
TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción	1
1.1	Biología sintética.....	1
1.2	Biorreactor	4
1.3	Diseño de un reactor continuo	7
1.4	Objetivos	11
1.4.1	Objetivo General	11
1.4.2	Objetivos Específicos	11
2	Metodología.....	12
2.1	Metodología General	12
2.2	Fase biológica.....	12
2.2.1	Diseño de las contrucciones genéticas	12
2.2.2	Construcción de plásmidos.....	16
2.2.3	Transformación de E. coli y almacenamiento	21
2.2.4	Pruebas de integridad de los vectores construidos	21
2.2.5	Pruebas de medición de fluorescencia	21
2.3	Fase Reactor.....	23
2.3.1	Concepción y Diseño.....	23
2.3.2	Implementación.....	24
2.3.3	Operación.....	26
2.4	Modelamiento matemático.....	27
3	Resultados y Discusión.....	29
3.1.1	Diseño de sistema de expresión recombinante	29
3.1.2	Elaboración de plásmidos.....	29
3.1.3	Transformación de E. coli y almacenamiento.	32
3.1.4	Pruebas de integridad de vectores construidos.....	33
3.1.5	Análisis de la expresión de los genes reporteros en cada sistema	36
3.1.6	Concepción y Diseño.....	43
3.1.7	Calibración de bombas.....	44
3.1.8	Implementación del reactor continuo	45
3.1.9	Distribución de tiempos de residencia	46
3.1.10	Pruebas de crecimiento bacteriano y generación de proteína.	49
3.1.11	Modelamiento matemático.....	53
4	Conclusiones y proyecciones	55

5	Bibliografía	57
6	Anexos.....	60
6.1	Secuencias Génicas	60
6.2	ELECTROFORESIS DE ADN	65
6.2.1	Materiales.....	65
6.2.2	Preparación de un gel de agarosa al 1%.....	66
6.2.3	Preparación de 1kb plus Ladder	66
6.2.4	Migración de ADN	66
6.3	Disolución y purificación de ADN	67
6.3.1	Materiales.....	67
6.3.2	Procedimiento.....	67
6.4	Preparación de células quimiocompetentes.....	68
6.4.1	Materiales:	68
6.4.2	Procedimiento.....	68
6.5	Quimiotransformación	68
6.5.1	Materiales.....	68
6.5.2	Procedimiento.....	69
6.6	Elaboración de medio LB	69
6.6.1	Materiales.....	69
6.6.2	Procedimiento.....	69
6.7	Resultados de la purificación del gel	69
6.8	Placas de cultivo de tetR y los controles negativos	70
6.9	PCR	71
6.9.1	Materiales.....	71
6.9.2	Procedimiento.....	71
6.10	Mediciones del experimento de distribución de tiempo de residencia ...	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Mix de ligación para el sistema tetRojo.	20
Tabla 2: Principales características de los sistemas de expresión de proteína fluorescente utilizados.	29
Tabla 3: Localización de los plásmidos liofilizados en el kit iGEM 2015.	29
Tabla 4: Masa obtenida al realizar el corte del gel de agarosa para la obtención de los fragmentos utilizados para los controles negativos.....	32
Tabla 5: Masa obtenida al realizar el corte del gel de agarosa para la obtención de los fragmentos utilizados para los controles negativos.....	32
Tabla 6: Mediciones de fluorescencia del pellet resuspendido en medio PBS en fluorímetro, con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión a 538 nm, para medir la presencia de GFP.	41
Tabla 7: Mediciones de fluorescencia del pellet resuspendido en medio PBS en fluorímetro, con una longitud de onda de excitación de 544 nm y una longitud de onda de emisión a 590 nm, para medir la presencia de mRFP1.	41
Tabla 8: DO ₆₀₀ de los diferentes cultivos usados en la prueba de inducción.....	42
Tabla 9: Ponderación del resultado de fluorescencia por la DO ₆₀₀ del cultivo para mediciones de excitación a 485 nm y una emisión de 538 nm.	42
Tabla 10: Ponderación del resultado de fluorescencia por la DO ₆₀₀ del cultivo para mediciones de excitación a 544 nm y una emisión de 590 nm.	42
Tabla 11: Parámetros más importantes de operación del reactor de cascada de CSTR.	44
Tabla 12: Resultados del τ promedio obtenido experimentalmente, junto al τ teórico. Además, se muestra la diferencia entre ambos valores.....	49
Tabla 13: Valores obtenidos del ajuste de parámetros del modelo matemático simple de fuerza de promotor.	54
Tabla 14: Parámetros más importantes de operación del reactor de cascada de CSTR.	55
Tabla 15: Masa obtenida al realizar el corte del gel de agarosa para la obtención de los fragmentos utilizados para la elaboración del sistema tetRojo.	69
Tabla 16: Concentración de material genético obtenido luego de la disolución del gel de agarosa y posterior purificación del ADN.	69
Tabla 17: Mix de PCR utilizada para las 20 reacciones.	71
Tabla 18: Programa utilizado para el PCR, la etapa de Denaturación, alineamiento y extensión se repite 35 veces.	72
Tabla 19: Datos obtenidos de la experiencia de distribución de tiempos de residencia.	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama resumen de los métodos utilizados en la ciencia y en la ingeniería ²	1
Figura 2: Analogía entre los métodos en computación y biología sintética. ⁴	2
Figura 3: Pieza modular de una puerta lógica Y. ⁵ Este sistema se utiliza para obtener una respuesta cuando el sistema esta en presencia de dos efectores específicos.	3
Figura 4: Ejemplo del sistema de ensamblado de biobricks. ⁵ Se muestra como al estandarizar sitios restricción en lugares específicos de los plasmidios, se pueden generar pautas de trabajo estándar.	3
Figura 5: Esquema representativo de un biobrick.....	4
Figura 6: Esquema general de un reactor del tipo batch.....	5
Figura 7: Esquema de dificultades para cada tipo de biorreactor.....	6
Figura 8: Diagrama general de un sistema de reactores CSTRs en cascada.	6
Figura 9: Diagrama general del plásmido generador de mRFP1 en presencia de IPTG. LacI representa el promotor de lactosa. BBa_B0034 el sitio de unión al ribosoma. mRFP1 el código codificante de la proteína monomérica fluorescente roja. BBa_B0010 y BBa_B0012 los terminadores. VR y VF2 corresponden a los sitios de unión de partidores. CamR la resistencia a cloranfenicol. pMB1 el origen de replicación. En BioBrick prefix y suffix se ubican las enzimas de restricción estándar del plasmidio.	13
Figura 10: Diagrama general del plásmido generador de GFP en presencia de IPTG. LacI representa el promotor de lactosa. BBa_B0034 el sitio de unión al ribosoma. GFP el código codificante de GFP. BBa_B0010 y BBa_B0012 los terminadores. VR y VF2 corresponden a los sitios de unión de partidores. CamR la resistencia a cloranfenicol. pMB1 el origen de replicación. En BioBrick prefix y suffix se ubican las enzimas de restricción estándar del plasmidio.....	14
Figura 11: Diagrama general del plásmido generador de GFP en presencia de arabinosa. BBa_I13453 representa el promotor de arabinosa. BBa_B0034 el sitio de unión al ribosoma. mRFP1 el código codificante de la proteína monomérica fluorescente roja. BBa_B0010 y BBa_B0012 los terminadores. VR y VF2 corresponden a los sitios de unión de partidores. CamR la resistencia a cloranfenicol. pMB1 el origen de replicación. En BioBrick prefix y suffix se ubican las enzimas de restricción estándar del plasmidio.....	14
Figura 12: Esquema de activación del sistema regulador de genes basado en tetR, por medio de la inhibición de tetR por medio de aTc. Adaptado de The Caltech iGEM 2007 ²⁴	15
Figura 13: Diagrama general del plásmido generador de mRFP1 en presencia de aTc. P(tetR) representa el promotor sensible de tetR. BBa_J23116 es un promotor constitutivo. BBa_B0034 el sitio de unión al ribosoma. mRFP1 el código codificante de la proteína monomérica fluorescente roja. tetR es el código codificante de tetR. BBa_B0010 y BBa_B0012 los terminadores. VR y VF2 corresponden a los sitios de unión de partidores. KanR la resistencia a la kanamicina. pMB1 el origen de replicación. En BioBrick prefix y suffix se ubican las enzimas de restricción estándar del plasmidio.	16

Figura 14: Diagrama general del plásmido que genera tetR constitutivamente (izquierda) y del plásmido que genera mRFP1 a partir de un promotor sensible de tetR (derecha).....	18
Figura 15: Metodología de ensamblaje 3A para la unión de dos biobricks mediante el uso de enzimas de restricción. E: EcoRI, X: XbaI, S: SpeI, P: PstI. Adaptada de iGEM ²⁶	18
Figura 16: Diagrama general del plásmido generador de mRFP1 en presencia de lacI con resistencia a kanamicina.	19
Figura 17: Esquema de diseño propuesto de los reactores y sus conexiones. Las líneas naranja muestran flujo de medio con inductor, mientras que las verdes flujo de medio sin inductor. La inoculación se realiza en R0, mientras que la inducción en R1. B1 y B2 indican las bombas utilizadas.....	24
Figura 18: Piezas utilizadas en la construcción del reactor continuo.	25
Figura 19: Fotografía del montaje experimental para la calibración de la bomba BT100-1L Multi-channel Peristaltic Pump.....	25
Figura 20: Fotografía de la solución final luego de rehidratar los plásmidos liofilizados.	30
Figura 21: Gel de agarosa de los productos de digestión obtenidos anteriormente. Los fragmentos importantes se encuentran con su peso molecular indicado en la imagen.	31
Figura 22: Gel de electroforesis de las soluciones generadas luego del corte con NotI en los vectores pSB1K3 – J04450 y pSB1C3 – I13521.....	32
Figura 23: Placa de cultivo dividida en 8 partes para E. coli Top10 con el vector tetRojo	33
Figura 24: Placa de cultivo dividida en 8 partes para E. coli Top10 con el vector del control negativo con resistencia al cloranfenicol.....	33
Figura 25: Placa de cultivo dividida en 8 partes para E. coli Top10 con el vector del control negativo con resistencia a la kanamicina	34
Figura 26: Gel de agarosa al 2% con 4 muestras de la reacción de PCR de cada control negativo. C-: Con resistencia a cloranfenicol; K- con resistencia a la kanamicina. .	34
Figura 27: Gel de agarosa al 1% con 8 muestras de la reacción de PCR del constructo tetRojo (1-8), 3 controles positivos (+) y un tubo sin material genético (-).....	35
Figura 28: Gel de agarosa al 1% con una nueva reacción de PCR de la colonia 2 del constructo tetRojo.	36
Figura 29: 10 ensayos de inducción. Se encuentran bacterias transformantes para cada constructo por duplicado, a excepción de los controles negativos. A cada uno de ellos se le incorporó el inductor respectivo con una OD ₆₀₀ de 1 y se dejó crecer el cultivo durante una noche a 37 °C.	37
Figura 30: Imagen de los cultivos luego de una inducción durante una noche a 37 °C. Cada cultivo se identifica con el promotor respectivo y con el color de la proteína secretada, en el caso de los constructos generadores, mientras que a los controles negativos se les denomina con la inicial de la resistencia que poseen más un signo negativo. Los signos positivos y negativos en la segunda fila corresponden a la presencia o no de inductor respectivamente. Para los controles negativos se utilizaron ambos inductores.	37
Figura 31: Imagen de la fluorescencia de los pellets obtenidos luego de la centrifugación y decantación del medio LB. Estos pellets son resultado de las pruebas	

de inducción. Cada cultivo se identifica con el promotor respectivo y con el color de la proteína secretada, en el caso de los constructos generadores, mientras que a los controles negativos se les denomina con la inicial de la resistencia que poseen más un signo negativo. Los signos positivos y negativos en la segunda fila corresponden a la presencia o no de inductor respectivamente. Para los controles negativos se utilizaron ambos inductores.38

Figura 32: Pellets obtenidos de la prueba de inducción de LacI+Rojo. A la izquierda se muestra el pellet sin inductor mientras que a la derecha con inductor.....38

Figura 33: Pellets obtenidos de la prueba de inducción de LacI+Verde. A la izquierda se muestra el pellet sin inductor mientras que a la derecha con inductor.....39

Figura 34: Pellets obtenidos de la prueba de inducción de pBAD+Verde. A la izquierda se muestra el pellet sin inductor mientras que a la derecha con inductor39

Figura 35: Pellets obtenidos de la prueba de inducción de tetRojo. A la izquierda se muestra el pellet sin inductor mientras que a la derecha con inductor39

Figura 36: Pellets obtenidos de la prueba de inducción de los controles negativos. A la izquierda se muestra el pellet del constructo con resistencia al cloranfenicol, mientras que a la derecha se presenta el vector con resistencia a la kanamicina....40

Figura 37: Curva de calibración de la bomba Watson Marlow 505U Pump. Se presenta la relación de RPM vs Flujo.....45

Figura 38: Reactor de cascada de CSTR armado. Se denominó reactor RO al reactor que funcionó sólo como generador de biomasa para todo el sistema.46

Figura 39: Grafico de barrido de longitud de onda. En la muestra 1 se observa el barrido de longitud de onda para el blanco. En la muestra 2 se encuentra el Barrido de la solución de azul de metileno.46

Figura 40: Curva adimensional $F(t)$ para una perturbación tipo escalón en el reactor.47

Figura 41: Curvas obtenidas del modelo matemático de distribución de tiempo de residencia, tomando un tiempo de residencia promedio de 1,259 [h].....48

Figura 42: Curva 1 – $F(t)$ obtenida a partir de los datos experimentales para la cascada de CSTR.....48

Figura 43: Disposición de los 8 minireactor en el interior del shaker para prueba con E. coli.49

Figura 44: Cascada de CSTR pasados 24 horas de funcionamiento luego de ser inoculado el reactor 0.....50

Figura 45: Gráfico de OD600 para cada reactor y cada experiencia luego de 24 [h] de inducción.51

Figura 46: Gráfico de OD600 en el tiempo calculado a partir del tiempo de residencia promedio para cada experiencia luego de 24 [h] de inducción.....51

Figura 47: Razón fluorescencia/OD600 para cada reactor y experiencia.52

Figura 48: Razón fluorescencia/OD600 en el tiempo calculado a partir de los tiempos de residencia promedio para cada experiencia.....52

Figura 49: Velocidad específica de formación de producto en el tiempo para cada reactor y experiencia.53

Figura 50: Grafico de fuerza de promotor para cada reactor. Estos valores fueron obtenidos de un ajuste de parámetros de un modelo matemático simple basado en balance de masa.54

Figura 51: Esquema de preparación de un gel de agarosa.....	66
Figura 52:Esquema de llenado y migración de ADN.....	67
Figura 53: Placa de cultivo de E. coli Top10 con el vector tetRojo.....	70
Figura 54: Placa de cultivo de E. coli Top10 con el vector del control negativo con resistencia al cloranfenicol.....	70
Figura 55: Placa de cultivo de E. coli Top10 con el vector del control negativo con resistencia a la kanamicina	71