1. La R4 tenía una concentración de 124.5ng/uL y la R1 de 135ng/uL.

JUNIO 30/2023

* Se hizo PCR para los genes CAR2 y ERG12

AGOSTO 3/2023

* Busqué en bases de datos (NCBI) los genes CAR0, CAR1, CAR2 de R toruloides ya que en los artículos de Landolfo 2017, los usaron

como referencia para obtener los primers que amplificaran los genes en R mucilaginoso (y les funcionó) y obtuve el phytoene desaturase (CrtI o CAR1). Se logró corriendo un BLASTn contra el gen de R. toruloides y accedí a descripciones, accedí a donde daba el nombre de R. mucil y le di en descargar fasta, también descargué el gen dándole click a su ID y descargándolo de esa nueva página. Realicé el mismo procedimiento para el CAR2 y CAR0

AGOSTO 8/2023

* Se hizo PCR del gen CAR1 y su respectiva electroforesis (se llevó a cabo un gradiente para verificar en qué temperatura amplifica la muestra de interés). Se usó la muestra genómica R3B.

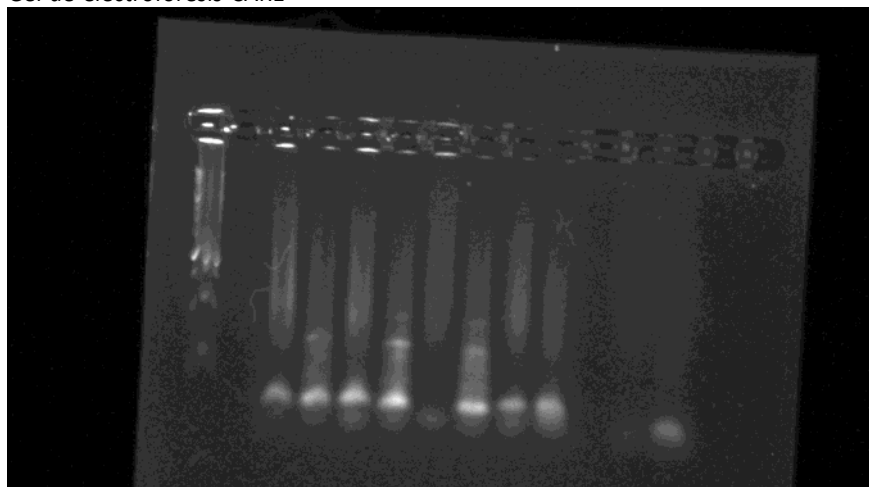
La disposición de las muestras en el termociclador para estandarizar fueron:

A	R3B.1	65°C
B	R3B.2	64.3°C
C	R3B.3 C1	63°C
D	R3B.4	61.1°C
E	R3B.5	58.8°C GRADIENTES DE TEMPERATURA
F	R3B.6 C2	56.9°C
G	R3B.7	55.7°C
H	R3B.8	55°C



Cantidad muestra: 10uL

Gel de electroforesis CAR1

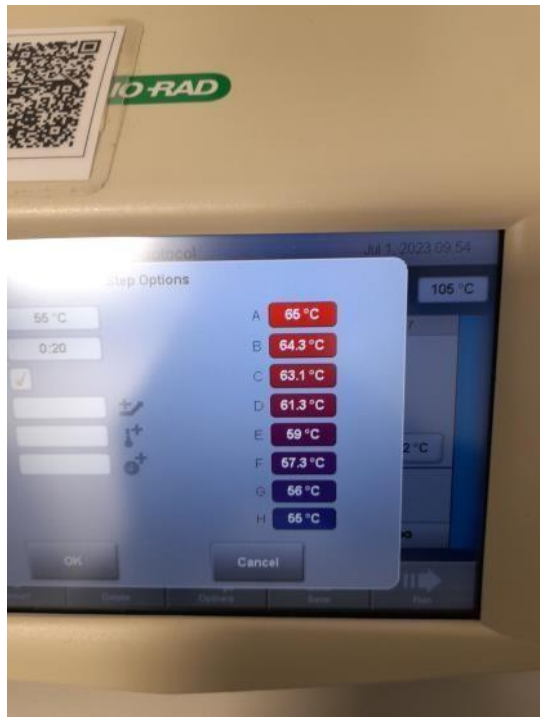


Nota: Hay que repetir PCR y Gel

AGOSTO 10/2023

* Se hizo PCR del gen CAR0. Se usó la muestra genómica R3B
La disposición de las muestras en el termociclador fue así:

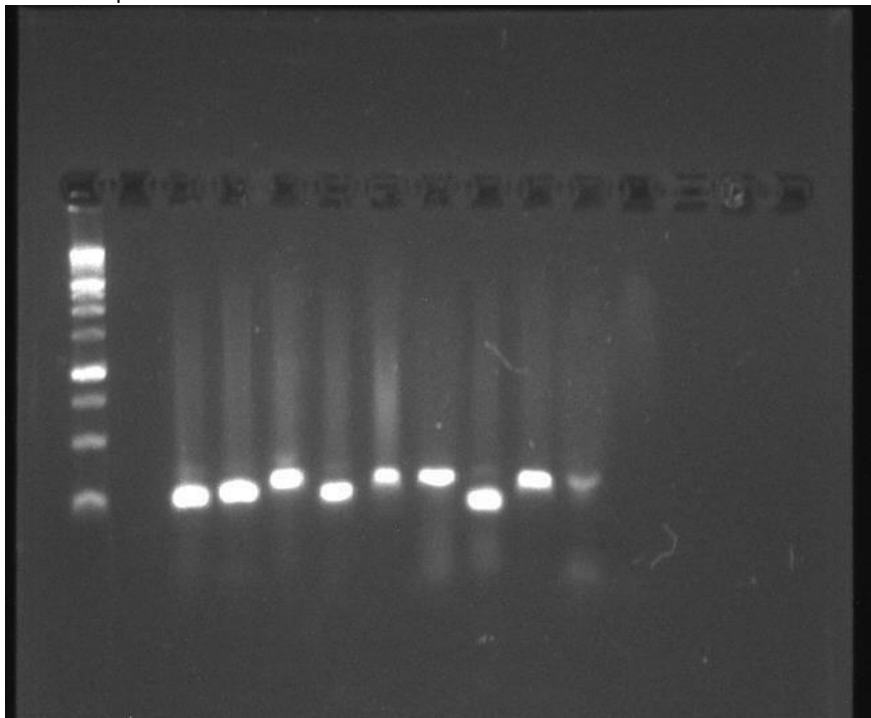
A	R3.1	65°C	GRADIENTES DE TEMPERATURA
B	R3.2	64.3°C	
C	R3.3	63.1°C	
D	R3.4	61.3°C	
E	R3.5	59°C	
F	R3.6	57.3°C	
G	R3.7	56°C	
H	R3.8	55°C	



Cantidad muestra: 10uL

* Se hizo electroforesis de productos PCR del gen CAR0.
La disposición de las muestras en la cama de electroforesis fue así:

ladder 10Kpb R3B.1 R3B.2 R3B.3 R3B.4 R3B.5 R3B.6 R3B.7 R3B.8 C1 C2



* Se diluyó la muestra genómica R3 de la siguiente manera

$C1V1 = C2V2$

$470\text{ng}/\mu\text{L} \cdot V1 = 100\text{ug}/\mu\text{L} \cdot 20\mu\text{L}$

$V1 = 4,25\mu\text{L}$ (vol. muestra que se diluirá)

vol de agua grado molecular = $20 - 4,25 = 15,75\mu\text{L}$

* Se marcó el tubo como R3 diluido Ago 10/23 y se usará para hacer PCR de CAR2

AGOST 11/2023

* Se realizó PCR del gen CAR2

La disposición de las muestras en el termociclador fue así:

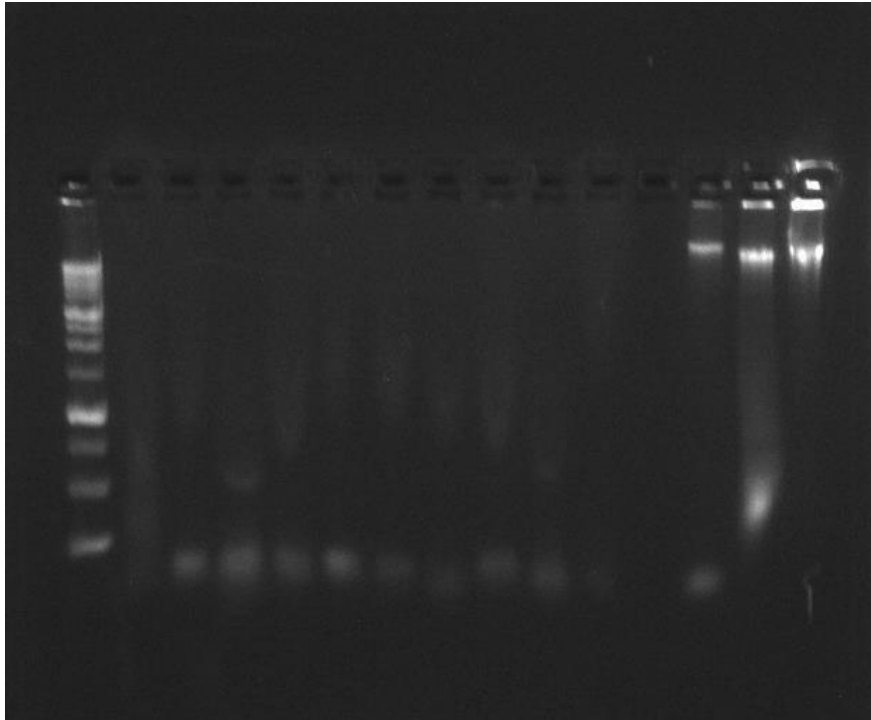
A	R3.1		65°C
B	R3.2		64.3°C
C	R3.3	C1	63°C
D	R3.4		61.1°C
E	R3.5		58.8°C GRADIENTES DE TEMPERATURA
F	R3.6	C2	56.9°C
G	R3.7		55.7°C
H	R3.8		55°C



Cantidad de muestras: 10uL

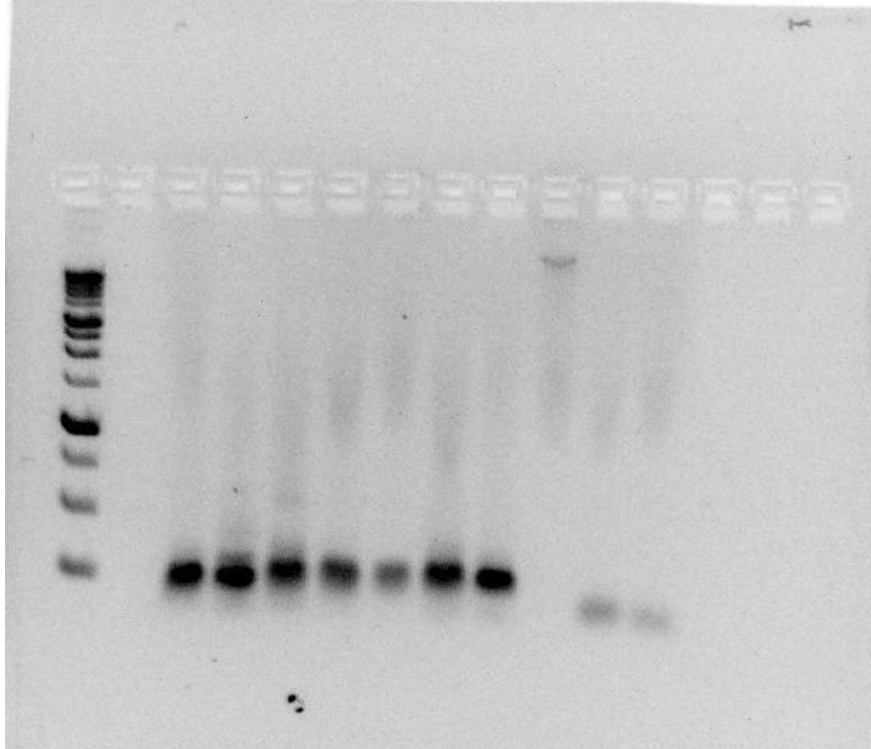
- Se realizó Gel de electroforesis del gen CAR2

De izquierda derecha: primer pozo, ladder de 10Kbp. Los siguientes 10 pozos están compuestos así: 2-9 muestras del gen CAR2, 9 y 10 son controles negativos. Las últimas tres no son muestras del proyecto, si no de Juan Manuel



- Se realizó PCR y gel del gen HMG1

Donde el primer pozo de izquierda a derecha: Ladder 10Kpb, 2-9 muestras gen HMG1, 10 y 11 controles negativos (máster mix amplificado)|



AGOSTO 15/2023

- Se hizo PCR y gel de electroforesis del gen ERG12

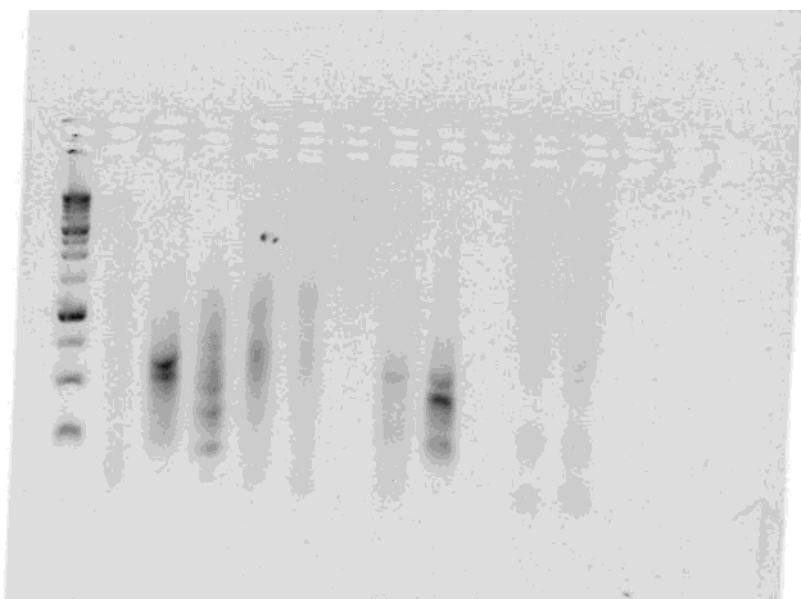
La disposición de las muestras en el termociclador fue así:

A	R3.1		55°C
B	R3.2		54.2°C
C	R3.3	C1	52.9°C
D	R3.4		51.2°C
E	R3.5		48.9°C GRADIENTES DE TEMPERATURA
F	R3.6	C2	46.9°C

G	R3.7	45.7°C
H	R3.8	45°C



- Se realizó Gel de electroforesis del gen ERG12
Donde el primer pozo de derecha a izquierda: Ladder 10Kpb, 2-9 muestras gen ERG12, 11 y 12 controles negativos (máster mix amplificado)



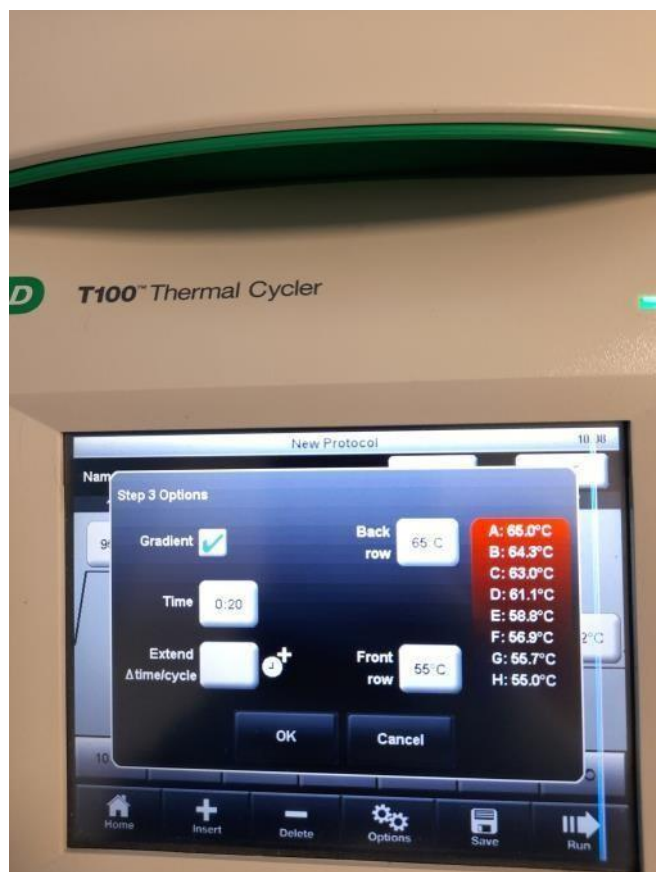
AGOSTO 17/2023

- Se realizó PCR y Electroforesis del gen CAR1
La disposición de las muestras en el termociclador fue así:

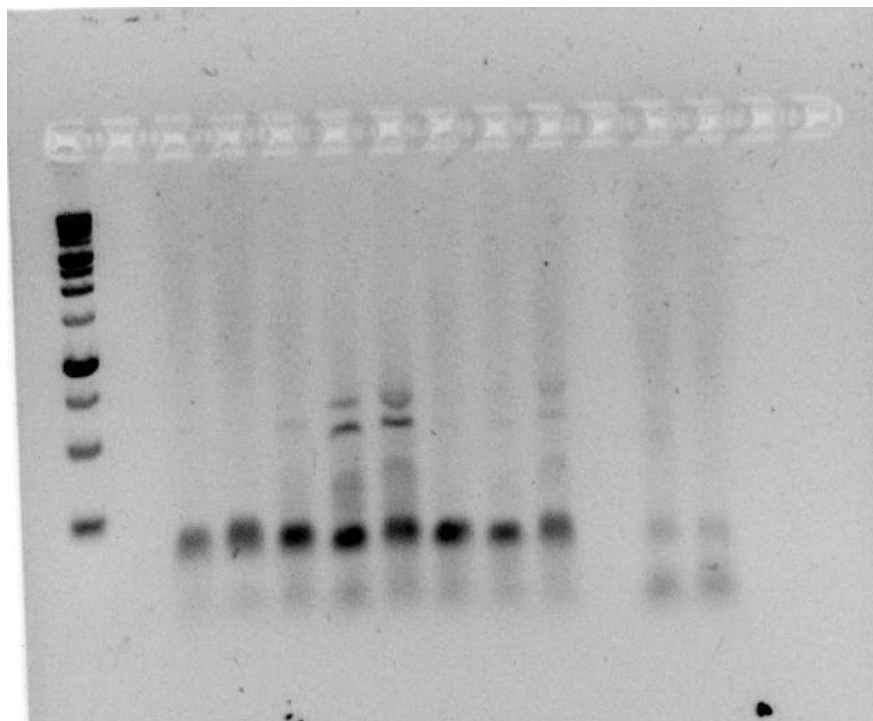
A	R3.1	65°C
B	R3.2	64.3°C
C	R3.3	63.0°C
D	R3.4	61.1°C
E	R3.5	58.8°C

C1 GRADIENTES DE TEMPERATURA

F	R3.6	C2	55.9°C
G	R3.7		55.7°C
H	R3.8		55.0°C



- Se realizó Gel de electroforesis del gen CAR1
Donde el primer pozo de izquierda a derecha: Ladder 10Kpb, 2-9 muestras gen CAR1, 11 y 12 controles negativos (máster mix amplificado)

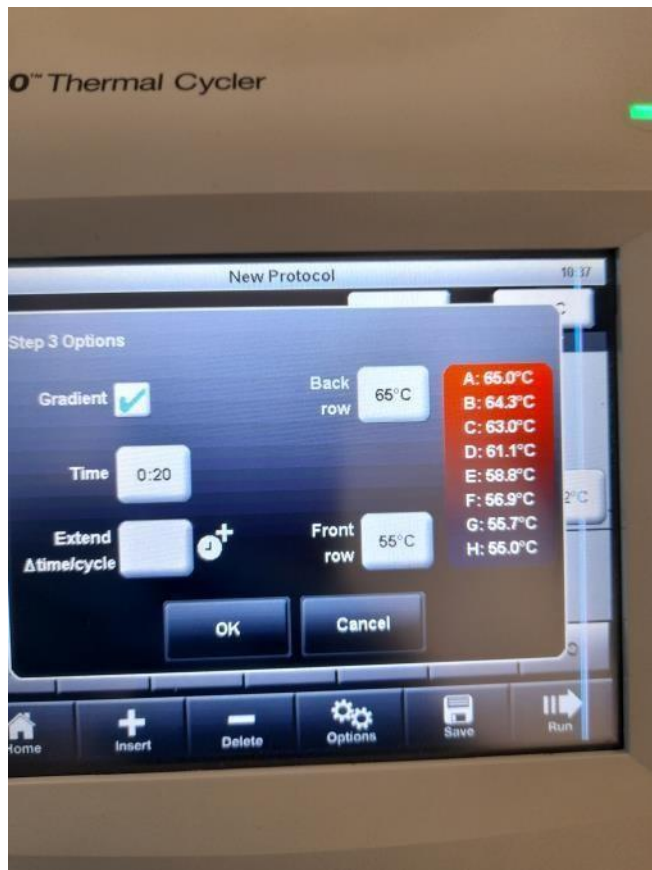


AGOSTO 23/2023

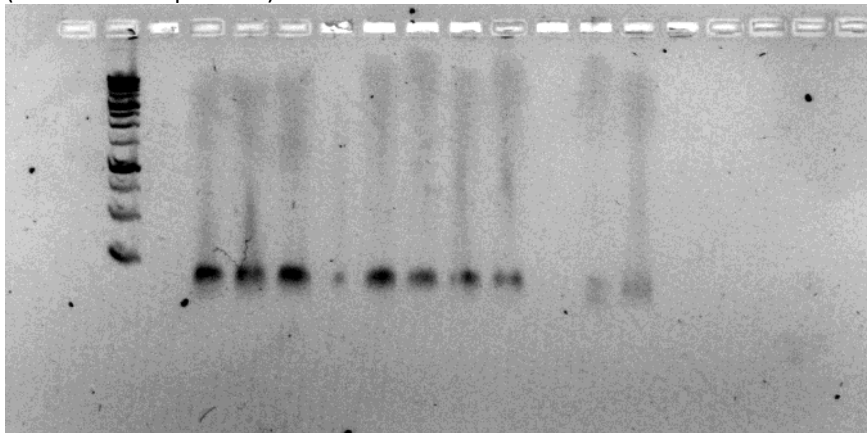
- Se realizó PCR del gen CAR2

A	R3.1		65°C
B	R3.2		64.3°C
C	R3.3	C1	63.0°C
D	R3.4		61.1°C
E	R3.5		58.8°C
F	R3.6	C2	55.9°C
G	R3.7		55.7°C
H	R3.8		55.0°C

GRADIENTES DE TEMPERATURA

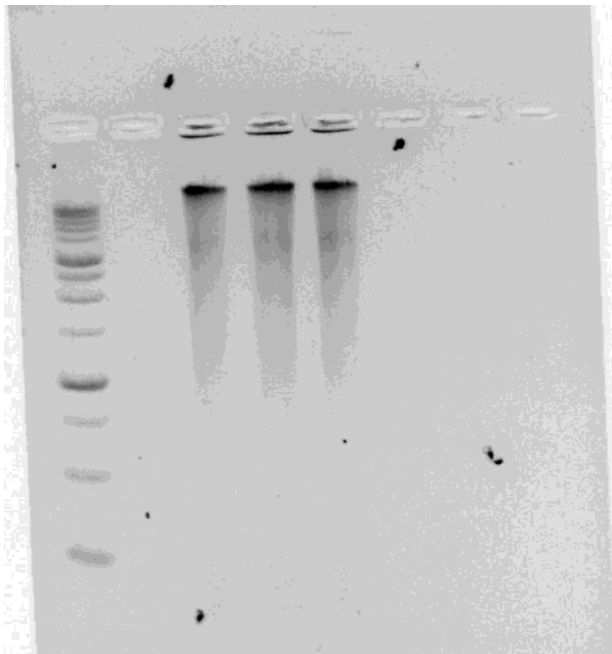


- Se realizó Gel de electroforesis del gen CAR2
Donde el primer pozo de izquierda a derecha: Ladder 10Kpb, 2-9 muestras gen CAR1, 11 y 12 controles negativos (máster mix amplificado)



AGOSTO 25/2023

- Se corrió Gel de electroforesis genómico de la muestra 2RB. La configuración para correr el gel de electroforesis de ADN genómico fue de 65V x 100mins x 1.2%

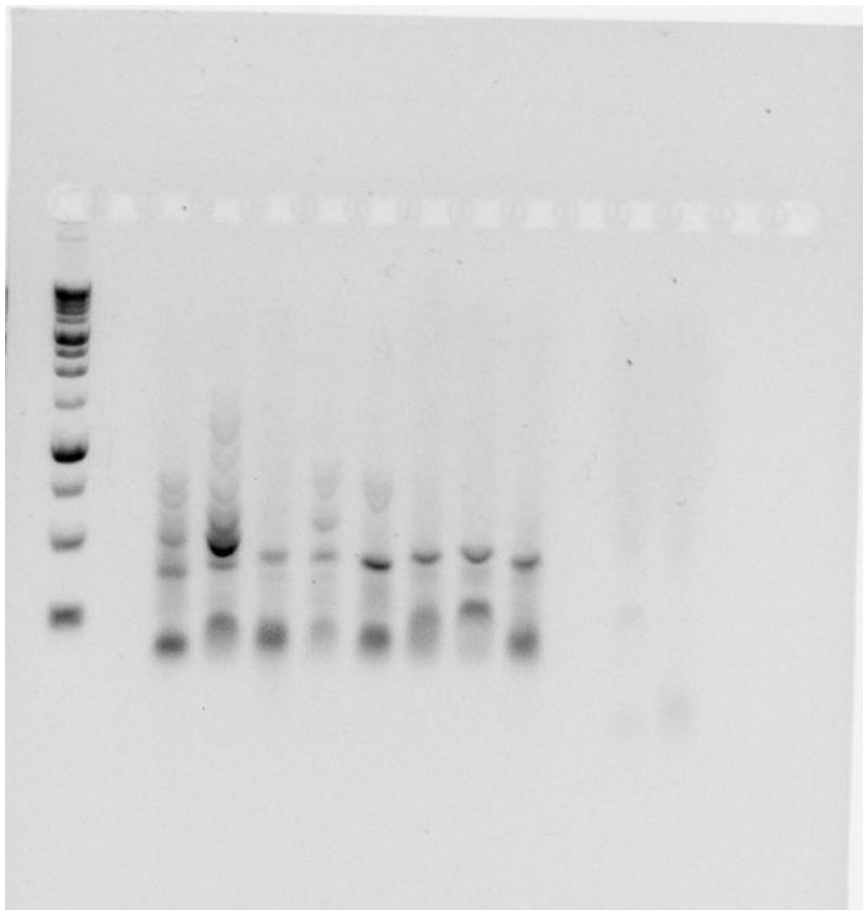


- Se realizó PCR del gen ERG12

A	R3.1	60°C
B	R3.2	59.2°C
C	R3.3	C1 58.0°C
D	R3.4	56.1°C
E	R3.5	53.8°C GRADIENTES DE TEMPERATURA
F	R3.6	C2 51.9°C
G	R3.7	50.7°C
H	R3.8	50.0°C



- Se realizó Gel del gen ERG12
 Donde el primer pozo de izquierda a derecha: Ladder 10Kpb, 2-9 muestras gen CAR1, 11 y 12 controles negativos (máster mix amplificado)



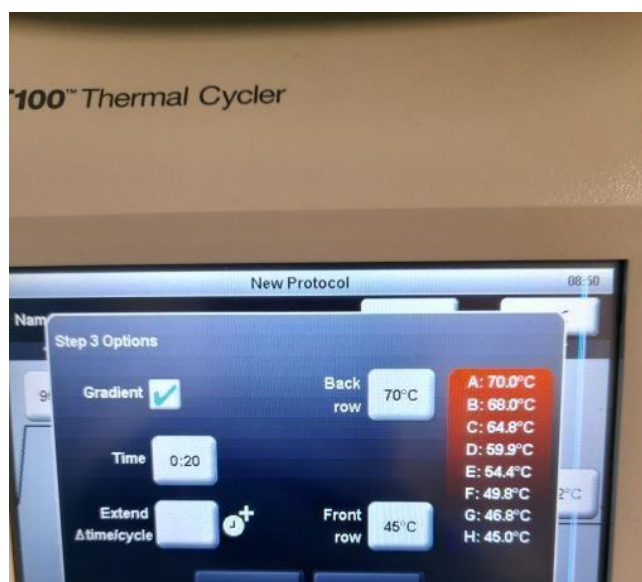
AGOSTO 29/23

- Se hizo PCR y Electroforesis gen ERG12: se usó un gradiente de 45-75°C para PCR

- PCR del gen

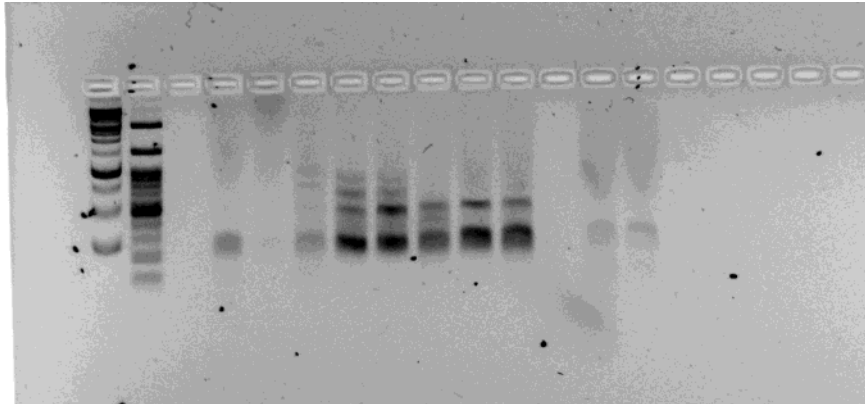
A	R3.1		70°C
B	R3.2		68.0°C
C	R3.3	C1	64.8°C
D	R3.4		59.9°C
E	R3.5		54.4°C
F	R3.6	C2	49.8°C
G	R3.7		46.8°C
H	R3.8		45.0°C

GRADIENTES DE TEMPERATURA





- Donde el primer pozo de izquierda a derecha: pozo1: Ladder 10Kpb, pozo 2: Ladder 3kPB 2-9 muestras gen CAR1, 11 y 12 controles negativos (máster mix amplificado)



Conclusiones: las temperaturas estandarizadas para cada gen para llevar a cabo la PCR a 25uL, de acuerdo a los resultados obtenidos son:

HMG1 = 65° o 55°.

CAR0 = 61.3°

CAR1 = 65°C

CAR2 = 63°C

ERG12 = no se ha logrado determinar.