[](https://www.google.cl/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi51sTltPvOAhVGD5AKHemtA6sQjRwIBw&url=http://noticias.unab.cl/destacados-universidad/unab-informa-suspension-de-clases-este-lunes-18-de-abril-en-sede-santiago/attachment/logo-universidad-andres-bello-2013-nuevo/&psig=AFQjCNGcNvzuyAxyyL13yE1oDgq_HpKFOw&ust=1473274353062819)

**Universidad Andrés Bello**

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**“Desarrollo de biosensores multiespectrales”**

Proyecto de Tesis presentado como parte de los requisitos para optar al Grado de **Magíster en Biotecnología**

**Co-director de Tesis:** Dr.Fernán Federici

Facultad de Ciencias Biológicas

Laboratorio de Biología Sintética

Universidad Católica de Chile

**Co-director de Tesis:** Dr. Timothy Rudge

Facultad de Ingeniería

Universidad Católica de Chile

**Profesor Patrocinador:** Dr.Fernando González Nilo

Facultad de Ciencias Biológicas

Centro de Biología Integrativa y Bioinformática

Universidad: Universidad Andrés Bello

**Macarena Andrea Muñoz Silva**

Santiago, Chile.

Diciembre, 2016.

**ÍNDICE**

[1. RESUMEN 3](#_Toc502841377)

[2. INTRODUCCIÓN 4](#_Toc502841378)

[2.1 Biología sintética 4](#_Toc502841379)

[2.2 Partes, dispositivos y sistemas de regulación transcripcional 4](#_Toc502841380)

[2.3 Construcción de Sistemas 5](#_Toc502841381)

[2.3.1 Ensamblaje Gibson 5](#_Toc502841382)

[2.3.2 Clonamiento Golden Gate 6](#_Toc502841383)

[2.4 Sistemas de regulación génica y su utilización como biosensores 7](#_Toc502841384)

[2.4.1 Selectividad de los biosensores 7](#_Toc502841385)

[2.5 Biosensores microbianos 8](#_Toc502841386)

[2.6 Tipos de señales de detección 8](#_Toc502841387)

[2.6.1 Biosensores electroquímicos 8](#_Toc502841388)

[2.6.2 Biosensores Ópticos 9](#_Toc502841389)

[2.7 Estudio de la dinámica de redes génicas en respuesta a la presencia de compuestos de interés 10](#_Toc502841390)

[2.8 Hipótesis 14](#_Toc502841391)

[2.9 Objetivos 14](#_Toc502841392)

[2.9.1 Objetivo general 14](#_Toc502841393)

[2.9.2 Objetivos específicos 14](#_Toc502841394)

[3. MATERIALES Y MÉTODOS 15](#_Toc502841395)

[3.1 Material biológico 15](#_Toc502841396)

[3.1.1 Cepas Bacterianas 15](#_Toc502841397)

[3.2 Diseño experimental 15](#_Toc502841398)

[3.2.1 Implementar un sistema de ensamblaje de ADN que permita la fabricación combinatorial y eficiente de sistemas genéticos. 15](#_Toc502841399)

[3.2.2 Purificación de piezas de DNA para ensamblaje desde gel 25](#_Toc502841400)

[3.2.3 Transformación de bacterias 26](#_Toc502841401)

[3.2.4 Selección colonias positivas de bacterias transformadas, generación de stocks en glicerol y cultivos líquidos 26](#_Toc502841402)

[3.2.5 Extracción y purificación de plásmidos utilizando un kit comercial 27](#_Toc502841403)

[3.2.6 Evaluar si la utilización de dos reporteros de referencia otorga mayor robustez a la información obtenida con un tercer reportero 27](#_Toc502841404)

[3.2.7 Evaluar si la utilización de tres reporteros otorga información suficiente para distinguir/analizar más de dos señales de interés. 28](#_Toc502841405)

[3.2.8 Analizar la información contenida en las mediciones de fluorescencia y densidad con respeto al entorno y las señales 29](#_Toc502841406)

[4. Resultados 31](#_Toc502841407)

[5. Discusión 32](#_Toc502841408)

[6.REFERENCIAS 32](#_Toc502841409)

[ANEXO 35](#_Toc502841410)

1. RESUMEN

El problema que representa la organización y expresión en los sistemas complejos, puede ser simplificada al considerar las redes génicas como elementos compuestos por subconjuntos de partes o módulos. La biología sintética, utiliza este enfoque, aplicando conceptos de la Ingeniería con el fin de construir sistemas predecibles y robustos con nuevas funciones celulares. En esta disciplina, existe una estructura jerárquica para construir los sistemas de regulación transcripcional, se encuentran las Partes, que son combinadas para formar los Dispositivos, los cuales pueden ser combinados para constituir Sistemas transcripcionales. Existen variadas técnicas para el ensamblaje de estos componentes, las cuales tienen como objetivo una construcción ordenada, siguiendo una estructura básica correspondiente a Promotor, Sitio de Unión al Ribosoma (RBS), Región Codificante y Terminador. Dado que los organismos poseen redes génicas que son robustas para responder a diversas señales, la biología sintética busca estudiar estas características para crear sistemas programables, utilizando microorganismos como las bacterias. Las propiedades ópticas de las sustancias, como la biolumunuscencia o fluorescencia, son la base de los biosensores ópticos, donde algunos se basan en el uso de proteínas fluorescentes como reporteros, utilizando la intensidad y la dinámica de cambio de esta señal como parámetro para su medición. Los cambios en la expresión de los reporteros se definen mediante variaciones intrínsecas y extrínsecas tanto al promotor como al contexto celular, las cuales son impredecibles, por lo que es necesario contar con métodos de medición confiables, que permitan diferenciar los cambios específicos frente a señales de interés de los cambios globales en la expresión. Una serie de promotores diferentes serán fusionados a tres reporteros fluorescentes de forma combinatoria en vectores de destino para estudiar sus dinámicas de expresión de manera simultánea y en conjunto con herramientas matemáticas y computacionales, se determinará si es posible obtener una mayor cantidad de información, y si esta es robusta y útil para el análisis de señales de interés.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Biología sintética

Las células en los organismos constituyen sistemas dinámicos complejos que son capaces de procesar información biológica y fisiológica importante, mediante la detección, integración y almacenamiento de señales internas y externas. Este procesamiento de información les permite “tomar” decisiones sobre su diferenciación, migración, interacción con otras células y tasa metabólica, basándose en la variación de su expresión génica (MacDonald y Deans, 2016; Alon, 2007).

El problema que representa la organización y expresión en los organismos, puede ser simplificada al considerar las redes génicas como elementos compuestos por subconjuntos de partes o módulos. En este fundamento se basa la biología sintética, que utiliza este enfoque para construir arquitecturas génicas nuevas que pueden realizar funciones complejas. Este campo, aplica paradigmas de la Ingeniería con el fin de construir sistemas predecibles y robustos con nuevas funciones celulares (Bashor *et al.*, 2010; MacDonald y Deans, 2016).

2.2 Partes, dispositivos y sistemas de regulación transcripcional

En biología sintética existe una estructura jerárquica para construir los sistemas de regulación transcripcional, en primer lugar, se encuentran las Partes, que corresponden a secuencias de DNA con una función biológica puntual, por ejemplo, un promotor o una región codificante. Estas partes son sometidas a métodos de caracterización y evaluaciones en distintas condiciones, de forma de que al utilizarlas se pueda predecir su comportamiento a partir de los parámetros obtenidos. Las partes no son utilizadas solas, ya que sólo representan una función biológica, sino que son combinadas para formar los Dispositivos, donde las primeras en conjunto tendrán una función biológica de orden mayor, como la expresión de una proteína, pero con propiedades dinámicas deseadas. Los dispositivos comparten una estructura génica similar entre si, pero tienen diferentes funciones en base a las partes individuales que lo conforman. De igual forma que con las partes, los dispositivos pueden ser combinados para constituir Sistemas transcripcionales, donde pueden cumplir funciones individuales o interactuar entre ellos, en el caso de que sus productos génicos tengan influencia sobre la expresión del producto de otro dispositivo. Los sistemas posteriormente son implementados en un Chasis, el cual puede ser una célula procarionte o eucarionte, o bien pueden ser Cell-Free (Noireaux, Bar-Ziv y Libchaber, 2003), que poseen todos los elementos biológicos necesarios para transcribir y traducir los Dispositivos del Sistema, así como también cualquier sustrato enzimático que pudiese ser requerido (Bashor *et al.*, 2010; Baldwin, 2012; MacDonald y Deans, 2016).

2.3 Construcción de Sistemas

Existen variadas técnicas para el ensamblaje de partes, dispositivos y sistemas transcripcionales, las cuales tienen como objetivo común la construcción ordenada de Sistemas de expresión, siguiendo una estructura básica correspondiente a Promotor, Sitio de Unión al Ribosoma (RBS), Región Codificante (CDS) y Terminador.

2.3.1 Ensamblaje *Gibson*

El ensamblaje *Gibson* consiste en el uso de tres enzimas en una sola reacción para el ensamblaje de moléculas de DNA o “Piezas” de gran tamaño. La reacción se produce en un tubo de 0,2 ml a 50°C, donde las enzimas utilizadas son una T5 exonucleasa 5’; una polimerasa de alta fidelidad, que posee una menor tasa de error que las polimerasas utilizadas comúnmente; y una DNA Ligasa *Taq*. Este tipo de ensamblaje permite la unión de fragmentos del orden de los 600 kb tanto para formar moléculas lineales como circularizadas, con una tasa de error baja, siendo esta un error cada 50 moléculas de DNA ensambladas, y al realizarse en un solo paso, simplifica el proceso y disminuye el tiempo invertido, además de evitar el uso de enzimas de restricción. Las moléculas de DNA contienen secuencias homologas en sus extremos, que podrán unirse por complementariedad luego de que la exonucleasa corte en los extremos 5’, posteriormente la Polimerasa y la DNA ligasa reparan y unen las moléculas (Gibson *et al.*, 2009). De esta forma la técnica asegura el ensamblaje ordenado tanto de partes como dispositivos dentro de los sistemas.

2.3.2 Clonamiento *Golden Gate*

El Clonamiento *Golden Gate* se basa en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS, las cuales cortan fuera del sitio de reconocimiento de la enzima hacia uno de sus lados, esta secuencia es asimétrica (Weber *et al*., 2011). La orientación de estos sitios determina que fragmentos retienen el sitio de reconocimiento luego de la digestión, lo que permite liberar los fragmentos y el vector aceptor eliminando los sitios de restricción. Los extremos generados por la digestión son diseñados para ser complementarios y son ligados en la misma reacción. El producto de ligación no posee los sitios de reconocimiento, evitando que pueda volver a ser digerido y ligado. Las secuencias que flanquean los fragmentos de DNA a ensamblar pueden ser secuencias de 4 nucleótidos a elección, que presentan homología, por lo que permitirá el ensamblaje ordenado de las partes de interés (Engler y Marillonet, 2014). Uno de los métodos basados en el Clonamiento *Golden Gate* es el Clonamiento Modular o *MoClo* (Weber *et al.*, 2011), por su nombre en inglés, en el cual existen vectores que poseen partes individuales, denominados módulos de nivel 0, que pueden contener Promotores, regiones 5’UTR o RBS, Secuencias Codificantes o CDS y Terminadores, los cuales están flanqueados por los sitios de restricción seguido de una secuencia de 4 nucleótidos, que en el sistema *CIDAR* se nombran con letras desde la A hasta la H (Iverson *et al*., 2016), permitiendo su ensamblaje en orden en vectores distintos a los primeros, dando paso a las Unidades Transcripcionales (TUs), correspondientes a construcciones de nivel 1. Finalmente, puede realizar un ensamblaje de múltiples TUs en un nuevo vector, dando paso a construcciones de nivel 2 (Weber *et al.*, 2011; Iverson *et al*., 2016).

2.4 Sistemas de regulación génica y su utilización como biosensores

Dado que los organismos han creado redes génicas que son robustas para responder a los cambios del entorno, resulta atractivo para la biología sintética poder explorar esta propiedad para crear sistemas programables, para detectar de forma robusta moléculas de interés u otras propiedades del ambiente (Cooper y Hall, 1988; MacDonald y Deans, 2016).

Los biosensores son dispositivos analíticos que utilizan componentes biológicos para responder selectivamente a una propiedad de interés. En el caso de contaminantes, por ejemplo, la concentración de estas moléculas será convertida por el dispositivo en información interpretable por el usuario. Los biosensores transforman información de interés del ambiente en otro tipo de información que es accesible al usuario, en este caso, para inferir o medir la presencia y/o nivel de una condición de interés. Esta transformación de la información suele estar basada en la detección de una molécula de interés y producción de una señal o conjunto de señales químicas, ópticas, eléctricas o de otra naturaleza (Cooper y Hall, 1988; Lowe, 1989; Lei, Chen y Mulchandani, 2006). De esta forma mediante el uso de dispositivos es posible programar a las células para que realicen la función de biosensor en gran variedad de campos, desde medicina hasta medioambiente (Cooper y Hall, 1988).

2.4.1 Selectividad de los biosensores

Dentro de los tipos de biosensores, los más comunes corresponden a los sensores directos o específicos, los cuales utilizan componentes internos conocidos a priori, como, por ejemplo, un receptor, para detectar una condición externa, como un contaminante, producir una señal que pueda ser caracterizada por el usuario. Estos biosensores suelen construirse mediante el uso de células conteniendo un gen reportero, cuya regulación está dada por la condición de interés (Su *et al*., 2011), como, por ejemplo, al utilizar el promotor de un gen cuya transcripción es activada por un receptor o un factor de transcripción en respuesta a la presencia de una señal en la muestra analizada. También se ha descrito el uso de enzimas, anticuerpos o receptores inmovilizados en matrices sólidas, que producen una señal medible, como la producción de compuestos coloreados, cambios de concentración de protones, emisión de luz o cambios en el potencial de membrana, frente a la presencia de la condición de estudio (Lei, Chen y Mulchandani, 2006). Avances en el campo de la biología sintética han dado lugar al desarrollo de sensores de orden mayor; capaces de integrar múltiples señales y transformar información compleja del contexto celular en información detectable por el usuario (Tamsir *et al.*, 2011; Nielsen *et al*., 2016; Benenson, 2012; Siuti *et al*., 2013).

2.5 Biosensores microbianos

Dentro de los tipos de organismos que se pueden utilizar para construir biosensores se encuentran los microorganismos como bacterias y levaduras, las cuales ofrecen ventajas en la capacidad para detectar un amplio rango de sustancias químicas, además de docilidad genética y tolerancia a rangos amplios de pH y temperatura (Lei, Chen y Mulchandani, 2006). Pueden ser fácilmente manipuladas y adaptadas para detectar diferentes tipos de sustancias, de ellas se puede obtener información tanto cuantitativa como cualitativa robusta, dado que son capaces de monitorear constantemente su entorno, detectando cambios muy pequeños y reaccionando frente a ellos de forma adecuada (Bousse, 1996; Lei, Chen y Mulchandani, 2006). Los biosensores microbianos han sido ampliamente utilizados para detectar gran variedad de analitos de interés, como metales pesados, aniones, azúcares, drogas, contaminantes orgánicos, entre otros. De esta forma, mediante ingeniería genética, es posible modificar bacterias para sensar diferentes tipos de sustancias, entregando señales medibles (Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Reshetilov, Iliasov y Reshetilova, 2010).

2.6 Tipos de señales de detección

Existen diferentes formas de cuantificar la información entregada por los biosensores microbianos, pero existen dos categorías principales que son más utilizadas, correspondientes a biosensores electroquímicos y biosensores ópticos.

2.6.1 Biosensores electroquímicos

Se basan en la detección de variaciones eléctricas entre las células y las muestras medidas, existen dos tipos de biosensores electroquímicos comúnmente utilizados: amperométricos y potenciométricos. Los primeros, basados en la utilización de un potencial fijo respecto a un electrodo de referencia, detectando la corriente eléctrica generada al producirse la oxidación o reducción de especies en la superficie de un electrodo distinto al de referencia. Este tipo de biosensores tiene buena sensibilidad y estabilidad, sin embargo, posee baja selectividad (Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Reshetilov, Iliasov y Reshetilova, 2010; Ji Won Lim *et al*., 2015). Los segundos, se basan en el uso de un electrodo selectivo para un tipo de ion o un electrodo que detecte gas recubierto con una capa de bacterias, y un electrodo de referencia. Las bacterias son capaces de metabolizar el analito y producen un cambio de potencial como resultado de la acumulación o pérdida del ion para el que el electrodo es específico. Este tipo de biosensor tiene una alta selectividad y sensibilidad, sin embargo, requiere un electrodo de referencia muy estable para realizar una detección adecuada (Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Reshetilov, Iliasov y Reshetilova, 2010; Ji Won Lim *et al*., 2015).

2.6.2 Biosensores Ópticos

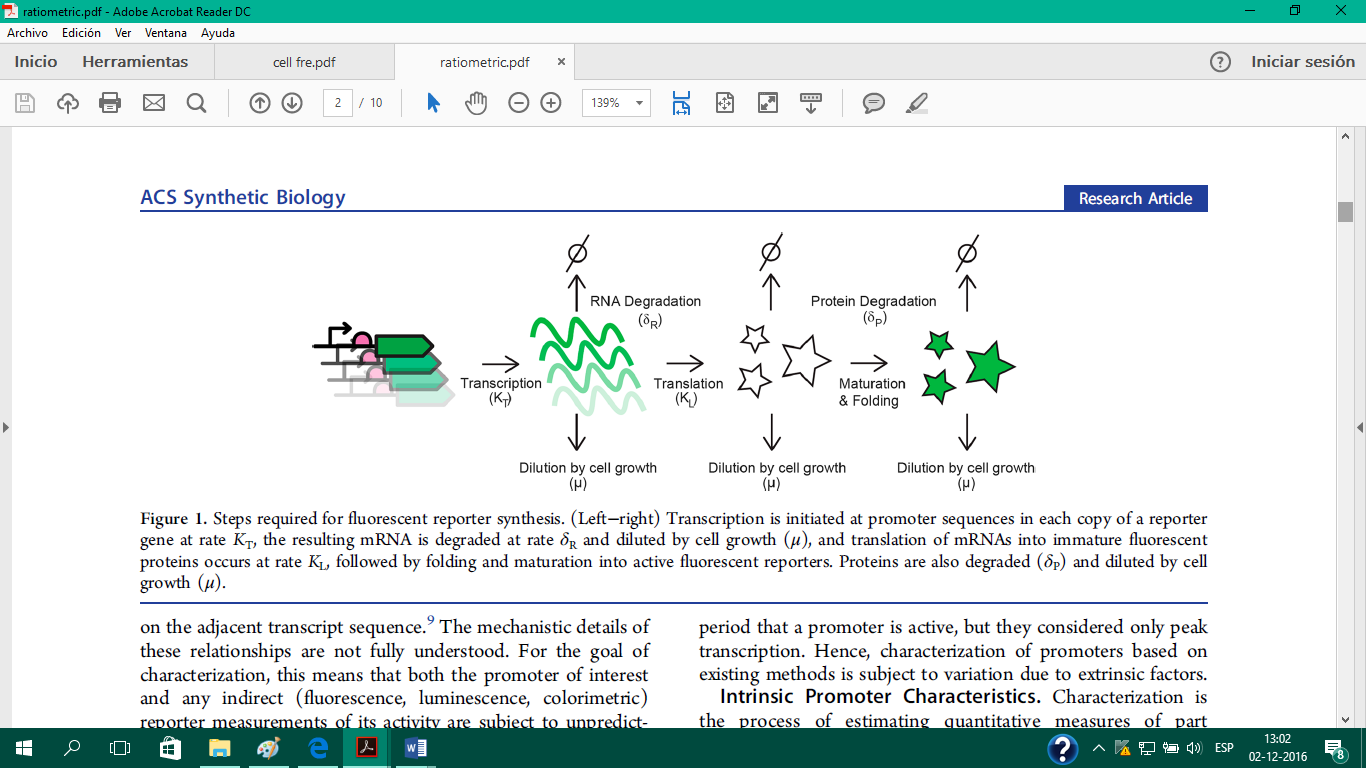
Las propiedades ópticas de las sustancias como absorción en el espectro UV-Visible, la bio- o quimioluminiscencia, la reflectancia o la fluorescencia son la base de este tipo de biosensores, los cuales ofrecen ventajas como ser compactos y de bajo costo de operación. Los principales biosensores ópticos utilizados son los bioluminicentes, fluorescentes y colorimétricos. En todos los casos se utilizan genes reporteros que pueden ser utilizados de forma inducible o constitutiva, dependiendo del tipo de biosensor que se desea construir (Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Ji Won Lim *et al*., 2015).

La bioluminiscencia se refiere al proceso de emisión de luz visible en organismos vivos mediante la reacción catalítica de una enzima. Este fenómeno se ha observado en diferentes organismos como bacterias, hongos, insectos y algas, entre otros. Las enzimas que catalizan esta reacción se denominan luciferasas y sus sustratos luciferinas, sin embargo, varía el proceso según cada especie (Meighen, 1993). En el caso de los biosensores de este tipo se utilizan reporteros como el gen *lux* presente bacterias bioluminiscentes, y la intensidad de la luz emitida indica según la especificidad del biosensor la concentración del analito o su influencia sobre el metabolismo del biosensor (Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Lim *et al*., 2015). De manera similar ocurre con los biosensores fluorescentes; basados en el uso de proteínas fluorescentes como GFP (Green Fluorescent Protein) u otras de distintos colores (Hsiu-Chuan Liao y Ou, 2005), utilizan la intensidad y la dinámica de cambio de esta señal como output para su medición (Hsiu-Chuan Liao y Ou, 2005; Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Ji Won Lim *et al*., 2015).

Para el caso de los biosensores colorimétricos, basta que las células expresen una enzima capaz de producir un compuesto coloreado, ya que este tipo de biosensor se basa en los cambios de color dentro de las células o en el medio donde se encuentran en presencia del analito a detectar (Hsiu-Chuan Liao y Ou, 2005; Lei, Chen y Mulchandani, 2006; Park, Tsai y Chen, 2013).

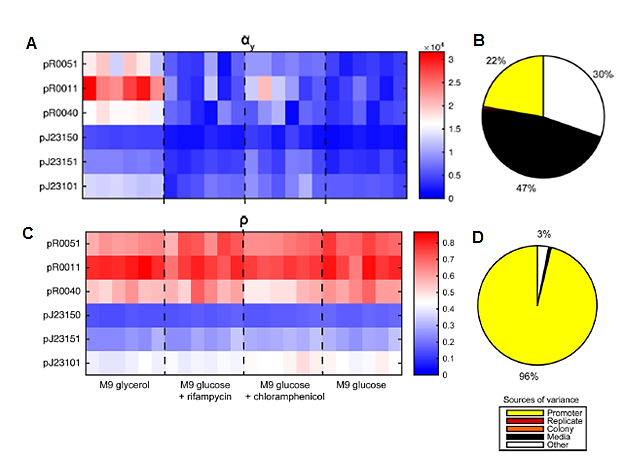
2.7 Estudio de la dinámica de redes génicas en respuesta a la presencia de compuestos de interés

Si bien, los biosensores ópticos, basados en proteínas fluorescentes, presentan ventajas frente a sensores de otra naturaleza, su utilización debe ir acompañada de un análisis adecuado para obtener mayor y mejor información respecto al analito bajo evaluación. En el caso de proteínas fluorescentes acopladas a promotores existen una serie de factores que pueden influenciar su transcripción y traducción (Elowitz, 2002). Esto se debe a que, al introducir un sistema o circuito génico en una célula, este depende netamente de los componentes celulares que la última posea para ser transcrito y traducido, los cuales corresponden a RNA polimerasas, ribosomas, tRNAs, entre otros, y no sólo su promotor (Elowitz, 2002; Rudge y Federici, 2016). Cambios en cada uno de estos parámetros llevará a diferencias en la lectura de la fluorescencia que no corresponden a cambios en la expresión del gen. Parte de estos factores, en conjunto con el contexto de medición de expresión y el sistema de medición, introducen una variación extrínseca a la forma en que el promotor dirige la transcripción de un gen. Además, la variación intrínseca de un promotor corresponde a la transcripción dirigida por este, de forma específica en una serie de contextos o condiciones diferentes (Rudge y Federici, 2016; Figura 2.7.1).



**Figura 2.7.1. Pasos para la síntesis de un reportero fluorescente.** (De izquierda a derecha) La transcripción es iniciada en una secuencia promotora en cada copia de un gen reportero a una tasa KT, el mRNA resultante se degrada a una tasa δR y diluido por el crecimiento celular (µ), y la traducción de mRNAs a proteínas fluorescentes inmaduras ocurre a una tasa KL, seguido de plegamiento y maduración a una proteína fluorescente activa. Las proteínas también se degradan (δP) y diluidas por el crecimiento celular (µ) (figura tomada desde Rudge *et al*., 2016).

Es por esto, que se hace necesario contar con métodos de medición confiables, que permitan determinar cómo se comportan las partes y/o sistemas génicos, permitiendo diferenciar los cambios específicos por señales de interés de los cambios globales que pueden ser introducidos por factores externos a la transcripción (Kelly *et al*., 2009; Rudge y Federici, 2016). En Rudge y Federici, 2016, se desarrolló un método, para abordar el problema de separar las variaciones específicas y globales en la transcripción. Este método utiliza combinaciones de dos reporteros fusionados a promotores, y se encontró que la tasa de producción de los reporteros se correlacionaba fuertemente. Considerando la razón de las tasas de producción de los reporteros, se redujo la variación extrínseca a menos de un 4%, obteniendo información específica respecto al comportamiento de los promotores estudiados (Figura 2.7.2). Esta razón se considera intrínseca a los promotores. Sin embargo, en este caso, los promotores utilizados, al ser constitutivos, no respondían de forma específica a señales, pero se sugiere que este método permite diferenciar entre las variaciones por factores intrínsecos y extrínsecos para cualquier tipo de promotor.



**Figura 2.7.2. Método de dos reporteros para extraer información de variabilidad especifica del promotor de interés.** A) Análisis de expresión de 6 promotores en 4 condiciones diferentes. B) Fuentes de variabilidad en los datos utilizando un reportero. C) Análisis de expresión de los mismos 6 promotores en 4 condiciones diferentes, pero utilizando el método de dos reporteros. D) Fuentes de variabilidad en los datos utilizando dos reporteros (figura modificada desde Rudge y Federici, 2016).

En este estudio, el uso de dos promotores permitió separar la variación extrínseca que afecta la expresión de los reporteros para un solo promotor, utilizando un segundo promotor como referencia.

En este proyecto, se desea estudiar la dinámica de respuesta de redes génicas a la presencia de compuestos de interés utilizando promotores diferentes que serán fusionados a tres reporteros fluorescentes de manera combinatorial en un vector para estudiar sus dinámicas de expresión de manera simultánea. Con los métodos de construcción descritos anteriormente, se pueden elaborar reporteros cuya actividad estará ligada a redes génicas, y que están influenciadas por propiedades externas. Esto representa una ventaja cuando no es posible encontrar un anticuerpo, enzima, receptor o molécula biológica específica para sensar un analito de interés, lo cual dificulta las estrategias para su detección. Si se considera que las células poseen redes génicas de regulación robustas y precisas, que se comportarán de forma similar cada vez que las células son expuestas a la misma muestra (Bashor *et al.*, 2010; MacDonald y Deans, 2016), se sugiere que se pueden construir redes con reporteros, que podrían entregar suficiente información para diferenciar muestras.

Dado que en el trabajo mencionado anteriormente se utilizaron tan solo dos reporteros fluorescentes, siendo este sistema útil, en el presente trabajo se evaluará la utilidad de introducir un reportero más, realizando el análisis de tres reporteros fluorescentes. El análisis de estas respuestas se basará en métodos estadísticos, matemáticos y computacionales.

2.8 Hipótesis

Utilizar tres genes reporteros, fusionados a promotores, permite obtener mayor información sobre las respuestas de los sistemas frente a señales de interés.

2.9 Objetivos

2.9.1 Objetivo general

Evaluar si la utilización de más de dos reporteros otorga mayor y mejor información respecto a señales de interés del contexto celular.

2.9.2 Objetivos específicos

1. Implementar un sistema de ensamblaje de ADN que permita la fabricación combinatorial y eficiente de sistemas génicos.

2. Evaluar si la utilización de dos reporteros de referencia otorga mayor robustez a la información obtenida con un tercer reportero.

3. Evaluar si la utilización de tres reporteros otorga información suficiente para distinguir/analizar más de dos señales de interés.

4. Analizar la información contenida en las mediciones de fluorescencia y densidad con respeto al entorno y las señales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 Cepas Bacterianas

Para llevar a cabo la selección de los vectores y Unidades Transcripcionales ensambladas y su propagación para las posteriores purificaciones, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* TOP10 One Shot™ quimiocompetentes (Invitrogen), cuyo genotipo es detallado y explicado en el anexo al final de este trabajo. Este genotipo es suficiente para evitar interferencias durante la captación de los vectores por parte de las bacterias y su posterior internalización y expresión (Addgene; Uniprot; Ivasiuk, 1975; Timms *et al.*, 1992; Durfee *et al.*, 2008).

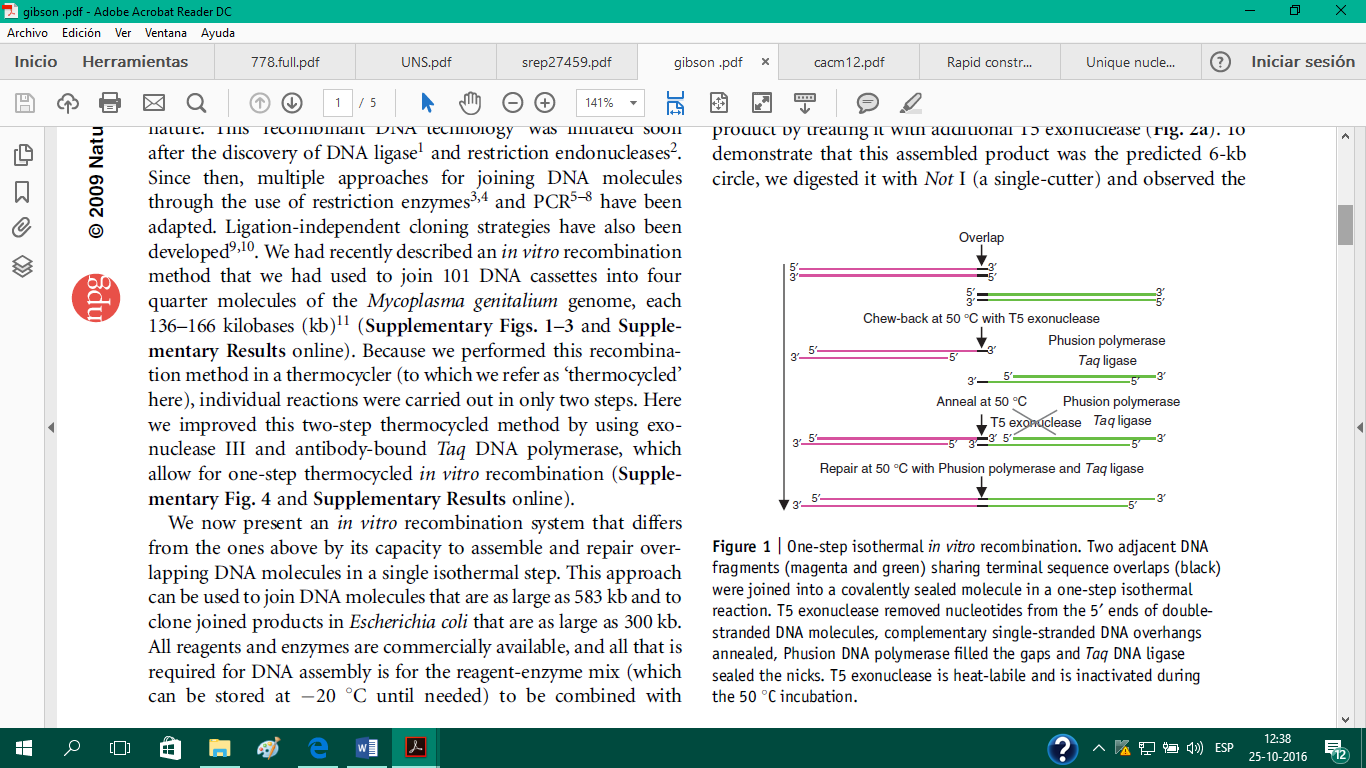
3.2 Diseño experimental

3.2.1 Implementar un sistema de ensamblaje de ADN que permita la fabricación combinatorial y eficiente de sistemas genéticos.

Como se mencionó anteriormente el ensamblaje *Gibson* consiste en el uso de tres enzimas en una sola reacción para el ensamblaje de moléculas de DNA o “Piezas” de gran tamaño. Las reacciones se realizaron en tubos de 0,2 ml a 50°C, donde las enzimas utilizadas fueron una T5 exonucleasa 5’ (Epicentre), una polimerasa de alta fidelidad, correspondiente a la Polimerasa Phusion (Invitrogen) y una DNA Ligasa *Taq* (NEB). La figura 3.2.1.1, describe el proceso de la reacción (Gibson *et al.*, 2009).

Los vectores de destino donde fueron clonadas las Unidades Transcripcionales se denominaron 1X\_p15a\_Cyan y 1X\_SEG\_Tur. Para obtenerlos, se realizaron reacciones de PCR con Polimerasa Phusion (Invitrogen), para obtener las piezas que fueron unidas posteriormente por Ensamblaje *Gibson*. Los vectores templado y partidores utilizados se adjuntan en las Tablas 3.2.1.1 y 3.2.1.2, mientras que en la Tabla 3.2.1.3, se indican los componentes de la reacción de PCR. El diseño de los primers para *Gibson* y todas las reacciones del presente trabajo se realizaron tomando en cuenta los siguientes parámetros: largo no mayor a 60 pares de bases; Tm ≤ 60°C; sin más de 4 C o G en los extremos, sobretodo en 3’; 45 ≤ CG% ≤ 60, siendo ideal 50%. El programa de PCR se realizó en un termociclador, el cual corresponde a 98°C por 30 segundos, luego 35 ciclos con 98°C por 10 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 3 minutos. Finalmente 72°C por 7 minutos.

Luego de cada reacción de PCR, los productos se corrieron en un gel de agarosa 2% p/v para las piezas de menos de 3 kb, y en un gel de agarosa 1% p/v para las piezas sobre este tamaño, ambos a 100V por 30 a 45 minutos. Al obtener las bandas de tamaño esperado, se purificaron desde el gel, y se cuantificaron para determinar su concentración y calidad, mediante el lector Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek). Para unir las piezas obtenidas mediante Ensamblaje *Gibson*, se determinaron las cantidades equimolares en picomoles de cada pieza, mediante las fórmulas indicadas en la Figura 3.2.1.2, en un volumen final de 4 µl, de los cuales se tomaron 1,5 µl y se mezclaron con 4,5 µl de mix de ensamblaje, cuya composición se adjunta en la Tabla 3.2.1.4. La mezcla se llevó posteriormente a un termociclador, donde el programa utilizado fue 5 minutos a 50°C, luego 60 minutos a 50°C. Una vez terminada la reacción se transformó una alícuota de 50 µl de *Escherichia coli* TOP10 para seleccionar colonias que poseían los vectores deseados.



**Figura 3.2.1.1. Esquema de reacción isotérmica de Ensamblaje *Gibson****.* Todos los procesos indicados ocurren en un mismo tubo de reacción y a la misma temperatura. Primero la T5 Exonucleasa 5’ corta los extremos de las moléculas de DNA, luego por complementariedad, se unen los fragmentos y la Polimerasa rellena los espacios, donde finalmente la *Taq* DNA Ligasa repara y une las moléculas (figura tomada desde Gibson *et* al., 2009).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Pieza | Partidores | Secuencias (5’🡪3) | Templado | Tamaño pieza (bp) |
| A | U1F  UXR | CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTG  GGTGGAAGGGCTCGGAGTTGTGG | pDestBAC | 115 |
| B | 1X\_p15aF  pGreenR | GATACATAGATTACCACAACTCCGAGCCCTTCCACCTACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTC  TGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTG | T52V2 | 700 |
| C | pGreenF  1X\_p15aR | CCTGAGCGAGACGAAATACGCGATC  GAGACGAGACAGCCTGAGAATGGATGCGAGTAATGTCTAGAAGCGGCCGCGAATTCCAG | STDSTD7 | 3105 |

**Tabla 3.2.1.1: “Templados y secuencia de partidores para amplificación de piezas para el vector 1X\_p15a\_Cyan”**

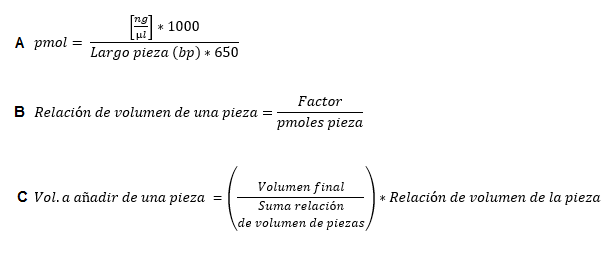
**Tabla 3.2.1.2: “Templados y secuencia de partidores para amplificación de piezas para el vector 1X\_SEG\_Tur”**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Pieza | Partidores | Secuencias (5’🡪3) | Templado | Tamaño pieza (bp) |
| A | 1XCF  sTsVR1 | GTCCTGTCTGTGACAAATTGC  CTAGAAGCGGCCGCGAATTCGACGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG | A1XCNL | 5056 |
| B | sTsVF1  U1R | CATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGTCGAATTCGCGGCCGCTTCTAG  GAGACGAGACGAGACAGCCTGAG | TMA1T | 1100 |
| C | UXF  1XCR | CCAGGATACATAGATTACCACAACTCCG  GAGGGCAATTTGTCACAGGGTTAAG | A1XCNL | 5729 |
| D | U1F  UXR | CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTG  GGTGGAAGGGCTCGGAGTTGTGG | pDestBAC | 115 |

**Tabla 3.2.1.3: “Mix de reacción de PCR para Polimerasa Phusion”**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Reactivo | Mix 1X (µl) | 1X\_p15a\_Cyan (3,1X) | 1X\_SEG\_Tur (4,1X) |
| Buffer 5x | 6 | 18,6 | 24,6 |
| H2O | 20,6 | 63,86 | 84,46 |
| dNTPs | 0,6 | 1,86 | 2,46 |
| Primer forward | 0,75 | 2,325 | 3,075 |
| Primer reverse | 0,75 | 2,325 | 3,075 |
| Phusion | 0,3 | 0,93 | 1,23 |
| Templado | 1 | - | - |
| Volumen total | 30 | - | - |

Se realizará una reacción de PCR por cada pieza a amplificar de forma independiente a las demás piezas. Se agregarán 29µl de mix y se agregará 1µl de templado.



**Figura 3.2.1.2. Fórmulas de cálculo de cantidades equimolares para piezas de Ensamblaje *Gibson*.** A) Fórmula para el cálculo de picomoles a partir de nanogramos de DNA, donde [ng/µl] corresponde a la concentración de la pieza, 1000 es factor de conversión de nanogramos a picogramos, el largo de pieza corresponde a los pares de bases de la molécula y 650 es el peso molecular promedio de un par de nucleóticos. B) Para determinar el volumen a añadir de cada pieza se necesita sacar la relación entre piezas, para lo cual se determina la relación de volumen de una pieza utilizando un factor, que puede ser 0,01 para piezas de más de 2500bp, 0,03 si la pieza tiene un tamaño entre 200 bp y 2500 bp, o 0,05 si la pieza es menos a 200 bp. C) En esa fórmula, el volumen final corresponde al de la mezcla de piezas, que en este caso será 4 µl, el cual es dividido por la suma de las relaciones de volumen de todas las piezas a ensamblar, esto finalmente se multiplica por la relación de la pieza a agregar.

**Tabla 3.2.1.4: “Mix de reacción para Ensamblaje *Gibson*”**

|  |  |
| --- | --- |
| Reactivo | Volumen (µl) |
| Buffer de reacción isotérmica 5X | 100 |
| T5 exonucleasa 10U/ µl | 2 |
| Polimerasa Phusion 2U/ µl | 6,25 |
| Taq DNA ligasa 40 U/ µl | 50 |
| H2O | 216,75 |
| Volumen | 375 |

Este mix puede ser almacenado en alícuotas de 15 µl hasta por un año (Gibson *et al.*, 2009), se utilizarán 4,5µl para la reacción, más 1,5 µl de la mezcla de cantidades equimolares de las piezas.

Dentro de los vectores de destino mencionados anteriormente, se clonaron las Unidades Transcripcionales indicadas en las Tablas 3.2.1.5 y 3.2.1.6, las cuales están compuestas por un Promotor, un Sitio de Reconocimiento para el Ribosoma (RBS), que será BCD2 o BCD12, una Secuencia Codificante (CDS), correspondiente a RFP o YFP, las cuales son proteínas fluorescentes, y un Terminador, correspondiente a ECK0818 o ECK9600, contenidas en módulos de nivel 0, los sitios de restricción utilizados son reconocidos por la enzima BsaI (NEB), cuya secuencia de reconocimiento es GAGACC/CTCTGG (Iverson *et al*., 2016). Los promotores son flanqueados por las secuencias A y B, los RBS serán flanqueados por las secuencias B y C, los CDS por las secuencias C y D y los terminadores por las secuencias D y E. Estas secuencias se ubican entre la parte a ensamblar y el sitio de reconocimiento, de forma que, al ser digeridos, los sitios de restricción son eliminados, y permiten el ensamblaje en orden de los módulos, formando las Unidades Transcripcionales, correspondientes al nivel 1, las cuales fueron clonadas dentro de los vectores 12X y 23X dentro de la misma reacción. Las Unidades Transcripcionales se denominaron como TUs 1, para las que están dentro de 12X y TUs 2, para las que están dentro de 23X. Las secuencias de A a E están indicadas en la Tabla 3.2.1.7. Los módulos nivel 0 a utilizar son parte del kit de *CIDAR MoClo* depositado en Addgene (Kit #1000000059). Para llevar a cabo las reacciones de Clonamiento, primero las partes fueron diluidas para tener una concentración de 2 ng/µl, luego se calcularon las partes equimolares de cada módulo de nivel 0, para tener aproximadamente 10 fmol de cada parte en un volumen de 10 µl. De esta mezcla se tomaron 7 µl, a los que se agregaron 1µl de buffer de T4 DNA Ligasa 10X (NEB), 1µl de T4 DNA Ligasa 10U/µl (NEB) y 1 µl de BsaI 20 U/µl (NEB). La reacción tuvo un volumen final de 10 µl, se llevó en un tubo de 0,2 ml al termociclador, con 20 ciclos de 2 minutos a 37°C, 3 minutos a 16°C. Posteriormente 5 minutos a 50°C y 10 minutos a 80°C. Una vez terminada la reacción se transformó una alícuota de 50 µl de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) para seleccionar colonias que poseían los vectores con las Unidades Transcripcionales ensambladas correctamente. En la Figura 3.2.1.3 se indican las ecuaciones para realizar los cálculos de las cantidades equimolares de los módulos.

**Tabla 3.2.1.5: “Partes de las Unidades Transcripcionales 1, en el vector 12X”**

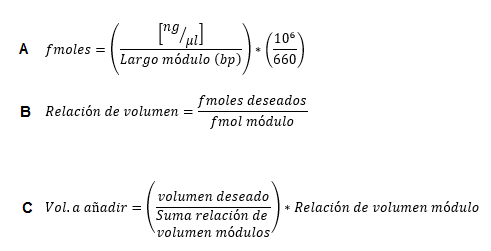
|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Promotores | RBS | CDS | terminador | Aceptor nivel 1 |
| A\_std\_B (TU1.1) | B\_BCD2\_C | C\_RFP\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |
| J23106\_AB (TU1.2) | B\_BCD2\_C | C\_RFP\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |
| J23107\_AB (TU1.3) | B\_BCD2\_C | C\_RFP\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |
| J23116\_AB (TU1.4) | B\_BCD2\_C | C\_RFP\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |
| R0040 (pTet)\_AB (TU1.5) | B\_BCD2\_C | C\_RFP\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |
| R0010 (pLacI)\_AB (TU1.6) | B\_BCD2\_C | C\_RFP\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |
| pLas81 (TU1.7) | B\_BCD2\_C | C\_RFP\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |
| pLux76 (TU1.8) | B\_BCD2\_C | C\_RFP\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |

**Tabla 3.2.1.6: “Partes de las Unidades Transcripcionales 2, en el vector 23X”**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Promotores | RBS | CDS | terminador | Aceptor nivel 1 |
| A\_std\_B (TU2.1) | B\_BCD12\_C | C\_YFP\_D | D\_ECK9600\_E | 23X |
| J23106\_AB (TU2.2) | B\_BCD12\_C | C\_YFP\_D | D\_ECK9600\_E | 23X |
| J23107\_AB (TU2.3) | B\_BCD12\_C | C\_YFP\_D | D\_ECK9600\_E | 23X |
| J23116\_AB (TU2.4) | B\_BCD12\_C | C\_YFP\_D | D\_ECK9600\_E | 23X |
| R0040 (pTet)\_AB (TU2.5) | B\_BCD12\_C | C\_YFP\_D | D\_ECK9600\_E | 23X |
| R0010 (pLacI)\_AB (TU2.6) | B\_BCD12\_C | C\_YFP\_D | D\_ECK9600\_E | 23X |
| pLas81 (TU2.7) | B\_BCD12\_C | C\_YFP\_D | D\_ECK9600\_E | 23X |
| pLux76 (TU2.8) | B\_BCD12\_C | C\_YFP\_D | D\_ECK9600\_E | 23X |

**Tabla 3.2.1.7: “Secuencias flanqueantes para sistema *CIDAR MoClo*”**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tipo de Módulo | Nombre secuencia | Secuencia |
| Promotor | A  B | GGAG  TACT |
| RBS | B  C | TACT  AATG |
| CDS | C  D | AATG  AGGT |
| Terminador | D  E | AGGT  GCTT |



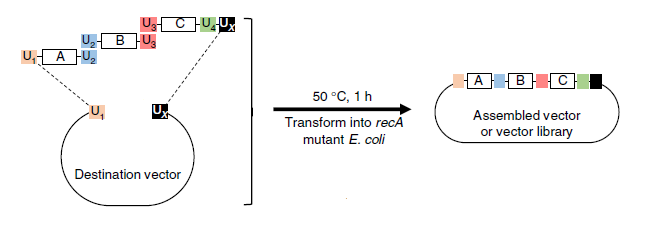
**Figura 3.2.1.3. Fórmulas para cálculos de cantidades equimolares para módulos de nivel 0.** A) Fórmula para calcular femtomoles a partir de la concentración de los módulos en nanogramos por microlitro, el largo del módulo corresponde al tamaño del vector en pares de bases, 106 corresponde al factor de conversión a femtogramos y 660 es el peso molecular promedio que tiene un par de nucleótidos. B) Para determinar el volumen a añadir de cada pieza se necesita sacar la relación entre piezas, para lo cual se determina la relación de volumen de una pieza utilizando la cantidad de femtomoles deseados y se divide en los femtomoles calculados en A) para cada módulo. C) En esa fórmula, el volumen deseado corresponde al de la mezcla de módulos, que en este caso será 10 µl, el cual es dividido por la suma de las relaciones de volumen de todas las piezas a ensamblar, esto finalmente se multiplica por la relación de la pieza a agregar.

Una vez obtenidas las Unidades Transcripcionales, se procedió a clonarlas según las combinaciones indicadas en la Tabla 3.2.1.8, en el vector 1X\_p15a\_Cyan. Dado que las TU1 comparten las mismas secuencias entre si excepto el promotor, y de igual forma sucede entre las TU2, se indica la combinación según sus promotores en la Tabla 3.2.1.8.

Para construir estos vectores, se realizó ensamblaje *Gibson*, pero con la utilización de Secuencias Nucleotídicas Únicas o UNSes, las cuales permiten realizar el ensamblaje de forma ordenada, la Figura 3.2.1.4 ejemplifica el uso de UNSes en el ensamblaje de vectores (Torella *et al*., 2014; Torella *et al*., 2014). Ya que los vectores de destino poseen U1 y UX, las TU1 poseen U1 y U2, y las TU2 poseen U2 y UX, se pudo amplificar mediante PCR con Polimerasa Phusion (Invitrogen), como se realizó para las piezas de los vectores de destino mencionados anteriormente. Las UNSes y los partidores utilizados se indican en la Tabla 3.2.1.9. Una vez obtenidas las piezas, se cuantificaron mediante el equipo Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek), para determinar la concentración y calidad del DNA. Las reacciones de ensamblaje *Gibson* se realizaron de igual forma que para los vectores de destino. Las UNSes utilizadas y su diseño son las descritas en Torella *et al.*, 2014.

**Tabla 3.2.1.8: “Combinaciones de TUs para el vector 1X\_p15a\_Cyan”**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 2.1 (J23101) | 2.3 (J23107) | 2.5(R0040) | 2.6 (R0010) | 2.7 (pLas81) |
| 1.1(J23101) | J23101/J23101 | - | - | - | - |
| 1.2 (J23106) | J23106/J23101 | J23106/J23107 | - | J23106/R0010 | J23106/pLas81 |
| 1.4 (J23116) | J23116/J23101 | J23116/J23107 | - | J23116/R0010 | J23116/pLas81 |
| 1.5 (R0040) | R0040/J23101 | R0040/J23107 | - | R0040/R0010 | R0040/pLas81 |
| 1.8 (pLux76) | pLux76/J23101 | pLux76/J23107 | pLux76/R0040 | pLux76/R0010 | pLux76/pLas81 |



**Figura 3.2.1.4. Ensamblaje *Gibson* mediante utilización de UNSes.** Cada parte a ensamblar estará flanqueada por 2 UNSes, las cuales al ser digeridas por la exonucleasa 5’ T5, quedarán con extremos que serán complementarios a la UNS de la parte siguiente (Gibson *et al.*, 2009; figura modificada de Torella *et al.*, 2014).

**Tabla 3.2.1.9: “Secuencia de UNSes utilizadas y partidores para amplificación piezas”**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Templado piezas | UNSes | Secuencias UNSes (5’🡪3’) | Partidores |
| 1X\_p15a\_Cyan | U1  UX | CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTC  CCAGGATACATAGATTACCACAACTCCGAGCCCTTCCACC | U1R  UXF |
| TUs 1 | U1  U2 | CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTC  GCTGGGAGTTCGTAGACGGAAACAAACGCAGAATCCAAGC | U1F  U2R |
| TUs 2 | U2  UX | GCTGGGAGTTCGTAGACGGAAACAAACGCAGAATCCAAGC  CCAGGATACATAGATTACCACAACTCCGAGCCCTTCCACC | U2F  UXR |

Posteriormente se construyó un vector accesorio utilizando el vector de destino 1XColE1. Este vector accesorio contiene las proteínas de regulación de respuesta LacI y TetR, que se utilizaron para analizar la respuesta a las señales de estudio IPTG y aTc respectivamente. El CDS de TetR, así como su promotor, RBS y terminador, existen como piezas level 0 para Golden Gate en el laboratorio y se detallan en la Tabla 3.2.1.10. LacI se expresa constitutivamente desde el vector 1XColE1 que se usará para ensamblar el vector accesorio. El vector 1XColE1 posee el origen de replicación ColE1, que es compatible con los vectores reporteros descritos en este trabajo, y el gen de resistencia a Carbenicilina. Esto hace que este vector accesorio sea compatible con los vectores finales en 1X\_p15a\_Cyan. Los primers y detalles de ensamblaje se detallan en tabla 3.2.1.11.

**Tabla 3.2.1.10: “Partes de unidad transcripcional de TetR”**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Promotores | RBS | CDS | terminador | Aceptor nivel 1 |
| A\_std\_B | B\_BCD2\_C | C\_TetR\_D | D\_ECK0818\_E | 12X |

**Tabla 3.2.1.11: “Secuencia de UNSes utilizadas y partidores para amplificación piezas del vector accesorio”**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Templado piezas | UNSes | Secuencias UNSes (5’🡪3’) | Partidores |
| 1XColE1 | U1  UX | CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTC  CCAGGATACATAGATTACCACAACTCCGAGCCCTTCCACC | U1R  UXF |
| TetR | U1  U2 | CATTACTCGCATCCATTCTCAGGCTGTCTCGTCTCGTCTC  GCTGGGAGTTCGTAGACGGAAACAAACGCAGAATCCAAGC | U1F  U2R |

3.2.2 Purificación de piezas de DNA para ensamblaje desde gel

Una vez obtenidas las piezas para los vectores de destino y correrlos en los geles indicados, las bandas obtenidas se purificaron mediante el uso del Kit Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), utilizando el Quick Protocol especificado por el proveedor. Posteriormente se determinó la calidad y concentración de las piezas mediante el lector Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek), para realizar posteriormente el cálculo de las cantidades equimolares de estas. Las partes purificadas se almacenaron a -20°C.

3.2.3 Transformación de bacterias

Para realizar la selección y propagación de vectores, se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10 One Shot™ quimiocompetentes (Invitrogen), las cuales se almacenan a -80°C en tubos de 0,6 ml, en alícuotas de 50 µl con buffer CCMB80. Estas se dejaron descongelar por 15 a 20 minutos en hielo, para posteriormente agregar el DNA a incorporar en el tubo. Para el caso del ensamblaje *Gibson* se usó todo el contenido de la reacción, mientras que para las reacciones de *Golden Gate* se usaron 5 µl. Una vez agregado el DNA se dejaron reposar por 20 a 30 minutos en hielo, para posteriormente dar un shock térmico a 42°C por 1 minuto en baño termorregulado. Luego se llevó al hielo inmediatamente por 2 a 5 minutos y se agregaron 250 µl de medio LB líquido bajo mechero. Se dejaron los tubos con bacterias 1 hora a 37°C y 250 rpm de agitación. Luego se tomaron 100 µl de bacterias y se sembraron bajo mechero en placas de LB agar con antibiótico, el cual se eligió según el vector a seleccionar. Se dejaron crecer durante 16 horas o durante la noche.

3.2.4 Selección colonias positivas de bacterias transformadas, generación de stocks en glicerol y cultivos líquidos

Luego de realizar los cultivos en los medios sólidos con antibióticos, 2 a 3 colonias obtenidas fueron picadas para realizar PCR de colonias con la enzima Polimerasa GoTaq (Promega), donde se utilizaron partidores para regiones puntuales de las construcciones, a modo de verificar la presencia de los vectores y que estos contenían los elementos deseados. El mix de reacción de PCR se adjunta en la Tabla 3.2.6.1, el programa que utilizado en el termociclador fue el siguiente: 95°C por 10 minutos, luego 35 ciclos con 95°C por 30 segundos, 55°-60°C por 30 segundos, 72°C por 1:30 minutos. Finalmente 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se correron en geles de agarosa 2% por 30-45 minutos a 100V. Si se obtenían bandas de los tamaños esperados, las colonias se consideraron positivas, y se realizaron cultivos de estas en 5 ml de LB líquido con el antibiótico correspondiente, se dejaron crecer durante la noche, para al día siguiente hacer un stock en glicerol, donde se agregaron 500 µl de medio líquido con bacterias y 500µl de glicerol 50% en tubos criogénicos (Invitrogen). Se almacenaron a -80°C.

**Tabla 3.2.4.1: “Mix Polimerasa Gotaq”**

|  |  |
| --- | --- |
| Reactivo | Mix 1X (µl) |
| Green Buffer Gotaq 5X | 2 |
| H2O | 4,45 |
| MgCl2 25Mm | 1,6 |
| DNTPs | 0,2 |
| Primer forward | 0,25 |
| Primer reverse | 0,25 |
| Enzima Gotaq | 0,25 |
| Templado | 1 |

3.2.5 Extracción y purificación de plásmidos utilizando un kit comercial

Una vez realizado el stock en glicerol, el resto del cultivo se utilizó para extraer y purificar los plásmidos de interés mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Los plásmidos obtenidos se cuantificaron mediante el equipo Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek), para determinar la concentración y calidad del DNA. Posteriormente, se almacenaron a -20°C.

3.2.6 Evaluar si la utilización de dos reporteros de referencia otorga mayor robustez a la información obtenida con un tercer reportero

Una vez obtenidas todas las combinaciones de TUs en los vectores de destino, se realizaron ensayos de crecimiento en medio M9 para las colonias que contenían estos vectores de tres reporteros, en placas de 96 pocillos estériles negras (Thermo). Para evaluar la influencia de diferentes fuentes de carbono, se dividió la placa en dos regiones mayores, una para mediciones en medio M9 suplementado con glucosa 0,4% y una para las mediciones en medio M9 suplementado con glicerol 0,2%. Dentro de cada región mayor se delimitaron 4 regiones de 10 pocillos cada una para los vectores evaluados, que fueron cuatro por ensayo, más dos columnas con 4 pocillos cada una para los controles de medio M9 solo y los controles de medio M9 con bacterias sin transformar para cada condición. Para cada ensayo se efectuaron mediciones de densidad óptica y de intensidad de fluorescencia para los tres reporteros fluorescentes en el equipo Synergy HTX (BioTek) y el software Gen5 (BioTek). Estos ensayos se realizaron durante 24 horas, con agitación constante, a 37°C y las mediciones se realizaron cada 15 minutos, siendo cada ensayo repetido 3 veces. Dado que los vectores de destino poseen CFP, en primera instancia se utilizaron estos como referencia en los ensayos para normalizar las mediciones de los otros dos reporteros (Kelly *et al*., 2009; Rudge *et al*., 2016), ya que estaba siempre fusionado al mismo promotor, de forma que solo cambiaban los promotores de los otros dos reporteros dentro de las TUs. La composición del medio M9 y los vectores evaluados por ensayos se detallan en las Tablas 3.2.6.1 y 3.2.6.2. La preparación del medio M9, y los ensayos se especifican en el Anexo.

Posterioremente, en base a los mismos datos obtenidos de estos ensayos, se utilizaron dos reporteros como referencia, siendo estos CFP y xx.

**Tabla 3.2.6.1: “Composición medio M9 para ensayos de crecimiento”**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reactivo | Concentración stock | Volumen necesario (25 ml) |
| Agua destilada estéril | - | 13,75 ml |
| MgSO4 \* 7H2O | 1M | 50μl |
| Sales M9\* | 5X | 5 ml |
| Glucosa | 20% v/v | 250 μl |
| Glicerol | 20% v/v | 125 μl |
| CaCl2 | 1M | 2,5 μl |
| Casaminoácidos | 1% p/v | 5 ml |

**\***Las sales M9 5X están compuestas por: Na2HPO4, KH2PO4, NaCl, NH4Cl. Los componentes deben ser agregados en este orden y se debe completar con agua destilada estéril hasta 25 ml totales. Los volúmenes de Glucosa y Glicerol, son para obtener concentraciones finales de 0,4% y 0,2% respectivamente.

**Tabla 3.2.6.2: “Vectores evaluados por ensayo”**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Ensayo | Vectores | | | |
| 1 | 1.1-2.1 | 1.8-2.1 | 1.8-2.5 | 1.8-2.6 |
| 2 | 1.5-2.1 | 1.5-2.3 | 1.5-2.6 | 1.5-2.7 |
| 3 | 1.8-2.1 | 1.8-2.3 | 1.8-2.6 | 1.8-2.7 |
| 4 | 1.2-2.1 | 1.2-2.3 | 1.2-2.6 | 1.2-2.7 |
| 5 | 1.4-2.1 | 1.4-2.3 | 1.4-2.6 | 1.4-2.7 |

**\*** 1.1: J23101, 1.2: J23106, 1.4: J23116, 1.5: R0040(pTet), 1.8: pLux76, 2.1: J23101, 2.3: J23107, 2.5: R0040(pTet), 2.6: R0010(pLacI), 2.7: pLas81.

3.2.7 Evaluar si la utilización de tres reporteros otorga información suficiente para distinguir/analizar más de dos señales de interés.

Para este objetivo los ensayos realizados se realizaron con colonias cotransformadas con el vector accesorio junto a uno de tres posibles plásmidos de tres reporteros, que contienen el promotor pTet (R0040), el promotor pLacI(R0010) o ambos, estos se indican en la Tabla 3.2.7.1. El vector accesorio produce las proteínas reguladoras que responden a las señales, afectando los promotores en el plásmido reportero. Las señales utilizadas fueron anhidrotetraciclina o aTc que interactúa con la proteína TetR y el promotor pTet, e IPTG, que interactúa con la proteína LacI y el promotor pLacI.

Inicialmente se realizó un ensayo para determinar el rango de concentraciones donde se podía observar influencia de las señales sobre el sistema. Para esto en una placa de 96 pocillos estéril negra (Thermo) se distribuyeron por duplicado diferentes concentraciones de aTc e IPTG por separado de menor a mayor concentración, y se incluyeron 4 controles, esto se repitió 3 veces. Una vez determinados estos rangos, se procedió a realizar nuevos ensayos en medio M9 normal complementado con combinaciones de concentraciones de ambas señales. En este caso la distribución de las placas fue xx dado que las combinaciones fueron yy. Ambos ensayos se realizaron durante 24 horas, con agitación constante, a 37°C, realizando las mediciones cada 15 minutos, siendo repetido 3 veces. En este caso sólo se utilizó un reportero de referencia, el cual corresponde CFP, dado que siempre es el mismo. Los rangos evaluados y las combinaciones de concentraciones posteriores se indican en las tablas 3.2.7.2 y 3.2.7.3.

3.2.8 Analizar la información contenida en las mediciones de fluorescencia y densidad con respeto al entorno y las señales

Con los datos obtenidos en los ensayos mencionados anteriormente, se procedió a realizar el análisis respecto a la síntesis de las proteínas fluorescentes, de forma de poder correlacionar esta información a la tasa de transcripción y crecimiento de las células en cada caso, en primera instancia de manera similar al trabajo realizado por Rudge y Federici, 2016, donde se correlaciona la síntesis de las proteínas fluorescentes a la tasa de transcripción y la tasa de crecimiento, reduciendo la variación extrínseca. Algunas de las ecuaciones involucradas en este método se relacionan a la determinación, en primer lugar, de la tasa de síntesis de la proteína fluorescente en un rango de tiempo.

Fp(t) es la tasa de síntesis por célula para una proteína fluorescente estable P; µ(t), es la tasa de dilución por crecimiento celular donde A(t) es la Densidad Óptica (OD) medida por absorbancia a 600nm. La Intensidad de fluorescencia medida en la muestra puede considerarse:

De aquí puede derivarse, la tasa de síntesis de proteína por célula:

Pero esta medición presenta dificultades, ya que en etapas de crecimiento temprano A(t) y la señal de fluorescencia son bajas y presentan mayor ruido (Rudge *et al*., 2015), por ende, puede ser re-escrita como:

En este proyecto, se utilizará tres reporteros diferentes, por lo tanto, se partirá calculando Fp(t), obteniendo F1(t), F2(t) y F3(t) para cada uno de los reporteros. Esto se deberá determinar para las combinaciones en diferentes condiciones, además de calcular A(t) y µ(t), para un mismo cultivo. Con esta información, se procederá a evaluar la relación entre los datos obtenidos, y de estos y el entorno, para extraer mayor y mejor información respecto a señales de interés del contexto celular, basándose en métodos matemáticos, estadísticos y computacionales (Objetivo General).

Para realizar el análisis se utilizaron funciones definidas en el lenguaje de programación Python, estas fueron escritas en notebooks a través de la plataforma Jupyter y almacenados a través de GitHub.

Los archivos de las mediciones de los ensayos fueron entregados por el equipo como un archivo Excel, donde las mediciones fueron transformadas a archivos de texto para poder utilizarlas.

Primero se creó un ambiente de programación, que contiene los paquetes y funciones necesarios para realizar el análisis, este ambiente puede ser instalado a través de Anaconda (proveedor), y contiene los paquetes (xxxxx).

Para poder trabajar con los datos se realizó el ajuste de las curvas obtenidas de las mediciones de densidad óptica mediante la función de ajuste Gompertz, para cada una de las réplicas. Al realizar este ajuste se pudo determinar qué cantidad de las mediciones se encontraban en fase exponencial, para trabajar posteriormente con ellos, esto debido a que en el trabajo de Rudge y Federici, 2016, se consideraron los datos dentro de esta fase. Así, se pudo hacer la selección de los datos en fase exponencial para las mediciones de fluorescencia y determinar la pendiente de los datos al graficar la intensidad de fluorescencia contra absorbancia para cada reportero. Estas pendientes se compararon entre si para observar correlaciones.

4. Resultados

POR OBJETIVO????

5. Discusión

6.REFERENCIAS

**Alon U.** (2007) Transcription Networks: Basic Concepts. En: *An introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits*.1st Ed., Chapman & Hall /CRC Press, Boca Raton, United States, p. 5-27.

**Baldwin G.** (2012) Parts, Devices and Systems. En: *Synthetic Biology: A Primer*. 1st Ed., Imperial College Press, London, England, p. 78-91.

**Bashor C.J., Horwitz A.A., Peisajovich S.G., Lim W.A.** (2010) Rewiring Cells: Synthetic Biology as a Tool to Interrogate the Organizational Principles of Living Systems. *Annual Reviews of Biophysics*, Vol. 39, p.515-537.

**Benenson Y.** (2012) Biomolecular computing systems: principles, progress and potential. *Nature Reviews*. Vol 13, p. 455-468.

**Bousse L.** (1996) Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators*. Vol. 34, p. 270-275.

**Cooper J.C., Hall E.A.H.** (1988) The nature of biosensor technology. *J. Biomed. Eng*., Vol 10, p.210-219.

**Date A., Pasini P., Daunert S.** (2010) Fluorescent and bioluminescent cell-based sensors: strategies for their preservation. *Advances in biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 117, p.57-75.

**Durfee T.,** [**Nelson R**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nelson%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Baldwin S**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Baldwin%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Plunkett G. 3rd**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Plunkett%20G%203rd%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**,** [**Burland V**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Burland%20V%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Mau B**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mau%20B%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Petrosino J.F**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Petrosino%20JF%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Qin X**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Qin%20X%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Muzny D.M**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Muzny%20DM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Ayele M**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ayele%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Gibbs R.A**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gibbs%20RA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Csörgo B**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cs%C3%B6rgo%20B%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Pósfai G**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=P%C3%B3sfai%20G%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Weinstock G.M**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Weinstock%20GM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.,** [**Blattner F.R**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Blattner%20FR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=18245285)**.** (2008) The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *Journal of Bacteriology*. Vol. 190, No. 7, p. 2597–2606.

**Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S.** (2002) Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science*, vol. 297, p. 1883-1886.

[**Engler C**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Engler%20C%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24395361)**.,** [**Marillonnet S**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Marillonnet%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24395361)**.** (2014) Golden Gate Cloning. *Methods Mol Biol*,1116:119-31.

**Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison III C.A., Smith H.** (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nature Methods*, vol. 6, n°5, p.343-347.

http://blog.addgene.org/plasmids-101-common-lab-e-coli-strains (24/09/2016, 16:45)

https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases/types-of-restriction-endonucleases (27/10/2016, 15:27)

http://www.sas.com/en\_id/insights/analytics/machine-learning.html (30/09/2016, 11:50)

<http://www.uniprot.org/uniprot/P0AFF4> (24/09/2016, 17:05)

**Hsiu-Chuan Liao V., Ou K.L.** (2005) Development and testing of a Green Fluorescent Protein-based Bacterial Biosensor for measuring bioavailable Arsenic contaminated groundwater samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol.24, n°7, p. 1624-1631.

[**Ivasiuk L.A**](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ivasiuk%20LA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=1221730)**.** (1975) Influence of the recA- mutation on spontaneous filamentation and the titer of the lambda phage in ylonB- mutants of E. coli K12 (lambda). *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 4:95-7.

[**Iverson S.V**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Iverson%20SV%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=26479688)**.,** [**Haddock T.L**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Haddock%20TL%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=26479688)**.,** [**Beal J**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Beal%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=26479688)**.,** [**Densmore D.M**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Densmore%20DM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=26479688)**.** (2016) CIDAR MoClo: Improved MoClo Assembly Standard and New *E. coli* Part Library Enable Rapid Combinatorial Design for Synthetic and Traditional Biology. *ACS Synth Biol*,15;5(1):99-103.

**Kelly J.R., Rubin A.J., Davis J.H., Ajo-Franklin C.M., Cumbers J., Czar M.J., de Mora K., Glieberman A.L., Monie D.D., Endy D.** (2009) Measuring the activity of BioBrick promoters using an in vivo reference standard. Journal of Biological Engineering, vol. 3, No. 4.

**Lei Y., Chen W., Mulchandani A.** (2006) Microbial Biosensors. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 586, p. 200-210.

**Noireaux V., Bar-Ziv R., Libchaber A.** (2003) Principles of cell-free genetic circuit assembly. *PNAS*, vol. 100, No. 22, p. 12672-12677.

**Tamsir A.**, **Tabor J. J.**, **Voigt C. A.** (2011) Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical ‘wires’.*Nature*. Vol. 469, No. 7329, p. 212–215.

**Thompson R.B.** (2008) Fluorescence lifetime biosensing: entering the mainstream. En: *Optical Biosesors: Today and* Tomorrow. Ligler. F.S., Rowe C.T., 2nd Ed., Elsevier, Oxford, UK, p. 287-300.

**Lim J.W., Ha D., Lee J., Lee S.K., Kim T.** (2015) Review of micro/nanotechnologies for microbial biosensors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 3, artículo 61.

**Lowe C.R.** (1989) Biosensors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. Vol. 134, No. 1224, p. 487-496.

**MacDonald I.C., Deans T.L.** (2016) Tools and applications in Synthetic Biology. *Advanced Drugs Delivery Systems*, Vol. 105, p. 20-34.

**Meighen E.A.** (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation and application of the *lux* genes. *The FASEB Journal*, vol.7, No.7, p. 1016-1022.

**Park M., Tsai S.L. and Chen W.** (2013) Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. *Sensors*, vol. 13, p. 5777-5795.

**Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Reshetilova T.A.** (2010) The Microbial Cell Based Biosensors. En: Intelligent and Biosensors, Vernon S. Somerset (Editor), 1st ed. Intech, Vukovar, Croatia.

**Rudge T.J., Brown J.R., Federici F., Dalchau N., Phillips A., Ajioka J.W., Haseloff J.** (2015) Characterization of Intrinsic Properties of Promoters. *ACS Synthetic Biology*, vol. 5, p. 89−98.

**Siuti P., Yazbek J., Lu T. K.** (2013) Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nature Biotechnology*. Vol 31, p. 448-453.

[**Timms A.R**](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Timms%20AR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=1552908)**.,** [**Steingrimsdottir H**](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Steingrimsdottir%20H%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=1552908)**.,** [**Lehmann A.R**](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lehmann%20AR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=1552908)**.,** [**Bridges B.A**](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Bridges%20BA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=1552908)**.** (1992) Mutant sequences in the rpsL gene of Escherichia coli B/r: mechanistic implications for spontaneous and ultraviolet light mutagénesis*.* [*Mol Gen Genet.*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1552908) 232(1):89-96.

**Torella J.P., Boehm C.R., Lienert F., Chen J.H., Way J.C., Silver P.A.** (2014) Rapid construction of insulated genetic circuits via synthetic sequence-guided isothermal assembly. *Nucleic Acids Research*, Vol. 42, No. 1 681–689.

**Torella J.P., Boehm C.R., Lienert F., Chen J.H., Way J.C., Silver P.A.** (2014) Unique nucleotide sequence–guided assembly of repetitive DNA parts for synthetic biology applications. *Nature Protocols*, Vol. 9, n°9, p.2075-2089.

**Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S.** (2011) A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *Plos One*, vol. 6, Issue 2, e16765.

ANEXO

Genotipo de *Escherichia coli* TOP10

El genotipo de las bacterias que serán utilizadas en el presente trabajo es: F- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G λ-, el cual se detalla a continuación:

F-: no contiene plásmido F. No realiza conjugación con otras bacterias, pues las proteínas necesarias para esto están codificadas en el plásmido F.

mcrA/mcrBC: inactivación de vía metabólica que corta DNA con citosina metilada. Este sistema identifica y destruye DNA foráneo, el cuál no se encuentra metilado.

mrr: inactivación de vía metabólica que corta DNA que tiene citosina o adenina metilada. Identifica y destruye DNA foráneo no metilado.

hsdRMS: inactivación de sistema de metilación y degradación de DNA. Identifica y destruye DNA foráneo no metilado.

Δ*lac*X74: Deleción del operón Lactosa completo. Las bacterias no pueden metabolizar la lactosa.

φ80*lac*ZΔM15: contiene parte del gen lacZ, permitiendo una complementación y recuperación de β-galactosidasa, suficiente para realizar la selección mediante colonias azules o blancas al agregar Xgal en placas.

recA1: mutación en ATPasa dependiente de DNA esencial para la recombinación y reparación general de DNA. Esta mutación reduce la recombinación de plásmidos, aumentando su estabilidad.

araD139: Alteración en la vía metabólica de la arabinosa. Mutación en L-ribulosa-phosphate 4-epimerasa que bloquea el metabolismo de la arabinosa.

Δ(*ara-leu*) 7697: falta parte del operón leuLABCD. Necesita Leucina en el medio para sobrevivir.

galU: mutación en vía metabólica de la galactosa. Mutantes no pueden metabolizarla.

galK: mutación en metabolismo de la galactosa. Mutantes no pueden metabolizar galactosa y tienen resistencia a la 2-deoxygalactosa. Cuando no son mutantes la metabolizan y se produce un metabolito tóxico para las mismas bacterias.

rpsL: mutación en subunidad S12, de ribosoma 30S.StrR: resistencia a estreptomicina dada por mutación rpsL

endA1: mutación en la Endonuclesa I, que corta DNA de forma inespecífica. Mejora el rendimiento del plásmido, en cuanto a su incorporación.

nupG: mutación en nucleósido permeasa, que es un gen regulador que permite la expresión constitutiva de genes de síntesis de desoxirribosa. Permite que las células puedan captar e incorporar los plásmidos de gran tamaño.

λ-: resistentes a Fago Lambda lisogénico. Al tener mutaciones en recA, no puede inducir la formación del profago si es infectada, pues el fago necesita a recA para insertarse en el genoma de la célula.

