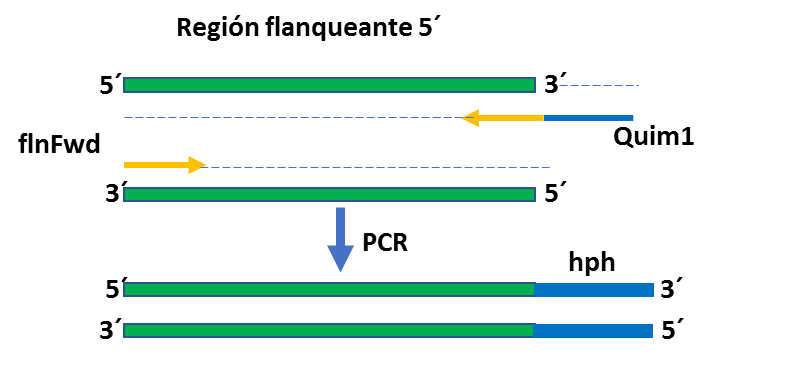
**Protocolo PCR doble unión para generar mutantes en *T. atroviride***

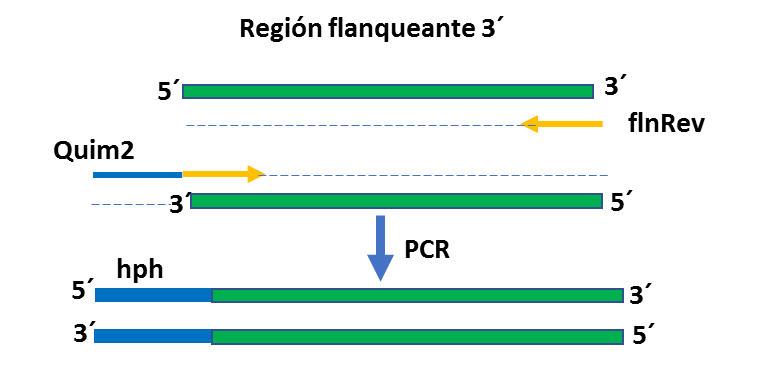
Para el reemplazo de algún gen o región dentro del genoma de *Trichoderma* es necesario realizar una construcción que tenga una región flanqueante de 1000 pb como mínimo en la posición 5 y 3 prima de la región de interés, y un marcador de selección entre las regiones (gen hph que le confiere resistencia a higromicina). Ver siguiente figura.



**Amplificación de las regiones flanqueantes**

Para la región flanqueante 5´ se diseña un oligo Fwd (flnFosFwd) al inicio del 5´ de la región y un oligo quimérico que es reverso complementario al 3’, este oligo quimérico (Quim1) además contiene 25 nucleótidos complementarios en el 5´del gen hph.



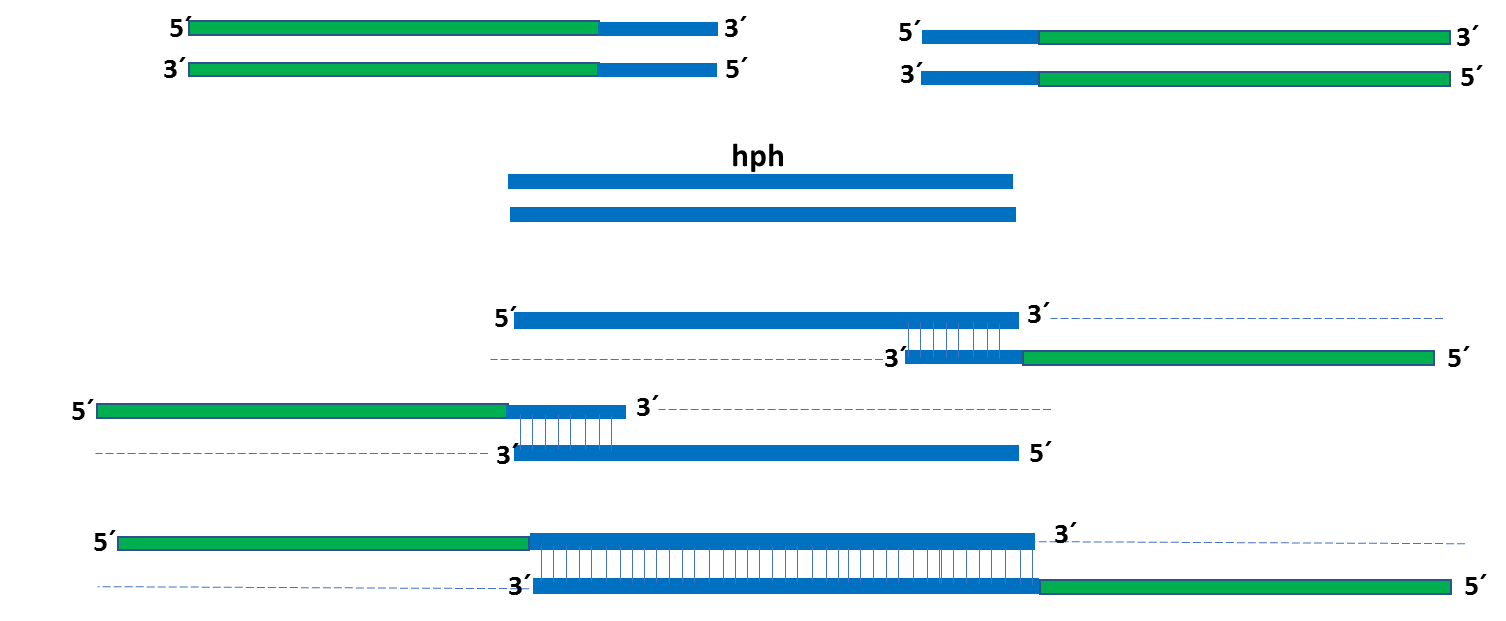
Para la región flanqueante 3´se diseña un oligo quimérico (Quim2) que es complementario en la posición 5´ de esta región y un oligo Rev (flnFosRev), el oligo Quim2 contiene 25 nucleótidos complementarios en el 3´del gen hph.

El gen hph es amplificado con los oligos hphFwd y hphRev.



**Empalme de la región 5´, hph y región flanqueante 3´**

Una vez amplificados cada uno de los tres elementos se mezclan en una reacción de PCR permitiendo la fusión o empalme de la región flanqueante 5’, hph y región flanqueante 3´. Finalmente, por PCR utilizando los oligos denominados Nest se amplifica la construcción final.





**Ejemplo: mutación del gen que codifica para una fosfolipasa en *T. atroviride*.**

Secuencia del gen (secuencia codificante en rojo e intrones en negro) más 2000 pb río arriba del ATG y 2000 pb rio abajo del codón de STOP (secuencia en gris).

TCATTGAGTGGCACGATGTATCAACCTGGCTAGACCTGGGACATTTGATGAGCATGAAAGAGCAAGGAGG

AGAAGAACGAAGATGGCAGTTATTGTTGATTCAAGACGCCAGGTATTAGTACTAGACGATATTCTGATGA

GGTTTACAAGTAGAAATGCGGCATATCTCTGTTTGAGCGTGACAGTGCGTTCATGGAAGCTTCTCGCATT

TCGCATTTCGTATTTCCCATCTGCACAACTGCCAGTCACTAAAGAGACAGACCTGCTTTGTTGATTATGC

TTGACAAAATCAGGTAAAGAGCTTCGTTATTGGTATCACCTATTACCCCCCAATCCAAAATCCAAAACTC

CATAACGCCATACTCAAAATTTAATCCTTCCAAATCATCTTTCTGATTTCCTCTCCGCCTACCAACCCAA

CAGCAGCAGGCCATCCTCCCAACGCACCAAAGACCCACCCATACGTCGCTTCATGCGCATACTTGACGCC

TCCCAGCAACAAATTGGCAACATCAAAGGCCAGACTCTCCTTGGGCGCAACCCTCATCACAAGCTGAGTG

CCCGTCTCGTCCACGTCCAAAGACCAGTCGAGGTCGAGCGTATGTCCAGAGCGCGAAATATCCACCGTGT

GGTTTTTGGTGGCCGAGTCGACGAGGTTGTATGCCAGCTCGATCTTGTCCGGGTTGCTGTAAAAGGACCA

GAAACCGCCCCAGGGAGGCGTAGATATGGTGATGGTGCCCCTTTGACCGACGGCTGTGAGCTTGCCGTTG

AGCGTCGTTTCGCCGGTTATGATGAACTCTATGCGCGCGCTGGGGCCCTCGCCAGAGTCAAAGTTGCTGA

GCGATGTGAGGACGATTTCGCCGATTCGACCACCGTTGATTGATGGGCCGGCTTCAAAGGGCAGATATTT

CTTCCTCTCTGCTTCCTGTAGGCCACAGATTAGCATATTGATTGCGCATTGAAATGAGTCTGTGAATATC

TCACGTTTGATCTGCTTGAAATGCCGGCAAAAGTAGGCCACCATTGGTTGTTGCCTTTGGTAATGTCAAA

GTGGATGTTTGTTATGAACATTTTGAGCCCCGGTGGGAGCTTGTCCACCACCAGAACTTGGCTGACTGAT

CCCCAGACCATTTTGGCAATGTAGTGTTGCTTGTATGAGTGAGATGGTAAAGAATAGAGAGATGCTGCGT

GCGTCTATTTTATGAAGGAGAAGGTGCTGCATTTATGATGAATATATAGCATCTTACACTGCAATGGTTC

ATAATTCGGCCAAGCGATATCATCACATGAACTATGGCATCGCTCTAGATCGGTCGAGATATCATCCGGC

ACTTCAGCTGCTGGCACCAGTACTCTCAACTGGCCAATTACCGCATGCTGATCGACCCCATTGCCCTCAG

CTGAAAAGATCATGGCCGACTCTTGCCACCCAGATTGTCCAGATTTGTCAACATGACTGCCAGGCCAAAG

CAAGGGAGGAATCAGACCGCCCGCAACGGCAACCATCTCTCTCAGCCGCTCTCAAACCTGGCTACACGGC

AAAAGATGGCAGTCCAGAACTCGCGACCCCCAGCCCGGCAGATGGCTAGATCGCAGTCTCCAGGCAATAT

TTCCCAGGGACCGTGGCTTGGCTAGCGGACGGGCCGCGCCTAAGTGGAGCAGAGAGGCTTAGGAGAGACA

AAAAGGCTCCAGCTCAGCTGGGCCAAGAGTCGATAATTCGCCTGTGGCGTGCCTGGAAACGGGGTGGTCC

GTTGATAGTTGCCTGTAGAGTTGTTCGTTTGGTCTGGTAGCGTCCCAGCTGTGATGCCTGCCCGAGGCGC

TCATCTCGTCTTATGTCCCCATTGGACCAGGTACATGCGTGTATATATAGACTGTATATGAACGGCACCA

ATGTCGTGTGAATTTTATCAAAGTAATAAAACTCTCTGTTTATTTCATTTGCCTTTTTTACTTGTTTTTT

TATTCCTATTTCGCATCACATCACAGTATATCCCAGCGCCATGGTCTATCTCCCCGCCACAAGACACCTC

AACGGCGTCCGCCTCCTCGCTCTGGATGGCGGCGGCGTCCGAGGCGTGGCATCCCTCATCATCCTCAAGG

AAATCATGAAGAGAGTCCAAGCGCGAAAGGGCCTCAAGGAGGAATGCCGTCCTGCAGACTACTTTGAGCT

CGGCGCGGGCACCAGCACTGGCGGTATCATCGGCATCATGCTCTTCCGGCTTCGCATGACGGCCTCGGAA

GCCATTGCAGAGTACGACGACATTTCCAAGGAGGTGTTTAGCCCCAAGATGTACGGCTGGAACATTACGC

GCGTGATGCCCAACAGGTTTGCTTCTTGGATCAACAACAGCAAGACGCTGGTGCAGAGCAGCCGGTTCGA

TGATGCATCGTTGAAGAAGGCCATTAACAAGGTTGTGGCCAAATATGGCCTGGACGAGGAGGACAGGCGG

TTAGAAGGCGATGCACCTTTACTACACCCCAAATCAGGCAGAATGTGGGTTCTGCAACACCTTGTCCGTT

ATACCTTGGATGAATGTATCTAATAAGATGATAGGATTGTCTGCACAACGGCCCAAAACAGGGCTGAAAC

AGTCCTGCTGAGATCCTACAAAGACAACACAATCCATGTCAAGTCCAAAGTCAACGATGCCATGAAGGAG

CACTCTGAGAAAATCACAATCAGCCTGGCCACACGAGCCACTTCCGCCGCACCCACTTACTTCCCCGAAG

TGAAGTGGCCAGAGCACGACCCCAAGTTGACATTCTGGGACGGCGGTCTCCTCAACAACAACCCCATCGA

CCAGCTGTGGTACTCGAGATATGAACTCGTCCAGCCAAGCGAGCCATCCCCTCCAGTCTCGTGCGTCATC

AGTCTGGGCACCGGCTACGTCAGGCCCGACTCGCCCTCAGAGTCATGGTTCCAGCTTGCGGGCGTGGCAT

CTTCCGTCATGGGCTTTGCGACAAACACAAATGCAAAGGGCAAGGACTTTTCACGGCACATGACGGCGTT

GAACAATCGTCCCGAGCATGCAAAGACGAGATATGTCAGATTAAACCCGTCGCTGGGTGCTAGCGATATT

GGACTGGCGGATTACACAAAGATGGAGGAGCTGAAGACGTTGGCGACCAAGTATATTGAGGACAAGGACA

ACCAGCTGTGGATTGACAAGGCTGTCCTCGCAGTGTGCGATGAGTAAGGGTTTGTGATGGTTTTGCTTGG

AAGAAATTGAAAGAGAATCTATGTATATGCCAGCGTGCGCAATGGATGATATTTTAGAAGTTGGAATGGA

TGAAACTACATGTTAATTTCGGTGTTAGATACAACAAGAAAGCCTTGCCTTCTGCATGTCGTTCCTCATT

TAGTACTGTTCTTGAAATTGTCTCATTCAAATTTCGGAATACTGAACCAAAACACCATTAAACATGTTAT

TCTCGAATATCATATGCGTCCTTCATAAAGTGCTCGAGACTTCACCCGCATCGACCTCTTCGCTCCGCTC

CGCCCCGCCCCGGCCGGCGGCACCGATAAAAAAAAATCCCCGCCGCGGGGGACCAACCCACCCGCCAAGG

CGGTCAAGCCCGGCAGAAATAATTCCTTCTCCGAATCCTCGATAGCAGCTCCAAGGTGACAACCTGCTGC

CATAACAAGACCATCCCCCCATCATTCGGCAGCGCATTTCTTAAGAGACACTCTCTGGCCACCGCCGTAG

ACGAATTCACTTCCATACCACATCGCCCTTGCCCATCATGAACGTCCCTTCACCTTTCGGCGGCAACACT

CCCTCCATTCCCCAGTTTGGTAACCAAGATCCAAATGTCAGAGCTGTAGGTCCCGCTGCTACCTTTACTT

TTCTTTTCTTCTCAGCGCATATACAGCTTTGCTAATTCGCTTTCGCGGGTCTAGATCCAAGGCGCAATGG

AGTCATGCTATGGAAAGTCCATCATGTCAGGTGTAATGGGTTTCGGCATGGGCGGACTGTTTGGTCTCTT

CATGGCTTCGGTACGTTTCTAGCCCATATTCCTCGTTTCCAGCTGCTCAAGCTAGCTCACTCCCAACATC

TTTGCACTTGTACTAACCTGGCTTTCTTTTTTTTTTCTTTTGCTATAGATGTCCTACGATACACCCTTCG

GCAGTCCCCTCCAAGGCGCCAACGGCCAACCCGCCGTCACCTCACTCCCCCTCCGCCAGCAGCTCAAAAT

CGGCTTCAAAGACATGGGCACGCGATCTTGGAGCATGGCAAAGAACTTTGGAAAGGTCGGCGGCCTGTTT

TCCGGAATCGAGTGCGGCATCGAGGGCCTGCGAGCCAAGAACGACCTGGTCAACGGCATGGCGGCGGGAT

GTCTAACGGGAGGCATCCTGGCCAAGAATGCGGGACCGCAGGCTGTTGTTGGAGGCTGCGCTGCGTTTGC

Diseño de oligos: se seleccionan las regiones flanqueantes con un mínimo de 1000 pb.

En la siguiente secuencia se reemplaza parte de la región que contiene el gen de la fosfolipasa y se sustituye por la secuencia del gen hph (secuencia en verde y azul de 1400 pb) para facilitar el diseño de los oligos quiméricos.

TCATTGAGTGGCACGATGTAT**CAACCTGGCTAGACCTGGGAC**ATTTGATGAGCATGAAAGAGCAAGGAGG

AGAAGAACGAAGATGGCAGTTATTGTTGATTCAAGACGCCAGGTATTAGTACTAGACGATATTCTGATGA

GGTTTACAAGTAGAAATGCGGCATATCTCTGTTT**GAGCGTGACAGTGCGTTCATGG**AAGCTTCTCGCATT

TCGCATTTCGTATTTCCCATCTGCACAACTGCCAGTCACTAAAGAGACAGACCTGCTTTGTTGATTATGC

TTGACAAAATCAGGTAAAGAGCTTCGTTATTGGTATCACCTATTACCCCCCAATCCAAAATCCAAAACTC

CATAACGCCATACTCAAAATTTAATCCTTCCAAATCATCTTTCTGATTTCCTCTCCGCCTACCAACCCAA

CAGCAGCAGGCCATCCTCCCAACGCACCAAAGACCCACCCATACGTCGCTTCATGCGCATACTTGACGCC

TCCCAGCAACAAATTGGCAACATCAAAGGCCAGACTCTCCTTGGGCGCAACCCTCATCACAAGCTGAGTG

CCCGTCTCGTCCACGTCCAAAGACCAGTCGAGGTCGAGCGTATGTCCAGAGCGCGAAATATCCACCGTGT

GGTTTTTGGTGGCCGAGTCGACGAGGTTGTATGCCAGCTCGATCTTGTCCGGGTTGCTGTAAAAGGACCA

GAAACCGCCCCAGGGAGGCGTAGATATGGTGATGGTGCCCCTTTGACCGACGGCTGTGAGCTTGCCGTTG

AGCGTCGTTTCGCCGGTTATGATGAACTCTATGCGCGCGCTGGGGCCCTCGCCAGAGTCAAAGTTGCTGA

GCGATGTGAGGACGATTTCGCCGATTCGACCACCGTTGATTGATGGGCCGGCTTCAAAGGGCAGATATTT

CTTCCTCTCTGCTTCCTGTAGGCCACAGATTAGCATATTGATTGCGCATTGAAATGAGTCTGTGAATATC

TCACGTTTGATCTGCTTGAAATGCCGGCAAAAGTAGGCCACCATTGGTTGTTGCCTTTGGTAATGTCAAA

GTGGATGTTTGTTATGAACATTTTGAGCCCCGGTGGGAGCTTGTCCACCACCAGAACTTGGCTGACTGAT

CCCCAGACCATTTTGGCAATGTAGTGTTGCTTGTATGAGTGAGATGGTAAAGAATAGAGAGATGCTGCGT

GCGTCTATTTTATGAAGGAGAAGGTGCTGCATTTATGATGAATATATAGCATCTTACACTGCAATGGTTC

ATAATTCGGCCAAGCGATATCATCACATGAACTATGGCATCGCTCTAGATCGGTCGAGATATCATCCGGC

ACTTCAGCTGCTGGCACCAGTACTCTCAACTGGCCAATTACCGCATGCTGATCGACCCCATTGCCCTCAG CTGAAAAGATCATGGCC**GACTCTTGCCACCCAGATTGTCCGATCGACGTTAACTGATATTGAAGG**AGCATTTTTTGGGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAACAATGAATGCCTATTTTGGTTTAGTCGTCCAGGCGGTGAGCACAAAATTTGTGTCGTTTGACAAGATGGTTCATTTAGGCAACTGGTCAGATCAGCCCCACTTGTAGCAGTAGCGGCGGCGCTCGAAGTGTGACTCTTATTAGCAGACAGGAACGAGGACATTATTATCATCTGCTGCTTGG

TGCACGATAACTTGGTGCGTTTGTCAAGCAAGGTAAGTGGACGACCCGGTCATACCTTCTTAAGTTCGCCCTTCCTCCCTTTATTTCAGATTCAATCTGACTTACCTATTCTACCCAAGCATCCAAATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAGTTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTCACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTCCAGCCGGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCATGCGGATTTCGGCTCCAACAATGTCCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTCGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCCTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGCCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCC**CAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG**GAGGAGCTGAAGACGTTGGCGACCAAGTATATTGAGGAAAGGACAACCAGCTGTGGATTGACAAGGCTGTCCTCGCAGTGTGCGATGAGTAAGGGTTTGTGATGGTTTTGCTTGGAAGAAATTGAAAGAGAATCTATGTATATGCCAGCGTGCGCAATGGATGATATTTTAGAAGTTG

AATGGATGAAACTACATGTTAATTTCGGTGTTAGATACAACAAGAAAGCCTTGCCTTCTGCATGTCGTTCCTCATT

TAGTACTGTTCTTGAAATTGTCTCATTCAAATTTCGGAATACTGAACCAAAACACCATTAAACATGTTAT

TCTCGAATATCATATGCGTCCTTCATAAAGTGCTCGAGACTTCACCCGCATCGACCTCTTCGCTCCGCTC

CGCCCCGCCCCGGCCGGCGGCACCGATAAAAAAAAATCCCCGCCGCGGGGGACCAACCCACCCGCCAAGG

CGGTCAAGCCCGGCAGAAATAATTCCTTCTCCGAATCCTCGATAGCAGCTCCAAGGTGACAACCTGCTGC

CATAACAAGACCATCCCCCCATCATTCGGCAGCGCATTTCTTAAGAGACACTCTCTGGCCACCGCCGTAG

ACGAATTCACTTCCATACCACATCGCCCTTGCCCATCATGAACGTCCCTTCACCTTTCGGCGGCAACACT

CCCTCCATTCCCCAGTTTGGTAACCAAGATCCAAATGTCAGAGCTGTAGGTCCCGCTGCTACCTTTACTT

TTCTTTTCTTCTCAGCGCATATACAGCTTTGCTAATTCGCTTTCGCGGGTCTAGATCCAAGGCGCAATGG

AGTCATGCTATGGAAAGTCCATCATGTCAGGTGTAATGGGTTTCGGCATGGGCGGACTGTTTGGTCTCTT

CATGGCTTCGGTACGTTTCTAGCCCATATTCCTCGTTTCCAGCTGCTCAAGCTAGCTCACTCCCAACATC

TTTGCACTTGTACTAACCTGGCTTTCTTTTTTTTTTCTTTTGCTATAGATGT**CCTACGATACACCCTTCG**

**GCAG**TCCCCTCCAAGGCGCCAACGGCCAACCCGCCGTCACCTCACTCCCCCTCCGCCAGCAGCTCAAAAT

CGGCTTCAAAGACATGGGCACGCGATCTTGGAGCATGGCAAAGAACTTTGGAAAGGTCGGCGGCCTGTTT

TCCGGAATCGAGTGCGGCATCGAGGGCCTGCGAGCCAAGAACGACCTGGTCAACGGCATGGCGGCGGGAT

GTCTAACGGGAGGCATCCTGGCCAAGAATGCGGGACCGCAGGCTGTTGTTGGAGGCTGCGCTGCGTTTGC

flnFosFwd CAA CCT GGC TAG ACC TGG GAC

FosQuim1 CCTTCAATATCAGTTAACGTCGATCGGACAATCTGGGTGGCAAGAGTC

FosQuim2 CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGGAGGAGCTGAAGACGTTGGCG

flnFosRev ATG CTC CAA GAT CGC GTG CCC

NestFos1 GAG CGT GAC AGT GCG TTC ATG G

NestFos2 CTG CCG AAG GGT GTA TCG TAG G

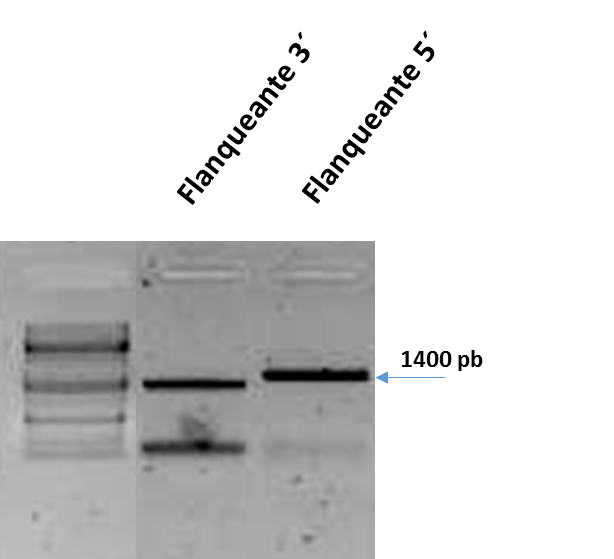
Condiciones del PCR para amplificar el gen hph y las regiones flanqueantes 5´ y 3´.

|  |  |
| --- | --- |
| **PCR flanqueante 5´** | |
| Buffer HF 10X | 5 μl |
| MgSO4 | 2 μl |
| dNTP´s (10 mM) | 2 μl |
| flnFosFwd (10 mM) | 2 μl |
| FosQuim1 (10 mM) | 2 μl |
| DNA genómico (1 ng/μl) | 2 μl |
| High Fidelity (Invitrogen) | 0.25 μl |
| H2O mQ | 34.75 μl |

|  |  |
| --- | --- |
| **PCR flanqueante 3´** |  |
| Buffer HF 10X | 5 μl |
| MgSO4 | 2 μl |
| dNTP´s (10 mM) | 2 μl |
| flnFosFwd (10 mM) | 2 μl |
| FosQuim1 (10 mM) | 2 μl |
| DNA genómico (1 ng/μl) | 2 μl |
| High Fidelity (Invitrogen) | 0.25 μl |
| H2O mQ | 34.75 μl |

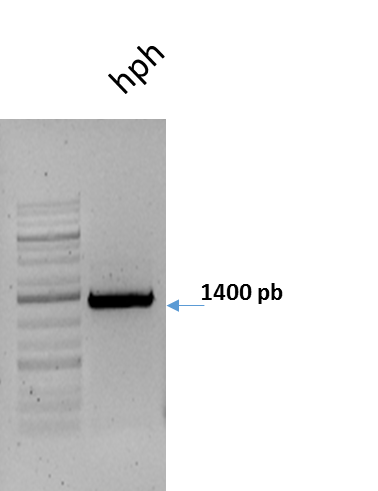
|  |  |
| --- | --- |
| **PCR hph** |  |
| Buffer HF 10X | 5 μl |
| MgSO4 | 2 μl |
| dNTP´s (10 mM) | 2 μl |
| hphFwd (10 mM) | 2 μl |
| hphRev (10 mM) | 2 μl |
| Plásmido pCB1004 (1 ng/μl) | 2 μl |
| High Fidelity (Invitrogen) | 0.25 μl |
| H2O mQ | 34.75 μl |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 94°C | 3 min | 1 ciclo | Flanqueante 5´  Flanqueante 3´ |
| 94°C | 30 seg | 32 ciclos |
| 58°C | 30 seg |
| 68°C | 1.30 min |
| 68°C | 5 min | 1 ciclo |



PCR de la región flanqueante 3’ (1100 pb) y la región flanqueante 5´(1400 pb)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 94°C | 3 min | 1 ciclo | hph |
| 94°C | 30 seg | 32 ciclos |
| 60°C | 30 seg |
| 68°C | 1.30 min |
| 68°C | 5 min | 1 ciclo |



PCR del gen hph (1400 pb)

**Condiciones del empalme**

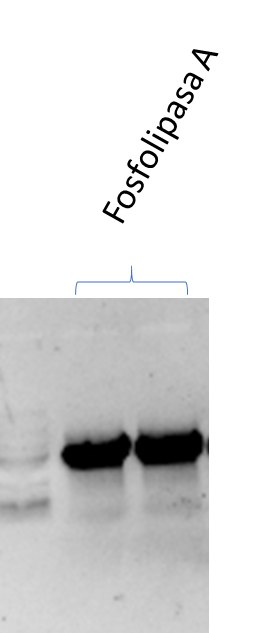
|  |  |
| --- | --- |
| **PCR empalme** | |
| Buffer HF 10X | 5 μl |
| MgSO4 | 2 μl |
| dNTP´s (10 mM) | 2 μl |
| Flanqueante 5´ | 1 μl |
| Flanqueante 3´ | 1 μl |
| hph | 1 μl |
| High Fidelity (Invitrogen) | 0.25 μl |
| H2O mQ | 37.75 μl |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 94°C | 5 min | 1 ciclo | Empalme |
| 94°C | 1 min | 10 ciclos |
| 58°C | 3 min |
| 68°C | 10 min |
| 68°C | 20 min | 1 ciclo |

**PCR final**

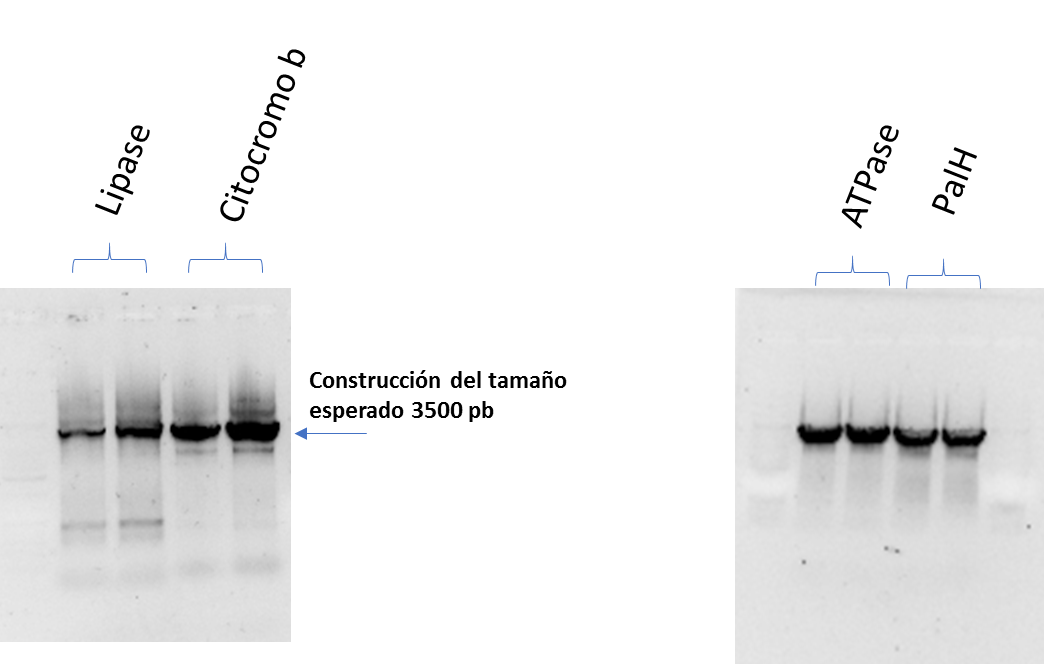
|  |  |
| --- | --- |
| **PCR flanqueante 5´** | |
| Buffer HF 10X | 5 μl |
| MgSO4 | 2 μl |
| dNTP´s (10 mM) | 2 μl |
| NestFos1 (10 mM) | 2 μl |
| NestFos2 (10 mM) | 2 μl |
| Empalme | 2 μl |
| High Fidelity (Invitrogen) | 0.25 μl |
| H2O mQ | 34.75 μl |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 94°C | 3 min | 1 ciclo | Construcción final |
| 94°C | 30 seg | 32 ciclos |
| 58°C | 30 seg |
| 68°C | 3.30 min |
| 68°C | 5 min | 1 ciclo |



Amplificación por PCR de la construcción para mutar el gen de fosfolipasa A

Con las mismas condiciones del empalme para la Fosfolipasa se lograron realizar las construcciones para mutar los genes que codifican para una lipasa, citocromo b5, ATPase y PalH.



Nota: es deseable que la Tm de los oligos esté entre 58-60°C. Es recomendable utilizar la enzima Platinum High Fidelity (Invitrogen) para la construcción, en experimento previos se utilizó la Fhusion Polimerase, sin embargo, el análisis por electroforesis del PCR final se observan muchas bandas inespecíficas.