

APÉNDICE A
SOLUCIONES Y MEDIOS

Tween 80 1%

- Disolver 1% (vol/vol) de Tween 80 en agua bidestilada.

Medio YPD

Pesar y diluir en agua bidestilada:

Extracto de levadura	3 g/l
Peptona	10 g/l
Glucosa	20 g/l

Medio Inductor

Pesar y diluir en agua bidestilada:

NaCl	0.3 g/l
K ₂ HPO ₄	0.3 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g/l
Gelatina	10 g/l

Medio Represor

Pesar y diluir en agua bidestilada:

NH_4NO_3	3 g/l
Glucosa	10 g/l
Gelatina	10 g/l
NaCl	0.3 g/l
K_2HPO_4	0.3 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/l

DNS

Solución A:

Mezclar 150 g de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua bidestilada.

Solución B:

Calentar y diluir 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 100 ml de NaOH 2N.

Mezclar la solución A y B y aforar a 500 ml.

Caseína 1% para zimogramas

Disolver 10 g/l de caseína en buffer Tris 0.1M.

Solución de Tinción

Metanol	20 ml
Ácido acético	3.6 ml
Agua bidestilada	26 ml

Agregar y mezclar colorante Coomassie 0.012 g

Solución de Destinción

Metanol	100 ml
Ácido acético	20 ml
Agua bidestilada	80 ml

Buffer de Carga no desnaturizante

Buffer Tris 1M (pH 6.8)	0.31 ml
SDS	2.0 ml
Glicerol	1.0 ml
Agua bidestilada	1.34 ml

Buffer de Electroforésis de Proteínas 1X

Tris	3.75 g/l
Glicina	18 g/l
SDS	1.25 g/l

Azocaseína

Pesar y diluir azocaseína al 15 % p/v en buffer de reacción.

Buffer de reacción:

Pesar y diluir MgCl₂ en buffer Tris 25 mM pH 7.6; concentración final 5mM

Poliacrilamida 10%

Geles de Tris Glicina SDS-poliacrilamida

	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	2.0	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	19.8
Acrilamida 30% ^a	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 10% ^b	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 10% ^c	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Comúnmente: ^aAcrilamida 29.2%, N,N-metil-bis-acrilamida 0.8%; ^bDodecil Sulfato de Sodio; ^cPersulfato de amonio; ^dN,N,N,N-Tetrametilendiamina.

APENDICE B

BUFFERS

Buffer Tris 1.5 M (pH 8.8)

Tris 181.5 g/L

Ajustar el pH con HCl

Buffer Tris 1.0 M (pH 6.8)

Tris 121.1 g/L

Ajustar el pH con HCl

Persulfato de amonio 10 % APS

Disolver 1 gramo en 9 ml de H₂O bidestilada

SDS 10%

Disolver 10 gramos de SDS en 90 ml de H₂O bidestilada

Buffer Tris 25 mM

Tris 30.2 g/L

Buffer Tris 0.1 M

Tris 12.1 g/L

APENDICE C

Desarrollo del halo de hidrólisis de las cepas mutantes obtenidas por medio de luz ultravioleta. Observación en medio de agar caseína.

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
Paterna	6	0.5	D	9	1	D	14	1.5	D	19	4	C
1	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
2	5	1	D	8	1	D	14	1	D	28	1.5	C
3	5	0.5	D	6	1	D	13	1	D	27	1.5	C
4	4	1.5	C	7	1.5	D	12	1.5	C	27	1	C
5	5	1	D	8	1	D	14	1	D	22	2.5	C
6	6	1	C	10	1.5	C	14	1.5	C	26	4	C
7	6	1	C	9	1	C	12	1	C	27	3.5	C
8	5	0	-	5	0	-	6	0.5	D	17	2	C
9	4	1	D	7	1.5	C	13	1	C	27	1.5	C
10	5	1	C	9	1	C	13	1.5	C	29	1.5	C
11	6	1	C	9	1	C	13	1	C	23	2	C
12	4	1.4	C	8	1.5	C	13	1	C	23	2.5	C
13	4	1	D	6	1.5	D	11	1	D	25	1	C
14	5	1	D	9	1.5	D	14	1.5	C	27	2	C
15	5	1.5	D	9	1	D	14	0.5	D	26	1.5	C
16	4	0.5	D	5	1	D	7	1.5	C	22	1	C
17	4	1	C	9	0.5	D	13	1	C	30	1.5	C
18	4	0	-	6	1	C	11	1.5	D	25	2.5	C
19	5	1.5	C	10	2	C	16	1	C	28	2.5	C
20	5	1	C	7	1.5	C	15	1	C	28	1	C
21	6.5	1	C	10	0.5	C	15	1	C	22	2	C
22	6	0	-	9	1.5	C	14	2	C	25	3	C
23	5	0.5	C	7	1.5	C	15	1	C	24	1	C
24	5	1	C	8	2	C	13	1.5	C	25	3	C
25	4	2.5	C	8	2	C	15	2	C	23	4	C
26	5	1	C	8	1.5	C	12	2.5	C	25	3.5	C
27	5	1	C	9	0.5	C	13	0.5	C	29	1	C
28	4	0	-	6	1	C	7	0.5	C	26	1	C
29	6	0	-	9	1	D	11	1	D	29	1	C
30	6	0	-	8	1	D	12	1	D	24	2.5	C
31	7	2	C	11	1.5	C	15	2	C	29	2.5	C
32	6	1	D	9	1	D	14	1	D	28	1.5	C
33	4	0.5	D	7	1.5	C	13	1	C	21	3	C
34	4	0.5	D	7	0.5	D	12	1	D	23	1	C
35	5	0	-	7	1	D	12	1	D	28	1.5	C
36	6	0	-	9	1	C	13	1.5	C	25	3	C
37	4	1	D	7	1	D	13	1	C	27	1	C
38	4	1	D	9	1.5	C	14	1.5	C	27	2	C
39	4	2	C	9	1.5	C	13	1.5	C	26	2	C

(Continuación)

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
40	4	0	-	7	1	D	12	1	C	26	1	C
41	5	2.5	C	10	1.5	C	15	1	C	28	2.5	C
42	5	1.5	C	8	1.5	C	13	2	C	28	3	C
43	6	0	-	8	1	C	14	1	C	29	1	C
44	5	1	D	9	1	D	13	1	C	26	1	C
45	4	2.5	C	9	1	C	12	1	C	25	1.5	C
46	5	1	D	10	0.5	D	14	1	D	29	1	C
47	4	0	-	7	1	C	11	2	C	22	3	C
48	5	2	C	9	1.5	C	14	1	C	26	2	C
49	4	1	D	9	1.5	C	15	0.5	C	30	1.5	C
50	5	0.5	D	9	1.5	C	14	0.5	C	28	1	C
51	5	1	C	10	1	C	14	1	C	29	1	C
52	4	1.5	C	7	1	C	13	1	C	28	1	C
53	4	0.5	D	8	1	D	11	2	C	23	2.5	C
54	5	1	D	10	1	C	12	1.5	C	27	1.5	C
55	5	1	C	9	1	C	16	1	C	31	1	C
56	5	1	C	9	1	D	16	1	C	31	1	C
57	4	1	C	8	0.5	D	13	0.5	C	26	1.5	C
58	4	0	-	7	1	D	12	1	C	26	1.5	C
59	4	1	C	5	1	C	15	1.5	C	29	2	C
60	7	1.5	C	10	1.5	C	14	1	C	27	1	C
61	4	0	-	6	1	D	9	1	D	20	1.5	D
62	4	0	-	5	0	-	9	0	-	22	1	D
63	5	0	-	7	0	-	11	1	D	25	1.5	D
64	6	0	-	7	0	-	9	1	D	24	1	D
65	6	0.5	D	7	0.5	D	11	1	D	25	1	C
66	6	0	-	9	1	D	14	1.5	D	27	2.5	C
67	6	1.5	C	9	1.5	C	16	1	C	30	1.5	C
68	6	1	D	9	1	D	4	1	D	29	1	C
69	6	1	D	8	1	D	14	1	D	28	1	C
70	4	1	D	9	1	D	13	1	D	29	1	C
71	6	1	C	10	0.5	C	14	1	C	30	1.5	C
72	5	0.7	D	7	1	C	10	1	C	25	1	C
73	4	1	C	8	1.5	C	13	1.5	C	30	1	C
74	5	1	C	8	1.5	C	13	1.5	C	26	2	C
75	5	1	C	10	1	C	14	1.5	C	31	1.5	C
76	6	1.5	D	10	1	C	15	1	C	30	1	C
77	5	0	-	8	0.5	C	12	1	C	25	2	C
78	5	1	D	9	0.5	C	14	1	C	27	3	C
79	5	1	D	10	1	C	16	1	C	30	1	C
80	6	1	D	10	1	C	16	1	C	29	2	C
81	6	0.5	C	9	1	C	14	1	C	29	1	C
82	6	0.5	C	8	1	C	10	2	C	18	4	C
83	6.5	0.5	C	9	1	C	15	1	C	29	1	C
84	7	1	C	10	1	C	15	1	C	28	1.5	C

(Continuación)

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
85	7	1.5	C	10	2	C	15	2	C	27	4.5	C
86	7	0	-	9	0.5	D	15	1	D	30	1.5	C
87	7	0.5	D	10	0.5	D	14	1	D	28	1	C
88	7	0	-	9	1	D	15	1	D	28	1.5	C
89	6	1	C	10	1	C	15	1.5	C	30	1.5	C
90	6	0.5	C	10	1	C	15	1	C	29	1.5	C
91	6	1	C	9	2	C	10	3.5	C	19	4	C
92	7	1.5	C	10	1	C	15	1.5	C	30	1.5	C
93	6	1	D	10	2	C	17	3	C	28	3	C
94	6	1.5	D	10	2.5	C	15	3	C	29	3	C
95	6	1	D	10	2.5	C	18	3	C	27	3	C
96	6	1	D	9	2	D	15	5	C	31	3	C
97	6	1	C	10	2.5	C	17	5	C	26	3	C
98	6	2	D	7	2.5	D	18	5	C	25	2.5	C
99	7	1	D	8	2	D	18	7	C	25	3	C
100	7	1.5	D	10	2	D	19	5	C	26	4	C
101	7	1	D	9	1	D	18	5	C	24	3	C
102	6	1	C	9	2.5	C	14	6	C	24	3.5	C
103	6	1.5	D	9	1.5	D	16	6	C	29	3	C
104	6	1.5	C	10	2	C	21	6	C	27	3	C
105	6	2	C	9	3	C	19	5	C	28	3	C
106	5	1	D	9	2	D	17	6	C	28	3.5	C
107	7	1.5	D	8	2.5	C	18	6	C	23	4	C
108	7	1	D	6	2	C	19	56	C	23	3	C
109	7	2	C	9	3	D	19	5	C	26	3	C
110	7	1	C	9	2	D	15	6	C	22	4	C
111	6	2.5	C	5	3	C	12	5	C	23	2	C
112	5	1	D	9	2	D	17	5	C	26	3.5	C
113	6	1	D	6	2.5	D	13	6	C	26	3	C
114	6	1.5	C	10	2	C	20	5	C	26	3	C
115	6	1	D	7	2	D	14	5	C	26	3	C
116	7	1.5	D	10	2	C	18	5	C	28	4	C
117	6	1.5	C	9	3	C	16	5	C	29	3.5	C
118	5	1	D	7	22	D	15	5	C	23	3.5	C
119	5	1	D	8	22	C	12	6	C	22	2	C
120	5	1	D	8	33	C	11	5	C	23	3	C
121	6	0	-	8	11	D	11	1	D	29	1	C
122	6	1	D	9	2.5	C	13	5	C	30	5	C
123	7	1	D	6	1.5	D	10	4	C	22	4	C
124	7	1	D	9	1.5	D	15	4	C	29	4	C
125	7	1	D	8	2.5	C	13	5	C	28	5	C
126	6	1	D	11	2	C	19	5	C	25	5	C
127	6	2	C	9	3	C	18	6	C	26	6	C
128	6	1	C	7	3	C	12	5	C	28	5	C
129	5	1.5	D	7	2	D	10	4	C	22	3	D

(Continuación)

Colonia	Día 1			Día 2			Día 3			Día 6		
	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A	Col	H	A
130	6	1	C	7	2	C	11	3	C	25	3	C
131	5	2	C	9	1.5	C	13	1.5	C	26	2	C
132	6	1	D	9	2	D	12	5	C	27	5	C
133	6	2.5	C	10	1.5	C	15	1	C	28	2.5	C
134	6	1	D	10	3	C	13	4	C	28	4	C
135	6	1	D	10	2.5	C	12	6	C	25	4	C
136	5	2	C	8	3	C	11	6	C	27	5	C

