



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

CONCEPCIÓN, DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN REPRESILADOR
BIOLÓGICO, ELECTRÓNICO E INFORMÁTICO COMO MATERIAL PEDAGÓGICO
PARA DIFUNDIR LA BIOLOGÍA SINTÉTICA EN INSTITUCIONES
EDUCACIONALES

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

SÉVERINE MARIANNE CAZAUX

PROFESOR GUÍA
ÁLVARO MARÍA OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

SANTIAGO DE CHILE

2016

CONCEPCIÓN, DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN REPRESILADOR BIOLÓGICO ELECTRÓNICO E INFORMÁTICO COMO MATERIAL PEDAGÓGICO PARA DIFUNDIR LA BIOLOGÍA SINTÉTICA EN INSTITUCIONES EDUCACIONALES

La Biología Sintética es un campo emergente a nivel internacional que integra la ingeniería a la biología, permitiendo el uso de organismos como máquinas o herramientas para solucionar problemas tanto ambientales como energéticos y de salud. Sin embargo, en Chile está poco desarrollada, a pesar de algunos esfuerzos recientes desde el 2012. Por los principios ingenieriles transversales que trae (estandarización, modularidad, abstracción), su interdisciplinaridad y la visión colaborativa que la caracteriza, la Biología Sintética se vuelve una disciplina de alto interés para la formación educativa de los profesionales de mañana.

Se propone en esta memoria la construcción de un oscilador biológico llamado represilador y del circuito electrónico equivalente, ambos simulados mediante un modelo matemático. El objetivo es utilizar estos sistemas para transparentar la analogía de comportamientos existentes entre Biología, Electrónica e Informática, basada en los principios de estandarización, modularidad y abstracción y utilizarlos como medio pedagógico.

Por una parte, se construyó el represilador con técnicas estandarizadas de ensamblaje de ADN como el Gibson Assembly, basándose en el trabajo de Elowitz^[1]. Por otra parte, el oscilador electrónico se construyó en base a la información encontrada en la literatura, proponiendo la integración de LEDs en el circuito como reporteros del comportamiento de las tensiones de salida de cada unidad electrónica, estas últimas representando las concentraciones de los distintos represores en el sistema biológico. Finalmente, la simulación de ambos osciladores se realiza mediante modelos matemáticos implementados en Matlab, permitiendo el análisis de la sensibilidad de los parámetros asociados a cada set de ecuaciones.

La construcción del represilador se completó parcialmente con el ensamblaje exitoso del plásmido conteniendo el módulo PLacI-TetR-RFP. Una discusión importante que se desprende es la crítica acerca del uso de partidores flanqueando zonas estándares diseñadas para el ensamblaje de ADN mediante enzimas de restricción, que perjudica la especificidad de las reacciones de PCR y por lo tanto dificulta la purificación y la reamplificación de fragmentos ensamblados de interés. El oscilador electrónico se implementó exitosamente en el laboratorio de electrónica de la Facultad y la simulación con el programa LTSpiceIV mostró que los LEDs rompen la dinámica oscilante. La simulación informática de los sistemas biológico y electrónico mostró que ambos tienen efectivamente un comportamiento oscilatorio. El análisis de sensibilidad identificó la expresión basal de los promotores como parámetro crítico para la generación de oscilaciones en el sistema genético y la alimentación del polo negativo de los amplificadores operacionales como parámetro determinante en la persistencia de éstas en el sistema electrónico. En paralelo, se diseñó una actividad pedagógica para el curso de Biología para Ingenieros y Científicos de la Facultad para llevar este trabajo a una aplicación.

En base a los resultados obtenidos, se concluye que se cumplió parcialmente los objetivos planteados y se propone un plan de acción a futuro para terminar el trabajo, el cual podría eventualmente ser aprovechado en el proyecto piloto de Educación y Cultura CTI del gobierno. Primero, se tiene que realizar los últimos ensamblajes genéticos para completar la construcción del represilador y luego monitorear la fluorescencia de las bacterias transformadas con el represilador. En el caso del sistema electrónico, se volverá al laboratorio para determinar el efecto de la inserción de los LEDs sobre la dinámica oscilatoria y probar varios sets de resistencias y condensadores para modificar la frecuencia de las oscilaciones. En cuanto a la simulación informática, se ajustará en el futuro a los parámetros experimentales de ambos sistemas biológico y electrónico.

AGRADECIMIENTOS

No sólo quiero agradecer a las personas que me apoyaron durante el proceso de mi memoria sino también a aquellas que, de alguna forma, hicieron que mi estadía en Chile fuera una experiencia linda, emocionante y llena de aprendizajes. A continuación, quiero dar las gracias:

Al Pr. Juan Asenjo, por permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Sra. Nancy Carrasco, por su paciencia infinita frente a todas las dudas que tuve a lo largo de estos meses en el laboratorio.

Al Pr. Álvaro Olivera, por su apoyo tanto técnico como emocional, en todas circunstancias. Gracias por haber aceptado ser mi profesor guía y por la confianza que me entregó no sólo durante la memoria, sino durante estos dos años y medio de estudio.

A la Sra. Oriana Salazar, por sus buenos consejos y su apoyo cada vez que lo necesité. Gracias también por su confianza.

A la Sra. Ziomara Gerdtzen, por haber aceptado también ser partícipe de este trabajo y haberme guiado con sus buenos consejos.

A Jose, mi mentor de laboratorio, por haber aguantado todas mis dudas, mis inseguridades y por haberme enseñado tanto. ¡Gracias por todas las comidas chinas compartidas, la compañía durante las horas indecentes de trabajo y las buenas conversaciones!

A Diego, el Rey de los Gibson Assembly. Te había dicho que te dedicaría la memoria si me resultara este ensamblaje de tres fragmentos. Bueno, funcionó a media pero igual te quiero agradecer el tiempo que me dedicaste cada vez que necesité tu ayuda, y tu buena onda, siempre.

A los chic@s de la sala “co-working”, Engel, Nacho, Luis, Medardo, Gabriel y Franco, por los buenos (y malos?) momentos que pasamos juntos, los momentos de relajación, las risas y la ayuda. Mención especial para Franco, gracias por los buenos momentos que compartimos fuera del marco del laboratorio.

A los chic@s del grupo de memoristas PESB2: Fede, Felitss, Lucho, Mayi, por el apoyo que siempre me proporcionaron, por sus consejos, por reírse de mis desventuras y por su amistad.

A mis compañeros de generación, por haberme apoyado a lo largo de estos dos años y medio y por los buenos momentos compartidos. Hicieron que me integrara fácilmente en el Departamento y transformaron este intercambio en una aventura increíble. Gracias en particular a Caro, Seba, Pablo, Nacho, Tati, Vale, Lucho, Javi, Fede, Joaco, Felitss, Tami, Pancho, Coni y Lore.

A Lorena, por ser la mejor compañera de departamento *ever*.

Al grupo OpenBio, por la aventura humana y los proyectos sacados en conjunto. Valoro mucho los lazos que formamos y la calidad de las personas que conocí en este grupo. Espero que se vengán más proyectos y aventuras.

A los chic@s de la Universidad Popular Patricio Manzano y las trabajadoras de la Facultad: aunque lleve poquito en la organización quiero agradecerlos porque su motivación, su altruismo, su empeño, su experiencia, su humildad y su generosidad me inspiran y le dan más sentido a lo que hago aquí en Chile y a este trabajo de memoria en particular.

A Nina, por tu amistad, las conversaciones, las salidas, las no-salidas, las confidencias, el apoyo constante y por tu generosidad. Espero que se vengán más momentos de complicidad y que se estrechen estos lazos que tejimos.

A Cloe, por estos numerosos años de amistad constante, en las buenas como en las malas y por el apoyo incondicional que me das día a día.

A mi familia: papá, mamá, Nicolas y Marjolaine, por ser los pilares de mi vida. Sin ustedes no habría llegado donde estoy hoy, les agradezco el amor incondicional y el apoyo constante que me dan. Les amo muchísimo, a pesar de los 11.000 km que nos separan.

A mi abuela Cathie, por todo el amor que me diste desde pequeña y por creer en mi en todas las circunstancias. No alcanzaste a verme irme, pero te llevo en mi corazón todos los días.

Tabla de Contenido

1.	Introducción	1
1.1	Surgimiento de la Biología Sintética.....	1
1.2	Aplicaciones de la Biología Sintética	2
1.3	La Biología Sintética a través del mundo	3
1.3.1	Situación internacional.....	3
1.3.2	Situación en Chile.....	6
1.4	De la necesidad de enseñar la Biología Sintética	7
1.5	Los principios ingenieriles detrás de la Biología Sintética.....	9
1.5.1	Estandarización.	9
1.5.2	Modularidad.....	12
1.5.3	Abstracción.....	13
1.6	Motivación de crear un kit pedagógico basado en Biología Sintética	13
2.	Objetivos	14
2.1	General.....	14
2.2	Específicos	14
3.	Antecedentes	15
3.1	Represilador	15
3.2	Circuito electrónico equivalente al represilador.....	17
3.3	Modelamiento matemático y analogía de los sistemas.....	20
4.	Metodología	22
4.1	Sistema biológico: construcción de un represilador	22
4.2	Sistema electrónico: metodología de obtención de oscilaciones.....	28
4.3	Simulación informática: determinación de la sensibilidad de los sistemas biológico y electrónico.....	29
4.3.1	Simulación del represilador.....	29
4.3.2	Simulación del oscilador electrónico.....	30
5.	Resultados	31
5.1	Sistema biológico: construcción del Represilador	31
5.1.1	Generación de una biblioteca con las partes a ensamblar	31
5.1.2	Generación de los módulos 1, 2 y 3	33
5.1.3	Análisis de la expresión de los represores derivados de los constructos genéticos en las células recombinantes	34
5.1.4	Ensamblaje de los módulos 2 y 3 en pET22b	35
5.1.5	Resultados de la secuenciación.....	48
5.1.6	Reconstrucción del represilador	49

5.2 Construcción del oscilador electrónico	54
5.3 Simulación informática de ambos osciladores, biológico y electrónico	60
5.3.1 Represilador biológico.....	60
5.3.2 Sistema electrónico.....	64
5.4 Actividad pedagógica	66
6. Discusión	67
6.1 Elementos que fallaron en la construcción de los osciladores	67
6.2 Análisis crítico de las metodologías utilizadas	70
6.3 Comparación del represilador con el oscilador electrónico	72
6.4 Aplicabilidad de la memoria.....	72
7. Conclusiones y proyecciones.....	74
7.1 Conclusiones.....	74
7.2 Proyecciones	74
8. Bibliografía.....	76
9. ANEXOS	82
Anexo 9.1 – Partidores utilizados a lo largo de la memoria.....	82
Anexo 9.2 – Preparación de células quimiocompetentes.....	87
Anexo 9.3 – Resuspensión y replicación de las partes del kit iGEM	88
Anexo 9.4 - Plaqueo por método de extensión	89
Anexo 9.5 - Cultivo líquido y Stock en glicerol	90
Anexo 9.6 – Miniprep.....	91
Anexo 9.7 - Resuspensión partidores.....	92
Anexo 9.8 – Preparación del cóctel para reacción de PCR.....	93
Anexo 9.9 – Protocolo de purificación en gel	94
Anexo 9.10 – Protocolo para realizar reacciones de Gibson Assembly	95
Anexo 9.11 - Electroforesis de ADN con GelRed	96
Anexo 9.12 – Protocolo para realizar PCR colonia	97
Anexo 9.13 – Ensayos Digestión.....	98
Anexo 9.14 – Electroforesis de proteínas	99
Anexo 9.15 – Resultados de secuenciación	100
Anexo 9.16 – Gráficos obtenidos a partir del análisis de sensibilidad de los parámetros del represilador	101
Anexo 9.17 – Propuesta de actividad pedagógica para el curso de BIC	107
Anexo 9.18 – Recursos utilizados durante la memoria.....	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Procesos bioquímicos y sus equivalentes en un sistema electrónico. Adaptado y traducido desde el trabajo de Teo et al, 2015.....	17
Tabla 2 - Establecimiento de la analogía entre las ecuaciones que rigen el comportamiento del represilador biológico y del oscilador electrónico, respectivamente. Fuente: elaboración propia en base a las ecuaciones de la literatura y la interpretación de su significado físico.....	21
Tabla 3 - Parámetros del represilador estudiados y rango de valores probado.....	29
Tabla 4 - Parámetros del circuito electrónico estudiados y rango de valores probado.	30
Tabla 5 - Resumen de las condiciones probadas y de su efecto sobre el carácter oscilatorio del sistema.	63

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 - Rubros de las aplicaciones de la Biología Sintética en el año 2010.	2
Fig. 2 – Número de solicitudes de patentes relacionadas con Biología Sintética emitidas entre 1990 y 2010.	3
Fig. 3 - Distribución acumulativa de las solicitudes de patentes entre 1990 y 2010.	4
Fig. 4 – Origen institucional de las solicitudes de patentes.	4
Fig. 5 – Instituciones activas en el campo de la Biología Sintética en el año 2013.	5
Fig. 6 - Evolución de la inversión en empresas de Biología Sintética desde 2009.	5
Fig. 7 – Descripción gráfica de la estructura de un BioBrick.	10
Fig. 8 – Descripción de la ligación de dos BioBricks con su estructura estándar.	10
Fig. 9 – Principio de funcionamiento del ensamblaje 3A.	11
Fig. 10 – Principio de funcionamiento de la reacción de Gibson Assembly.	12
Fig. 11 – Represilador de Elowitz.	15
Fig. 12 - Resultados experimentales: intensidad de la fluorescencia emitida por la bacteria a lo largo del tiempo, según el trabajo de Elowitz.	16
Fig. 13 - Diseño del represilador de la memoria.	16
Fig. 14 – Circuito electrónico equivalente al represilador. Fuente: Teo et al., 2015.	18
Fig. 15 – Circuito electrónico equivalente al represilador. Fuente: A. Wagemakers, 2008.	18
Fig. 16 – Respuesta del sistema electrónico diseñado por A. Wagemakers.	19
Fig. 17 - Represilador construido en la memoria.	22
Fig. 18 - Diagrama de bloques de las secciones principales de trabajo de la construcción del represilador.	23
Fig. 19 - Metodología de armado y testeo del circuito electrónico equivalente al represilador biológico.	28
Fig. 20 – Amplificación por PCR de las partes biológicas necesarias.	31
Fig. 21 – Amplificación por PCR de los tres promotores del sistema.	32
Fig. 22 – Resumen de las amplificaciones de todas las partes genéticas y sus temperaturas de annealing respectivas.	32
Fig. 23 - Resultados de los ensamblajes Promotor-RBS-ORF.	33
Fig. 24 - Resultados de la transformación de distintas E. coli DH5 α con cada uno de los tres módulos.	33
Fig. 25 - Resultados de los PCR de colonias realizados sobre las bacterias transformantes de la Fig. 24.	34
Fig. 26 - Expresión de los tres reportes en células recombinantes.	34
Fig. 27 - Visualización en transiluminador de proteínas de la RFP en células recombinantes.	35
Fig. 28 - Células transformadas con el mix de ligación Ptet-cl-Pcl-Lacl.	36
Fig. 29 - Resultados de amplificación de los distintos módulos construidos.	37
Fig. 30 - Resultados del ensamblaje de los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl por Gibson Assembly.	38
Fig. 31 - Gel de electroforesis del ensamblaje por Gibson Assembly de los constructos Ptet-cl y Pcl-Lacl.	38
Fig. 32 - Gel de electroforesis de las reamplificaciones del constructo ensamblado Ptet-cl-Pcl-Lacl. .	39
Fig. 33 - Cultivo en placa de bacterias E. coli BL21 quimiocompetentes transformadas.	40
Fig. 34 - Resultados de los PCR de colonias del plásmido contenido en las bacterias transformantes seleccionadas.	40
Fig. 35 - Gel de electroforesis de la reacción de Gibson Assembly entre los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl.	41

Fig. 36 - Gel de electroforesis de la reamplificación por PCR del producto purificado de la reacción de Gibson Assembly de la Fig. 35.	42
Fig. 37 - Gel de electroforesis de la reamplificación del producto de PCR de la Fig. 36, apuntando a aumentar la concentración de éste.	42
Fig. 38 - Resultado de la transformación, después de 16h de incubación a 37°C.	43
Fig. 39 - Resultados del PCR de colonias de las 15 colonias escogidas.	43
Fig. 40 - Resultados de las amplificaciones por PCR de todos los ensamblajes realizados desde el inicio del trabajo.	44
Fig. 41 - Comprobación por ensayo de digestión del ensamblaje PTet-cl-Pcl-Lacl.	45
Fig. 42 - Resultados de la amplificación por PCR de los tres fragmentos a ensamblar.	46
Fig. 43 - Resultado del ensamblaje simultáneo de los módulos 2 y 3 con el vector pET22b linealizado mediante reacción de Gibson Assembly.	46
Fig. 44 - A: Resultado de la transformación con el control positivo pUC. B: Resultado de la transformación con el mix de ligación por Gibson Assembly, ensamblaje simultáneo de los módulos 2, 3 y pET22b linealizado.	47
Fig. 45 - Resultado del PCR de colonias realizado sobre 16 colonias transformantes de la placa presentada en la Fig44-B.	47
Fig. 46 - Comprobación por ensayo de digestión del constructo Ptet-cl-Pcl-Lacl.	48
Fig. 47 - Metodología de reemplazo del RBS en el constructo PLacl-TetR-RFP.	49
Fig. 48 - Metodología de reemplazo del RBS en los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl.	50
Fig. 49 - Resultados de las amplificaciones de todas las partes.	51
Fig. 50 - Resultados de las ligaciones por Gibson Assembly.	51
Fig. 51 - Expresión de RFP en células transformadas con el constructo correcto PLacl-TetR-RFP.	52
Fig. 52 - Comprobación por ensayo de digestión de la reconstrucción del módulo PLacl-TetR-RFP con el RBS correcto.	53
Fig. 53 - Circuito electrónico comportándose como oscilador y análogo al represilador biológico.	54
Fig. 54 - Comparación entre la simulación entregada por Matlab y los resultados obtenidos en el trabajo de Wagemakers.	55
Fig. 55 - Simulación del oscilador electrónico con LTSpice IV.	56
Fig. 56 - Prueba experimental del oscilador en el laboratorio de electrónica.	57
Fig. 57 - Respuesta experimental del oscilador electrónico. Escala temporal: 2ms/cuadrado. Escala voltimétrica: 5 V/cuadrado.	58
Fig. 58 - Simulación del efecto de la inserción de un LED en el circuito sobre la dinámica oscilatoria del sistema electrónico.	59
Fig. 59 - Simulación en Matlab del comportamiento de un represilador ideal, en las condiciones descritas anteriormente.	60
Fig. 60 - Comportamiento del oscilador introduciendo la no idealidad de los tiempos de degradación de los tres represores.	61
Fig. 61 - Panorama de los distintos comportamientos que puede adoptar el sistema biológico según el valor de los parámetros claves del oscilador.	62
Fig. 62 - Efecto de la constante T sobre la dinámica de las oscilaciones.	64
Fig. 63 - Efecto de las tensiones de alimentación de los OPAMPs sobre la dinámica oscilatoria del sistema, cuando una de ellas es nula.	65
Fig. 64 - Efecto de las tensiones de alimentación de los OPAMPs sobre la dinámica oscilatoria del sistema.	65
Fig. 65 - Respuesta del sistema electrónico cuando la tensión Vcc- alcanza el valor umbral por sobre el cual se pierden las oscilaciones, en este caso Vcc- = -1,7 V.	66
Fig. 66 - Ejemplos de resultados de secuenciación.	69

Fig. 67 - Principio de funcionamiento del Ensamble 3A.....	70
Fig. 68 - Resultado del ensamblaje por Gibson Assembly de dos fragmentos que llevan los extremos estandarizados con Prefijo (Px) y Sufijo (Sx).	71
Fig. 69 - Resultado de la reamplificación del constructo unido por Gibson Assembly "1+2" de la Fig. 68, con el partidor directo que se une en el prefijo y el partidor reverso que se une en el sufijo.....	71

1. Introducción

1.1 Surgimiento de la Biología Sintética

Es difícil saber cuándo nació realmente la Biología Sintética. La razón es bastante simple: no hay acuerdos sobre su definición. Por ende, de acuerdo a cómo uno entiende esta disciplina, su origen puede variar en el tiempo. Aferrándose al significado de “síntesis”, se podría decir que existe la Biología Sintética desde que se empezó a reproducir artificialmente componentes y procesos biológicos, lo cual colocaría el inicio de esta disciplina al momento de los primeros avances en ingeniería genética, como el desarrollo de las técnicas de clonación y de PCR en los años 1980^[2]. De hecho, el término “Biología Sintética” apareció por primera vez en la publicación de Barbara Hobom en 1980 para referirse a la ingeniería de bacterias con técnicas de ADN recombinante^[2,3]. Los avances en las herramientas de computación y el desarrollo de técnicas de secuenciación a escala de genomas en los años 1990s permitieron discernir que los sistemas vivos funcionan, en parte, con base en módulos genéticos cumpliendo funciones específicas y bien definidas, lo que permitió replantear la Biología Sintética como una disciplina ingenieril^[4]. La integración de herramientas como el modelamiento matemático dio un giro en la manera con la cual se trabajaba la ingeniería genética, pues permitió describir y predecir el comportamiento de sistemas vivos complejos como si fueran máquinas constituidas de componentes estándares que permitían entender cómo se relaciona el conjunto con cada módulo independiente identificado^[6,4]. La síntesis de nuevos sistemas biológicos con diversos grados de complejidad permite además llegar a un nivel de entendimiento del funcionamiento de la vida que evita conjeturar teorías o malinterpretar algunas observaciones, reduciendo por lo tanto el sesgo en el análisis de fenómenos biológicos^[3]. Apoyándose en los conceptos y el lenguaje de la ingeniería, la Biología Sintética ha cumplido varios hitos, involucrando circuitos genéticos cada vez más complejos que permiten un entendimiento de los eventos moleculares cada vez mayor. Desde el *toggle switch* de Gardner y el repressilador de Elowitz en el año 2000^[7, 1] hasta la creación de un genoma artificial mínimo de 531 kpb en bacterias este año^[5], la Biología Sintética ha ido borrando progresivamente las fronteras entre lo natural y lo artificial, permitiendo al hombre diseñar nuevas formas de vida para fines de investigación o de bien común. A medida que se han ido entendiendo los procesos moleculares que rigen los comportamientos de organismos vivos, se han descubierto potenciales aplicaciones que, colaborando con otras disciplinas ingenieriles, podrían aportar al desarrollo de la sociedad y la preservación del medio ambiente.

Actualmente, la Biología Sintética se entiende como:

- “La ingeniería de la biología: la síntesis de sistemas complejos basados (o inspirados) en la biología que presentan funciones que no existen en la naturaleza. La perspectiva ingenieril puede ser aplicada a todos los niveles de jerarquía de las estructuras biológicas – desde las moléculas individuales hasta células enteras, tejidos y organismos. En claro, la biología sintética permitirá el diseño racional y sistemático de “sistemas biológicos”. ”^[6]
- “El diseño y la construcción de nuevas partes biológicas, dispositivos y sistemas y el re-diseño de sistemas biológicos naturales existentes para propósitos útiles.”^[7]

Las palabras “propósitos útiles” se pueden interpretar de numerosas formas, pero afortunadamente el enfoque hasta ahora ha sido orientado hacia el bien común y la resolución de problemas de origen natural o antropológico que el hombre está enfrentando. Efectivamente, los acontecimientos acumulados desde el inicio de la revolución industrial en la segunda mitad del siglo XVIII han de a poco despertado las conciencias: el hombre no puede seguir explotando sin límites los recursos naturales que son finitos o que tienen una tasa de regeneración más corta que la velocidad de explotación por

el humano. Los cambios climáticos y las actividades humanas ya empezaron a provocar efectos desastrosos [8], provocando la muerte de miles de especies animales y vegetales, aportando enfermedades en regiones que hasta entonces se encontraban protegidas de ellas [9, 10], aumentando el número de catástrofes naturales y generando conflictos y guerras por el agua, que se vuelve cada vez más escasa [11].

En este contexto, la urgencia de mitigar los impactos nefastos de la producción industrial humana y de su uso de los recursos naturales sobre el medio ambiente y la necesidad de resolver los problemas energéticos, ambientales y de salud que el hombre está conociendo, propicia el desarrollo de soluciones novedosas que buscan el equilibrio entre las actividades humanas y el respeto de su ambiente, enmarcándose en las nuevas políticas de sustentabilidad que toman cada vez más relevancia a escala internacional [12].

1.2 Aplicaciones de la Biología Sintética

Dentro de estas soluciones, la Biología Sintética permite el uso de organismos vivos como máquinas vivas o micro-fábricas para aportar soluciones a varios problemas tales como la producción de energía, o la detección y degradación de contaminantes en aguas y suelos [13]. A continuación, en la **Fig. 1**, se muestran los campos de aplicación de la Biología Sintética en el año 2010.

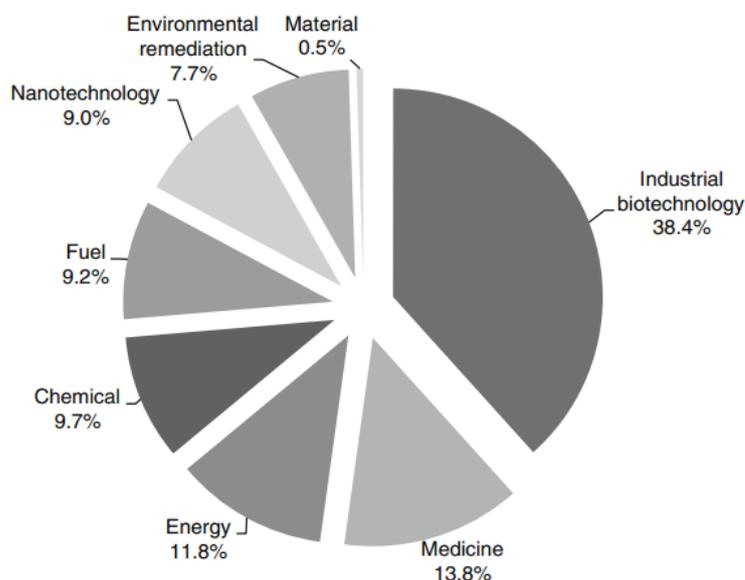


Fig. 1 - Rubros de las aplicaciones de la Biología Sintética en el año 2010. Fuente: Van Doren et al, 2013.

Ejemplos de estas aplicaciones son numerosos: en la producción de materiales, se puede destacar la producción de seda de araña, un polímero normalmente producido por arañas con propiedades mecánicas tan asombrosas que podría servir tanto para chaquetas anti-balas como para la fabricación de cuerdas flexibles para puentes [14, 15]. La protección ambiental también propone soluciones en base a organismos programados para degradar compuestos tóxicos como herbicidas [16]. Uno de los rubros emergentes es la fabricación de biocombustibles a partir de microorganismos en los cuales se integraron u optimizaron vías responsables para la producción de lípidos utilizados como molécula base en el proceso de fabricación de biocombustibles [17, 18]. Estos avances van muy ligados al trabajo que se ha hecho en la producción de energías renovables no convencionales, como la fabricación de hidrógeno a partir de microorganismos fotosintéticos [19]. Además, la Biología Sintética no deja de lado la industria química puesto que permite producir compuestos como detergentes a partir de microorganismos como bacterias o levaduras [20]. La Biología Sintética llegó también al campo de la medicina, en particular a través del diseño de circuitos genéticos como terapia para el cáncer de mama [21]. Finalmente, la posibilidad de rediseñar plantas permite abrazar un nuevo horizonte de

aplicaciones, desde cultivos mejorados para la producción de alimentos hasta la utilización de plantas como fuentes de materia prima renovable para la industria [22].

Las posibilidades que se abren gracias a la Biología Sintética son tan numerosas que se dice que la biología sintética promete ser la próxima revolución industrial [23, 24].

1.3 La Biología Sintética a través del mundo

1.3.1 Situación internacional

La Biología Sintética ha conocido un desarrollo muy rápido a nivel internacional desde los años 1990. El 70% del conocimiento científico mundial se encuentra en patentes [25], por lo que el estudio de las patentes emitidas desde este periodo permite identificar los actores que contribuyeron al desarrollo temprano de esta disciplina. A continuación, en la **Fig. 2**, se presentan los resultados de un análisis del 2013 de las solicitudes de patentes emitidas entre 1990 y 2010 en torno a Biología Sintética [29].

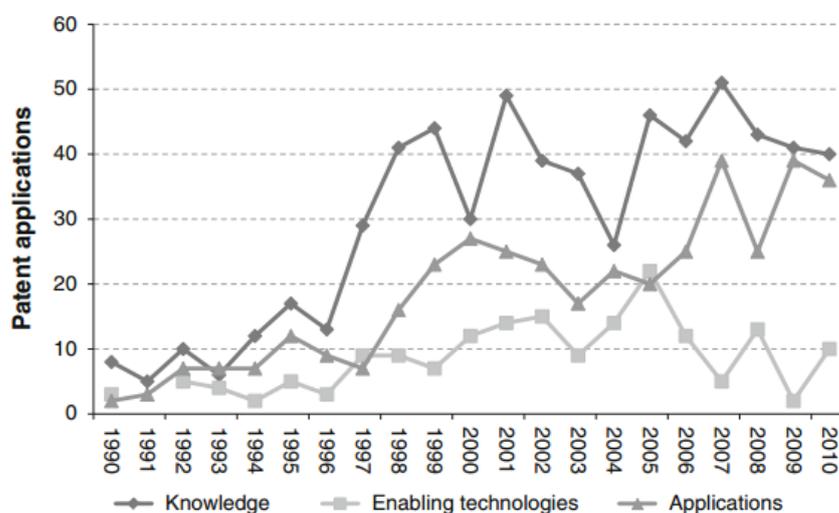


Fig. 2 – Número de solicitudes de patentes relacionadas con Biología Sintética emitidas entre 1990 y 2010, en los campos siguientes: (1) Conocimiento; (2) Tecnologías esenciales; (3) Aplicaciones. Fuente: Van Doren et al, 2013.

Se nota que la prioridad se puso en la generación de conocimiento y el desarrollo de aplicaciones de la Biología Sintética, habiéndose por lo menos cuadruplicado el número de patentes entre 1990 y 2010 para cada uno de estos campos. El desarrollo de tecnologías esenciales, consideradas en el estudio como necesarias para el desarrollo de la Biología Sintética y sus principios, se vio de a poco abandonado en la segunda mitad de la década de los 2000.

Los principales países involucrados en este desarrollo sobre el mismo periodo son del hemisferio norte, liderados por los Estados Unidos que emitieron el 45% de las solicitudes de patentes, seguidos por los países europeos que suman el 28% del total y por los países de Asia Oriental que suman 13%, como se puede observar en la **Fig. 3**.

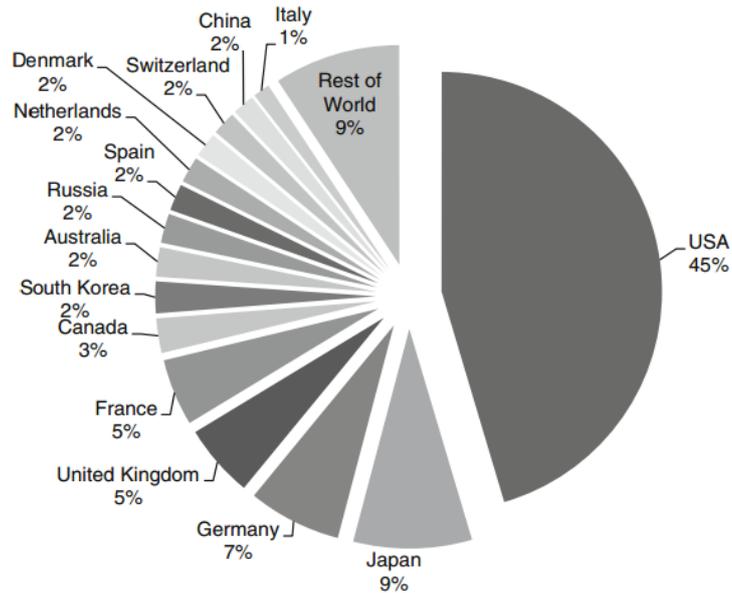


Fig. 3 - Distribución acumulativa de las solicitudes de patentes entre 1990 y 2010. Fuente: Van Doren et al, 2013.

Más del 80% de las solicitudes de patentes proviene de empresas o de universidades, como se nota en la Fig. 1.4, lo cual es consistente con que lo que se genera principalmente en torno a la Biología Sintética es conocimiento y aplicaciones comerciales (Fig. 1.1).

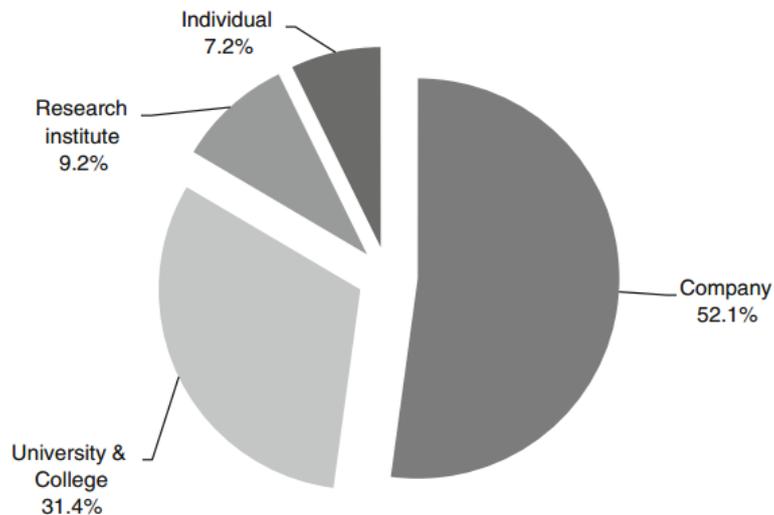


Fig. 4 – Origen institucional de las solicitudes de patentes. Fuente: Van Doren et al, 2013.

Tres años después, la tendencia no cambia mucho: el mapa de la Fig. 1.5 muestra que el desarrollo de la Biología Sintética lo llevan esencialmente los Estados Unidos, Europa y Asia del Este/Sur-Este. Sin embargo, se nota un progreso por parte de China, que aumentó sensiblemente su presencia en el mundo de la Biología Sintética, puesto que si en el 2010 poseía el 2% de las patentes que solicitadas en un periodo de 20 años, en el 2013 posee más del 5% de las instituciones (empresas, universidades, centros de investigación, etc) activas en el campo de la Biología Sintética. Basta con mirar el número de equipos que representan anualmente a China en la competencia iGEM, la competencia de Biología Sintética más relevante a escala internacional, que pasó de 11 a 42 entre el 2010 y el 2013, para medir el involucramiento de las universidades chinas en Biología Sintética. Este año se inscribieron 62 equipos chinos, contra 65 equipos estadounidenses [26].

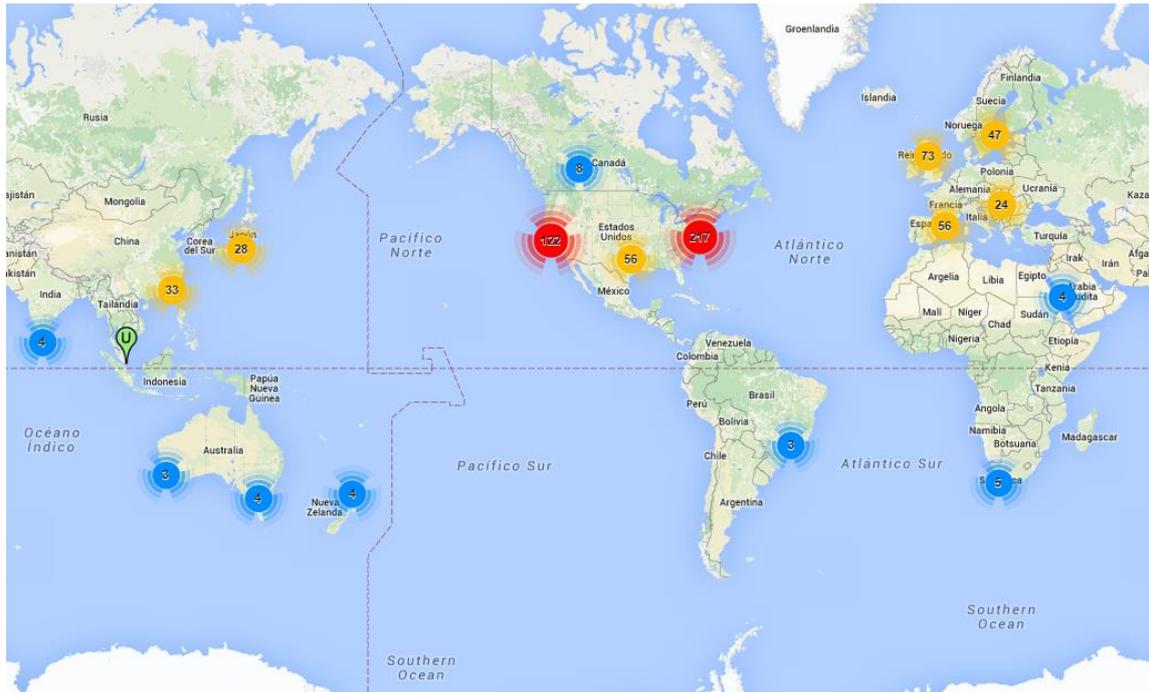


Fig. 5 – Instituciones activas en el campo de la Biología Sintética en el año 2013. Se entiende por instituciones cualquier empresa, universidad, centro de investigación, laboratorio u otros centros. Son consideradas activas las instituciones que proporcionan información explícitamente relacionada con trabajo en Biología Sintética a través de sus páginas web, publicaciones científicas, patentes, reportes gubernamentales y artículos de prensa o en revistas. Fuente: SynBio Project.

El mercado de la Biología Sintética ha estado aumentando a medida que se han resuelto problemas de escalamiento industrial de proyectos de investigación [27] y, de acuerdo a análisis de mercado, se proyecta que el mercado de la Biología Sintética podría alcanzar USD 38,7 billones de aquí al 2020 [28]. De esta forma, el número de empresas de Biología Sintética financiadas entre 2009 y 2015 se ha quintuplicado (ver Fig. 6-A), arrojando en primer lugar a la empresa Editas Medicine, primera empresa de edición de genoma basada en la tecnología de CRISPR/Cas9 [29], con una inversión de USD 120 millones en el año 2015 (ver Fig. 6-B).

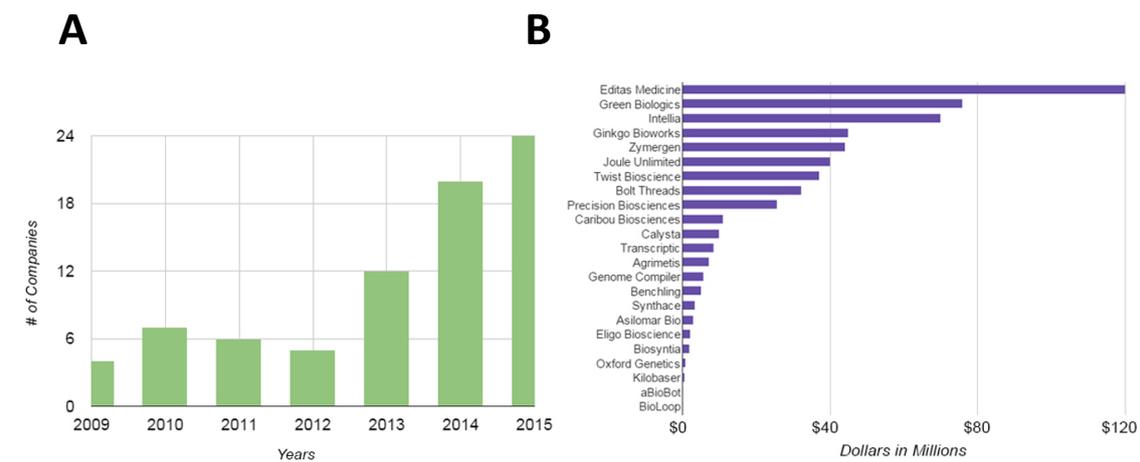


Fig. 6 - Evolución de la inversión en empresas de Biología Sintética desde 2009. **A:** Número de compañías en el mundo trabajando con Biología Sintética financiadas entre 2009 y 2015. **B:** Clasificación de las empresas de Biología Sintética de acuerdo a la inversión que recibieron, en millones de dólares, en el año 2015. Fuente: SynBioBeta, 2015.

A escala internacional, varias organizaciones hacen avanzar el debate sobre la Biología Sintética, promoviendo la investigación en esta área, su transferencia efectiva a la sociedad y la reflexión sobre las consecuencias de su uso en el entorno. Algunas instituciones relevantes son por ejemplo: Synenergene, un programa europeo enfocado en el desarrollo de la investigación responsable y de la innovación en ese campo, construida colaborativamente gracias a un diálogo abierto con los accionistas y la comunidad ^[30]; J. Craig Venter Institute, una iniciativa estadounidense que juntó varias instituciones científicas en un solo centro gigante y multidisciplinar de investigación genómica ^[31], de escala tan grande como el grupo multi-universidades SynBERC que busca sentar las bases necesarias para facilitar y acelerar el desarrollo de la Biología Sintética ^[32] ; The BioBrick Foundation, una organización estadounidense que describe su misión de la manera siguiente: “asegurar que la ingeniería de la biología se conduce de manera abierta y ética para beneficiar a toda la gente y al planeta.” ^[33] y dirige una iniciativa llamada OpenWetWare para compartir de la información entre investigadores y grupos que trabajan con Biología Sintética ^[34]; Etc Group, una organización internacional con representantes de los cinco continentes que vela por la conservación de la biodiversidad y la protección de comunidades vulnerables a través de la vigilancia de las nuevas tecnologías y promoviendo el desarrollo responsable de éstas ^[35]; ERASynbio, una agrupación internacional de agencias de financiamiento para favorecer el desarrollo de la Biología Sintética, impulsada inicialmente por la Comisión Europea ^[36]; el Laboratorio de Microbiología de la Academia China de Ciencias, un centro de investigación en microbiología chino que desarrolla trabajos en la reconstrucción y la optimización de rutas metabólicas en microorganismos ^[37] ; Biomass Systems and Synthetic Biology Center, un centro brasileño cuya misión es “generar conocimiento científico y tecnologías para la producción de fuentes de energía sustentables usando plantas, microorganismos y sus combinaciones” ^[38].

1.3.2 Situación en Chile

Como se nota en el mapa de la **Fig. 5**, no hay en Chile iniciativas con resonancia internacional en torno a la Biología Sintética. Sin embargo, el mapa es del 2013 y no considera avances posteriores a esa fecha. Es relevante mencionarlo puesto que en Chile se ha despertado interés en este campo desde el 2012, tanto en la comunidad científica como en la comunidad educativa.

En el 2013, la Universidad Mayor, a través de su incubadora Gesta Mayor, se adjudicó un fondo de CLP 40 millones a partir del Programa de Apoyo al Entorno de CORFO para promover la Biología Sintética en los colegios y las universidades chilenas, con especial énfasis en el concurso iGEM, competencia educativa iniciada por el MIT en el 2004 y que en diez años ha logrado imponerse internacionalmente ^[39]. En particular, ese año organizó el Jamboree regional de iGEM, por lo que todos los equipos latinoamericanos vinieron a Chile para defender sus proyectos ^[40]. Desde entonces ha promovido la participación de varios colegios chilenos en la categoría High School de la competencia internacional de Biología Sintética, como los colegios Emelina Urrutia, San Andrés y el Liceo Eugenio Hostos en el año 2015 y más recientemente permitió a dos equipos del colegio Saint Rose y uno del Liceo Eugenio Hostos participar de la edición 2016 de este concurso. En paralelo, varias universidades del país participaron también de esta competencia: la Pontificia Universidad Católica en el 2012 y el 2013, la Universidad Mayor en el 2014 y las Universidades de Chile y Adolfo Ibáñez en el 2015 ^[26]. Los equipos abordaron problemáticas tan diversas como la lucha contra algunas enfermedades como la silicosis ^[41], el cáncer de la piel ^[42], la enfermedad celiaca ^[43] o la fibrosis cística ^[44], pero también la producción in vitro de componentes de interés industrial ^[45], la bioluminiscencia ^[46], o la producción de un plástico biodegradable ^[47].

También, en el año 2013, el Doctor en Ingeniería Eléctrica y Ciencias de la Computación y Profesor del MIT Ron Weiss impartió una charla titulada “Biología Sintética: desde partes a módulos a aplicaciones terapéuticas” en la Universidad Adolfo Ibáñez, en la Escuela de Diseño y el Departamento de Bioingeniería ^[48], con el fin de dar a conocer esta nueva manera de abordar la biología y sus potenciales impactos en el futuro ^[49]. La concientización sobre las potencialidades de la Biología Sintética siguió su

camino con el encuentro “¡Vamos al lab!” organizado por la SOFOFA y que convocó a representantes de 11 empresas ese mismo año ^[50, 51].

En 2014, la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile organizó el Segundo Encuentro de Biología Sintética, en donde varios expositores internacionales dieron a conocer diversos proyectos apuntando a resolver problemas de salud humana o desarrollar nuevas aplicaciones ^[52]. Esta conexión con el internacional está facilitada por la actividad del profesor asistente Fernán Federici, que hace su postdoctorado en Biología Sintética en la Universidad de Cambridge. En el año 2016, la Universidad de Chile organizó un simposio con un curso práctico sobre el manejo de la técnica CRISPR/Cas9 ^[53].

A nivel institucional, existe un Núcleo Milenio en Biología Sintética y Biología de Sistemas Vegetales apoyado por la Pontificia Universidad Católica de Chile y la Universidad Adolfo Ibáñez ^[54], que es un centro de investigación financiado por la Iniciativa Científica Milenio, programa del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo y que depende de la Subsecretaría de Economía y Empresas de Menor Tamaño ^[55]. Este centro utiliza la Biología Sintética como herramienta para desarrollar de manera interdisciplinaria la Biología Vegetal y proponer soluciones basadas en plantas a necesidades como la salud, la energía y el alimento ^[56].

En el ámbito productivo, si bien existen más de 200 empresas de biotecnología en Chile, pocas utilizan ingeniería genética en el desarrollo de sus soluciones: de los 68 socios de Asembio, menos de diez tienen una actividad directa o indirectamente relacionada con ingeniería genética: BioIngen Tech, Andes Biotechnologies, Activaq, Green Biofactory, Genzyme o Neobiotech, Biosonda, Núcleo Biotecnología Curauma y Vaccimed ^[57]. De estas empresas, ninguna se basa en técnicas de Biología Sintética, aunque varias sí utilicen ADN artificial fabricado químicamente. Sin embargo, se puede destacar la actividad de la start’up Kaitek Labs, la cual habla de “computadoras bacterianas” para referirse a los microorganismos que diseñan e ingenian para fabricar sus biosensores de marea roja^[58].

Por lo anterior, se puede destacar una voluntad a escala del país de potenciar el desarrollo de la Biología Sintética en Chile. Sin embargo, hasta ahora los avances se han observado en los ámbitos de la investigación y de la educación, pero poco en el área productiva.

1.4 De la necesidad de enseñar la Biología Sintética

Primero, en varios países, la enseñanza de la Biología resulta poco interesante o difícil para numerosos alumnos que ven en esta disciplina un ejercicio de memoria más que una ciencia experimental que les permite entender su entorno: en la Conferencia Internacional para la Mejora de la Enseñanza de la Biología y otras ciencias experimentales en la Educación Parvularia y Media, realizada en Santiago en Abril 2016, se ejemplificó este diagnóstico con un extracto de una prueba en una escuela de los Estados Unidos, en el que se pedía al alumno identificar la frase en la cual las palabras “retículo endoplásmico” estaban correctamente utilizadas. Este ejemplo permite efectivamente entender por qué los alumnos consideran que la Biología es una disciplina aburrida que sólo requiere de memoria como si fueran clases de gramática ^[59].

En esta conferencia se enfatizó en que la responsabilidad de las Universidades es acercar este conocimiento de forma más didáctica y amigable en el parvulario y en la enseñanza media. Esto se traduce, en Chile por ejemplo, en que los estudiantes de posgrado deban dedicar al menos 100 horas anuales a la realización de clases para transferir el conocimiento que vayan adquiriendo en su formación ^[59]. De esta forma se fomenta la colaboración entre profesores, estudiantes de posgrado y alumnos.

Las instituciones educacionales, además de transmitir conocimiento, son también un lugar de formación ciudadana a través de la enseñanza de disciplinas como Historia, Geografía, Filosofía, Ciencias Sociales y Naturales, etc. ^[60]. Es decir, un alumno no sólo viene a estudiar, sino que también crece como persona a través del sistema educativo. En ese sentido, de acuerdo a un documento del MINEDUC, desde la década de los noventa se está tratando en la educación chilena de incluir en la malla curricular “Objetivos Fundamentales Transversales” (OFT) para complementar y mejorar el sistema tradicional de enseñanza con malla vertical que separa los contenidos en disciplinas que no están interconectadas. Estos OFT aplican tanto para la educación básica como para la media y la enseñanza a adultos y están enfocados en desarrollar en los alumnos tanto conocimientos como habilidades y valores acerca de la construcción del ser humano y su relación a la sociedad, favoreciendo el debate sobre temas sociales y la adaptación de los contenidos a la contingencia ^[61].

Sin embargo, la implementación de estos OFT no ha sido del todo efectiva y la educación chilena sigue bastante fragmentada ^[66]. Además, a nivel internacional se promueven valores basados en una visión individualista del ser humano, como el mérito personal y el trabajo esforzado, aunque el éxito social no necesariamente dependa de estos factores ^[62]. Chile no escapa a la regla y esta misma dinámica se refleja hasta en el sistema educativo, comenzando por los mismos OFT descritos anteriormente, que colocan al individuo al centro de la formación a través de contenidos sobre el crecimiento y la autoafirmación personal, la autoestima, el rigor y la perseverancia en el trabajo, etc. ^[61].

La otra característica de la educación chilena es que existe una lógica de financiamiento de las instituciones educacionales, tanto públicas como privadas, que termina, según varios estudios, favoreciendo que una educación de calidad sea el privilegio de las clases acomodadas ^[63-65]. Esta discriminación por niveles socio-económicos genera una educación elitista que fomenta la meritocracia y silencia las necesidades reales de la mayoría, resultando en una falta de empatía hacia los que no tuvieron la oportunidad de recibir una educación de calidad.

Frente a esta situación es necesario revertir este paradigma. Aunque sea un problema multi-variables que no tiene una solución sencilla ni inmediata, se puede actuar en la manera en la que se imparte el conocimiento a los alumnos, empezando por la introducción de valores de colaboración y de tolerancia en el mismo sistema educativo. Enseñando estos principios de colaboración y colectivismo a una edad temprana, se puede esperar contribuir a formar ciudadanos más responsables que tengan como meta el bienestar de la comunidad y sepan detectar y analizar los problemas a enfrentar.

La ingeniería es una herramienta muy potente a la hora de resolver problemas, y por el contexto actual es evidente que la humanidad va a tener que desarrollar cada vez más soluciones a los conflictos que está enfrentando. En particular, lo que hace la fuerza del razonamiento ingenieril es la capacidad humana a desacoplar problemas (modularidad), abstraer sistemas observados (abstracción) y proponer soluciones replicables y normalizadas (estandarización). La Biología Sintética no escapa a la regla y logra poner estos tres principios al servicio de la Biología. Sin embargo, el interés de enseñar la Biología Sintética va más allá de la transmisión de los pilares ingenieriles: efectivamente, permite romper con la tradición de enseñar las disciplinas científicas como si fueran independientes, pues conecta al menos biología, matemática y electrónica en una sola disciplina. Además, al requerir las competencias de estas especialidades, fuerza el trabajo colaborativo. La Biología Sintética se basa también fuertemente en el movimiento Open Source, promoviendo el libre acceso al conocimiento en torno a sus avances para alcanzar, por el trabajo cooperativo, a resolver problemas con la participación de la sociedad. Por lo tanto, la enseñanza de la Biología Sintética adquiere relevancia tanto por los conocimientos técnicos transmitidos (fundamentos de biología molecular y principios de la ingeniería) como por los valores morales vehiculados (trabajo en equipo, valoración de la cooperación por sobre el individualismo, necesidad de resolver problemas concretos).

1.5 Los principios ingenieriles detrás de la Biología Sintética

Como se describió en el primer párrafo de la introducción, la definición de la Biología Sintética todavía sufre variaciones, pues surge desde la ingeniería genética y metabólica sin limitarse a una de ellas. Uno de los aspectos que la hace asemejarse a otras disciplinas ingenieriles es la utilización de modelos matemáticos para predecir el comportamiento de los organismos diseñados. La Biología Sintética permite considerar una célula como una micro-máquina, programable mediante un código de cuatro bases: el ADN. Esta disciplina estandariza el trabajo efectuado por la ingeniería genética y lo lleva un paso más adelante, confeccionando desde cero nuevas rutas, que no existen en la naturaleza, para enseñarles a organismos funciones que no sabían realizar antes u optimizando funciones ya existentes. La Biología Sintética hace posible el trabajo con ADN sintético, es decir que ya no es necesario para los ingenieros y los biotecnólogos extraer la función que les interesa desde un organismo, sino que pueden mandar a sintetizar la secuencia nucleotídica correspondiente en empresas químicas que fabrican ADN a medida, a partir de secuencias validadas que están registradas en bancos de datos y que se pueden descargar. A continuación, se presentan los tres pilares fundamentales de la Biología Sintética en los cuales se enfoca esta memoria: Estandarización, Modularidad y Abstracción.

1.5.1 Estandarización.

Para entender el concepto de estandarización en Biología, se hace más fácil abordarlo desde la mirada mecánica: las herramientas cotidianas como los tornillos respetan un proceso de fabricación específico que obedecen a una norma y que hace que los tornillos regidos por dicha norma se comporten de la misma manera, sean intercambiables e iguales entre ellos, esto cualquiera sea el lugar o el momento, mientras se fabriquen durante el periodo de vigencia de la norma y dentro del área geográfica que cubre.

En Biología, existe una molécula soporte de toda la información genética de un organismo: el ADN. Descifrado gracias al trabajo de Nirenberg y Matthaei, hace cincuenta y cinco años ^[67], el código genético ha permitido establecer relaciones entre secuencias de ADN y producción de proteínas. En paralelo, se estudiaron sitios más específicos del ADN relacionados con procesos celulares, como promotores y transcripción ^[68]. Esto permitió identificar de a poco las “partes” genéticas, que el repositorio iGEM de partes biológicas estándares define como unidades funcionales de ADN que codifican para una función biológica particular y que no se pueden dividir en unidades funcionales más pequeñas ^[69]. Estas secuencias se encuentran en todos los organismos y comparten características comunes de estructura y función. En esta memoria, las partes genéticas más relevantes que se utilizarán son: los promotores, responsables de iniciar la transcripción de un gen particular; los sitios de unión a ribosoma o RBS (*Ribosome Binding Site*, sigla en inglés), en donde se une la maquinaria de traducción; los marcos abiertos de lectura u ORF (*Open Reading Frame*, sigla en inglés); los terminadores, que detienen el proceso de transcripción.

La sistematización y estandarización de las técnicas y herramientas de trabajo de biología molecular es uno de los grandes desafíos de la Biología Sintética, que ya ha logrado facilitar mucho el trabajo de laboratorio mediante el diseño de técnicas y herramientas ingenieriles, como los vectores modulares o las partes genéticas estándares ^[70].

En ese sentido cabe destacar la creación de los BioBricks en el MIT; los BioBricks son partes genéticas insertadas en vectores de formato estándar que facilita el ensamblaje sucesivo de las piezas mediante enzimas de restricción. La competencia internacional de Biología Sintética iGEM ha permitido la generación de una biblioteca de más de 20 000 BioBricks que queda de libre uso para los equipos participantes y laboratorios asociados y de libre acceso a todo público por la liberación en línea de todas las secuencias de estas partes ^[71].

El BioBrick es una parte genética cualquiera, ya sea promotor, RBS, ORF, terminador, o una combinación de las opciones anteriores, flanqueada en su extremo 5' por una región llamada prefijo que consta de dos sitios de corte para EcoRI y XbaI y en su extremo 3' por otra región similar llamada sufijo y que contiene los sitios de corte para las enzimas SpeI y PstI [72]. Por lo tanto, todos los BioBricks tienen la estructura Prefijo–Secuencia–Sufijo, como se muestra en la **Fig. 1.7**.

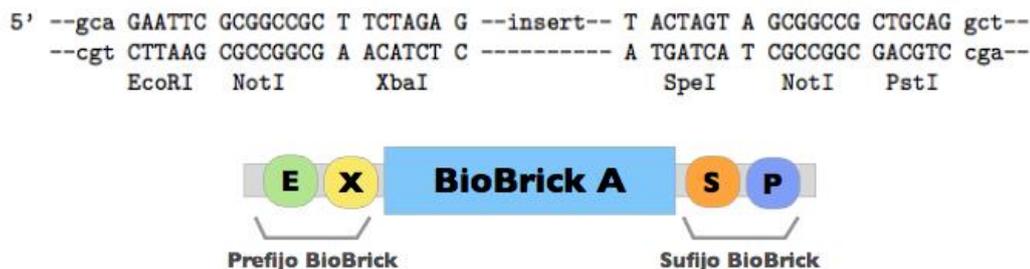


Fig. 7 – Descripción gráfica de la estructura de un BioBrick. E: EcoRI. X: XbaI. S: SpeI. P: PstI. Fuente: *Biología Sintética one-oh-one*, 2015.

La razón para este arreglo es que la ligación de dos BioBricks genera una tercera pieza con la misma estructura que las partes “padres”. Efectivamente, la ligación de los extremos de dos fragmentos digeridos previamente por SpeI y XbaI genera un nuevo sitio que no es reconocido por ninguna enzima de restricción. A ese sitio se le llama “scar”, “cicatriz” en español (ver **Fig. 8**).

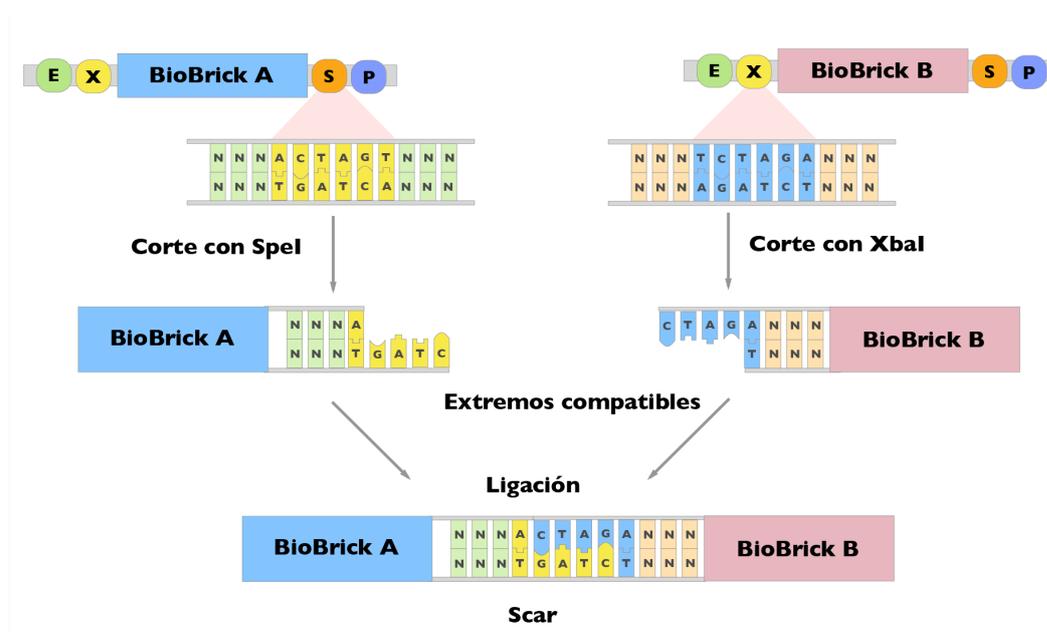


Fig. 8 – Descripción de la ligación de dos BioBricks con su estructura estándar. Fuente: *Biología Sintética one-oh-one*, 2015.

Esta propiedad sirvió de base para el diseño de una técnica de ensamblaje estándar: el ensamblaje 3A, en el cual la letra A es la inicial de “Antibióticos”. Esta técnica, cuyo principio de funcionamiento se explica en la **Fig. 9**, permite ensamblar dos BioBricks, insertados en sus vectores respectivos, en un tercer vector “backbone”.

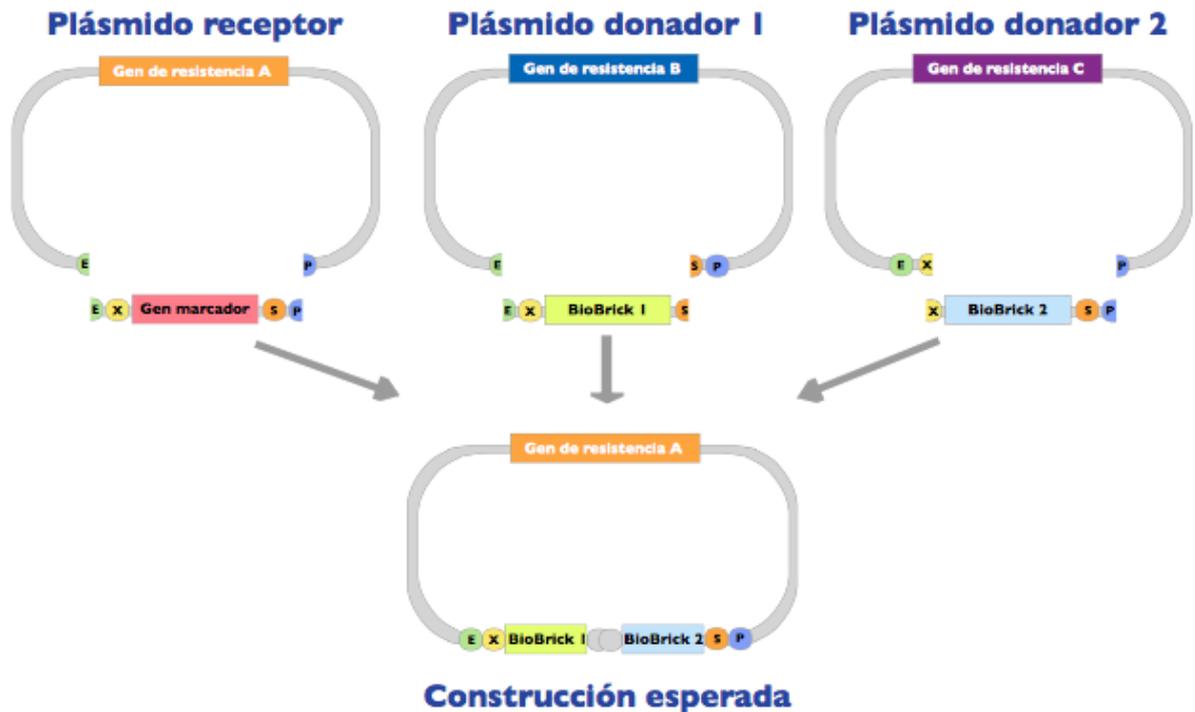


Fig. 9 – Principio de funcionamiento del ensamblaje 3A. Al digerir el BioBrick 1 con *EcoRI* y *SpeI* y el BioBrick 2 con *XbaI* y *PstI*, se genera un dispositivo constituido por ambas partes separadas por el scar dejado por su ligación y flanqueado de los mismos sitios *EcoRI* y *XbaI* en su extremo 5' y *SpeI* y *PstI* en su extremo 3'. Es decir, el vector backbone recibe un inserto con la misma estructura estándar de Prefijo-Secuencia-Sufijo, lo cual permite en teoría realizar ensamblajes sucesivos, generando insertos cada vez más complejos. Fuente: *Biología Sintética one-oh-one*, 2015.

Otro ejemplo de estandarización en Biología y relevante para el entendimiento del trabajo de esta memoria, es el desarrollo de la técnica de Gibson Assembly para el ensamblaje de varios fragmentos de ADN. Se basa en la construcción de adaptadores en los extremos de los fragmentos a ensamblar, complementarios entre sí. Estas colas transforman las partes de ADN en verdaderos legos genéticos que se pueden ensamblar por complementariedad de los adaptadores. La fabricación de éstos pasa por el diseño de partidores que además de alinear contra la secuencia de interés para permitir su amplificación, tienen una cola con la secuencia del adaptador deseado, resultando después de la reacción de PCR en un fragmento que tiene la secuencia de interés concatenada al adaptador correcto para permitir el ensamblaje con el otro fragmento a ensamblar. Se muestra el principio de funcionamiento de esta técnica en la **Fig. 10**.

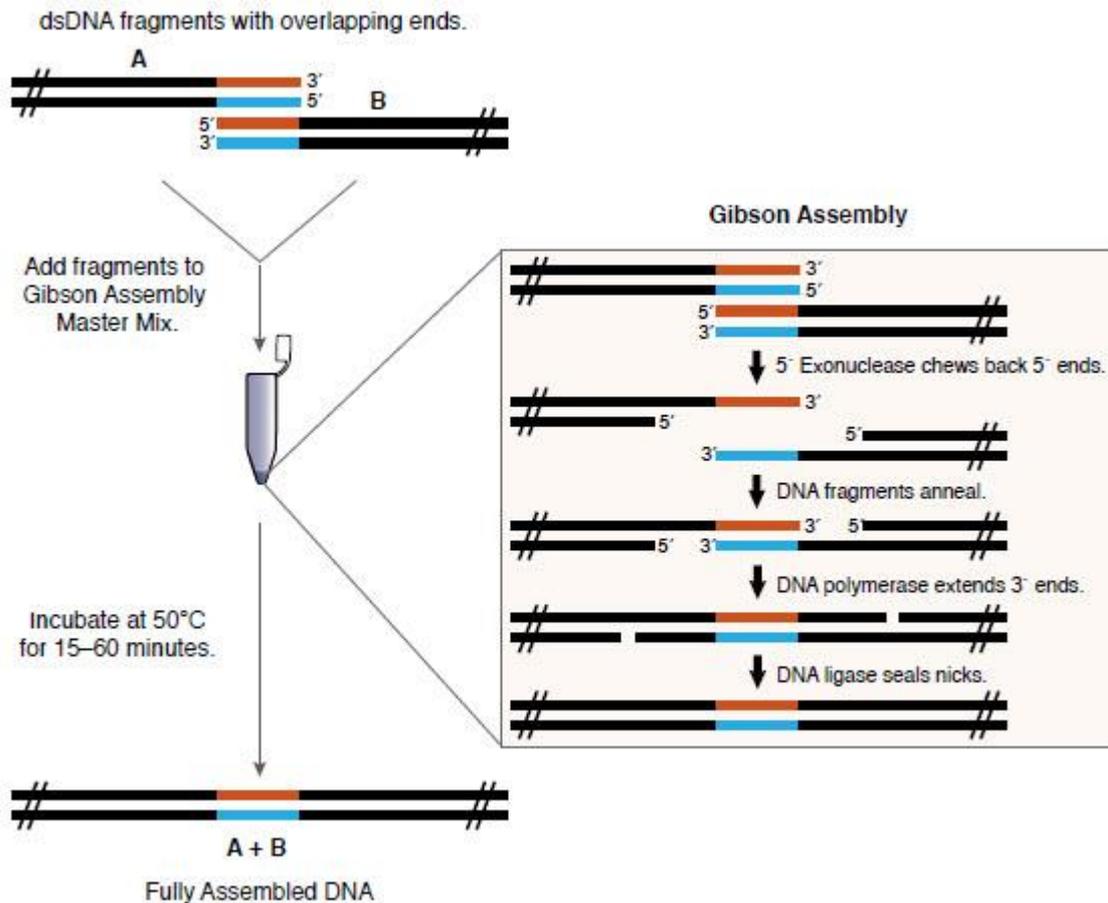


Fig. 10 – Principio de funcionamiento de la reacción de Gibson Assembly. Los fragmentos A y B poseen en sus extremos 3' y 5' (de la hebra sentido), respectivamente, secuencias complementarias una a la otra. El tratamiento por la exonucleasa T5 permite que las hebras complementarias de ambos fragmentos interactúen y la T4 DNA Ligasa permite sintetizar los enlaces para juntar los fragmentos, de tal forma que A queda unido con B mediante el adaptador. Si no se quiere espacio entre las secuencias A y B, se puede diseñar el adaptador de A para ser complementario al extremo 5' de B y el adaptador de B para ser complementario al extremo 3' de A. Fuente: Manual de NEB para la reacción de Gibson Assembly.

1.5.2 Modularidad

H. M. Sauro, en su artículo *Modularity defined*, explica que en ingeniería, un módulo es una unidad funcional que conserva sus propiedades intrínsecas independientemente del entorno al que esté conectado y que esta independencia se logra minimizando los efectos de retroacción que el entorno tiene sobre el módulo^[73]. La modularidad permite entonces descomponer un problema macroscópico en varios sub-problemas independientes y por lo tanto construir la solución global a partir de las soluciones parciales, que son los módulos.

Así como un objeto de un espacio euclidiano se puede construir y descomponer mediante una base de vectores ortogonales que lo caracteriza, un sistema biológico se puede describir mediante componentes ortogonales, combinables e intercambiables que son secuencias de ADN o de amino ácidos cumpliendo funciones específicas^[3, 74]. En particular, se puede diseñar una función compleja dentro de un organismo descomponiéndola en sub-funciones bases que son pasos esenciales para lograr la construcción de la función global. Cada sub-función se puede diseñar a partir de módulos genéticos constituidos de partes estándares.

1.5.3 Abstracción.

La abstracción es un proceso que consiste en extraer desde la evidencia experimental las leyes que rigen el comportamiento del sistema observado y además, permite establecer analogías con otros sistemas que parecían *a priori* totalmente desconectados del objeto observado.

La Biología Sintética se esfuerza mucho en abstraer el comportamiento de los sistemas biológicos para facilitar su entendimiento y su manipulación. De esta forma, se han generado analogías fuertes con la computación y la electrónica. Por ejemplo: el ADN ya no se considera sólo como una molécula que soporta toda la información de un organismo sino también como un código que se puede manipular, modificar y mejorar. Por lo tanto, los organismos pasan a considerarse como máquinas programables y reprogramables a las cuales se les puede enseñar cualquier función por modificación de su información genética. Además, todas las reacciones metabólicas conocidas de una célula son modelables, por lo que se puede simular el comportamiento del organismo de acuerdo a las condiciones en las cuales crece. Otro ejemplo: los procesos celulares son regulados por redes complejas de genes interdependientes, las cuales se denominan “circuitos” genéticos, en analogía con los circuitos electrónicos que representan la interdependencia de componentes eléctricos estándares que, una vez puestos en relación uno con el otro, permiten cumplir la función deseada.

En el trabajo de *J. Y. Teo*, se construyeron circuitos electrónicos para representar todos los procesos celulares esenciales como por ejemplo transcripción, traducción, producción de metabolitos, degradación de moléculas, etc., mediante la combinación de componentes electrónicos que son, para algunos, equivalentes directos de elementos biológicos ^[75].

1.6 Motivación de crear un kit pedagógico basado en Biología Sintética

Cabe destacar que en Chile existe desde el 2012 una iniciativa de la Red Latinoamericana de Biología basada en laboratorios portátiles de Biología Molecular y Genómica para la enseñanza media, que permite transmitir conceptos y experiencias en Biología de manera mucho más didáctica y participativa: los alumnos pueden acercarse al mundo del laboratorio y realizar actividades como reacciones de PCR, geles de electroforesis, incluso transformaciones de bacterias para generar clones fluorescentes mediante la fabricación de vectores conteniendo el gen de la proteína de fluorescencia verde GFP (Green Fluorescent Protein, sigla en inglés) ^[66]. Ése parece ser un camino adecuado para fomentar el interés y la participación colaborativa de las nuevas generaciones de alumnos, acercándolos al mundo de la ingeniería a través de la biología y desarrollando su capacidad crítica.

Inspirándose de esta iniciativa, se decidió elaborar un kit pedagógico apuntando a difundir los principios de la Ingeniería a través el ejemplo de la Biología Sintética, que mezcle tanto biología, electrónica y matemática con el fin de promover el aspecto colaborativo y multidisciplinario del trabajo de un ingeniero responsable. Este trabajo propone entonces la síntesis de un oscilador biológico, directamente adaptado del represilador de Elowitz ^[1], y de un circuito electrónico equivalente encontrado en literatura ^[75] que traduzca a escala macroscópica el comportamiento microscópico del represilador. Además, para transparentar la analogía entre ambos sistemas, se simula y compara el comportamiento de cada uno. A través de estos tres componentes, el trabajo propone ilustrar los principios de estandarización, modularidad y abstracción mediante el ejemplo de la Biología Sintética.

2. Objetivos

2.1 General

Diseñar, implementar y operar un represilador biológico, electrónico e informático para que pueda ser utilizado como material pedagógico en instituciones educacionales, con el fin de explicar los conceptos de estandarización, modularidad y abstracción aplicados a la Biología Sintética.

A continuación, se detallan los objetivos específicos de este trabajo. Se señala entre paréntesis el/los principios de la Biología Sintética a los que cada objetivo específico se asocia.

2.2 Específicos

1. Transparentar la analogía de comportamiento entre el represilador y el oscilador electrónico (abstracción).
2. Llevar a cabo la construcción del represilador con técnicas estándares de ensamblaje de ADN (estandarización y modularidad).
3. Construir el oscilador electrónico equivalente al represilador (estandarización, modularidad y abstracción).
4. Simular ambos sistemas, biológico y electrónico, y analizar la sensibilidad de los modelos matemáticos asociados (abstracción).
5. Diseñar una actividad pedagógica y su plan de evaluación para proponérsela a instituciones educacionales.

3. Antecedentes

3.1 Represilador

El represilador es un circuito constituido por tres genes A, B y C codificando por la producción de sus propios represores: por ejemplo, A codifica para el represor de B que es responsable de la síntesis del represor de C que a su vez codifica la producción del represor de A [76]. En forma natural este tipo de sistema regulado juega un papel importante en la percepción del tiempo de las células, en particular los ciclos día-noche en las plantas [77].

En el año 2000, Elowitz fabricó un represilador sintético a partir de los represores TetR, LacI y λ cl. Se describe el sistema en la Fig. 11 [1]. Este trabajo sirve de base para el desarrollo de esta memoria.

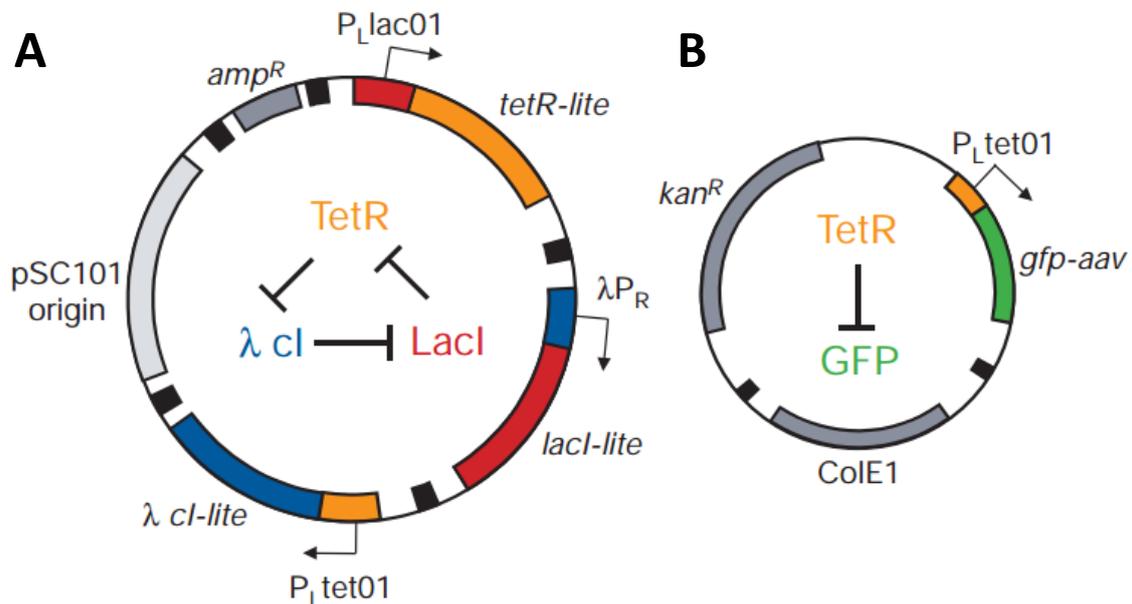


Fig. 11 – Represilador de Elowitz. **A:** Plásmido “funcional” conteniendo los tres ORFs del represilador y sus promotores respectivos. P_{Llac} es un promotor reprimible por LacI y que activa la producción de TetR, represor del promotor P_{Ltet} que a su vez controla la expresión de λ cl, represor del promotor λP_R , el cual controla la producción de lacI. Esto se puede resumir simbólicamente de la manera siguiente: TetR inhibe a λ cl que inhibe a LacI que inhibe a su vez a TetR. Se asociaron por colores los promotores y sus represores respectivos. El plásmido tiene el gen amp^R de resistencia a ampicilina y tiene bajo número de copias. **B:** Plásmido con actividad reportera: la secuencia que codifica para la proteína de fluorescencia verde GFP se encuentra bajo el control del promotor P_{Ltet01} , el cual controla también en el otro plásmido la producción de λ cl. Esto significa que las producciones de GFP y de λ cl se desarrollan en paralelo, por lo tanto la GFP es un buen reportero de la producción del represor. El plásmido tiene el gen kan^R de resistencia a kanamicina y tiene alto número de copias.

Las simulaciones del sistema de Elowitz proporcionaron las recomendaciones siguientes: para funcionar, los represores tenían que tener una vida media comparable a la de sus ARNm respectivos y los promotores tenían que ser igualmente fuertes. Por lo tanto se agregó a todos los represores y a la GFP una cola de degradación rápida reconocible por las proteasas de *E. coli* que destruyen la proteína asociada a la cola; y además se utilizaron promotores híbridos para que tengan una fuerza similar: P_{Llac} y P_{Ltet} son promotores del fago λ con los operadores Lac y Tet, respectivamente [1].

En el sistema de Elowitz, el represor LacI proviene de *E. coli* mientras que TetR viene del transposón Tn10 del gen de resistencia a tetraciclina y λ cl del fago λ . En la Fig. 12 se muestra los resultados experimentales obtenidos al seguir una bacteria aislada: efectivamente, no hay un comportamiento de las poblaciones de bacterias a nivel macroscópico y la sincronización de poblaciones conteniendo el represilador por quorum-sensing es el objeto de un trabajo entero. [78]

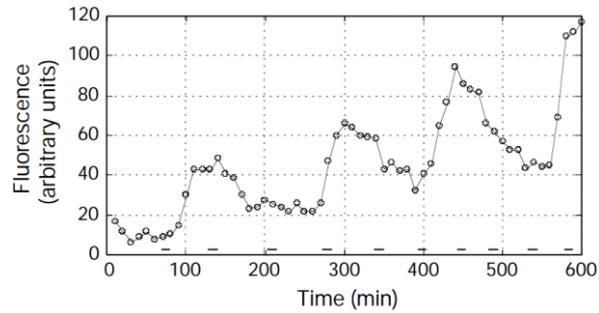


Fig. 12 - Resultados experimentales: intensidad de la fluorescencia emitida por la bacteria a lo largo del tiempo, según el trabajo de Elowitz [1]. Se nota el carácter oscilatorio del sistema.

En esta memoria, se construyó un represilador basado en los mismos elementos, como se puede ver en la Fig. 13, con algunas variaciones y limitaciones de diseño.

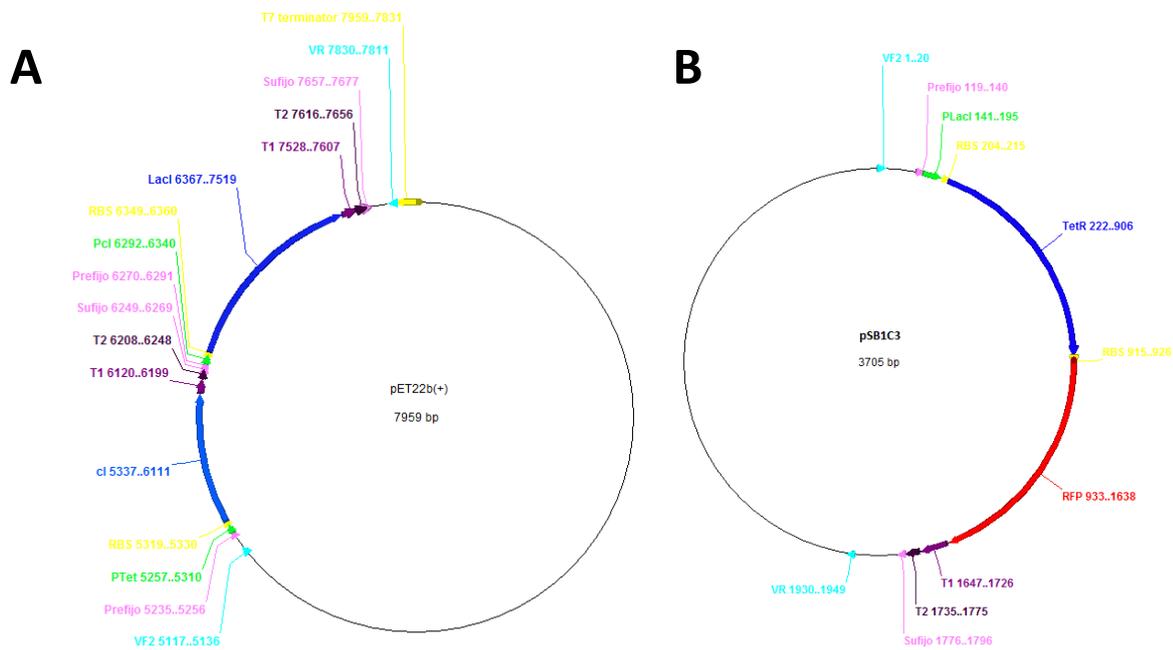


Fig. 13 - Diseño del represilador de la memoria. **A:** Plásmido conteniendo los ORFs de los represores *cl* y *LacI* bajo el control de los promotores *Ptet* y *Pcl*, respectivamente. El plásmido tiene resistencia a ampicilina y alto número de copias. **B:** Plásmido conteniendo el ORF de *TetR* y su reportero *RFP* bajo el control del promotor *PLacI*. Posee resistencia a cloranfenicol y alto número de copias.

Se decidió separar uno de los tres represores de los otros dos para dejarlo junto a su reportero y asegurarse por lo tanto que los eventos de producción del represor *TetR* y de la proteína de fluorescencia roja (*RFP*) estén temporalmente acoplados. Además, en el diseño original de Elowitz, se necesitaban dos promotores *PLacI*, uno para controlar la producción de *TetR* y otro para controlar la del reportero. Por lo tanto, existía un riesgo que la cantidad de represor *LacI* no alcanzara para inhibir a ambos promotores, riesgo que se reduce con el diseño propuesto en esta memoria puesto que ningún promotor está duplicado. Además, la construcción se hace más sencilla puesto que no es necesario juntar todos los módulos en un mismo plásmido. El mayor inconveniente que trae este diseño es que, por estar en vectores distintos, los módulos requieren que ambos plásmidos tengan un número de copias semejante, en este caso alto.

Todas las partes seleccionadas para esta memoria provienen del kit iGEM 2015, recibido tras la inscripción del equipo UChile-OpenBio a la competencia iGEM. Este kit contiene en particular los promotores *PLacI*, *Ptet* y *Pcl* y los ORFs *TetR*, *cl* y *LacI*. La razón por la cual se escogió como reportero

la RFP y no la GFP es que el kit también contenía un vector llevando un inserto constituido de P_{lacI} unido a un RBS y controlando la expresión de una RFP unida a un terminador. Como el promotor P_{lacI} original del vector tenía características limitantes, como su inhibición en presencia de glucosa, se decidió finalmente no utilizarlo y reemplazarlo por otro promotor P_{lacI} del kit. Sin embargo, se conservó toda la estructura con RBS-RFP-Terminador para la construcción de los módulos.

Los represores del kit fueron todos diseñados para portar una cola de degradación rápida (“LVA-tail”) de secuencia aminoacídica AANDENYALVA en su extremo. De esta forma, se respeta la condición de diseño de los tiempos de vida media de los represores con respecto a la de sus ARNm respectivos. Se esperaría por lo tanto observar un comportamiento similar al del sistema de Elowitz. Sin embargo, una limitación a tomar en consideración es que probablemente no se observarán oscilaciones netas y muy regulares, puesto que el trabajo de Elowitz evidenció que existe un “ruido de fondo” debido a efectos estocásticos. Además, existe un ruido proveniente de la transmisión del estado de oscilaciones durante la división celular, por lo que también contribuye a dificultar la nitidez del patrón de fluorescencia. ^[1]

3.2 Circuito electrónico equivalente al represilador

Si se considera una célula como una mini-máquina o una fábrica, entonces cada una de las reacciones bioquímicas que ocurren en su seno son procesos que se pueden descomponer, modelar e imitar. Para ilustrarlo, en el año 2015 se realizó un trabajo en el cual 16 sistemas biológicos fueron simulados por circuitos electrónicos análogos casi exclusivamente compuestos de transistores, condensadores y resistencias. Se presenta en la **Tabla 1** algunos elementos de la analogía entre las reacciones químicas involucradas en procesos biológicos y los procesos electrónicos.

Tabla 1 - Procesos bioquímicos y sus equivalentes en un sistema electrónico. Adaptado y traducido desde el trabajo de Teo et al, 2015.

Procesos biológicos	Procesos electrónicos análogos
Dinámica de una reacción química	Flujo de electrones en un transistor
Concentración del reactivo	Concentración de electrones en la entrada del transistor
Concentración del producto	Concentración de electrones en la salida del transistor
Enzimas o catalizadores aceleran la velocidad de reacción	Aumentar el voltaje disminuye las barreras energéticas en un transistor y aumenta el flujo de corriente
Balance de masa en flujos	Ley de corriente de Kirchhoff (o ley de los nodos)
Balance de energía química	Ley de tensión de Kirchhoff (o ley de las mallas)
Concentración de un químico	Corriente

Seguindo esta analogía, se modelaron varios sistemas biológicos, entre los cuales, el represilador de Elowitz, lo que se muestra en el **Fig. 14**.

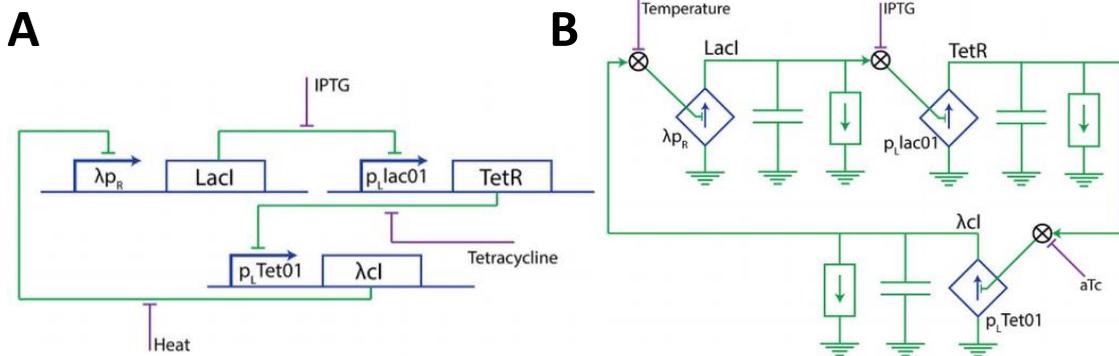


Fig. 14 – Circuito electrónico equivalente al represilador. Fuente: Teo et al., 2015. **A:** Represilador biológico tal como lo diseñó Elowitz. Se agregaron los elementos susceptibles de inhibir el efecto de cada represor: el IPTG, la tetraciclina o anhidrotetraciclina (aTc) y el calor contrarrestan el efecto inhibitor de $Lacl$, $TetR$ y λcl , respectivamente. **B:** Sistema electrónico análogo al represilador de Elowitz. Los generadores de corriente, representados por cuadros azules con flechas verticales, representan cada uno de los tres promotores. Los transistores, representados por rectángulos verdes con flecha vertical, representan los eventos de degradación de la molécula cuya producción está inducida por el promotor; en el caso del sistema electrónico, la producción de los represores es el flujo de corriente a la salida de cada generador de corriente. Entre cada unidad electrónica se agregó un multiplicador para poder incluir, como input, el efecto de los inhibidores de cada represor.

En otro trabajo, se había simulado con circuitos analógicos el comportamiento del represilador genético mediante transistores en primera instancia, y amplificadores operacionales (OPAMPs) en segunda instancia ^[79]. Se presenta en la **Fig. 15** el sistema montado con OPAMPs que será finalmente el usado en esta memoria por las razones siguientes: si bien el trabajo de Teo y cols. plantea una analogía bio-electrónica sólida, no se muestra ningún resultado experimental o simulación del comportamiento del circuito electrónico, a la diferencia del trabajo de A. Wagemakers, que puede por lo tanto servir de base para analizar los resultados que se obtuvieron en la memoria. En cuanto a la elección de un circuito con OPAMPs y no con transistores, se relaciona más con la experiencia que se tiene con estos componentes y el hecho de que facilitan la analogía con los componentes biológicos gracias a su comportamiento.

La construcción del circuito requiere de los tres componentes principales siguientes: OPAMPs, condensadores y resistencias. El arreglo de la **Fig. 15** muestra claramente una sucesión de tres unidades electrónicas idénticas, cada una representando la producción de un represor.

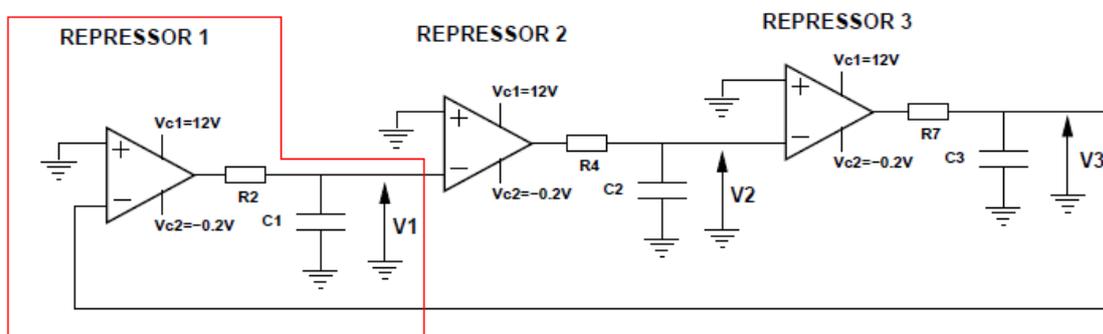


Fig. 15 – Circuito electrónico equivalente al represilador. Fuente: A. Wagemakers, 2008. La unidad cuadrada en rojo simboliza un módulo genético, el amplificador operacional siendo el promotor y la tensión V_1 a la salida del circuito RC representando la cantidad de moléculas del represor 1 producidas. La conexión al polo (-) del amplificador siguiente simboliza la represión. Esta cadena en circuito cerrado genera oscilaciones.

El amplificador operacional entrega una tensión de salida que puede tomar dos valores, ya sea V_{c1} (positivo, 12V en la **Fig. 15**) si la tensión de la entrada es negativa o V_{c2} (negativo, -0,2V en la **Fig. 15**) si la tensión de la entrada es positiva. Este valor depende de la tensión V_{n-1} que ingresa en la entrada negativa del OPAMP n. Por lo tanto, el OPAMP tiene un rol parecido al de un promotor que inicia el proceso de transcripción a menos que esté presente su represor. La concentración de cada represor en este circuito corresponde a las tensiones V_i a la salida de cada módulo i. Siguiendo la cadena de la **Fig. 15**: cuando $V1$ aumenta, provoca una disminución de $V2$ (el OPAMP entrega -0.2V), lo cual provoca el aumento de $V3$, que hace disminuir $V1$, permitiendo que $V2$ aumente de nuevo, etc.

La respuesta de este sistema, según el trabajo de A. Wagemakers, se muestra a continuación en la **Fig. XVI**.

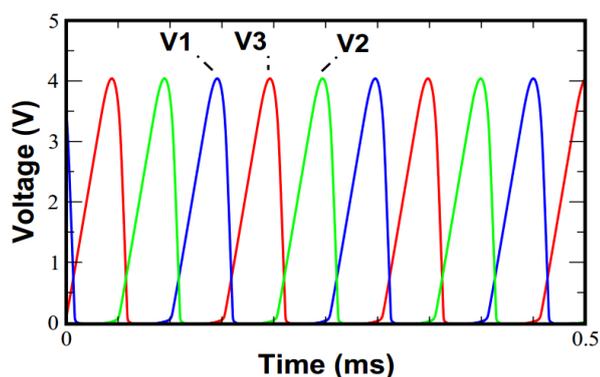


Fig. 16 – Respuesta del sistema electrónico diseñado por A. Wagemakers. Se graficaron las tensiones de salida de cada unidad electrónica $V1$, $V2$ y $V3$ (en Volts) a lo largo del tiempo (escala temporal: ms). Fuente: A. Wagemakers, 2008.

El periodo de oscilaciones depende a la vez del tipo de OPAMP y de la constante de tiempo τ , producto del transistor R por la capacidad C. En este trabajo, se escogieron un OPAMP de referencia UA741, una resistencia $R = 1 \text{ k}\Omega$ y una capacidad $C = 1 \text{ }\mu\text{F}$ para una constante de tiempo de $\tau = 1 \text{ ms}$. Esto generó oscilaciones de periodo 0,15 ms, como se nota en la **Fig. 16**. Las tensiones de alimentación fueron escogidas, según el autor, para que la respuesta del sistema sea más cercana a la del oscilador genético sin que las tensiones alcancen valores negativos^[79].

En primera instancia se decide conservar todos los parámetros del sistema para reproducirlo y estudiar cómo mejorarlo: se propone insertar a la salida de cada módulo un LED que pueda servir de “reportero” de la evolución de las tensiones $V1$, $V2$ y $V3$, evitando por lo tanto el uso de un osciloscopio, que es un equipamiento que no todas las instituciones educacionales poseen. También se propone estudiar el efecto de distintos tipos de valores del par (R;C) para aumentar el periodo de oscilaciones y hacerlo detectable por el ojo humano, en el caso de que el sistema con los LEDs funcione.

3.3 Modelamiento matemático y analogía de los sistemas

La simulación informática se basará en el modelo matemático del represilador de Elowitz, según las ecuaciones siguientes:

$$\frac{dm_i}{dt} = -m + \frac{\beta}{1 + p_j^\alpha} + \beta_0$$
$$\frac{dp_i}{dt} = -\gamma (p_i - m_i)$$

Donde m_i representa la concentración de ARNm de una proteína y p_i la concentración de la proteína correspondiente.

Los otros parámetros se describen como sigue: α es un coeficiente de Hill, $\frac{\beta}{1+p_j^\alpha}$, es un término de inhibición del promotor por otro represor, β y β_0 representan la cantidad de proteínas producidas dentro de la célula bajo el control de cierto tipo de promotor según exista inhibición (β_0) o no ($\beta + \beta_0$) y γ representa la tasa de degradación de la proteína con respecto a la de ARNm ^[1].

Como cada módulo genético se representa por estas dos ecuaciones, en total son 6 ecuaciones acopladas, es decir 12 parámetros que determinan el comportamiento del sistema biológico. En la literatura aparecen los valores óptimos para el funcionamiento del oscilador, por lo que se podrán tomar como referencia para encontrar las condiciones en las cuales se generan las oscilaciones. Sin embargo, se tendrá que realizar un análisis de sensibilidad de estos parámetros para poder concluir sobre su efecto sobre el oscilador genético.

Las condiciones que fueron probadas en el trabajo de Elowitz son las siguientes: $\alpha = 2$; $\beta/\beta_0 = 1000$; $\gamma = 5$ (tiempo de degradación del ARNm: 2 min; tiempo de degradación de las proteínas: 10 min) ^[1].

Como el parámetro α no es un parámetro sobre el cual se pueda actuar directamente, puesto que tiene que ver con la forma en la cual los represores inhiben al promotor, durante el análisis de sensibilidad no se variará, al contrario de los otros parámetros.

Por otra parte, se estudiará la simulación del oscilador electrónico, que se rige por las ecuaciones siguientes:

$$R_1 C_1 \frac{dV_1}{dt} = -V_1 + H_v(-V_3)$$
$$R_2 C_2 \frac{dV_2}{dt} = -V_2 + H_v(-V_1)$$
$$R_3 C_3 \frac{dV_3}{dt} = -V_3 + H_v(-V_2)$$

$$H_v(x) = V_{c2} \quad x < 0$$
$$H_v(x) = V_{c1} \quad x > 0$$

Donde V_i representa la tensión a la salida de cada módulo i (ver **Fig. 15**), R_i y C_i representan la resistencia y el condensador del módulo i , respectivamente, y $H_v(x)$ representa la función de comparador del OPAMP: entrega una tensión V_{c2} si V_i es positiva y V_{c1} si V_i es negativa ^[79].

La manera en la cual se relacionan las ecuaciones tanto del sistema genético como del circuito electrónico se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2 - Establecimiento de la analogía entre las ecuaciones que rigen el comportamiento del represilador biológico y del oscilador electrónico, respectivamente. Fuente: elaboración propia en base a las ecuaciones de la literatura y la interpretación de su significado físico.

Parámetro biológico	Sentido biológico	Parámetro electrónico análogo	Sentido físico
p_i	Concentración del represor i	V_i	Tensión medida a la salida del módulo i
β_0	Producción basal del represor i (p_i) por el promotor en presencia de su represor j	V_{c2}	Tensión basal cuando $V_j > 0$
$\beta + \beta_0$	Concentración del represor i (p_i) provocada por la inducción de promotor en ausencia de su represor j ($p_j = 0$)	V_{c1}	Tensión medida cuando $V_j = < 0$
γ	Frecuencia de degradación del represor i con respecto a la de su ARNm	$\frac{1}{R_i * C_i}$	Frecuencia de decaimiento de la tensión V_i
$\frac{\beta}{1 + p_j^\alpha}$	Término de inhibición de la proteína p_i por el represor p_j	$H_v(-V_j)$	Término de inhibición de la tensión V_i por V_j

4. Metodología

4.1 Sistema biológico: construcción de un represilador

El represilador implementado en esta memoria consta de dos plásmidos (ver **Fig. 17**):

- Uno contiene el represor TetR, junto con la proteína reportera de fluorescencia roja (RFP: Red Fluorescent Protein, sigla en inglés), bajo el promotor PLacI. En el resto de este trabajo, se llamará “módulo 1” el constructo “PLacI-TetR-RFP”.
- El otro contiene los represores cl y LacI bajo los promotores PTet y Pcl, respectivamente. En el resto de este trabajo se llamará “módulo 2” el constructo “PTet-cl” y “módulo 3” el constructo “Pcl-LacI”. Por lo tanto, se denominará “módulo 2+3” el ensamblaje de los dispositivos “2” y “3”.

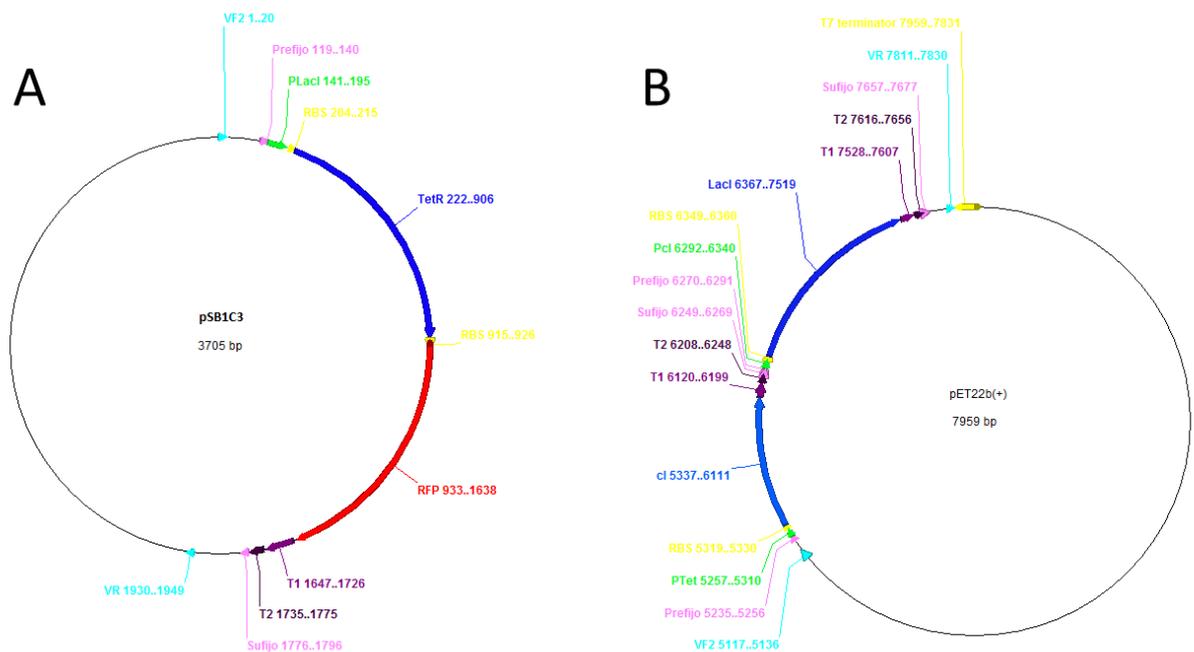


Fig. 17 - Represilador construido en la memoria. **A:** plásmido pSB1C3 permitiendo la expresión del represor TetR y de su proteína reportera RFP bajo el control del promotor PLacI. **B:** plásmido pET22b(+) permitiendo la expresión de los represores cl y LacI bajo el control de los promotores PTet y Pcl, respectivamente. Fuente: diseño obtenido a partir del programa Ape.

Para lograr la construcción del oscilador biológico, se siguieron las cinco etapas que se muestran en la **Fig. 18** y que se detallan a continuación.



Fig. 18 - Diagrama de bloques de las secciones principales de trabajo de la construcción del represilador. La etapa de verificación se colocó al final del diagrama para facilitar su lectura, sin embargo interviene en todas las etapas del diagrama, y en particular al final.

1. Diseño de partidores

Objetivo: Diseñar todos los partidores que se van a utilizar en las distintas etapas del proceso de construcción del oscilador, para mandarlos a sintetizar y empezar el trabajo en laboratorio. Esto considera los partidores para las reacciones tanto de PCR como de Gibson Assembly. Se puede encontrar en el **Anexo 1** la lista completa de todos los partidores utilizados a lo largo de la memoria, con sus características físicas (largo, contenido GC, temperaturas de *annealing*).

Metodología: el diseño de los partidores debe considerar al menos los criterios siguientes:

Complementariedad: los partidores deben ser complementarios a la hebra que se desea copiar. Es decir, uno tiene que ser complementario a una zona de la hebra sentido y el otro a una zona de la hebra anti-sentido.

Temperatura de *annealing*: es la temperatura a la cual los partidores se unen por complementariedad de las bases nitrogenadas a la hebra del ADN que se quiere copiar. Como la reacción de PCR involucra una fase de reclutamiento de la DNA Polimerasa a 72°C, se recomienda que la temperatura de *annealing* de los partidores sea más baja que 72°C, por el riesgo de que se reclute la polimerasa antes de que los partidores se hayan unido correctamente en el lugar deseado, lo que conduciría posiblemente a una mala amplificación del fragmento deseado. Se aceptan generalmente temperaturas de *annealing* entre 58°C y 63°C. La temperatura de *annealing* tiene que ser parecida en ambos primers, pues las condiciones de unión tienen que ser las mismas.

Largo: El largo del partidador es determinante. Si es demasiado corto, podría unirse en más de un sitio del templado de ADN, introduciendo amplificaciones inespecíficas y bajando el rendimiento de la reacción de PCR. Si es demasiado largo, podría formar estructuras secundarias como *self-annealing* o *hairpins*, lo cual impediría su correcta unión al templado e impediría el buen desarrollo de la reacción. Además, en ambos casos, un partidador demasiado corto o largo podría ocasionar problemas en el reclutamiento de la polimerasa. Se recomienda generalmente un largo entre 18 y 25 bases.

Terminación por G o C: con una menor prioridad que los dos criterios mencionados anteriormente, se recomienda también que el extremo 3' del partidor sea constituido por una guanina (G) o citosina (C). La razón para esto es que los enlaces G-C son más fuertes que los enlaces A-T porque involucran tres puentes hidrógenos y no dos. De esta forma, el extremo 3' del partidor queda mejor unido a su templado, por tener menos grados de libertad (la flexibilidad está reducida por la presencia de un tercer puente de hidrógeno), lo cual favorece una mejor unión de la polimerasa e impide que ésta interprete la vibración del extremo 3' como un error de apareamiento y lo corrija sacando los últimos nucleótidos del partidor. En cambio, no se recomienda tener más de una base G o C en el extremo 3' para evitar uniones inespecíficas en otras zonas del templado. Sin embargo, la estabilidad del extremo 3' se considera solamente si no afecta demasiado la temperatura de *annealing* o el largo.

Para aquellos casos donde se agrega una cola a los partidores, en particular para las reacciones de Gibson Assembly, se tienen que considerar además los criterios siguientes:

Complementariedad de la cola: la reacción de Gibson Assembly sólo funciona si la cola es complementaria a la zona en donde se desea realizar el ensamblaje.

Temperatura de *annealing* de la cola: se recomienda diseñar la zona de *overlapping* para que su temperatura de *annealing* se encuentre entre 48°C y 55°C. Bajo 47°C la reacción no funcionará y sobre 55°C la agitación térmica se vuelve demasiado alta para que la unión de las colas se haga bien.

Largo de las colas: la zona de *overlapping* tiene que ser de aproximadamente 16 pb. Las colas pueden ser un poco más largas que la zona de *overlapping* siempre que se cuide que el conjunto "partidor + cola" no forme estructuras secundarias a las temperaturas de trabajo.

Inserción de los RBS: en esta memoria, los promotores utilizados no incluyen, en sus secuencias, sitios de unión a ribosoma (*Ribosome Binding Site*, sigla en inglés), por lo que era necesario introducirlos al momento de realizar el ensamblaje con las secuencias codificantes de los represores. Esta inserción se realiza diseñando las colas de los partidores que se unan en la hebra anti-sentido del promotor y la hebra sentido de la secuencia codificante, para que sus secuencias incluyan la del RBS y los espaciadores correspondientes para permitir buenas transcripción y traducción.

2. Generación de una biblioteca de las partes a ensamblar

Objetivo: El represilador es un conjunto de partes biológicas, en particular de promotores y marcos de lectura abiertos. Para poder proceder a la construcción del oscilador, es por lo tanto necesario disponer de cada una de estas partes en una concentración de trabajo suficiente. El objetivo de esta sección es por lo tanto generar una biblioteca de las partes genéticas esenciales para la construcción del represilador.

Metodología:

Preparación de bacterias *E. coli* quimiocompetentes: es necesario tener un stock de bacterias tratadas químicamente para aceptar un plásmido en su organismo. Para esto se procede a la preparación de bacterias *E. coli* debilitadas quimiocompetentes mediante un protocolo que se detalla en el **Anexo 2**.

Resuspensión de las partes del kit: Desde el año 2015 se dispone de un kit enviado por la Fundación iGEM con centenas de partes biológicas bajo el formato de plásmidos liofilizados, entre las cuales se encuentran las partes útiles para esta memoria siguientes: Ptet (R0040), Pcl (R0051), PLacI

(R0011), TetR (C0040), cl (C0051), LacI (C0012) y el vector pSB1C3 que contiene la secuencia de la RFP insertada entre un RBS y un doble terminador (J04450). Por lo tanto, es necesario resuspender las partes de interés, mediante un protocolo que se encuentra en el **Anexo 3**.

Quimiotransformación: Una vez que se tienen por una parte, los vectores de interés y por otra parte, las bacterias quimiocompetentes, se puede proceder a la quimiotransformación, una operación que permite ingresar en una bacteria algún material genético de interés, en este caso, los distintos vectores con las partes aisladas del repesilador. El protocolo asociado se encuentra en el **Anexo 2**.

Plaqueo por método de extensión: Después de haber transformado las células hay que cultivarlas para que se multipliquen y que multipliquen el plásmido que se les introdujo. El primer cultivo se hace en un medio sólido de agar, en placas de Petri, con el antibiótico correspondiendo a la resistencia que trae el plásmido que se espera haber transformado en la bacteria. El procedimiento se detalla en el protocolo del **Anexo 4**.

Cultivo líquido: Normalmente se tiene que identificar primero las colonias positivas, ie que aceptaron efectivamente el plásmido con el inserto de interés, mediante una técnica que se describe en la sección 5. Sin embargo, en este caso, no hay duda sobre el hecho de que el plásmido contenga el inserto de interés, puesto que las partes del kit fueron secuenciadas por la Fundación iGEM previamente al envío. Entonces, basta con seleccionar algunas colonias de las placas de Petri y hacerlas crecer en un medio de cultivo líquido con antibiótico para seguir con la elaboración de la biblioteca. El protocolo de cultivo líquido se encuentra en el **Anexo 5**.

Stock en glicerol: Cuando las bacterias ya crecieron, se guarda una fracción del cultivo para mezclarlo con glicerol y mantenerlo a -80°C. La función del glicerol es impedir que el agua del medio congele y rompa las células. Una vez guardadas a -80°C, las células se pueden conservar años. Esto conforma una biblioteca pseudo-permanente de partes biológicas, mantenidas adentro de células congeladas. El procedimiento para realizar un Stock en glicerol se encuentra en el mismo anexo del cultivo líquido (**Anexo 5**).

Miniprep de las partes: la parte del cultivo líquido que no se guarda como stock en glicerol se somete a un procedimiento especial para purificar el plásmido de interés: la miniprep. Esta operación consiste básicamente en romper las células y eliminar progresivamente, por centrifugaciones y filtraciones sucesivas, todo el material de la célula que no sea el plásmido de interés: ácidos nucleicos, proteínas, restos de membranas, etc. Al final de esta etapa se obtiene una biblioteca temporaria de todas las partes necesarias para la memoria, a partir de la cual se puede trabajar directamente. El protocolo de miniprep se encuentra en el **Anexo 6**.

3. Generación de los módulos 1, 2 y 3:

Objetivo: Ensamblar todos los promotores con los ORFs (Open Reading Frame, sigla en inglés) correspondientes por una parte y ensamblar los constructos 1, 2 y 3 en el vector receptor pSB1C3 por otra parte. El resultado de esta sección consta de tres plásmidos: pSB1C3 cargado con el módulo 1 (PLacI-TetR-RFP), pSB1C3 cargado con el módulo 2 (Ptet-cl) y pSB1C3 cargado con el módulo 3 (Pcl-LacI).

Metodología:

Resuspensión de todos los partidores: Los partidores diseñados en la sección 1 llegan liofilizados, por lo que primero hay que resuspenderlos según el procedimiento del **Anexo 7**, para obtener una concentración de 100 mM. Esto forma el stock de partidores. Luego, para poder utilizarlos en las siguientes etapas, se preparan diluciones a 5 mM de estos partidores.

Amplificación por PCR de las partes a ensamblar: la *Polymerase Chain Reaction* (PCR, sigla en inglés), es una reacción que permite amplificar un fragmento dado de ADN dentro de una secuencia más grande. Para que funcione se necesitan, además del templado de ADN, un buffer adecuado, nucleótidos, agua, partidores y una polimerasa. La elección de la polimerasa puede variar de acuerdo al objetivo del PCR: si es sólo visualizar un amplicón dado, se puede utilizar una polimerasa de baja fidelidad como la Taq, que no tiene actividad 3'-5' exonucleasa (no corrige errores de copia). En cambio, si el objetivo es aislar una secuencia de ADN para utilizarla o secuenciarla, conviene ocupar una polimerasa de alta fidelidad como la Phusion o la KoD, que son las que se utilizaron en este trabajo. Aquí, el objetivo es amplificar todos los insertos de los vectores de la biblioteca de partes para poder proceder posteriormente a los ensamblajes entre promotores y ORFs. El protocolo detallado y el programa de PCR se encuentran en el **Anexo 8**.

Purificación desde gel o desde producto de PCR según especificidad de la amplificación: Una vez amplificados los insertos de ADN, hay que purificarlos, es decir aislar el fragmento lineal deseado del buffer y de los otros elementos de la reacción de PCR así como de eventuales amplificaciones inespecíficas. Si el producto de PCR presenta amplificaciones de fragmentos no deseados se debe purificar el ADN de interés desde un gel de agarosa. Si no hay impurezas, se puede proceder a la purificación directamente desde la alícuota del producto de PCR. El procedimiento para llevar a cabo esta purificación se detalla en el **Anexo 9**. El objetivo aquí es obtener alícuotas de los promotores puros y de los ORFs puros por una parte y del vector pSB1C3 linealizado por otra parte.

Gibson Assembly entre el promotor y el ORF: El Gibson Assembly es una técnica de ensamblaje de ADN que permite unir dos o más fragmentos entre ellos mediante zonas de complementariedad. En la etapa de amplificación por PCR se creó artificialmente la secuencia del RBS que tiene que ir unido al promotor. El ensamblaje esperado en esta etapa es por lo tanto el conjunto “promotor-RBS-ORF” para los módulos 1, 2 y 3. Para simplificar la notación, se resumirá después a “promotor-ORF”. El procedimiento para realizar el Gibson Assembly se encuentra en el **Anexo 10**.

Amplificación del ensamblaje por PCR: Luego de obtener los ensamblajes deseados, se tiene que insertar cada uno de ellos en el vector pSCB1C3. Sin embargo, la reacción sólo funciona si las partes están en concentración suficiente, por lo que primero hay que proceder a la amplificación de los constructos 1, 2 y 3.

Purificación del ensamblaje y del vector linealizado: Esta etapa tiene como objetivo purificar los constructos 1, 2 y 3 con colas de complementariedad a pSB1C3.

Gibson Assembly entre el ensamblaje y el vector: Luego, se procede al ensamblaje entre cada uno de los constructos y el vector receptor. En el caso del módulo 1, se dejó en la secuencia del plásmido el ORF de la RFP. En el caso de los módulos 2 y 3, se quitó esta secuencia y sólo se dejó la secuencia del terminador doble.

Transformación: Una vez obtenidos los tres módulos en sus vectores respectivos, se transforman *E. coli* quimiocompetentes para que empiecen a replicar el plásmido.

Plaqueo por método de extensión: Se cultivan las células transformadas en agar con cloranfenicol, puesto que el vector pSB1C3 incluye un módulo de resistencia a cloranfenicol.

Cultivo líquido: Después de seleccionarse las colonias positivas (es decir, aceptaron un plásmido que tiene el inserto de interés), se crecen en medio LB líquido con cloranfenicol.

Stock en glicerol: Una vez crecidas se realiza un Stock en glicerol para guardar los módulos 1, 2 y 3 en sus vectores disponibles en el refrigerador a -80°C. En esta etapa ya se logra obtener el primer plásmido del represilador, el que tiene la proteína reportera RFP.

Miniprep: Con el resto del cultivo líquido se realiza una miniprep para obtener una alta concentración de plásmidos puros y poder proceder a la siguiente etapa de la construcción del represilador.

4. Ensamblaje de los módulos 2 y 3 en pET22b

Objetivo: Unir los módulos 2 y 3 entre ellos y obtener el vector de expresión pET22b con el resultado del ensamblaje.

Metodología:

Amplificación por PCR: Para poder proceder al ensamblaje de las partes es necesario trabajar con concentraciones adecuadas, por lo que primero se necesita amplificar por PCR los dos módulos a ensamblar (2 y 3) y el vector pET22b que será posteriormente el receptor del ensamblaje 2+3.

Purificación desde gel: Luego, se tiene que purificar los tres fragmentos lineales de ADN obtenidos en la amplificación de la etapa anterior.

Gibson Assembly entre 2 y 3: Se procede después a la unión entre los módulos 2 y 3, el extremo 3' del constructo 2 siendo complementario al extremo 5' del dispositivo 3. En la misma reacción también se unen el extremo 5' del módulo y el extremo 3' del módulo 3 al vector pET22b, permitiendo así la obtención del segundo plásmido del represilador. El ensamblaje simultáneo de los tres fragmentos lineales para reconstruir el vector permite evitar la etapa de reamplificación del módulo 2+3.

Transformación: Luego este plásmido se inserta en *E. coli* mediante quimiotransformación y se sigue el mismo proceso anterior.

Plaqueo por el método de extensión: se cultivan las células transformadas en agar sólido con ampicilina, puesto que el pET22b trae un gen de resistencia a ampicilina.

Cultivo líquido: Se cultivan las colonias recombinantes positivas en medio LB líquido con ampicilina.

Stock en glicerol: Se guardan partes de los cultivos a -80°C en glicerol, para tener un stock permanente del plásmido y así completar la construcción del represilador.

5. Verificación de los constructos y de su funcionalidad

Electroforesis de ADN: esta técnica permite visualizar en gel de agarosa el resultado de todas las amplificaciones por PCR y de las reacciones de Gibson Assembly, separando por aplicación de un campo eléctrico los distintos fragmentos de ADN de una mezcla de acuerdo a sus tamaños respectivos. Por lo tanto, permite deducir el tamaño del fragmento amplificado o ensamblado, lo cual es un indicador del éxito o del fracaso de la operación. El protocolo se puede encontrar en el **Anexo 11.**

PCR de colonias: técnica que permite averiguar si una bacteria transformante es también recombinante, es decir si el plásmido que aceptó tiene el inserto de interés. Para esto, se lisan las células para liberar su material genético en el medio, en particular el plásmido transformado, y se realiza una reacción de PCR con los partidores que flanquean el inserto que se está buscando. El protocolo de esta técnica se encuentra en el **Anexo 12**.

Ensayos de digestión: se puede utilizar esta operación para averiguar también si el plásmido de interés tiene el inserto correcto. La etapa consiste en digerir con enzimas de restricción el plásmido en lugares que generan un patrón distinto según el plásmido tenga el inserto deseado o no, o si está en el sentido correcto o no. Se puede encontrar el protocolo de digestión enzimática en el **Anexo 13**.

Electroforesis de proteínas: sirve para determinar si los distintos represores de la memoria se están efectivamente expresando. Efectivamente, según el dogma central de la Biología Molecular, se requieren de ambas etapas de transcripción y traducción para expresar una proteína a partir de un gen. Se puede visualizar el contenido proteico de una célula induciendo los genes cuya expresión se desea corroborar, cargando la célula denaturada en un gel de poliacrilamida y aplicando un campo eléctrico para separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Si la proteína de interés está presente se verá como una banda más ancha e intensa que las otras bandas que representan las proteínas expresadas naturalmente en la célula. Se detalla el protocolo de electroforesis de proteínas en el **Anexo 14**.

Secuenciación: Permite evaluar la consistencia de las secuencias de los constructos armados. Se requiere de la tecnología de un laboratorio externo para poder llevar este análisis a cabo. La secuenciación es una electroforesis capilar de ADN, permitiendo identificar y discriminar todos los nucleótidos de una secuencia genética dada. Por lo tanto, el resultado es inequívoco: permite validar si el constructo tiene la secuencia esperada o no.

4.2 Sistema electrónico: metodología de obtención de oscilaciones

El sistema electrónico se estructura en tres unidades equivalentes, cada una representativa de uno de los módulos genéticos. Más que la construcción en sí del circuito, lo importante es encontrar las condiciones en las cuales se producen efectivamente las oscilaciones. Para esto, se siguen los cinco pasos de la metodología de la **Fig. 19**.

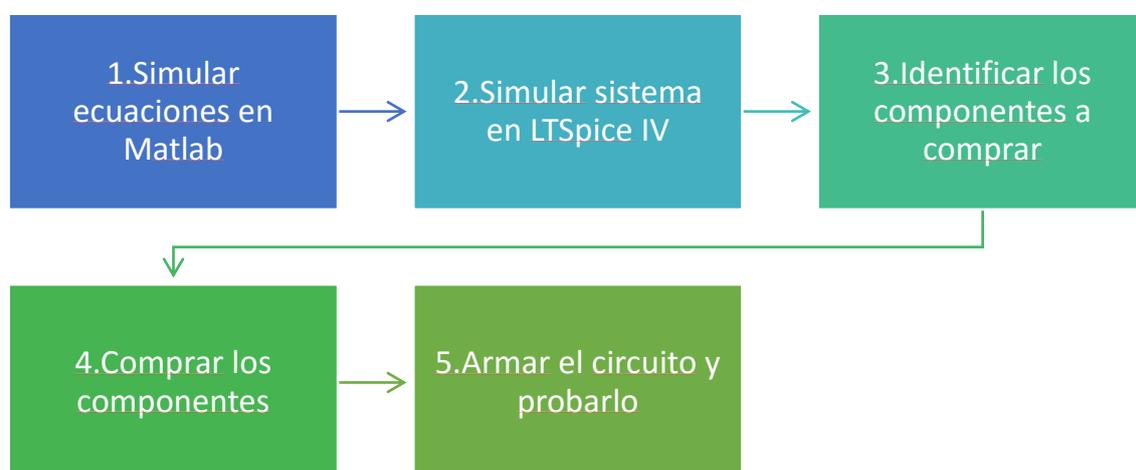


Fig. 19 - Metodología de armado y testeo del circuito electrónico equivalente al represilador biológico.

A continuación, se detallan los puntos principales de esta metodología:

1. Simular ecuaciones en Matlab

Objetivo: Establecer la analogía entre las ecuaciones que rigen el comportamiento del oscilador biológico y las que determinan el comportamiento del sistema electrónico.

Metodología: Se puede variar en Matlab el valor de los parámetros físicos equivalentes a los parámetros biológicos para determinar en qué condiciones el sistema electrónico genera oscilaciones.

2. Simular el sistema en LTSpice IV

Objetivo: Determinar cuáles son las condiciones y los componentes electrónicos estándares que permiten el funcionamiento real del oscilador electrónico, saliendo de la simulación ideal realizada en el punto 1.

Metodología: Se construye el oscilador electrónico en el programa, escogiendo en el catálogo de partes las que sirven. Variando el tipo de OPAMPs, el valor de las resistencias y de las capacidades, se puede encontrar las condiciones en las cuales el sistema oscila. Estas condiciones definen el tipo y la referencia de las partes, que por su carácter estándar facilita la adquisición de las mismas en cualquier tienda de electrónica.

5. Armar el circuito y probarlo

Objetivo: Comprobar si las partes identificadas generan oscilaciones en las condiciones previstas por el programa LTSpiceIV y realizar ajustes si fuera necesario.

Metodología: Para armar el circuito se utilizó un protoboard para conectar con cables resistencias y capacidades de distintos valores amablemente facilitadas por el laboratorio de electrónica de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, junto con OPAMPs, osciloscopios y fuentes de poder.

4.3 Simulación informática: determinación de la sensibilidad de los sistemas biológico y electrónico.

4.3.1 Simulación del represilador

Objetivo: Determinar de qué manera afectan cada uno de los 12 parámetros de las ecuaciones que rigen el comportamiento del represilador.

Metodología: El único parámetro que no se estudió fue el coeficiente de Hill, por ser un parámetro empírico sin significado físico inmediato. No se estudiaron los parámetros b y b_0 por separado sino que la razón β/β_0 que tiene más significado físico. Se implementó primero las ecuaciones en Matlab y luego se hizo variar cada uno de los parámetros fijando los otros 5. Se escogió cuatro valores repartidos en cuatro órdenes de magnitud distintos y se estudió el efecto del cambio para cada uno así como las combinaciones de los distintos valores de cada parámetro.

Tabla 3 - Parámetros del represilador estudiados y rango de valores probado.

c_1 (adimensional)	0,5 ; 5 ; 50 ; 500
c_2 (adimensional)	0,5 ; 5 ; 50 ; 500
c_3 (adimensional)	0,5 ; 5 ; 50 ; 500
β_1/β_{10} (adimensional)	1 ; 10 ; 100 ; 1000
β_2/β_{20} (adimensional)	1 ; 10 ; 100 ; 1000
β_3/β_{30} (adimensional)	1 ; 10 ; 100 ; 1000

4.3.2 Simulación del oscilador electrónico

Objetivo: Determinar las condiciones críticas de alimentación de los OPAMPs que permiten la generación de oscilaciones en el circuito.

Metodología: Se implementó en Matlab el set de ecuaciones que rige el comportamiento del oscilador electrónico y se varió el valor nominal de las tensiones de alimentación de los OPAMPs para determinar en qué condiciones críticas se producían oscilaciones.

Tabla 4 - Parámetros del circuito electrónico estudiados y rango de valores probado.

Vcc+ [V]	12 ; 10 ; 8 ; 6 ; 4 ; 2 ; 1 ; 0,1; 0
Vcc- [V]	-12; -5 ; -4 ; -3 ; -2 ; -1 ; -0,5; -0,1 ; -0,01; 0
R [Ω]	1000; 10000; 100000; 100; 10;
C [mF]	0,001; 1; 10; 100; 0,1; 0,01;

5. Resultados

5.1 Sistema biológico: construcción del Represilador

5.1.1 Generación de una biblioteca con las partes a ensamblar

Después de haber resuspendido todos los partidores, se realizó la amplificación por PCR de todas las partes a utilizar, utilizando la Phusion DNA Polymerase como polimerasa, las temperaturas de los partidores indicadas por Oligocalc y un tiempo de extensión de 20-30s por 1000 bp, como se recomienda en la hoja técnica de la enzima. En la **Fig. 20**, se muestran los resultados de dichas amplificaciones.

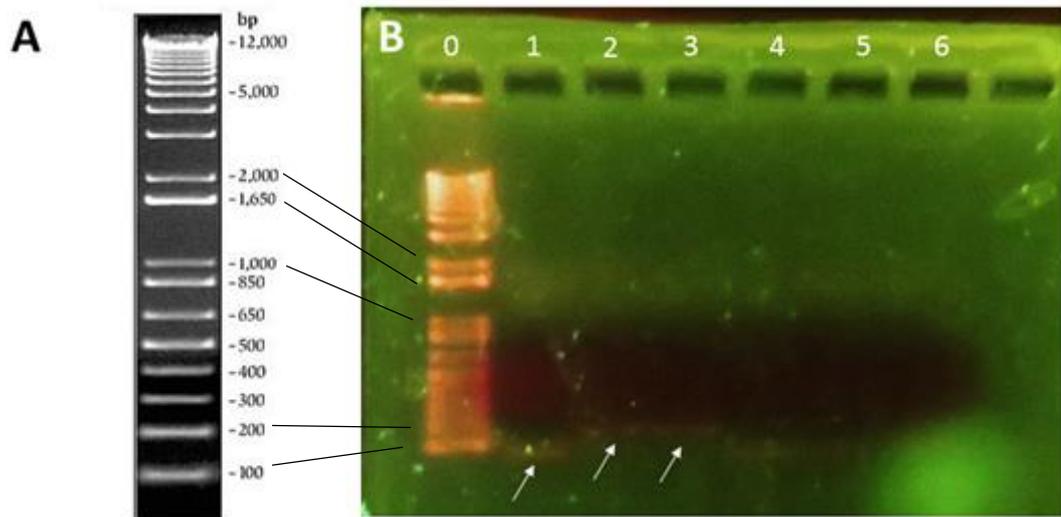


Fig. 20 – Amplificación por PCR de las partes biológicas necesarias. A: Marcador de peso molecular utilizado: 1kb Plus Ladder. B: Gel de electroforesis revelando el resultado de amplificación por PCR de las partes siguientes: 0: marcador de peso molecular; 1: PLacI, temperatura de annealing: 58,4°C; 2: Pcl, temperatura de annealing: 58,0°C; 3: PTet, temperatura de annealing: 58,0°C; 4: Lacl temperatura de annealing: 58,8°C; 5: cl, temperatura de annealing: 59,6°C; 6: TetR, temperatura de annealing: 58,4°C.

En el carril 0 de la **Fig. 20 – B**, se puede apreciar el espectro del marcador de peso molecular. Si bien se puede observar que los carriles 4, 5 y 6 no presentan bandas de amplificación, existe una incertidumbre sobre el resultado de la PCR en los carriles 1, 2 y 3, dado que se observan posibles bandas, indicadas por las flechas blancas.

Para levantar esta incertidumbre, se corrieron las mismas amplificaciones en un gel de agarosa a 2,5% con el marcador 50bp Ladder para resolver los promotores cuyos tamaños son del orden de 200 pb en los tres casos, como se detalla en la **Fig. 22 – A**. El resultado de este gel se muestra en la **Fig. 21**.

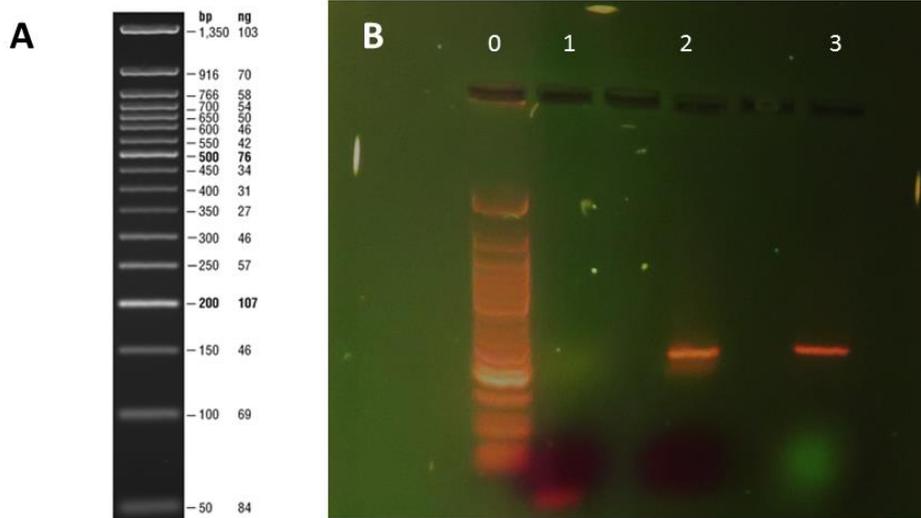


Fig. 21 – Amplificación por PCR de los tres promotores del sistema. A: Marcador de peso molecular utilizado: 50bp Ladder, New England BioLabs. B: Gel de electroforesis revelando el resultado de amplificación por PCR de las partes siguientes: 1: PLacl; 2: Pcl; 3: PTet. En el carril 0 se aprecia el patrón de bandas del marcador de peso molecular.

A partir de los resultados del gel, se concluye que la amplificación de los promotores Pcl y PTet resultó, mientras que la de PLacl no.

Se volvió a realizar amplificaciones por PCR de Pcl, PLacl, cl, TetR y el vector pSB1C3 con distintas temperaturas para determinar con cual funcionaba mejor la reacción. La Fig. 22 muestra el resultado de este experimento.



Fig. 22 – Resumen de las amplificaciones de todas las partes genéticas y sus temperaturas de annealing respectivas. A: Tamaño esperado de las partes amplificadas. B: Resultado de las distintas amplificaciones. En los carriles 1, 2 y 3 se amplificó Pcl a 52°C, 53°C y 54°C, respectivamente. En los carriles 4, 5 y 6 se amplificó PLacl a 52°C, 53°C y 54°C, respectivamente. En los carriles 7, 8 y 9 se escogió de temperaturas de annealing de cl a 52°C, 53°C y 54°C, respectivamente. En los carriles 10, 11 y 12 las temperaturas de annealing de TetR se fijaron a 55°C, 56°C y 57°C, respectivamente. Por fin, en los carriles 13, 14 y 15 se fijó la temperatura de annealing del vector pSB1C3 a 56°C, 57°C y 58°C, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió que Pcl, PLacl y cl se amplificarían a 54°C, TetR a 57°C, PTet y pSB1C3 a 58°C. No se tiene fotografía de la amplificación de Lacl pero su temperatura óptima se encontró a 57°C.

5.1.2 Generación de los módulos 1, 2 y 3

Luego de haber realizado la amplificación de todas las partes, se unieron todos los promotores a los ORFs correspondientes por reacción de Gibson Assembly, la secuencia del RBS insertada artificialmente al momento de las amplificaciones de los promotores: PLacI-RBS con TetR, Ptet-RBS con cl y Pcl-RBS con Lacl. Luego se linealizó el vector pSB1C3 de dos formas distintas: una que mantenía el ORF de la RFP en la secuencia del vector y otra que lo dejaba fuera. De esta forma, nuevamente por Gibson Assembly, se pudo insertar los módulos en sus vectores receptores respectivos. Así, el módulo TetR quedó unido con su reportero RFP mientras que los otros dos módulos se unieron al vector privado de la RFP. La **Fig. 23** presenta un resumen de los ensamblajes realizados.

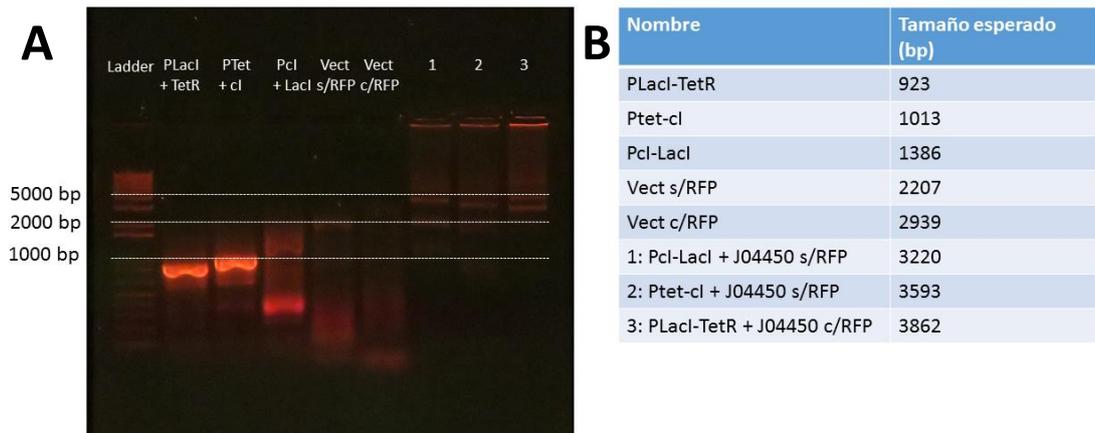
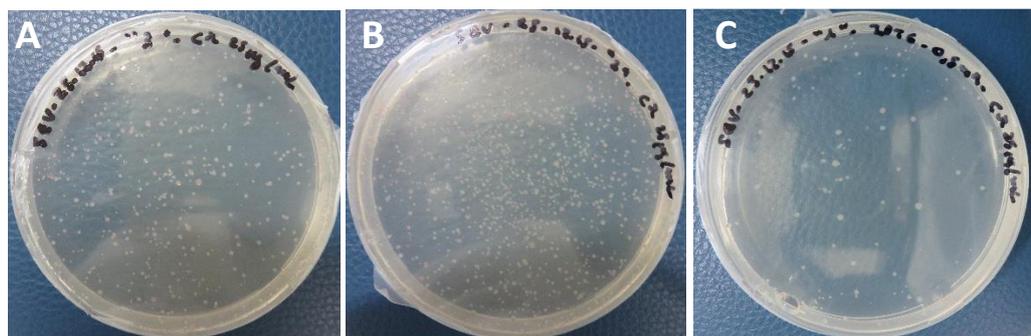


Fig. 23 - Resultados de los ensamblajes Promotor-RBS-ORF. A: Resultado por gel de electroforesis de los ensamblajes promotor-RBS-ORF. 1: Módulo 1 ensamblado con el vector pSB1C3 cargado con RFP. 2: Módulo 2 ensamblado con el vector pSB1C3 sin RFP. 3: Módulo 3 ensamblado con el vector pSB1C3 sin RFP. Marcador de peso molecular: 1Kbp Plus Ladder. B: Tabla resumiendo las partes involucradas y los tamaños esperados de los ensamblajes.

Luego, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes con los vectores que contenían cada uno de los tres módulos. Después de 16 h de incubación a 37°C se obtuvieron colonias transformantes en cada placa como se muestra en la **Fig. 24** y se realizaron PCR de colonias para 8 colonias de cada placa. El resultado se muestra a continuación en la **Fig. 25**.



*Fig. 24 - Resultados de la transformación de distintas *E. coli* DH5 α con cada uno de los tres módulos. A: constructo PLacI-TetR-RFP. B: constructo Ptet-cl. C: constructo Pcl-Lacl.*

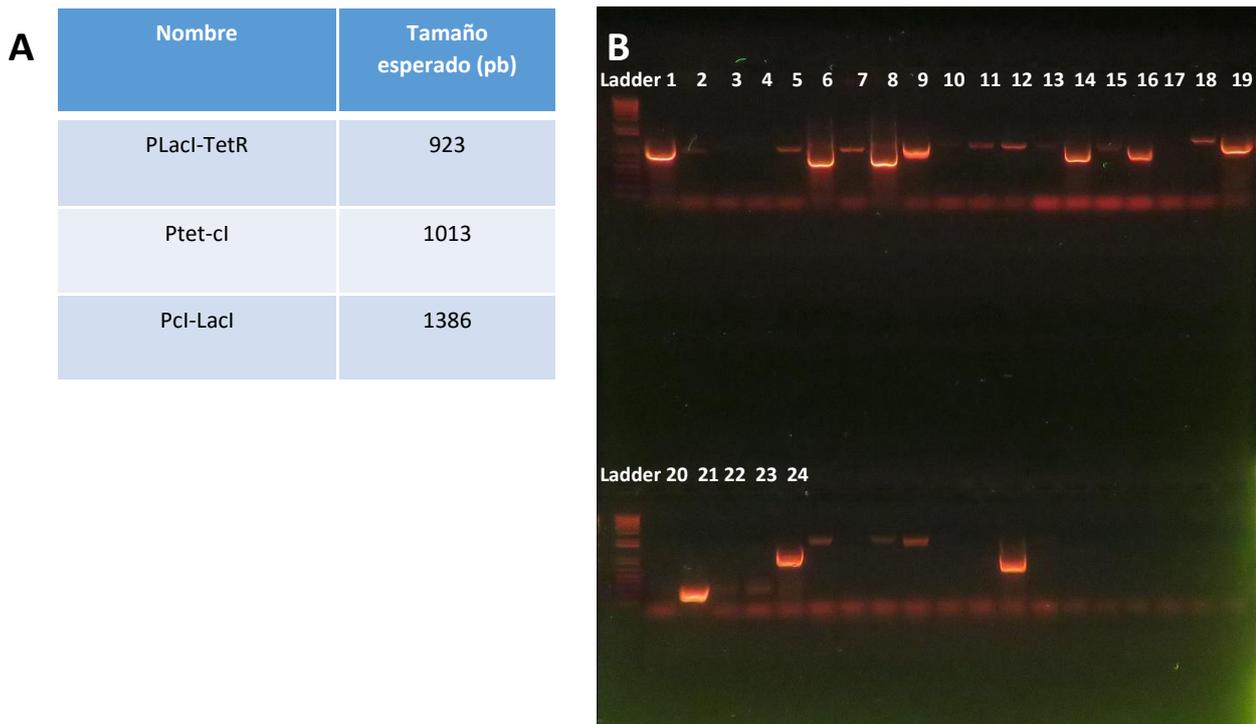


Fig. 25 - Resultados de los PCR de colonias realizados sobre las bacterias transformantes de la Fig. 24. **A:** Tamaños esperados de cada módulo. **B:** Resultados de los PCR de colonias. Marcador de peso molecular: 1kbp Ladder. Carriles 1 a 8: módulo PLacI-TetR. Carriles 9 a 16: módulo Ptet-cl. Carriles 17 a 24: módulo Pcl-LacI. Los carriles siguientes son muestras ajenas a este trabajo.

5.1.3 Análisis de la expresión de los represores derivados de los constructos genéticos en las células recombinantes

Se realizó un gel de proteínas con cada uno de los tres módulos independientes construidos. Se espera la producción de las proteínas siguientes: TetR, RFP, cl y LacI cuyos pesos moleculares se muestran en la Fig. 26 - B. Los resultados se muestran en la Fig. 26. Cada muestra se cargó en dos carriles, la segunda correspondiendo a una dilución al tercio de la primera columna.

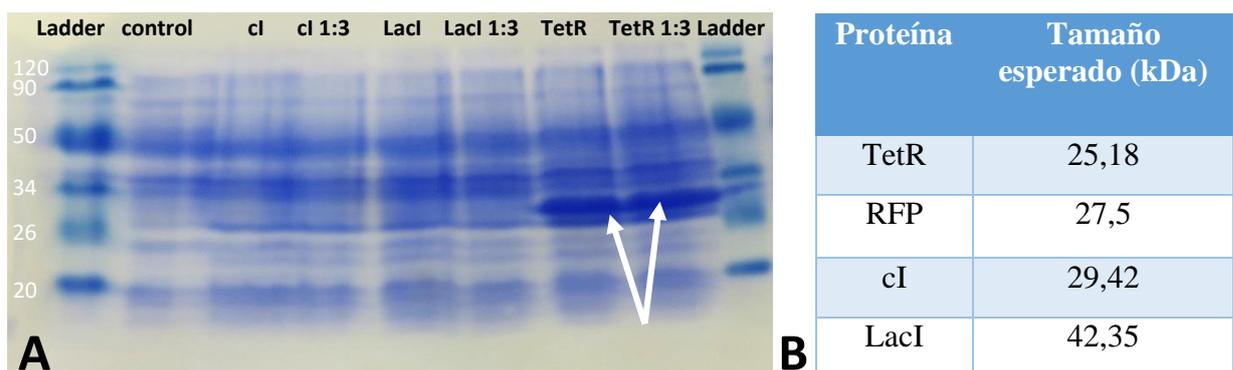


Fig. 26 - Expresión de los tres reportes en células recombinantes. **A:** Resultado del gel de proteínas de las bacterias E. coli BL21 transformadas con pSB1C3 como soporte del módulo Ptet-cl, pSB1C3 como soporte de Pcl-LacI y pSB1C3 como soporte de PLacI-TetR-RFP. El control es el contenido proteico de bacterias E. coli BL21 quimiocompetentes no transformadas. Marcador utilizado: Prestrained Protein Molecular Weight Marker. Todos los tamaños están expresados en kDa. **B:** Tamaños esperados en kDa de las proteínas deseadas.

Se observa una sobre expresión de una proteína en los carriles de la muestra PLacI-TetR-RFP, de un tamaño que corresponde a la RFP. No se logra determinar si el represor TetR no se está expresando o si se está expresando junto con la RFP por la similitud de los tamaños. La producción de la RFP es

evidente por el color rojo del pellet proveniente del cultivo de las bacterias transformadas con el plásmido pSB1C3 que contiene el módulo PLacI-TetR-RFP. En la **Fig. 27** se muestra la observación a través del transiluminador de proteínas de la fluorescencia roja emitida por dichas células. Sin embargo, no se aprecian las bandas de interés en los carriles correspondiendo a las muestras Ptet-cl y Pcl-LacI.

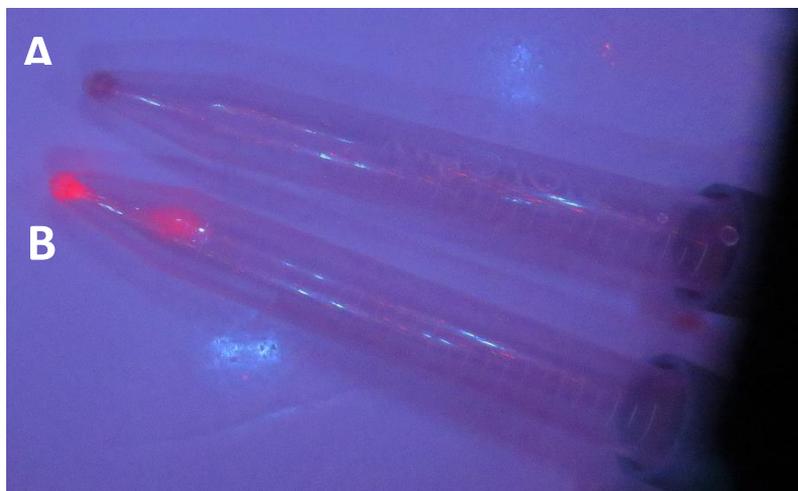


Fig. 27 - Visualización en transiluminador de proteínas de la RFP en células recombinantes. A: control negativo con células transformadas con un plásmido pET22b que no produce RFP. B: células transformadas con el plásmido pSB1C3 cargado con el módulo PLacI-TetR-RFP.

5.1.4 Ensamblaje de los módulos 2 y 3 en pET22b

La estrategia inicial para realizar este ensamblaje era utilizar el método del ensamble 3A, descrito en la **Fig. IX** y el **Anexo 13**. Entonces, primero se realizó una digestión doble de los módulos Ptet-cl y Pcl-LacI con las enzimas EcoRI, SpeI y XbaI, PstI, respectivamente. Como vector receptor se escogió el pSB1A3 puesto que contiene un gen de resistencia a ampicilina, distinto al vector pSB1C3 que sirve como base a cada uno de los módulos y lleva un gen de resistencia a cloranfenicol.

Luego, se transformó dos alícuotas de *E. coli* BL21(DE3) con los vectores siguientes:

1. plásmido pUC18 para células supercompetentes, prestado por Jose Duguet y sirviendo de control positivo para la transformación.
2. Mix de ligación: vector pSB1A3 llevando, en la teoría, los módulos unidos Ptet-cl y Pcl-LacI.

Después de esto, se dejaron las placas en el incubador a 37°C. Luego de 15 h de incubación, se obtuvieron los resultados siguientes de la **Fig. 28**.

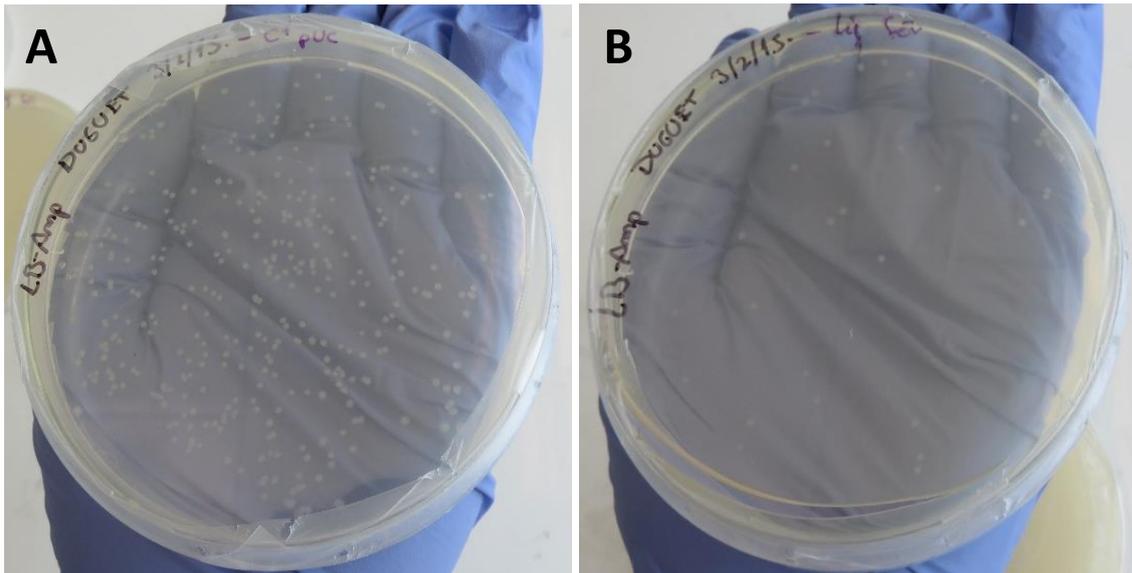


Fig. 28 - Células transformadas con el mix de ligación PTet-cl-Pcl-Lacl. **A:** Control positivo con pUC18. **B:** Ligación de los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl en pSB1A3 por el método de ensamble 3A.

Se obtuvieron colonias transformantes, sin embargo, los PCR de colonias realizados mostraron que no eran recombinantes, por lo que se concluye que eran falsos positivos.

Frente al fracaso del ensamblaje de ADN con enzimas de restricción, se decidió cambiar la estrategia de ensamblaje, pues en ese momento, se contaba con partidores que cumplían las funciones siguientes:

1. Px_Sx_Fwd: partidore que alinea con el prefijo y que tiene una cola complementaria al sufijo;
2. Px_Sx_Rev: partidore que alinea con el sufijo y que tiene una cola complementaria al prefijo;
3. Px_pET22b_Fwd: partidore que alinea con el prefijo y que tiene una cola complementaria al vector pET22b, río arriba del promotor T7.
4. Sx_pET22b_Rev: partidore que alinea con el sufijo y que tiene una cola complementaria al vector pET22b, en el terminador T7.

Se recuerda que la definición de prefijo y sufijo se muestra en la **Fig. 7** de la sección de Introducción. Con estos partidores, se proponía por lo tanto unir los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl por Gibson Assembly mediante sus sufijo y prefijo, respectivamente.

Para eso, primero se volvió a preparar amplificaciones de las partes a unir mediante reacciones de PCR, cuyos resultados se pueden apreciar en la **Fig. 29**.

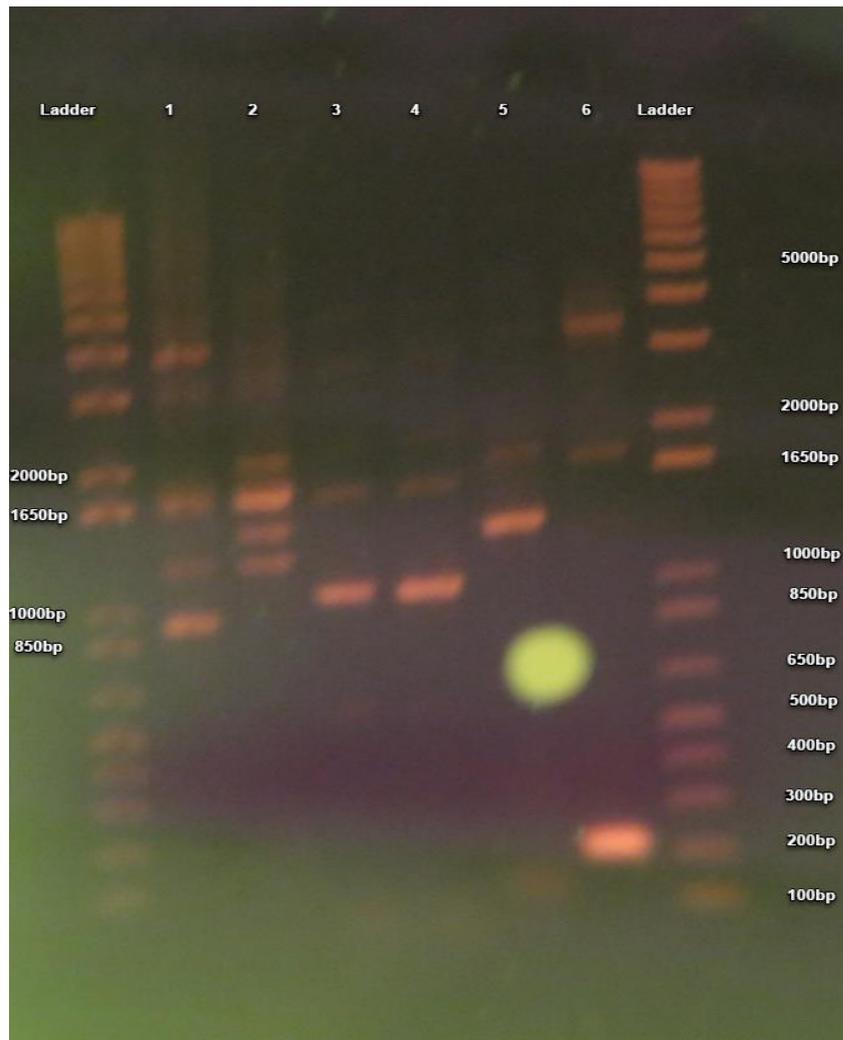


Fig. 29 - Resultados de amplificación de los distintos módulos construidos. Marcador de peso molecular: 1kb Plus Ladder. **Carriles 1 a 5:** muestras de cada dispositivo genético. **1:** módulo P_{LacI}-TetR (colonia 5). **2:** módulo P_{LacI}-TetR (colonia 7) **3:** módulo P_{tet-cl} (colonia 3). **4:** módulo P_{tet-cl} (colonia 4). **5:** módulo P_{cl-LacI} (colonia 2). **Carril 6:** muestra de otro trabajo.

Las muestras de los carriles 3 y 4 presentan ambas una banda intensa a la altura esperada (alrededor de 1000 pb) y bandas de amplificación inespecífica de tamaños superiores. La muestra del carril 5 también presenta una banda a la altura esperada (cerca de 1400 pb) y bandas de amplificaciones inespecíficas. Se purificaron las bandas de interés.

Se realizó el Gibson Assembly de P_{tet-cl} y P_{cl-LacI} cuyo resultado se puede observar en el gel de electroforesis que se muestra en la **Fig. 30**.

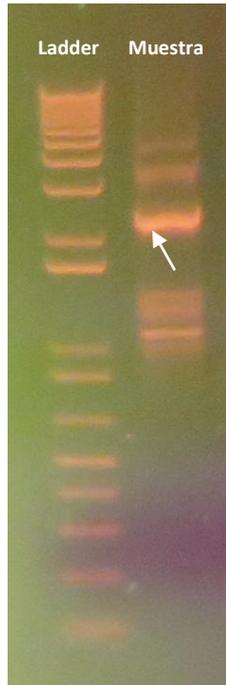


Fig. 30 - Resultados del ensamblaje de los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl por Gibson Assembly. Marcador de peso molecular: 1kbp Plus Ladder. Se indica por una flecha blanca el producto de ligación esperado de la reacción de Gibson Assembly.

El tamaño esperado es de aproximadamente 2400 pb. Dentro de varias amplificaciones inespecíficas, se observa una banda intensa a la altura esperada y ésta se purificó. Sin embargo, no se logró reamplificar el ensamblaje por razones que se detallarán en la sección siguiente.

Después de volver a ensamblar los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl (ver Fig. 31) y de realizar varios PCRs sobre el mismo producto de ligación (ver Fig. 32), se logró purificar el ensamblaje.

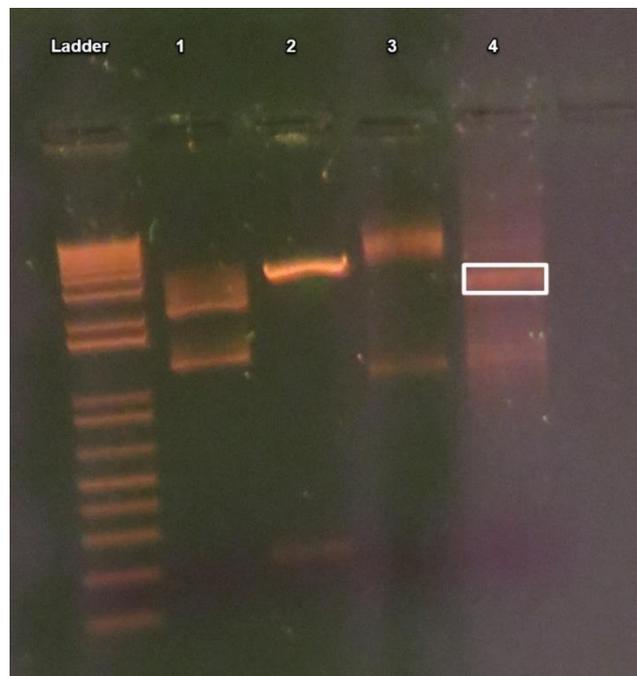


Fig. 31 - Gel de electroforesis del ensamblaje por Gibson Assembly de los constructos Ptet-cl y Pcl-Lacl. 1, 2 y 3: Muestras ajenas a este trabajo. 4: Gibson Assembly de los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl. Se destacó en el cuadro blanco la banda que representa el ensamblaje.

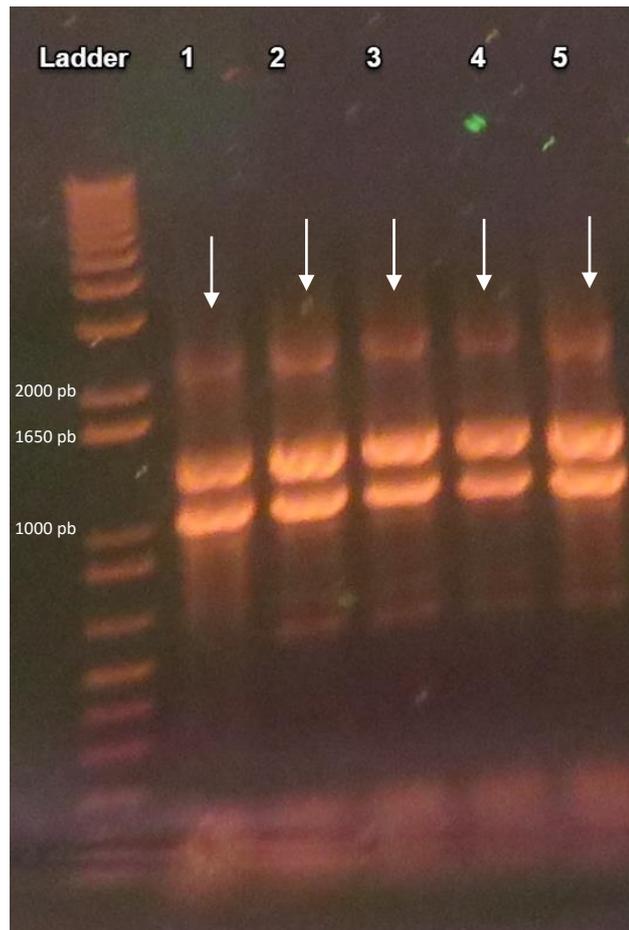


Fig. 32 - Gel de electroforesis de las reamplificaciones del constructo ensamblado Ptet-cl-Pcl-Lacl. 1 a 5: Reamplificaciones del módulo ensamblado. Se indican por flechas blancas las bandas correspondiendo al producto deseado.

Puesto que resultaron las 5 amplificaciones, aunque con muy baja especificidad para el producto deseado, se purificaron las cinco muestras en una misma columna para concentrar el producto de interés y luego, se procedió al ensamblaje por Gibson Assembly del módulo purificado con el vector pET22b linealizado.

Luego de proceder a la transformación de bacterias quimiocompetentes *E. coli* BL21 y cultivarlas en una placa con ampicilina (puesto que el pET22b viene con resistencia a ampicilina), se incubaron por 16 horas a 37°C. También se cultivó un control positivo con el plásmido pUC18. Los resultados se muestran en la Fig. 33.

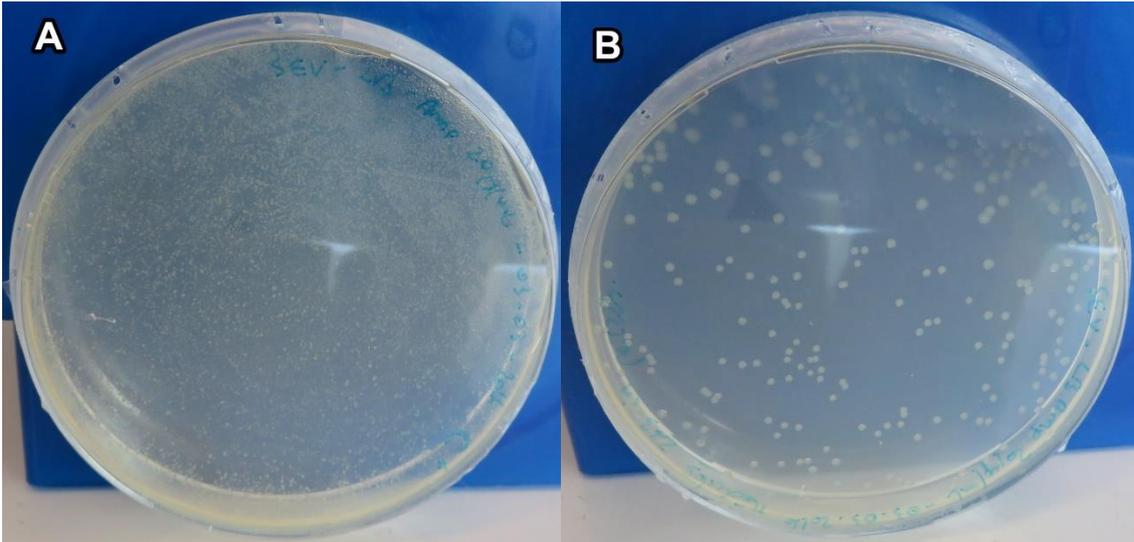


Fig. 33 - Cultivo en placa de bacterias *E. coli* BL21 quimiocompetentes transformadas. **A:** Control positivo: transformación con el plásmido pUC18. **B:** Resultado de la transformación con el mix de ligación por Gibson Assembly.

De la placa de la **Fig. 33-B** se escogieron 15 colonias y se sometieron a la prueba del PCR de colonias, con dos controles positivos: uno corresponde al módulo lineal de Gibson Assembly entre P_{tet}-cl y P_{cl}-Lacl y el otro a la miniprep de Lacl. Para amplificar se utilizaron los partidores VF2 y pSB1C3_La_{cl}_Rev. En la **Fig. 34** se muestra el resultado de los PCR de colonias.

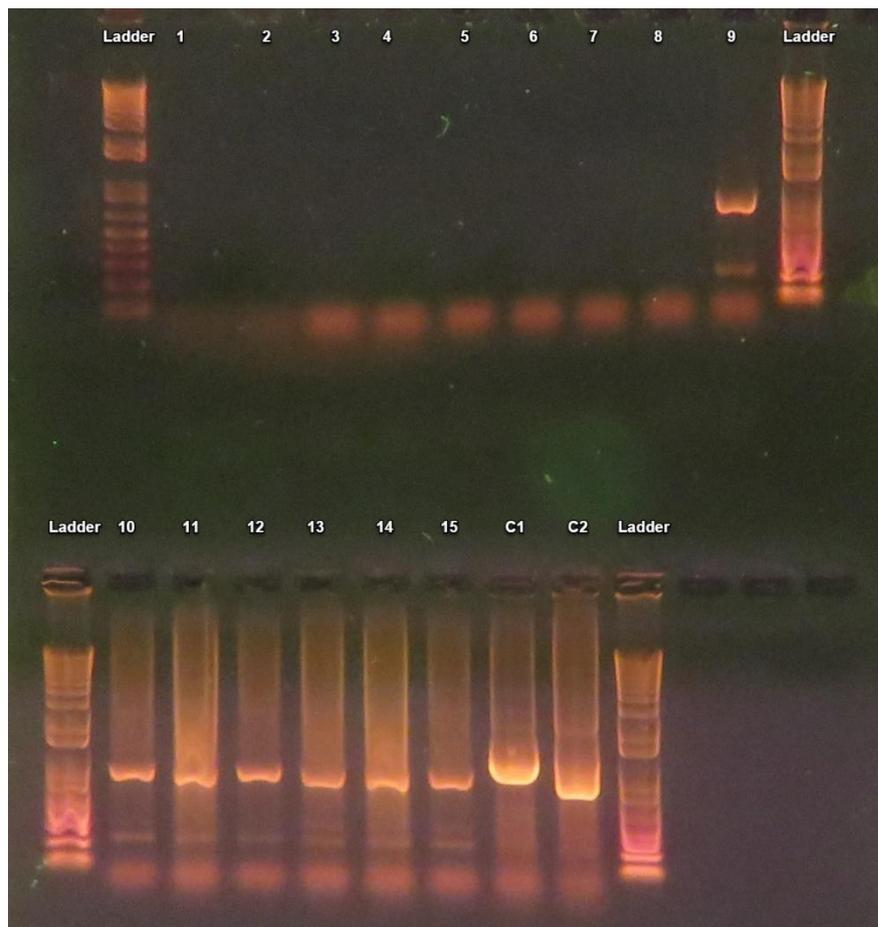


Fig. 34 - Resultados de los PCR de colonias del plásmido contenido en las bacterias transformantes seleccionadas. **1 - 15:** colonias 1 a 15, en el mismo orden. **C1:** control positivo con Lacl. **C2:** Control positivo con el ensamblaje P_{tet}-cl-P_{cl}-Lacl.

Se aprecia que ninguna colonia tiene el inserto deseado, sino que solamente se ligó el módulo con LacI. Además, se puede observar que el control positivo del módulo ensamblado Ptet-cl+Pcl-LacI no dio el resultado esperado, por lo que se tuvo que volver a construir este dispositivo para ligarlo en pET22b. Volviendo a amplificar los fragmentos a ensamblar desde sus minipreps respectivas, se realizó nuevamente una reacción de Gibson Assembly. Se muestra el resultado del ensamblaje en la **Fig. 35**.

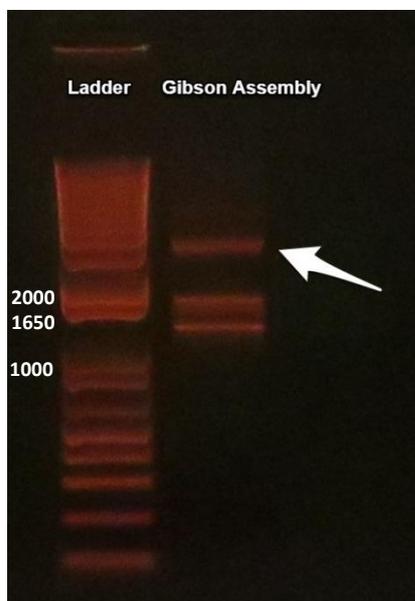


Fig. 35 - Gel de electroforesis de la reacción de Gibson Assembly entre los módulos Ptet-cl y Pcl-LacI. El marcador de peso molecular utilizado es el 1kbp Plus Ladder. Todos los tamaños indicados son en pb. Se indica por una flecha blanca la banda de interés, es decir el fragmento ensamblado de un tamaño esperado de aproximadamente 2400 pb.

Sin embargo, se observa que todos los fragmentos tienen un tamaño aparente más grande de lo esperado. Se procedió a la purificación desde gel de la banda, eluyendo en agua libre de nucleasas y la cuantificación dio una concentración del orden de 2 ng/ μ L y una pureza de 1,6. Pese a la mala calidad del fragmento se decidió proceder a una reamplificación con la totalidad del ADN como templado para la reacción de PCR. Se muestra el resultado en la **Fig. 36**.

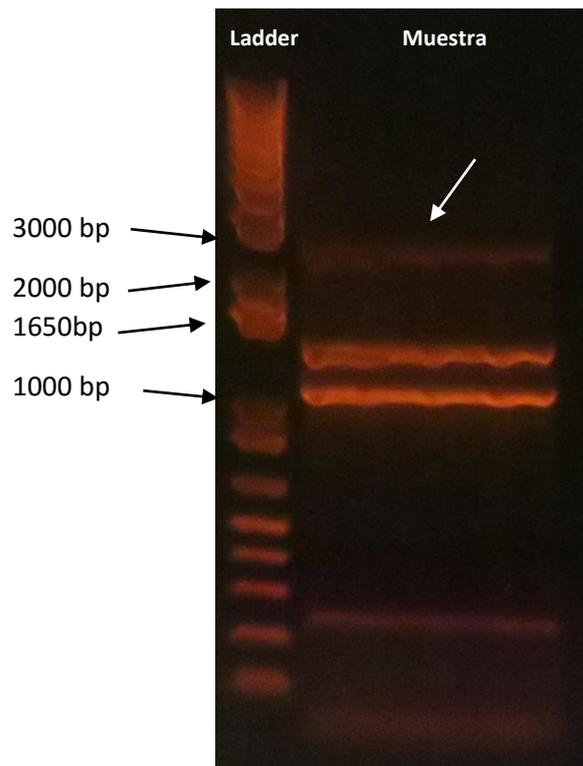


Fig. 36 - Gel de electroforesis de la reamplificación por PCR del producto purificado de la reacción de Gibson Assembly de la Fig. 35.

Primero, se observa que si bien se había cortado y purificado sólo la banda del Gibson Assembly correspondiendo *a priori* al fragmento unido, la figura muestra que al reamplificar el módulo, las bandas de cada parte individual vuelven a aparecer. Sin embargo, la reamplificación, esta vez, funcionó, puesto que se puede observar la banda de interés cerca de los 2400bp. También se aprecia que desapareció el artefacto que afectaba a todas las bandas un peso molecular mayor a lo esperado.

Por la baja concentración que se obtuvo al purificar el producto de PCR de la **Fig. 36**, se decidió volver a amplificarlo, aunque esto pudiera conllevar problemas de secuencia por la fidelidad de la enzima, a pesar de usarse la Phusion High Fidelity. Se utilizaron los mismos partidores: Prefijo_pET22b_Fwd y Sufijo_pET22b_Rev. La **Fig. 37** muestra el resultado de la reamplificación.

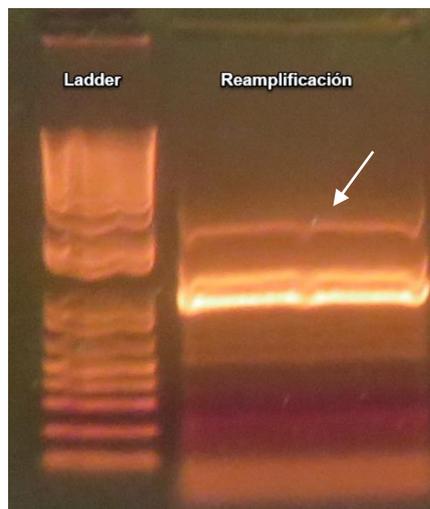


Fig. 37 - Gel de electroforesis de la reamplificación del producto de PCR de la Fig. 36, apuntando a aumentar la concentración de éste. Se indica por una flecha blanca la banda de interés.

Se observa la banda de interés cerca de los 2400 pb. La purificación permitió determinar la concentración del fragmento de interés, del orden de 20 ng/μL, a partir del cual se realizó un ensamblaje con el vector pET22b. Se volvió a transformar bacterias *E. coli* BL21 quimiocompetentes con el mix de ligación por Gibson Assembly y se dejaron crecer 16 horas en placa de agar con ampicilina. El resultado de la transformación se muestra en la **Fig. 38**.

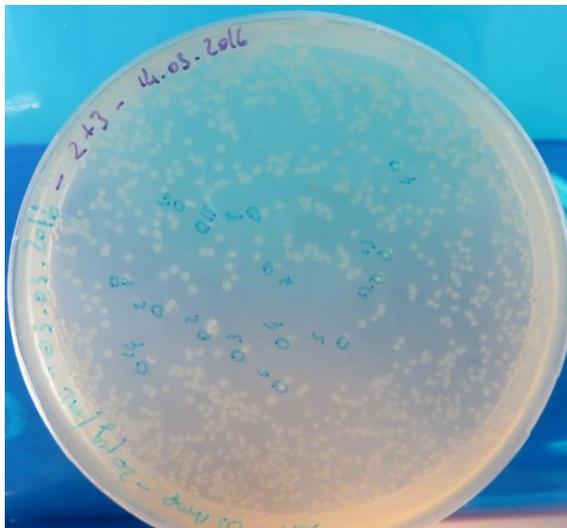


Fig. 38 - Resultado de la transformación, después de 16h de incubación a 37°C. En azul se destacan las colonias seleccionadas para realizar las reacciones de PCR de colonias.

Como se muestra en la **Fig. 38**, se seleccionaron 15 colonias para realizar PCR de colonias. Los resultados se muestran en la **Fig. 39**. Para llevar a cabo esta amplificación se ocuparon los partidores PxSx Fwd y Rev, que alinean con el prefijo y el sufijo de la secuencia de interés, respectivamente. Se escogió como control positivo una muestra de otro proyecto que contiene también los sitios Prefijo y Sufijo, con el objetivo de comprobar la funcionalidad de los partidores utilizados en las otras 15 reacciones de PCR.

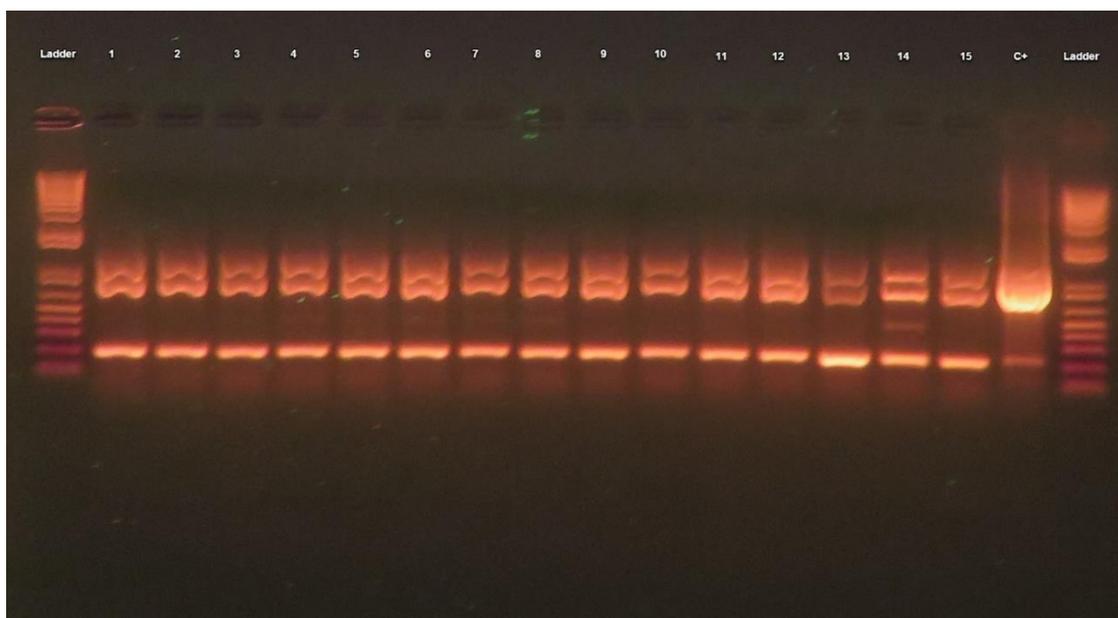


Fig. 39 - Resultados del PCR de colonias de las 15 colonias escogidas. C+: control positivo, en este caso la amplificación con PxSx fwd y Rev de una muestra de otro proyecto (*lactato deshidrogenasa*) que contiene los mismos sitios de prefijo y sufijo.

Se aprecia la presencia de dos bandas cuyos tamaños corresponden aproximadamente a los de los dos módulos a partir de los cuales se realizó el ensamblaje. No se observa la amplificación del fragmento unido, lo cual no significa que no esté, sino que en proporción probablemente se amplificaron más los módulos más cortos, y de manera exponencial. También podría ser que las bacterias hayan aceptado dos plásmidos, cada uno con un inserto distinto, pero el resultado es el mismo en las 15 colonias, lo cual sugiere que la probabilidad de tal evento sea baja.

Se aprecia una tercera banda, de 200 pb, que tiene el tamaño de un promotor, sin embargo no debería verse un fragmento de este tamaño por el ensamblaje realizado. Puede que sea una amplificación inespecífica de los partidores que ocurre en el mismo vector pET22b.

En el intervalo, se mandó a sintetizar partidores que amplificaban específicamente el módulo ensamblado Ptet-cl-Pcl-Lacl. Se decidió entonces volver a amplificar todos los módulos construidos hasta el momento: para cada módulo simple PLacl-TetR, Ptet-cl y Pcl-Lacl se ocuparon los partidores estándares VF2 y VR, que flanquean zonas del vector que contiene estos insertos. Para el módulo ensamblado se ocuparon los partidores específicos Ptet_Fwd y Sx_Rev, que amplifican desde el promotor Ptet hasta el sufijo del constructo. Los resultados de esta amplificación se muestran en la **Fig. 40**.

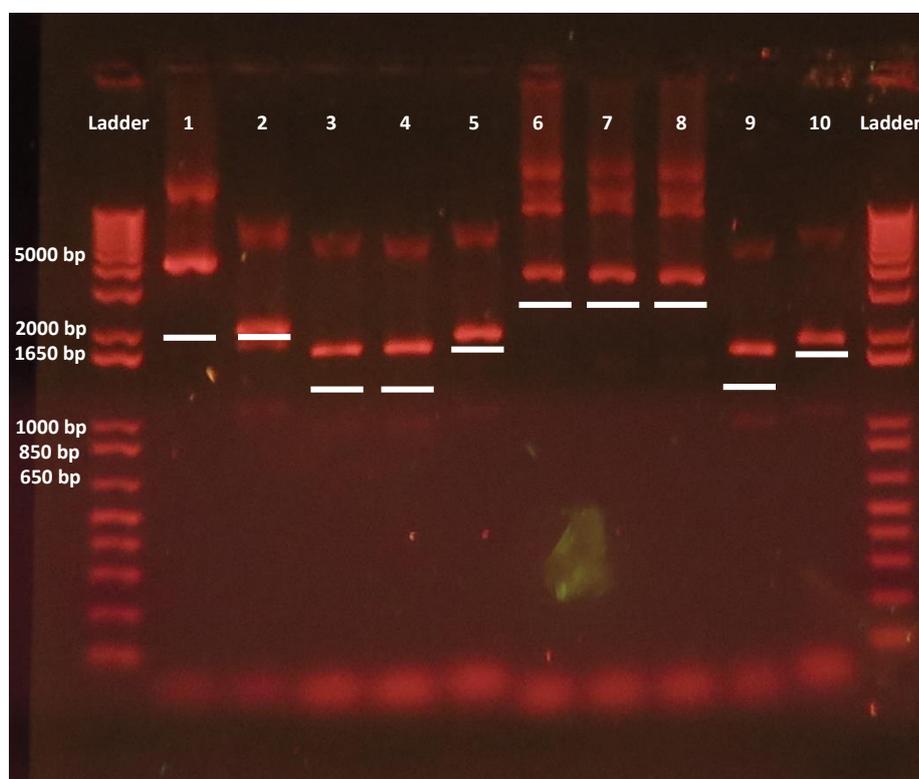


Fig. 40 - Resultados de las amplificaciones por PCR de todos los ensamblajes realizados desde el inicio del trabajo. 1: Módulo PLacl-TetR-RFP (colonia 5). 2: Módulo PLacl-TetR-RFP (colonia 7). 3: Módulo Ptet-cl (colonia 3). 4: Módulo Ptet-cl (colonia 4). 5: Módulo Pcl-Lacl (colonia 2). 6: Módulo ensamblado Ptet-cl-Pcl-Lacl (colonia 3). 7: Módulo ensamblado Ptet-cl-Pcl-Lacl (colonia 8). 8: Módulo ensamblado Ptet-cl-Pcl-Lacl (colonia 15). 9: control positivo del módulo Ptet-cl. Se comprueba la funcionalidad del partidor pET22_Ptet_Fwd. 10: control positivo del módulo Pcl-Lacl. Se comprueba la funcionalidad del partidor pET22_Lacl_Rev.

La **Fig. 40** muestra que, aparte del carril 2, todas las bandas de interés de los otros carriles se encuentran a una mayor altura de lo esperado, aunque el orden relativo de los tamaños se haya conservado, por lo que todavía no se podía determinar si el ensamblaje Ptetcl-Pcl-Lacl había resultado bien o no.

Por lo tanto, se realizó un ensayo de digestión doble sobre las minipreps de tres de estas colonias (3, 8 y 15) con las enzimas EcoRI y PstI. Después de algunos problemas de contaminación de las muestras por nucleasas, se logró realizar ensayos cuyos resultados se muestran a continuación en la **Fig. 41**.

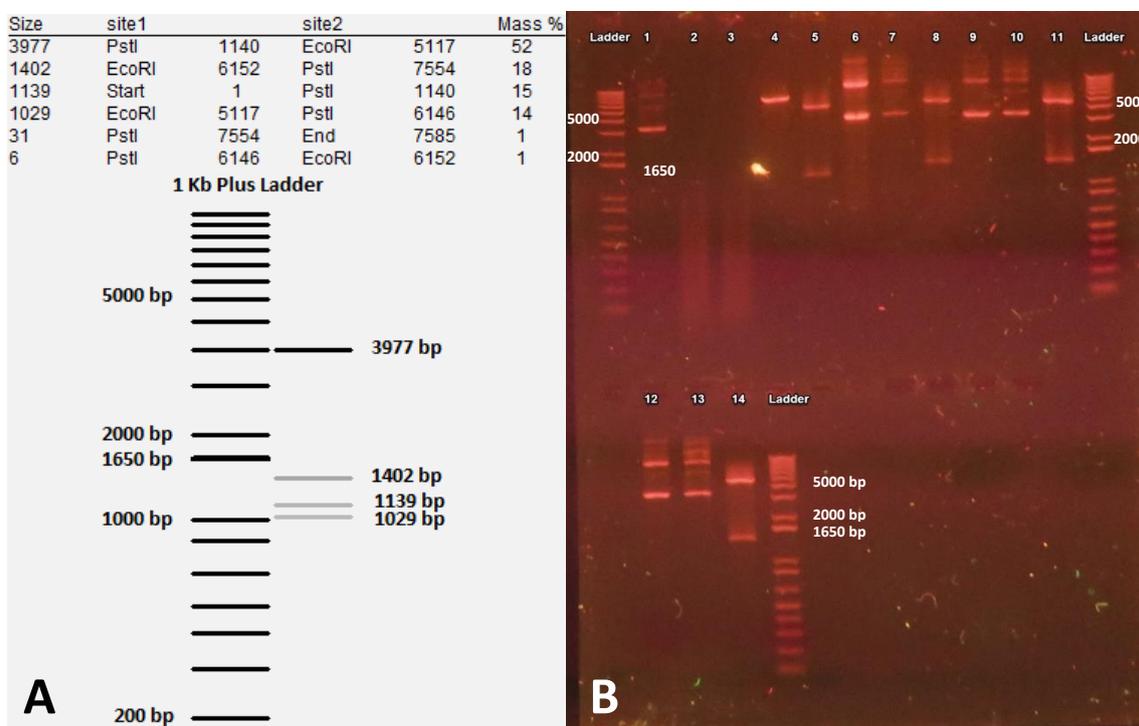


Fig. 41 - Comprobación por ensayo de digestión del ensamblaje PTet-cl-Pcl-Lacl. A: Ensayo de digestión virtual realizado por el programa Ape. Se esperan 6 bandas de digestión pero solamente 4 detectables con el marcador de peso molecular utilizado (1kbp Plus Ladder): 3977 bp, 1402 bp, 1139 bp y 1029 bp. B: Resultados del ensayo de digestión real. 1: miniprep de pET22(+). 2: control negativo de la digestión doble de pET22b(+). 3: digestión doble de pET22b(+). 4: otra miniprep de pET22b(+). 5: digestión doble de pET22b(+). 6: miniprep de la colonia C3. 7: control negativo de la digestión doble de C3. 8: Digestión doble de C3. 9: miniprep de la colonia C8. 10: control negativo de la digestión doble de C8. 11: Digestión doble de C8. 12: miniprep de la colonia C15. 13: control negativo de la digestión doble de C15. 14: Digestión doble de C15.

Se puede observar que ninguna de las 3 colonias tiene el patrón de digestión esperado sino que pareciera que la ligación se realizó con sólo uno de los insertos.

Frente a los resultados negativos del ensayo de digestión, se volvió a construir el ensamblaje a partir de las amplificaciones de los módulos Ptet-cl, Pcl-Lacl y del vector pET22 linealizado, que se pueden observar en la **Fig. 42**. Todas las reacciones se realizaron a 58°C con la Phusion DNA Polymerase.

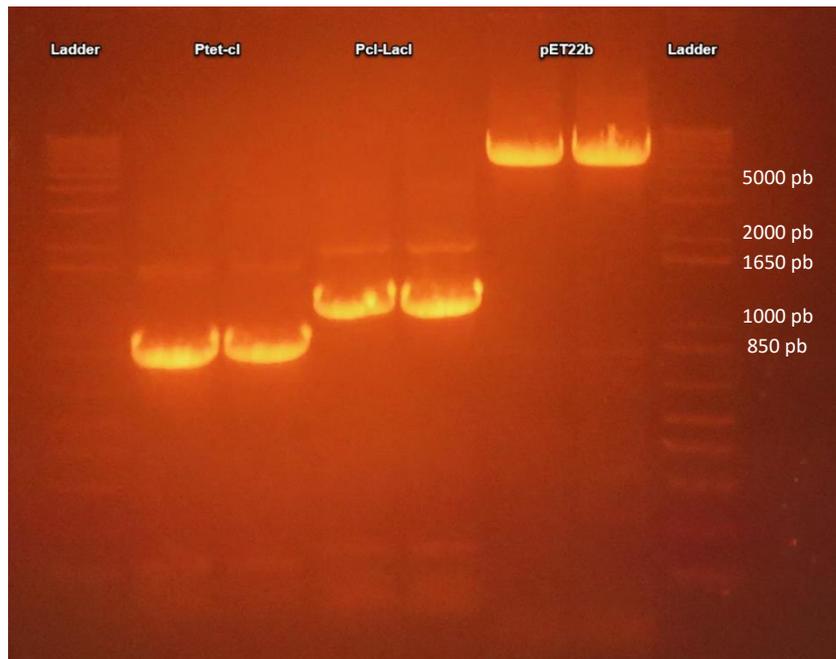


Fig. 42 - Resultados de la amplificación por PCR de los tres fragmentos a ensamblar: uno compuesto por el promotor *Ptet* y el ORF *cl*, otro compuesto por el promotor *Pcl* y el ORF *Lacl* y por último, el vector *pET22b* linealizado para recibir la unión de los dos módulos anteriores. Marcador de peso molecular: *1kbp Plus Ladder*.

Luego, se realizó la reacción de ligación por Gibson Assembly a 50°C durante 30 min, mezclando inserto total y vector en proporciones 3:1 y cada fragmento de inserto en proporción 1:1. Se puede apreciar el resultado de la reacción en la Fig. 43. Las bandas intensas corresponden a cada fragmento individual que no ligó.

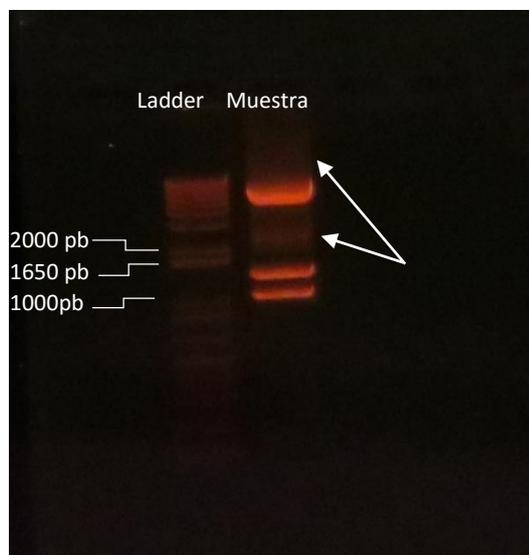


Fig. 43 - Resultado del ensamblaje simultáneo de los módulos 2 y 3 con el vector *pET22b* linealizado mediante reacción de Gibson Assembly. Se indican por flechas blancas los productos potenciales de ligación. Marcador de peso molecular: *1kbp Plus Ladder*.

Después de esto, se transformaron *E. coli* BL21 quimiocompetentes con el mix de ligación de Gibson Assembly. También se realizó un control positivo de la transformación con el plásmido *pUC18*, y se cultivaron en medio agar sólido con ampicilina. Después de 16 hrs de incubación, se pudo comprobar que la transformación había resultado, tanto para el control positivo como para el mix de ligación, como se muestra en la Fig. 44.

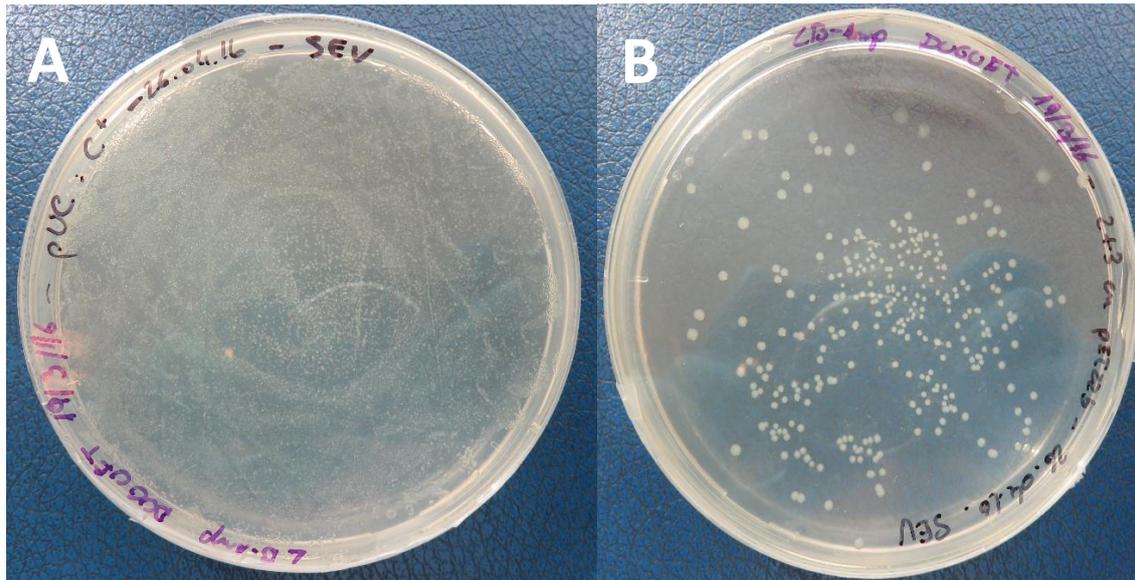


Fig. 44 - A: Resultado de la transformación con el control positivo pUC. B: Resultado de la transformación con el mix de ligación por Gibson Assembly, ensamblaje simultáneo de los módulos 2, 3 y pET22b linealizado.

De la placa de transformantes, se seleccionaron 16 colonias para someterlas a un PCR de colonias, el resultado del cual se muestra a continuación en la **Fig. 45**.

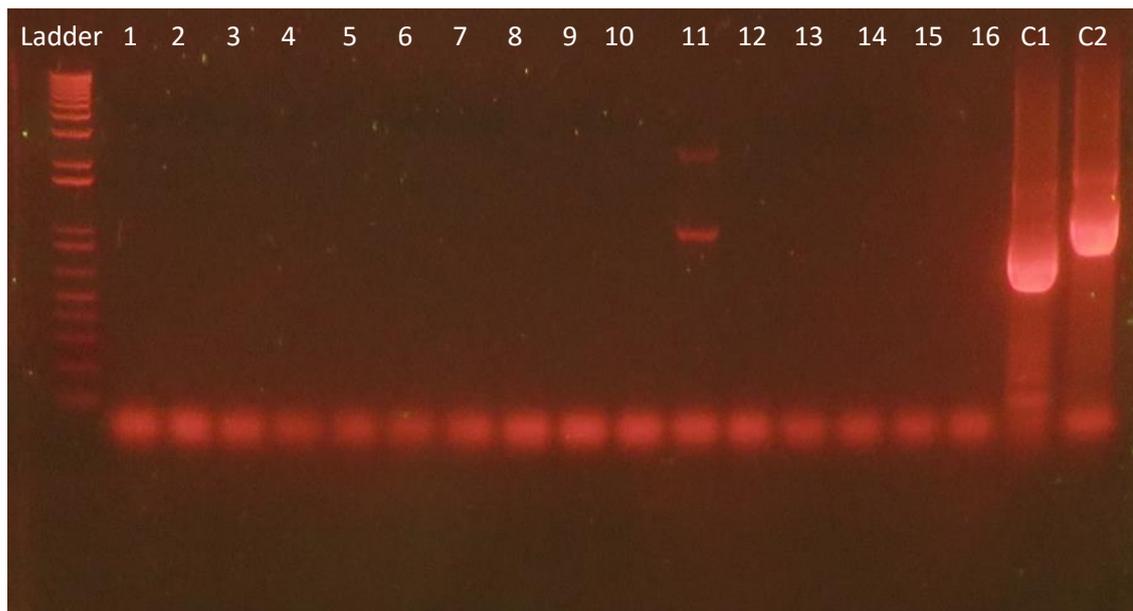


Fig. 45 - Resultado del PCR de colonias realizado sobre 16 colonias transformantes de la placa presentada en la Fig44-B. Ladder: 1Kb Plus. **Carriles 1 a 16**: colonias 1 a 16, en ese orden. **C1**: control positivo cl, amplificado con Ptet_Fwd y cl_Rev. **C2**: control positivo, Lacl amplificado con Pcl_Fwd y Lacl_Rev.

Se observan dos bandas en el carril 11: una que tiene un tamaño semejante al del constructo total Ptet-cl-Pcl-Lacl (~2400 pb) y otra cerca de 1000 bp. Esto corresponde a lo esperado, pues el partidor reverse que se ocupó es complementario a una zona del sufijo, entonces tiene dos sitios de unión posibles, generando amplicones de tamaños 2423 bp y 1015 bp, respectivamente.

Se preparó una miniprep del pET22b con el constructo a partir del cultivo líquido de la colonia que había dado los resultados anteriores, para comprobarlos con un ensayo de digestión, cuyos resultados se muestran en la **Fig. 46**. El ensayo consistió en una digestión doble con EcoRI y PstI, con un control negativo que contenía el templado, el buffer de la digestión doble y agua. También se incubó la miniprep a 37°C junto con la digestión y el control negativo, durante el mismo tiempo de reacción.

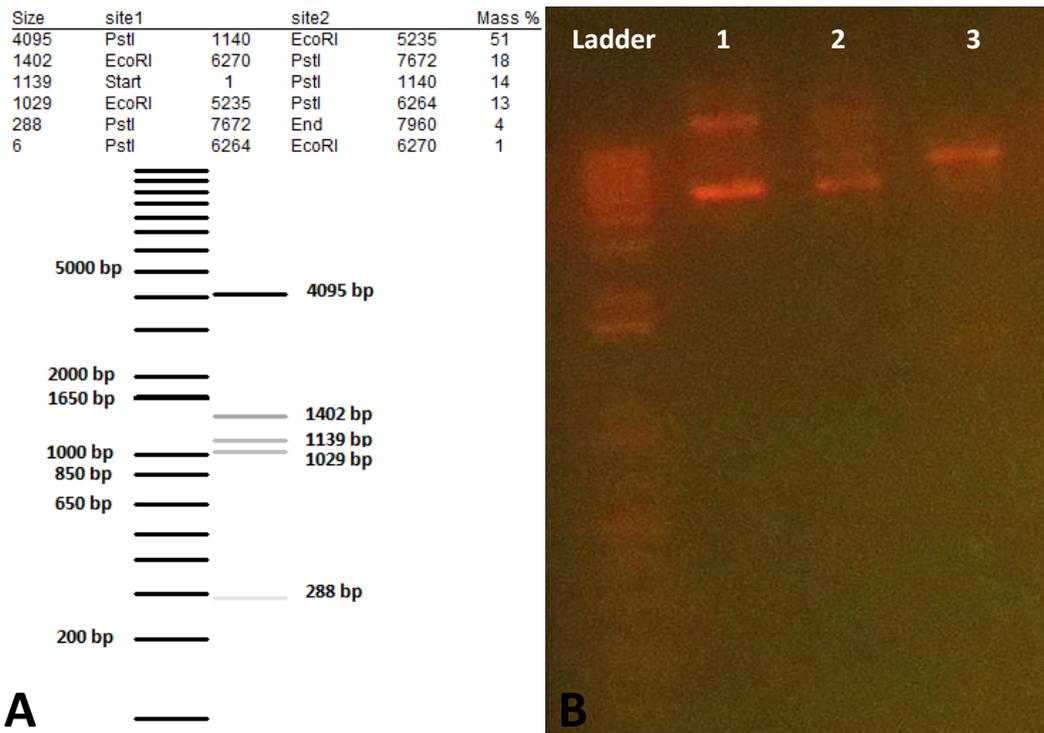


Fig. 46 – Comprobación por ensayo de digestión del constructo *Ptet-cl-Pcl-Lacl*. **A:** Patrón esperado de la doble digestión. Adaptado del análisis realizado por el programa Ape. **B:** Resultados de la doble digestión. Marcador de peso molecular: 1kbp Plus Ladder. **1:** miniprep. **2:** control negativo. **3:** digestión doble.

No se puede apreciar el patrón esperado en el gel de electroforesis de la digestión doble. Esto cuestiona el resultado obtenido anteriormente por PCR de colonias, a menos que haya ocurrido algún problema durante la digestión. Faltó un control con un pET22b sin inserto, sin embargo en el momento no se disponía de dicho control.

5.1.5 Resultados de la secuenciación

Se mandó a secuenciar los constructos siguientes:

1. Dos minipreps del vector pSB1C3 con el constructo PLacI-TetR-RFP;
2. Dos minipreps del vector pSB1C3 con el constructo *Ptet-cl*;
3. Una miniprep del vector pSB1C3 con el constructo *Pcl-Lacl*;
4. Tres minipreps distintas del vector pET22b con el constructo *Ptet-cl-Pcl-Lacl*.

Al estudiar los resultados de la secuenciación del módulo PLacI-TetR-RFP, se reveló que de las dos muestras, la más fidedigna a la secuencia original tenía un 96% de homología. La diferencia provenía del RBS que precede el ORF de TetR, que se encontró estar insertado al revés: era la secuencia del reverso-complemento del RBS que seguía al promotor, no el RBS. Lo mismo ocurrió con los módulos *Ptet-cl* y *Pcl-Lacl*.

Los RBS de los tres módulos, menos el que precede el ORF de la RFP por ser un RBS nativo, estaban insertados al revés por motivos que se discutirán en la sección siguiente.

El estudio de las secuenciaciones de los módulos ensamblados *Ptet-cl-Pcl-Lacl* reveló que simplemente no se había podido llevar a cabo la secuenciación, pues el partidador de la reacción *reverse* no pudo alinear y al parecer el de la reacción *forward* tampoco. Esto indica ya sea que hubo un problema al momento de secuenciar, lo cual es poco probable pues el patrón se repitió para las tres minipreps de este constructo; o que las bacterias no tenían la secuencia de interés en el plásmido adquirido. Ejemplos de los resultados de secuenciación se pueden encontrar en el **Anexo 15**.

Frente a estos resultados se decidió volver a diseñar partidores con la secuencia correcta del RBS y volver a construir los plásmidos a partir de los tres vectores validados por secuenciación (menos la

parte del RBS). La estrategia escogida se describe en las **Fig. 47** y **Fig. 48**. Los resultados que siguen son los que se alcanzaron a obtener en el tiempo de trabajo que quedaba.

5.1.6 Reconstrucción del represilador

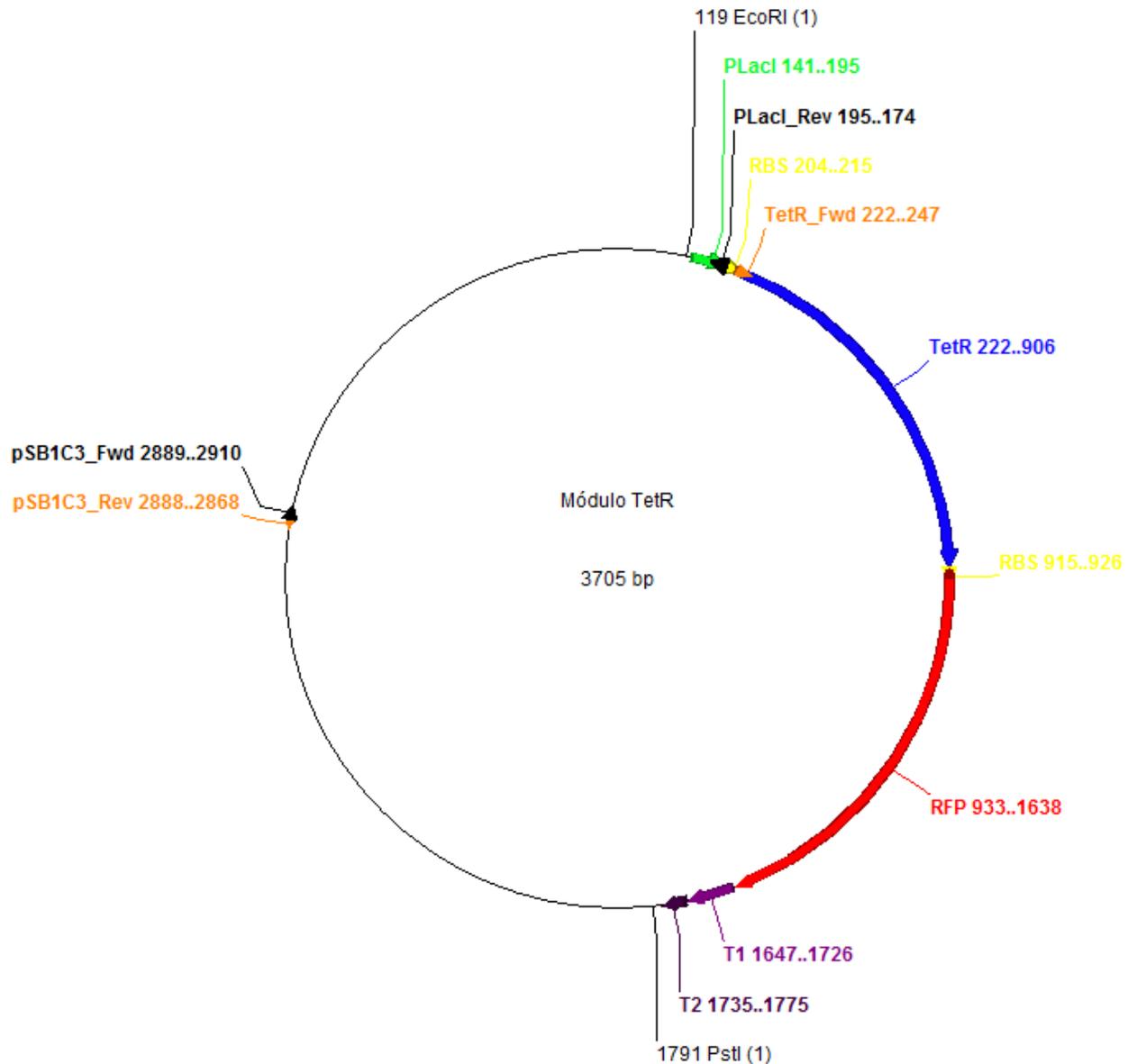


Fig. 47 - Metodología de reemplazo del RBS en el constructo PLacI-TetR-RFP. Se amplifican dos fragmentos del vector, uno que contiene el promotor PLacI sin la secuencia del RBS y flanqueado por los partidores pSB1C3_Fwd y Pacl_Rev simbolizados en negro; otro fragmento que empieza desde el codón de inicio de TetR y flanqueado por los partidores TetR_Fwd y pSB1C3_Rev simbolizados en naranja. Los partidores PLacI_Rev y TetR_Fwd tienen colas complementarias entre sí que contienen la secuencia correcta del RBS. El partidor pSB1C3_Fwd tiene una cola complementaria a la secuencia de pSB1C3_Rev. De esta forma en una misma reacción de Gibson Assembly se puede reconstruir la totalidad del vector con la secuencia correcta del RBS.

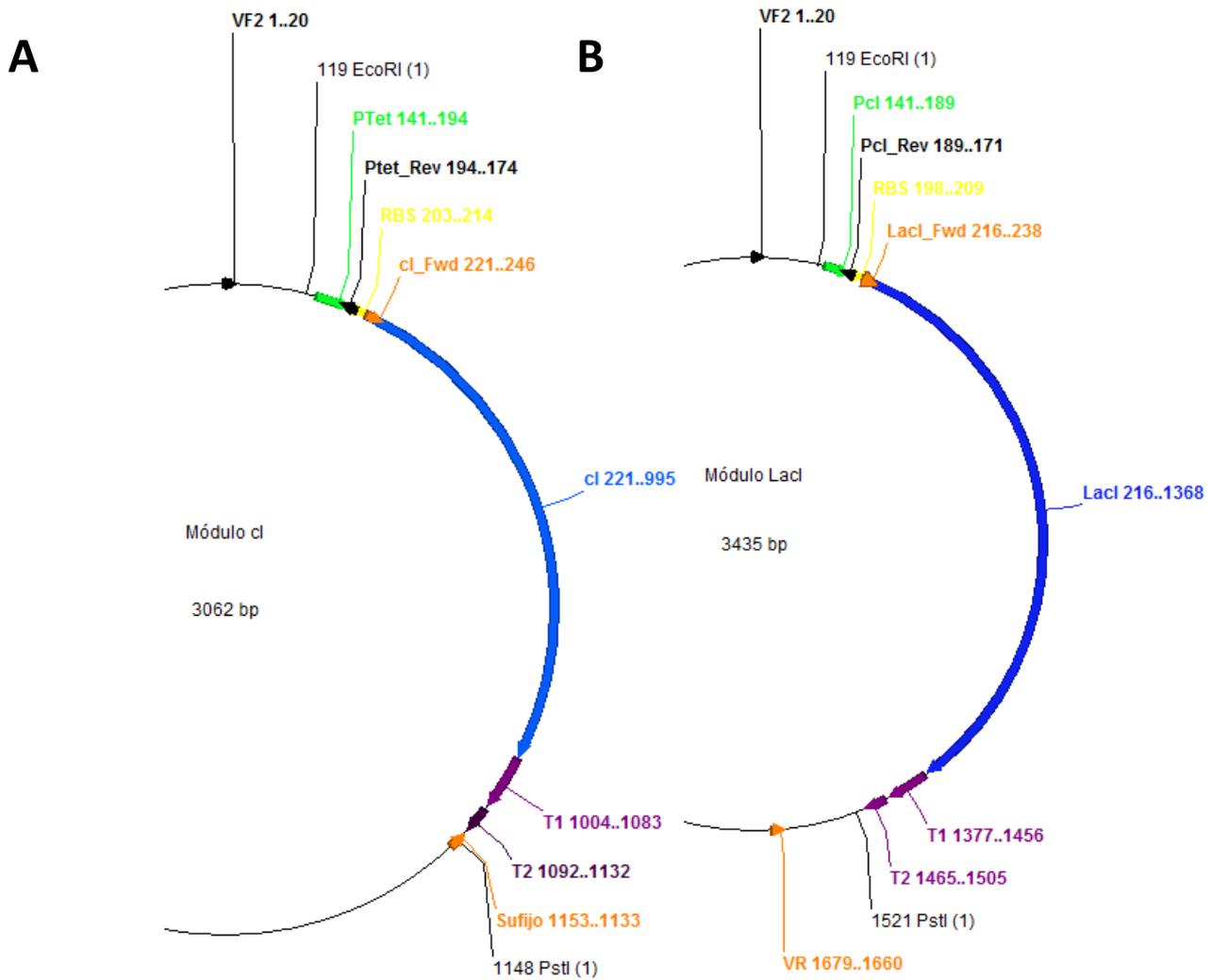


Fig. 48 - Metodología de reemplazo del RBS en los módulos Ptet-cl y Pcl-LacI. **A:** Para insertar la secuencia correcta del RBS en el módulo cl, se amplifica un fragmento conteniendo el promotor Ptet y flanqueado por los partidores VF2 y Ptet_Rev (en negro) y otro fragmento conteniendo la secuencia de cl y flanqueado por los partidores cl_Fwd y Sufijo_Rev (en naranja). Los partidores Ptet_Rev y cl_Fwd tienen colas complementarias entre sí y llevando la secuencia correcta del RBS. **B:** Misma estrategia: se amplifican un fragmento con la secuencia del promotor Pcl y flanqueado por los partidores VF2 y Pcl_Rev (en negro) y otro fragmento con la secuencia de LacI flanqueado por LacI_Fwd y VR (en naranja). Los partidores Pcl_Rev y cl_Fwd tienen colas que permiten reinsertar la secuencia correcta del RBS al momento de la unión por Gibson Assembly.

Una vez reconstituidos los módulos cl y LacI con la secuencia correcta del RBS, se reamplifica el módulo LacI con los partidores Px_Sx_Fwd y VR. Esta etapa es necesaria pues el partidor Fwd tiene una cola complementaria al partidor Rev del módulo cl (complementariedad prefijo-sufijo). La razón por la cual no se amplifica directamente el primer fragmento del módulo LacI con los partidores Px_Sx_Fwd y Pcl_Rev es que el fragmento generado tendría un tamaño de 71 bp, lo cual dificultaría la comprobación de que resultó su ensamblaje con el fragmento llevando la secuencia de LacI y que mide 1464 bp. En cambio, el fragmento conteniendo el promotor amplificado desde el sitio de unión de VF2 tiene un tamaño de 189 bp. Los partidores VF2 y VR que se usan en este caso tienen cada uno una cola complementaria a un sitio del vector pET22b, para permitir la inserción del módulo ensamblado Ptet-cl-Pcl-LacI en su vector receptor.

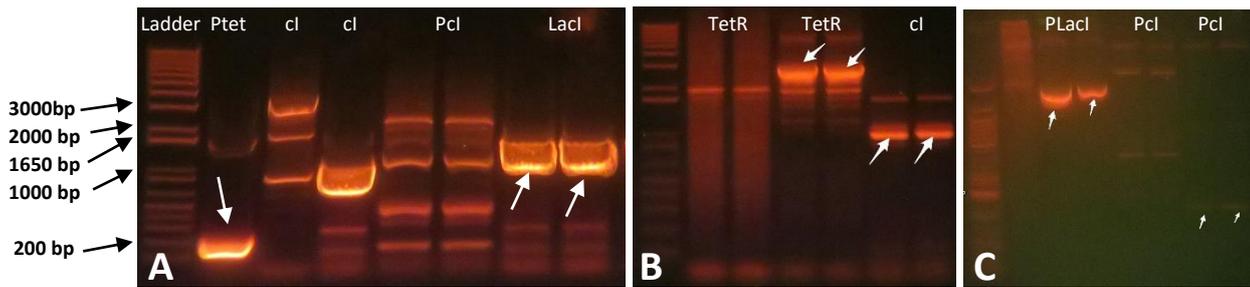


Fig. 49 - Resultados de las amplificaciones de todas las partes. Se purificaron las bandas que se indican con flechas blancas.

Después de amplificar las partes necesarias (ver Fig. 49), se procedió a los tres ensamblajes por Gibson Assembly siguientes:

1. PLacl con TetR: el resultado esperado es el vector pSB1C3 recircularizado de 3705 bp y cargado con PLacl-TetR-RFP, con secuencias correctas de RBS.
2. Ptet-cl: el resultado esperado es un fragmento lineal de 1153 bp con secuencia correcta de RBS y colas a pET22b en su extremo 5' y al prefijo del módulo Pcl-Lacl en su extremo 3'.
3. Pcl-Lacl: el resultado esperado es un fragmento lineal de 1679 bp con secuencia correcta de RBS y colas a pET22b en ambos extremos. Sirve de precursor para generar el fragmento Pcl-Lacl con cola al sufijo del módulo Ptet-cl en su extremo 5' y a pET22b en su extremo 3'.

Los resultados de estos ensamblajes se muestran a continuación en la Fig. 50.

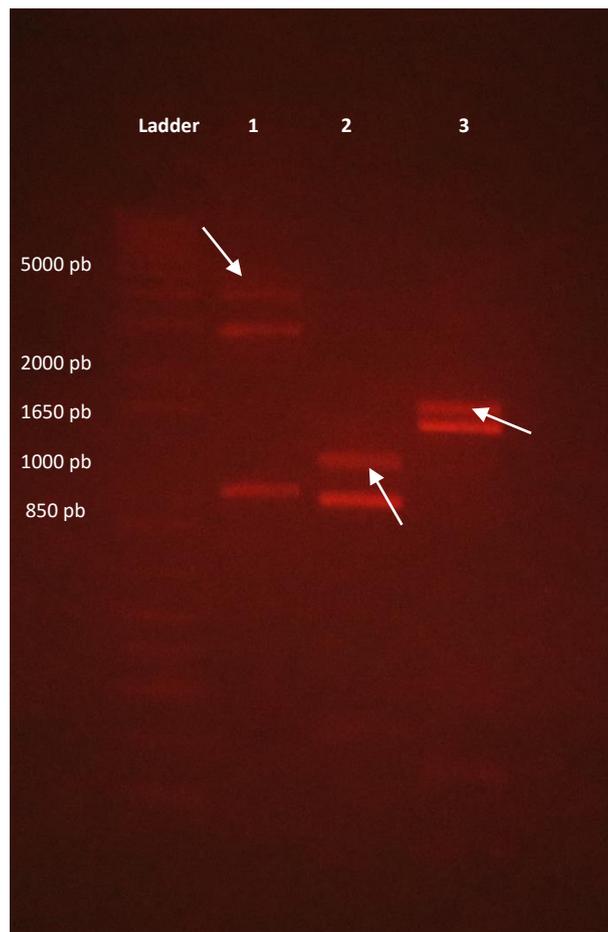


Fig. 50 - Resultados de las ligaciones por Gibson Assembly de: **1:** pSB1C3 con PLacl y RBS correcto + pSB1C3 con TetR y RFP; **2:** PTet con RBS correcto + cl; **3:** Pcl con RBS correcto + Lacl. Se indica mediante flechas blancas las bandas correspondiendo a los productos esperados de ligación.

Frente al éxito de estos ensamblajes, se transformaron bacterias *E. coli* BL21 con el plásmido pSB1C3 reconstituido y llevando en su inserto las secuencias de TetR y de la RFP. Al día siguiente se observaron colonias transformantes de las cuales varias presentaban una coloración rojiza. Se cultivaron algunas de ellas y se muestra en la **Fig. 51** el resultado de una centrifugación del cultivo de una de estas colonias.

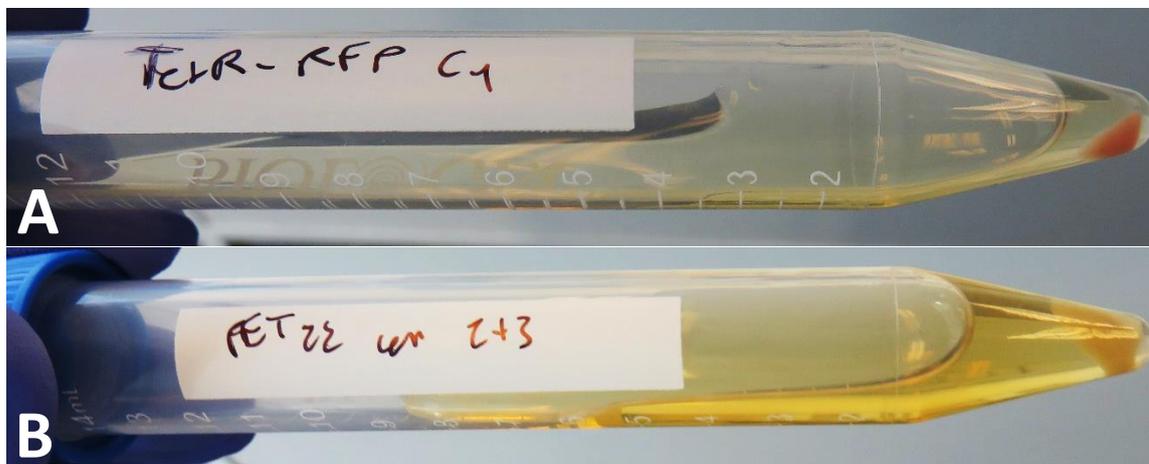


Fig. 51 - Expresión de RFP en células transformadas con el constructo correcto PLacI-TetR-RFP. A: Pellet del cultivo líquido de las bacterias transformadas con el plásmido pSB1C3 que tiene el inserto PLacI-TetR-RFP, reconstituido según el método de la Fig. 47. El color rojo del pellet evidencia una producción de RFP y por lo tanto comprueba la unión del promotor PLacI y su RBS con el resto del módulo. B: Pellet del cultivo líquido de la ligación por Gibson Assembly del vector pET22b(+) con los módulos c1 y LacI unidos y conteniendo los RBS equivocados. Sirve de control para confirmar que se está efectivamente produciendo RFP en la Fig. 51-A.

Para comprobar que el ensamblaje había sido exitoso, se realizó un ensayo de digestión sobre la miniprep derivada del mismo cultivo de la **Fig. 51-A**. Se realizó una digestión doble con las enzimas EcoRI y PstI. Para cada ensayo, se incubó la miniprep correspondiente a 37°C durante el mismo tiempo de la digestión y se realizó un control negativo de la digestión que sólo incluyó el templado, el buffer de la digestión doble y agua. Se muestran los resultados a continuación en la **Fig. 52**.

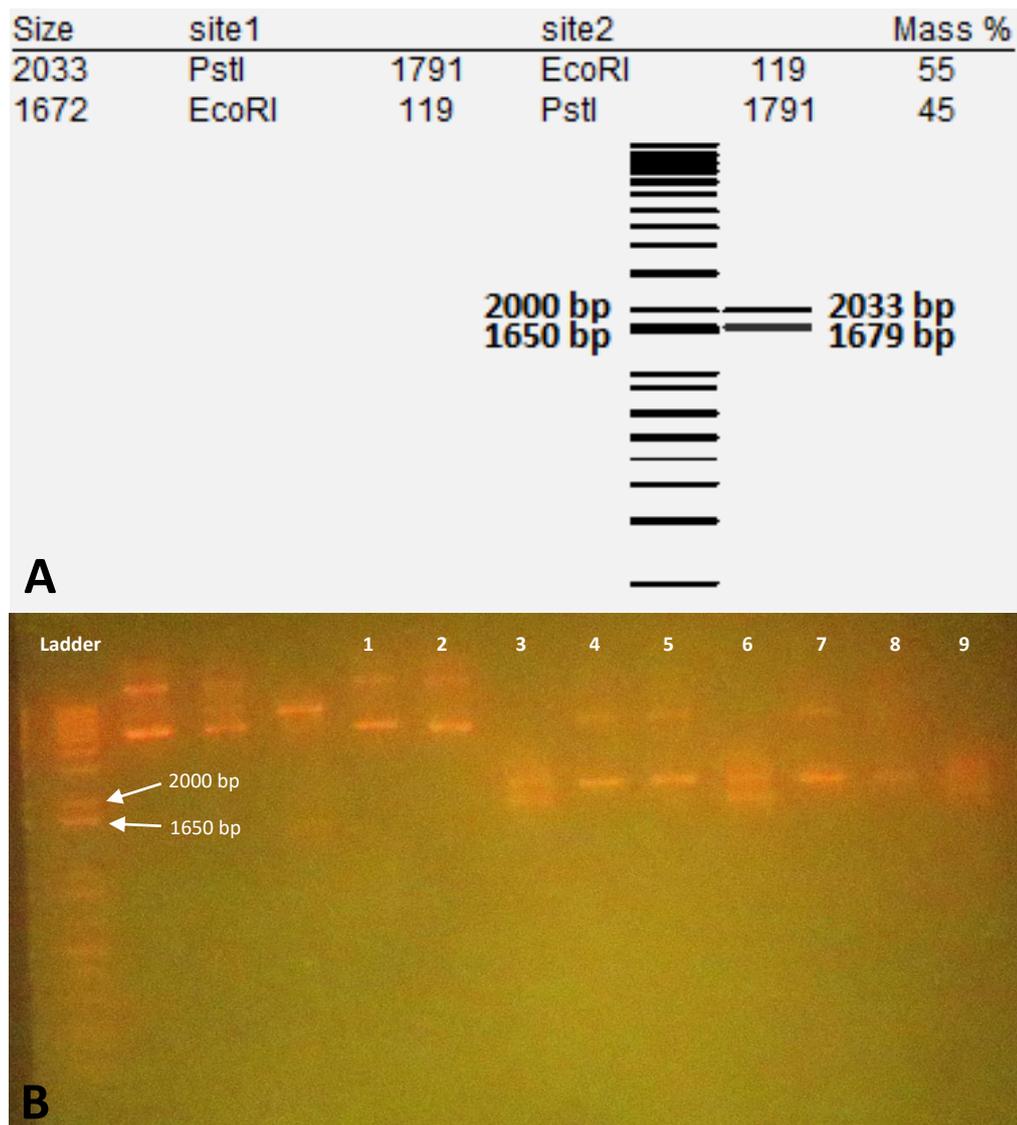


Fig. 52 - Comprobación por ensayo de digestión de la reconstrucción del módulo PLacI-TetR-RFP con el RBS correcto. **A:** Patrón de digestión esperado. Adaptado del análisis realizado por el programa Ape. **B:** Patrón de digestión obtenido para cada colonia probada. **1:** Miniprep de la colonia C1. **2:** Control negativo de la digestión doble de C1. **3:** Digestión doble de C1. **4:** Miniprep de la colonia C2. **5:** Control negativo de la digestión doble de C2. **6:** Digestión doble de C2. **7:** Miniprep de la colonia C3. **8:** Control negativo de la digestión doble de C3. **9:** Digestión doble de C3.

Se puede observar que en los carriles 3, 6 y 9 el patrón de digestión obtenido corresponde a lo esperado, por lo que se concluye que el ensamblaje del módulo PLacI-TetR-RFP fue exitoso.

Por otra parte, si bien la amplificación del módulo P_{tet}-cl fue exitosa y que también se tiene desde antes una concentración alta de vector pET22 linealizado, la amplificación del módulo P_{cl}-LacI con los partidores Px_{Sx}_Fwd y pET22b_VR no ha resultado hasta ahora, por lo que no se pudo proceder al ensamblaje por Gibson Assembly de estos tres fragmentos. Seguramente con más tiempo se hubiera alcanzado el ensamblaje, pero por los plazos de esta memoria el trabajo en laboratorio quedó en esta etapa.

5.2 Construcción del oscilador electrónico

El oscilador electrónico consta de tres unidades, cada una simulando el comportamiento de un módulo genético. Una unidad se compone de un amplificador operacional (OPAMP) que cumple un rol equivalente al de un promotor, seguido por la combinación de una resistencia y de un condensador, que juntos simulan la producción de uno de los represores. La **Fig. 53** permite recordar la estructura del oscilador.

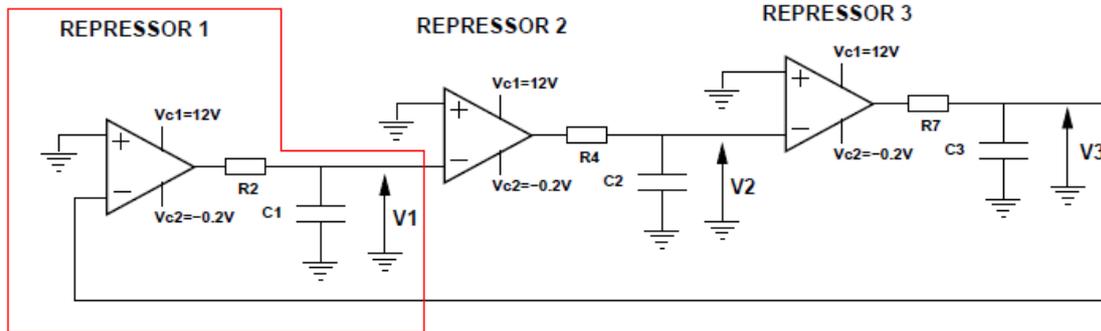


Fig. 53 - Circuito electrónico comportándose como oscilador y análogo al represilador biológico. Se destaca en rojo la unidad base representativa de un módulo genético, responsable por la producción de un represor. Fuente: A. Wagemakers, 2008.

Las ecuaciones que rigen el comportamiento del oscilador electrónico son las siguientes:

$$R_1 C_1 \frac{dV_1}{dt} = -V_1 + H_v(-V_3)$$

$$R_2 C_2 \frac{dV_2}{dt} = -V_2 + H_v(-V_1)$$

$$R_3 C_3 \frac{dV_3}{dt} = -V_3 + H_v(-V_2)$$

$$H_v(x) = V_{c2} \quad x < 0$$

$$H_v(x) = V_{c1} \quad x > 0$$

En donde R_i es el valor de la resistencia i , C_i es el valor de la capacidad del condensador i y V_i es la tensión de salida del módulo i , es decir la tensión de entrada del OPAMP del módulo $i+1$. El producto $R_i * C_i$ es la constante de tiempo de cada unidad i que determina la duración de la carga y descarga del condensador i : la carga máxima se alcanza en un tiempo cercano a cinco veces el producto $R_i * C_i$ [80] por lo que se analizarán las variaciones del parámetro $\tau_i = R_i * C_i$ y no de cada uno de los parámetros R_i y C_i .

La función $H_v(V_{i-1})$ representa la tensión a la salida del OPAMP i : de acuerdo al valor de la tensión que le llega desde la unidad electrónica precedente, entrega ya sea la tensión V_{c1} o V_{c2} que son sus tensiones de alimentación positiva y negativa, respectivamente.

Se simuló el sistema en Matlab, escogiendo como parámetros:

$$V_{c1} = 12 \text{ V}$$

$$V_{c2} = -0,2 \text{ V}$$

$$T_1 = T_2 = T_3 = 1,0 \text{ ms}$$

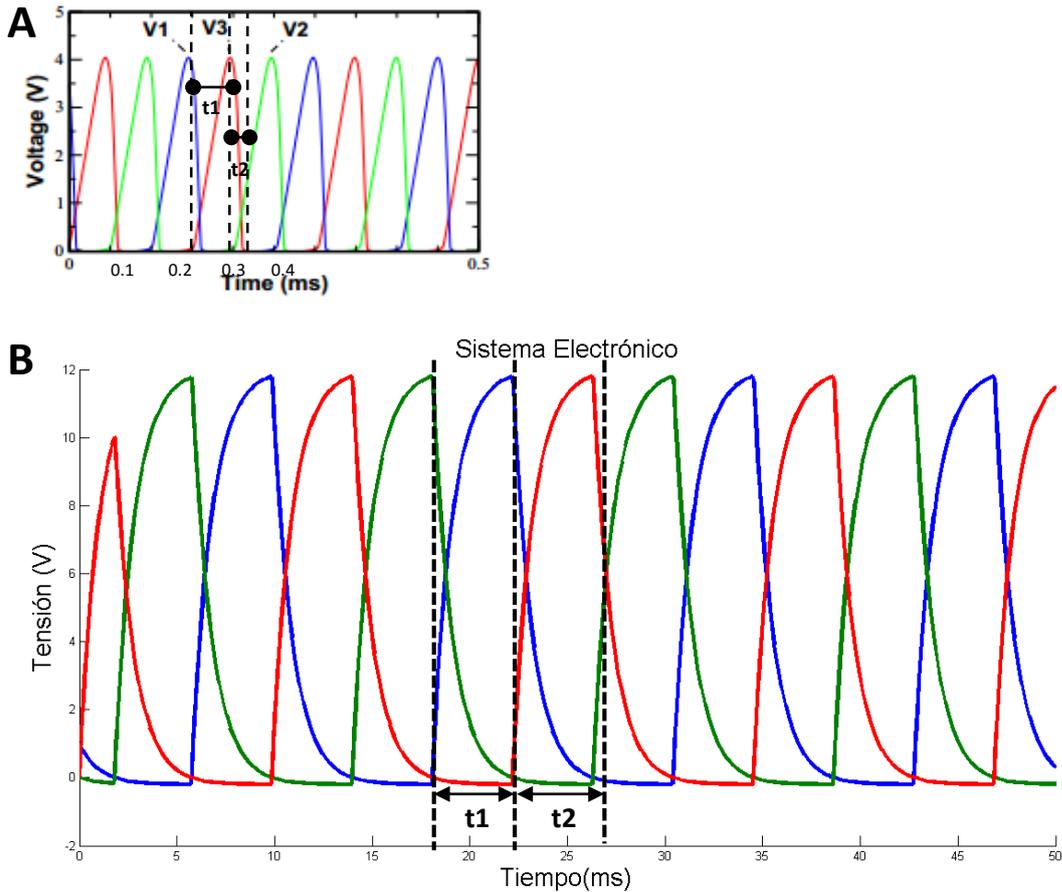


Fig. 54 - Comparación entre la simulación entregada por Matlab y los resultados obtenidos en el trabajo de Wagemakers. **A:** Comportamiento del oscilador según el trabajo de Alexander Wagemakers. La curva roja podría por ejemplo representar la concentración del represor TetR y las curvas verde y azul las concentraciones de LacI y cI, respectivamente. Referencia del OPAMP: UA741. $R_1 = R_2 = R_3 = 1k\Omega$. $C_1 = C_2 = C_3 = 1\mu F$. V1, V2 y V3 representan las tensiones de salida de cada unidad electrónica. t_1 : tiempo de carga del condensador (curva roja): $t_1 \sim 0,05$ ms. t_2 : tiempo de descarga del condensador (curva roja): $t_2 \sim 0,02$ ms. Fuente: A.Wagemakers, 2008 (adaptado). **B:** Simulación gráfica del comportamiento del oscilador con Matlab. Cada curva de color representa la tensión a la salida de una de las tres unidades. t_1 : tiempo de carga del condensador (curva azul): $t_1 \sim 4$ ms. t_2 : tiempo de descarga del condensador (curva azul): $t_2 \sim 5$ ms.

Se nota, en la **Fig. 54-B** que en estado estacionario, la amplitud cresta a cresta de las oscilaciones alcanza el valor de V_{c1} y los tiempos de carga y descarga son de aproximadamente $5T$, lo cual corresponde a la teoría. Sin embargo, el patrón de oscilaciones es bastante distinto de lo que muestra en el trabajo de A. Wagemakers en la **Fig. 54-A**, donde los tiempos de carga y descarga son 20 y 50 veces inferiores a la constante de tiempo T , respectivamente. Esa diferencia puede provenir del tipo de componentes que se usan, puesto que si bien en primera aproximación, esta simulación permite entender que el circuito electrónico tiene efectivamente un comportamiento oscilatorio, este modelo es parcialmente representativo de la realidad: se basa en ecuaciones que no consideran la no idealidad de los componentes electrónicos.

Para remediar esto se recurrió al programa LTSpice IV que permite simular el comportamiento de circuitos electrónicos a partir de componentes referenciados, estándares y con características manipulables para aproximarse al comportamiento real. La **Fig. 55** muestra el resultado de la simulación.

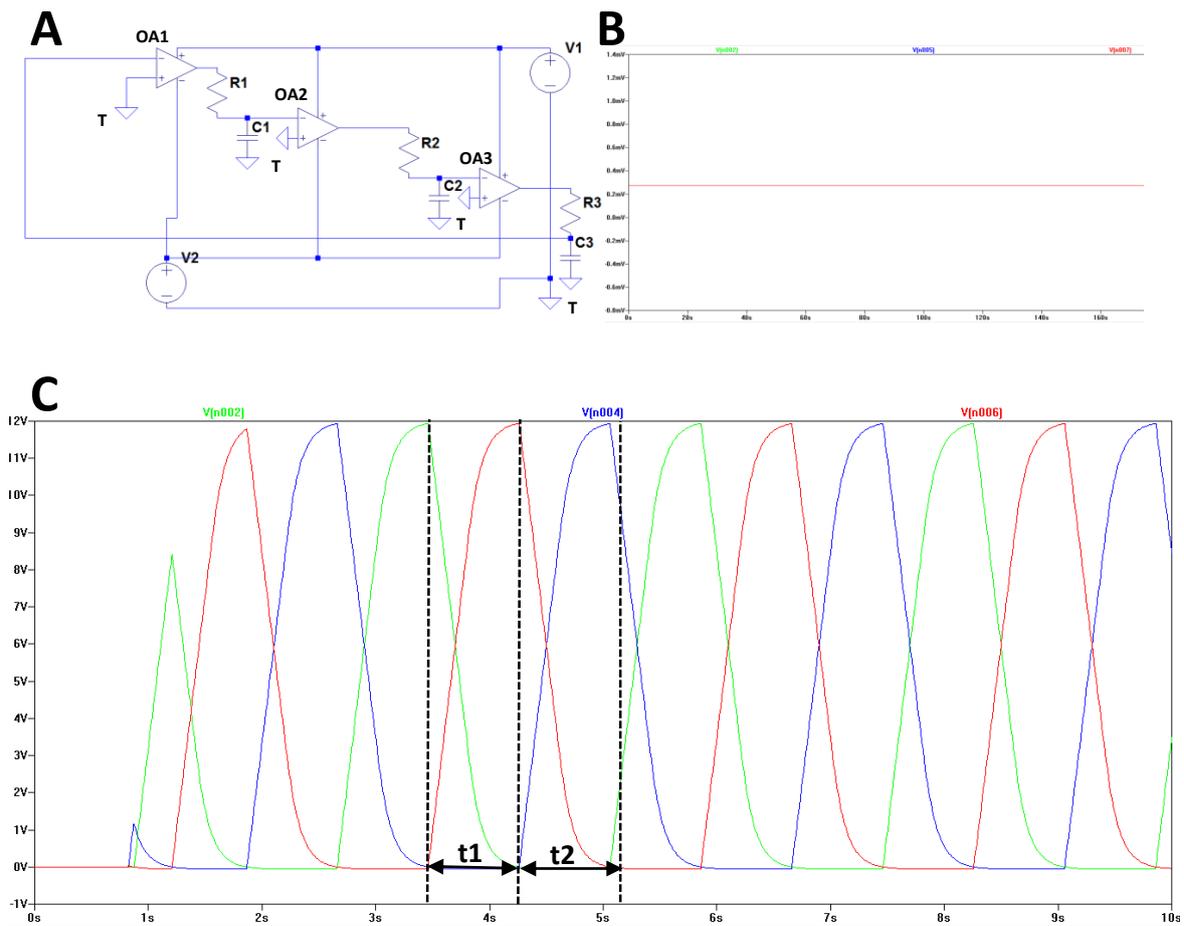


Fig. 55 - Simulación del oscilador electrónico con LTSpice IV. **A:** Circuito electrónico del oscilador construido en el programa LTSpice IV. OA_i: amplificador operacional del módulo i. R_i: resistor del módulo i. C_i: condensador del módulo i. V1: fuente de poder que entrega la tensión positiva V_{c1} para alimentar el polo positivo de los OPAMPs. V2: fuente de poder que entrega la tensión negativa V_{c2} para la alimentación del polo negativo de los OPAMPs. T: símbolo de tierra, donde el potencial es nulo. **B:** Simulación en LTSpice IV del circuito A con los valores de parámetros siguientes: $R_1 = R_2 = R_3 = 1000 \Omega$; $C_1 = C_2 = C_3 = 1 \mu\text{F}$; $V_{c1} = 12 \text{ V}$; $V_{c2} = -0,2 \text{ V}$. OPAMP: UniversalAmplificator2 (referencia del programa LTSpiceIV). **C:** Simulación en LTSpice IV del circuito A con los valores de parámetros siguientes: $R_1 = R_2 = R_3 = 100 \Omega$; $C_1 = C_2 = C_3 = 1 \text{ mF}$; $V_{c1} = 12 \text{ V}$; $V_{c2} = -0,06 \text{ V}$. UniversalAmplificator2. t_1 : tiempo de carga del condensador (curva roja): $t_1 \sim 0,8 \text{ s}$. t_2 : tiempo de descarga del condensador (curva roja): $t_2 \sim 0,9 \text{ s}$.

Se puede observar que al probar el sistema con las condiciones de trabajo de A. Wagemakers, no se generan oscilaciones. Puede que esta diferencia de comportamiento se deba a que el OPAMP utilizado en la simulación del programa tiene una referencia distinta al que se ocupó en el otro trabajo (la biblioteca del programa no tenía OPAMP del tipo UA741 sino sólo "Universal"). Sin embargo, se lograron generar oscilaciones bajo condiciones distintas, aunque en el caso de la Fig. 55-C, con una constante de tiempo $T = 0,1 \text{ s}$, los tiempos de carga y descarga no corresponden a lo esperado. Como no se pudo compatibilizar las simulaciones de Matlab y LTSpice IV, se decidió probar físicamente el oscilador, siguiendo las condiciones de trabajo de A. Wagemakers, para poder establecer una comparación efectiva. Se compraron por lo tanto los componentes necesarios para la construcción del oscilador (ver Fig. 39-A) y se decidió probar el sistema en el laboratorio de electrónica del Departamento de Ingeniería Eléctrica de la FCFM. El montaje se muestra en la Fig. 56-B.

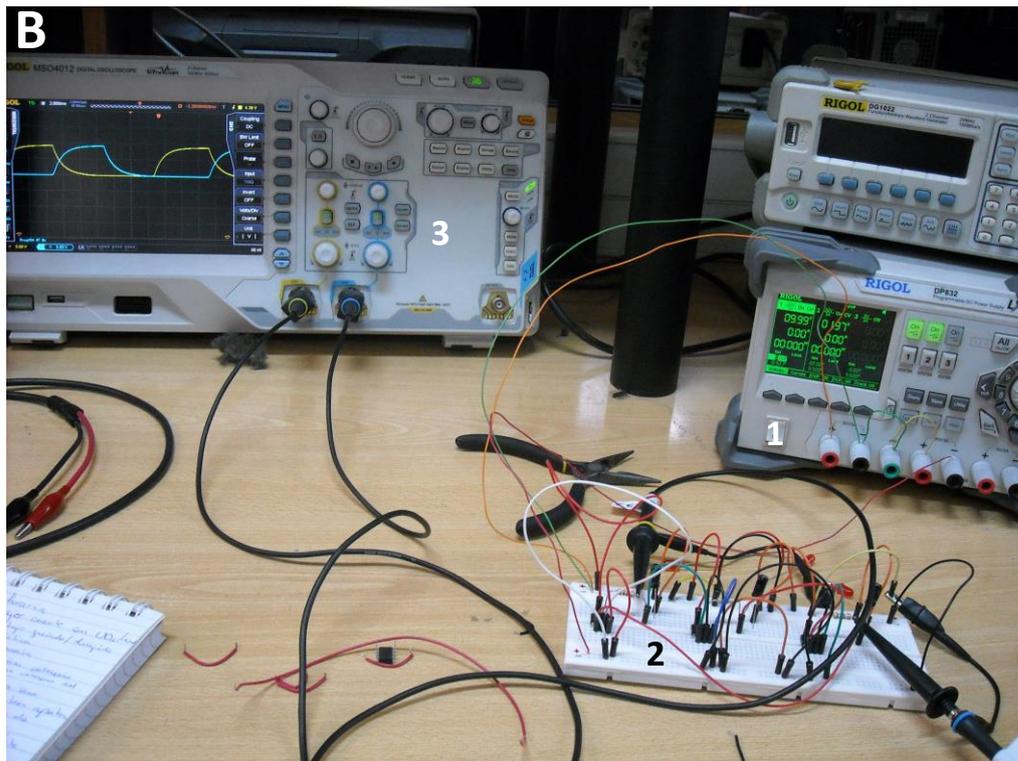
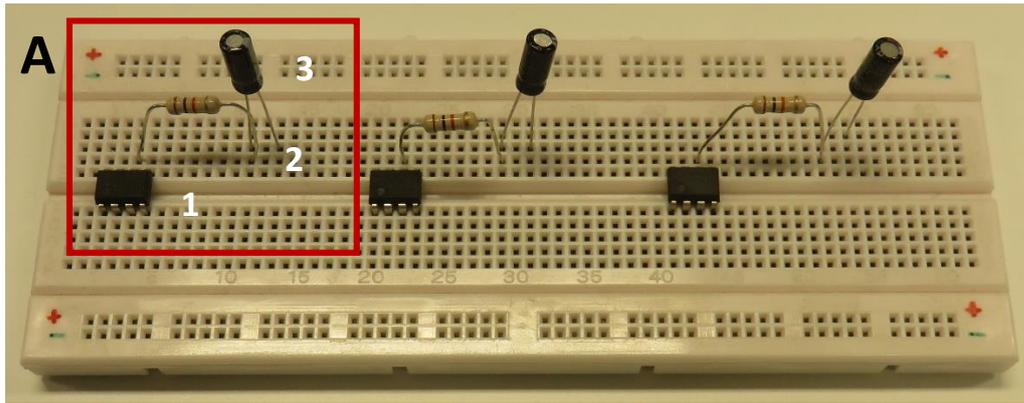


Fig. 56 - Prueba experimental del oscilador en el laboratorio de electrónica. **A:** Montaje del circuito electrónico. Se quitaron todas las conexiones eléctricas para poder apreciar los distintos componentes del circuito. **1:** OPAMP UA741. **2:** Resistor de 1 k Ω . **3:** Condensador de 1 μ F. La zona cuadrada corresponde a una de las tres unidades electrónicas, simulando el comportamiento de un gen. **B:** Montaje total del sistema operando en el laboratorio de electrónica. **1:** Fuente de poder alimentando a los tres OPAMPs. **2:** Circuito electrónico conectado. **3:** Osciloscopio midiendo la tensión de salida de dos de las tres unidades electrónicas.

Se comprobó en el laboratorio que el oscilador electrónico funciona, bajo las condiciones del trabajo de A. Wagemakers, sin embargo la respuesta es distinta, como se muestra en la **Fig. 57**.

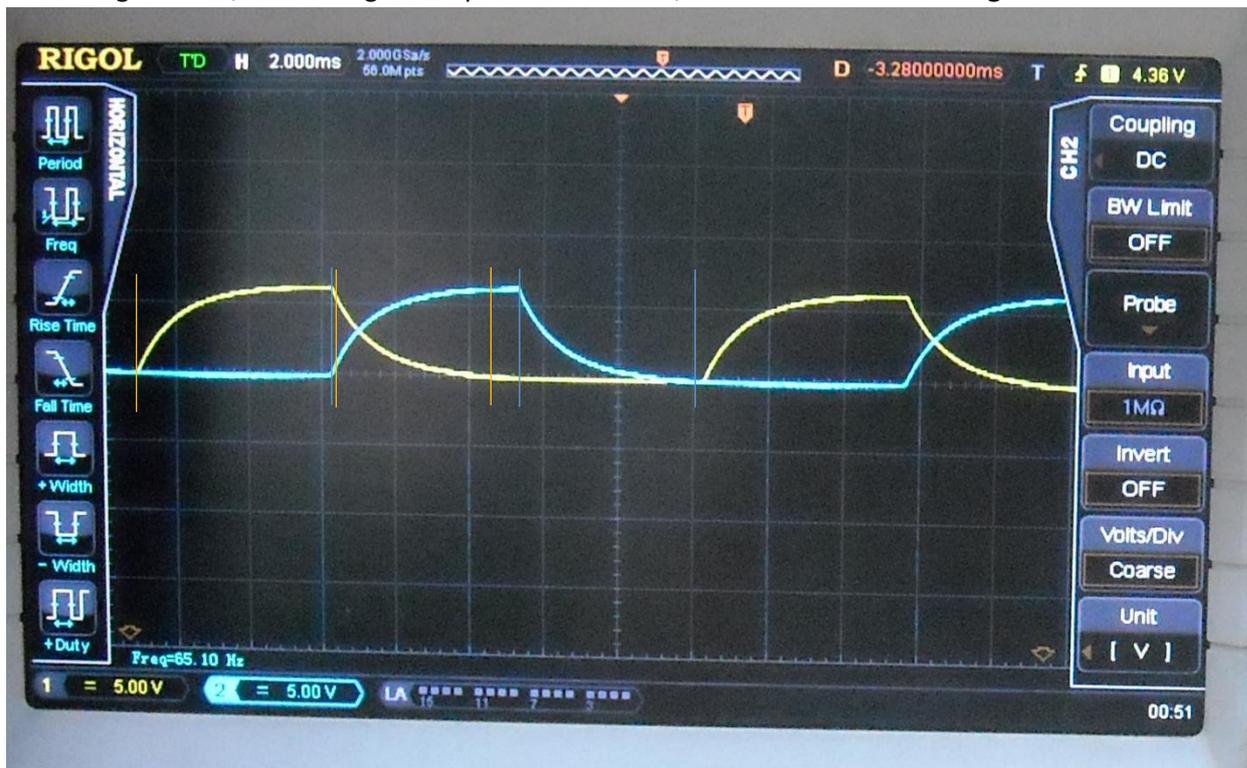


Fig. 57 - Respuesta experimental del oscilador electrónico. Escala temporal: 2ms/cuadrado. Escala voltimétrica: 5 V/cuadrado.

Se puede observar las respuestas tienen un comportamiento exponencial representativo de los eventos de carga/descarga del condensador, más que la forma de una senoide.

Efectivamente se podría describir el evento de carga por $q(t) = A*(1-\exp(-t/T))$ y el evento de descarga por $q(t) = A*\exp(-t/T)$, donde q es la carga del condensador, t el tiempo, T la constante de tiempo igual al producto $R*C$ y A un factor a determinar según las condiciones iniciales del sistema^[80]. La amplitud y el periodo de estos eventos periódicos son de aproximadamente 6 V y 15 ms, respectivamente, con un tiempo de carga de 5ms y de descarga de 4,5ms en el caso de la curva azul, 5,6 ms y 4 ms en el caso de la curva amarilla.

Después de haber comprobado que el oscilador funciona, se quiso probar el efecto de la integración de una LED en el circuito electrónico. Como el tiempo faltó para volver al laboratorio de electrónica, y dado que la simulación con los dos programas resultó ser representativa del sistema, se decidió estudiar en el programa LTSpiceIV dicha modificación. Los resultados se muestran a continuación en la **Fig. 58**.

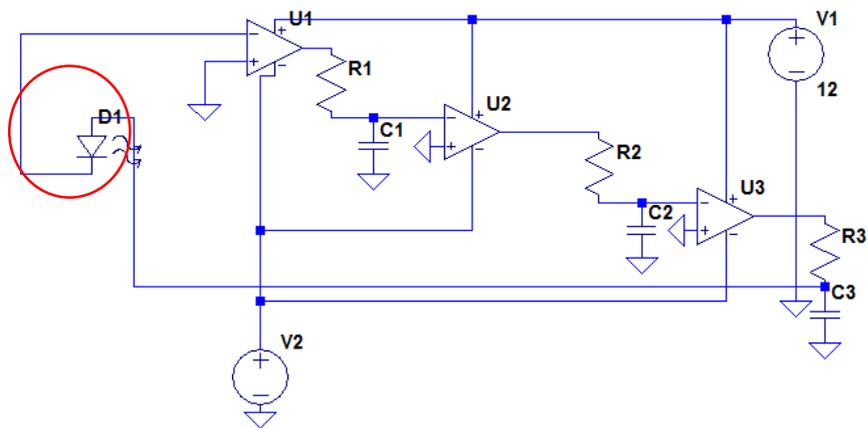
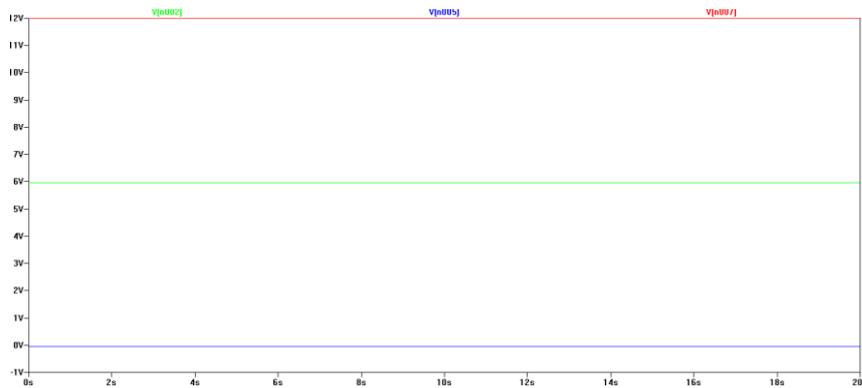
A**B**

Fig. 58 - Simulación del efecto de la inserción de un LED en el circuito sobre la dinámica oscilatoria del sistema electrónico. **A:** Circuito electrónico con un LED integrado, destacado en el círculo rojo. **B:** Efecto de la inserción del LED en el circuito sobre las oscilaciones obtenidas en las condiciones de la Fig. 55-C.

Se observa que se pierde el carácter oscilatorio del sistema a integrar un LED en el circuito. Aunque no se haya podido comprobar en laboratorio, es probable que este efecto se deba a las características internas del LED, en particular su tensión umbral de activación. Si el LED fuera ideal, dejaría pasar la corriente por cualquier tensión $V > 0$. Sin embargo, muchos LEDs dejan pasar la corriente solamente si la tensión se encuentra entre 1,8 V y 2,2 V con una corriente de 10 a 20 mA^[81]. En este caso, apenas la tensión de salida de un módulo pasa por debajo del umbral el diodo deja de conducir la corriente, lo que elimina las oscilaciones. La salida de cada módulo se queda en sus condiciones iniciales, lo cual explica la respuesta obtenida. Pareciera por lo tanto que un LED no es un buen reportero para este tipo de circuitos si se conecta en serie. Una alternativa sería conectarlo en paralelo y estudiar el efecto de esta operación sobre el comportamiento del oscilador electrónico.

5.3 Simulación informática de ambos osciladores, biológico y electrónico

5.3.1 Represilador biológico

Se puede modelar el comportamiento del represilador mediante las ecuaciones siguientes ^[1]:

$$\frac{dm_i}{dt} = -m + \frac{\beta}{1 + p_j^\alpha} + \beta_0$$

$$\frac{dp_i}{dt} = -\gamma (p_i - m_i)$$

Por lo tanto, la presencia de eventos oscilatorios depende de la expresión basal del promotor β/β_0 , de la razón entre el tiempo de degradación de proteínas con respecto al ARNm γ , y del coeficiente de Hill que en este análisis se mantendrá en su valor óptimo empírico 2.

Para tener una primera aproximación al comportamiento del represilador, se consideró un sistema ideal en el cual los tres módulos genéticos y sus represores respectivos tienen las mismas características; es decir que se consideran intercambiables, con el mismo tiempo de degradación de las proteínas y de los ARNm y con promotores de igual fuerza y poca expresión basal.

Estas condiciones se representan en los valores de parámetros siguientes:

$$\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = 1000 \text{ [cantidad de represor/(min*célula)]}$$

$$\beta_{01} = \beta_{02} = \beta_{03} = 1 \text{ [cantidad de represor/(min*célula)]}$$

$$\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = 5 \text{ [adimensional]}$$

Es decir que si cuando un módulo está inhibido por su represor se produce 1 molécula de proteínas por minuto, entonces en ausencia del represor se producen 1000; y si la vida media del ARNm es de 2 min, la de la proteína es de 10 min.

Se muestra a continuación, en la **Fig. 59**, el resultado de esta simulación.

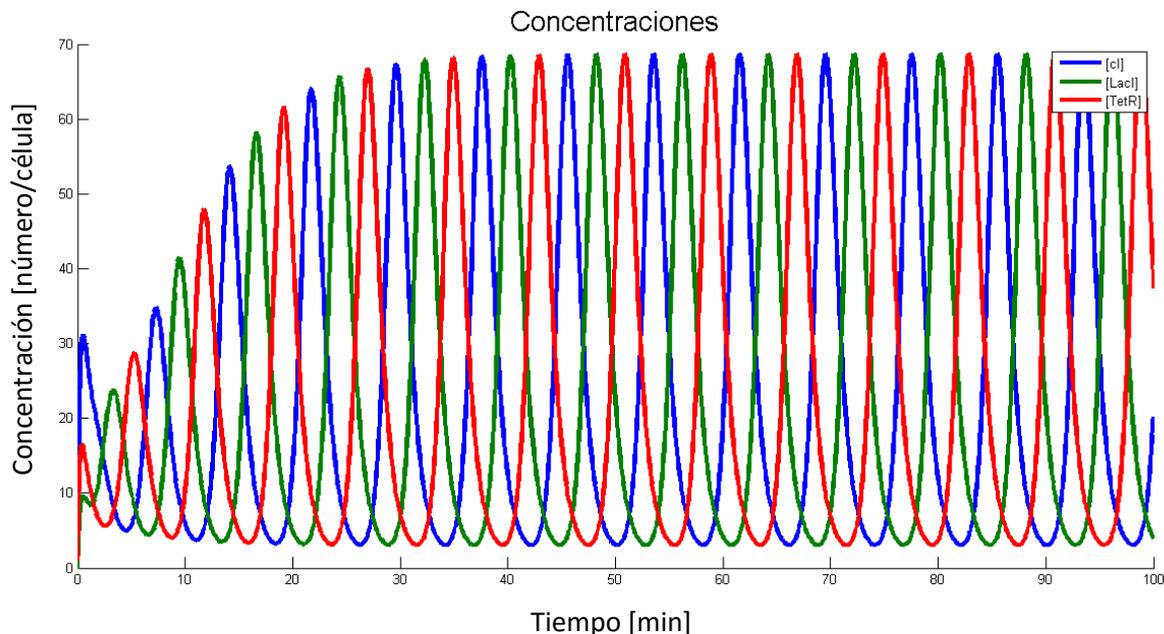


Fig. 59 - Simulación en Matlab del comportamiento de un represilador ideal, en las condiciones descritas anteriormente.

Luego, se consideró una no idealidad potencial con respecto al sistema de Elowitz: no se sabe en cuánto tiempo se degradarán los represores, a pesar de que posean una cola de degradación rápida para acercarse a este tiempo de degradación al de los ARNm. Asumiendo el peor caso con un tiempo de

degradación del orden de 100 min (versus 2min para el ARNm), el sistema tendería a funcionar con los parámetros siguientes:

$$\beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = 1000 \text{ [cantidad de represor/(min*célula)]}$$

$$\beta_{01} = \beta_{02} = \beta_{03} = 1 \text{ [cantidad de represor/(min*célula)]}$$

$$\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = 50 \text{ [adimensional]}$$

En este caso, la simulación entregó el resultado de la **Fig. 60**.

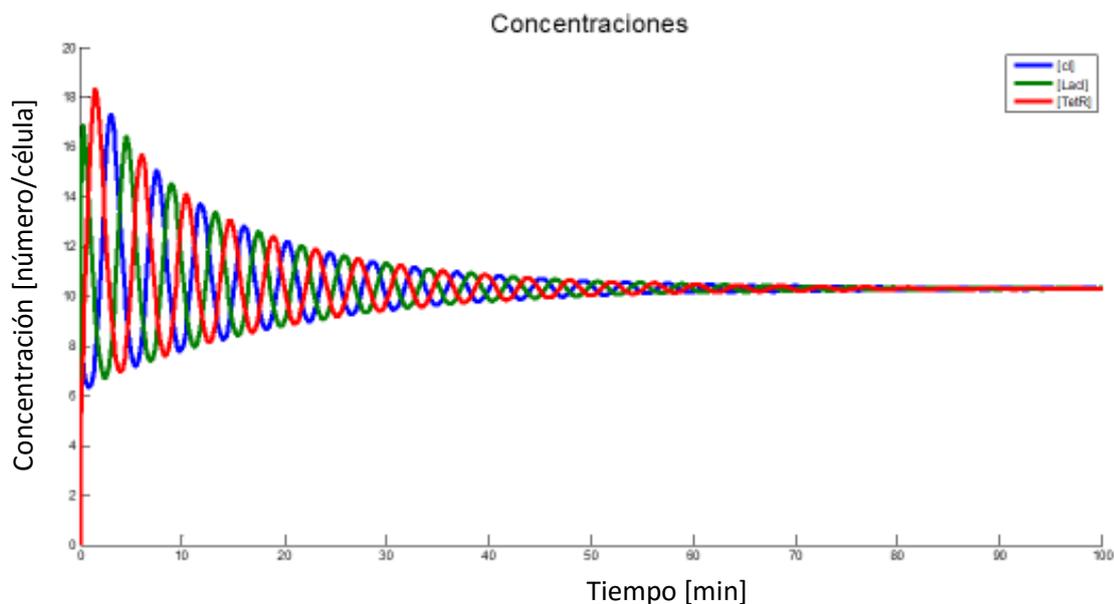


Fig. 60 - Comportamiento del oscilador introduciendo la no idealidad de los tiempos de degradación de los tres represores.

Se nota que si bien se pueden observar oscilaciones, éstas no se mantienen en el tiempo, convergiendo el sistema después de una hora hacia concentraciones de represores fijas o con variaciones no detectables. Además, también se nota que la concentración inicial de los represores en el sistema oscilante es aproximadamente cuatro veces inferior a la del sistema descrito en la **Fig. 59**. Ya que por los plazos de esta memoria no se podía realizar un ajuste de parámetros, midiendo los valores experimentales de cada uno de estos parámetros, se realizó un análisis de sensibilidad de los parámetros β (considerando siempre $\beta_0 = 1$) y γ . Esto llevó a la detección de cinco tipos distintos de comportamientos del sistema, ilustrados en la **Fig. 61**:

1. Oscilatorio con concentraciones de represores similares: el sistema oscila periódicamente y todos los represores tienen una concentración que varía en el mismo rango de valores. Las oscilaciones se mantienen en el tiempo.
2. Oscilatorio con prevalencia de un represor: el sistema oscila periódicamente y estas oscilaciones se mantienen en el tiempo, sin embargo uno de los represores tiene una concentración que varía en un rango de valores más amplio que los otros dos.
3. Oscilatorio pseudo-amortiguado: en el estado transitorio el sistema se amortigua, sin embargo en el estado estacionario el sistema sigue oscilando periódicamente. Las concentraciones de los represores pueden variar en el mismo rango o puede haber prevalencia de un represor.
4. Amortiguado: el sistema es pseudo-periódico, las oscilaciones se amortiguan en el tiempo hasta alcanzar un estado estacionario en el cual los represores tienen concentraciones fijas o con variaciones no detectables.
5. No oscilatorio: el sistema no presenta oscilaciones.

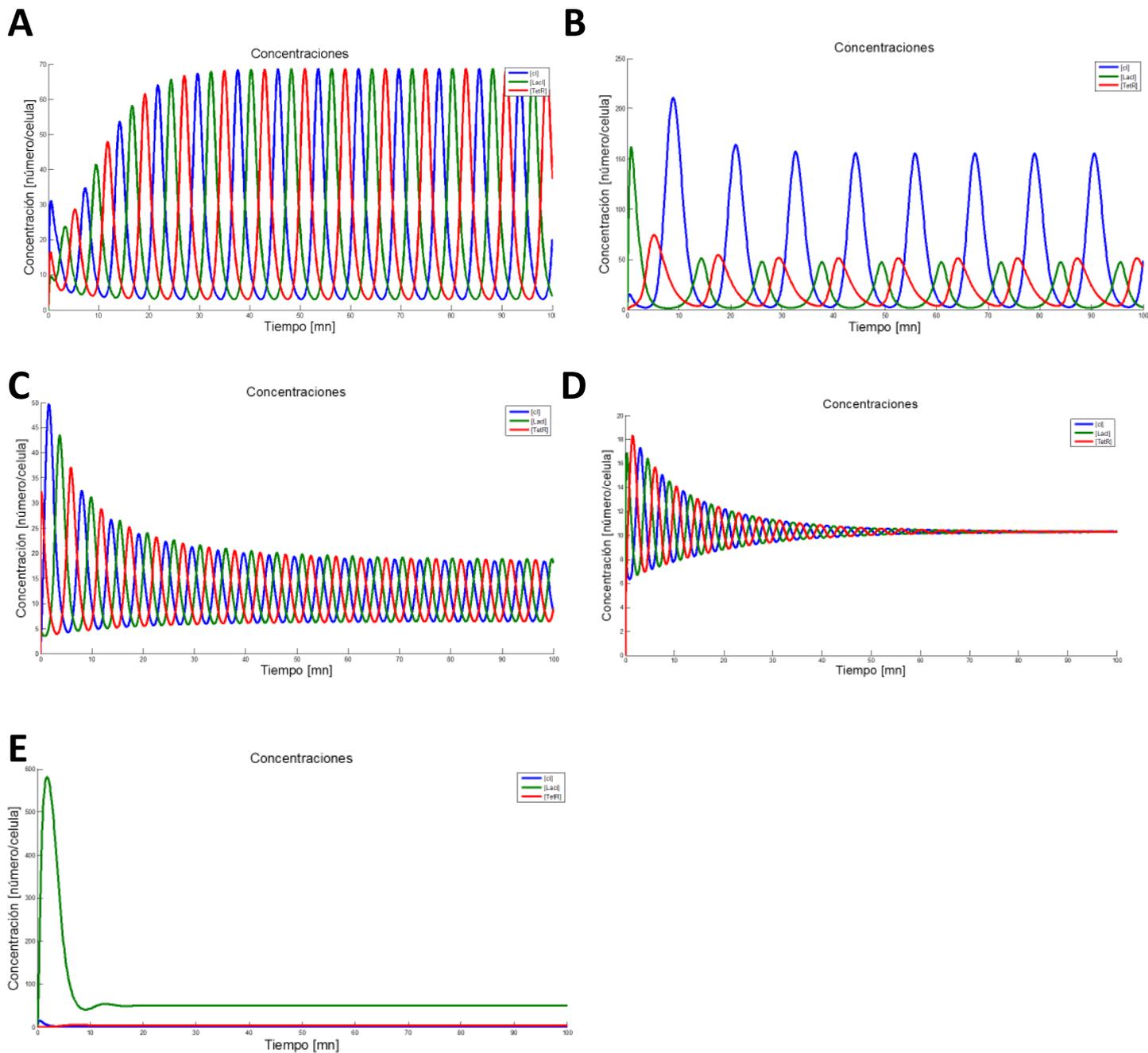


Fig. 61 - Panorama de los distintos comportamientos que puede adoptar el sistema biológico según el valor de los parámetros claves del oscilador. **A:** Régimen periódico con concentraciones de represores similares. Condiciones del ejemplo: $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = 5$. **B:** Régimen periódico con predominancia de uno de los represores. Condiciones del ejemplo: $\gamma_1 = \gamma_2 = 5$ y $\gamma_3 = 0,5$. **C:** Régimen periódico pseudo amortiguado. Condiciones del ejemplo: $\gamma_1 = 5$ y $\gamma_2 = \gamma_3 = 500$. **D:** Régimen amortiguado tendiendo a cero. Condiciones del ejemplo: $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = 50$. **E:** Régimen aperiódico, ya sea aperiódico crítico o aperiódico (sobreamortiguado). Condiciones del ejemplo: $\theta_1 = \theta_2 = 1000$ y $\theta_3 = 10$.

Tabla 5 - Resumen de las condiciones probadas y de su efecto sobre el carácter oscilatorio del sistema.

Oscilante con concentraciones similares	Oscilante con prevalencia de un represor
$\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 5; \gamma_3 = 5$ $\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 5; \gamma_3 = 50$ $\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 5; \gamma_3 = 500$ $\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 50; \gamma_3 = 500$ $\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 50; \gamma_3 = 50$ $\gamma_1 = 0,5; \gamma_2 = 0,5; \gamma_3 = 0,5$	$\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 5; \gamma_3 = 0,5$ $\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 0,5; \gamma_3 = 500$ $\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 0,5; \gamma_3 = 0,5$ $\gamma_1 = 50; \gamma_2 = 50; \gamma_3 = 0,5$ $\gamma_1 = 500; \gamma_2 = 500; \gamma_3 = 0,5$ $\gamma_1 = 0,5; \gamma_2 = 0,5; \gamma_3 = 5$ $\gamma_1 = 0,5; \gamma_2 = 0,5; \gamma_3 = 50$ $\gamma_1 = 0,5; \gamma_2 = 0,5; \gamma_3 = 500$
Oscilante pseudo-amortiguado	Oscilante amortiguado
$\gamma_1 = 5; \gamma_2 = 500; \gamma_3 = 500$ $\gamma_1 = 50; \gamma_2 = 50; \gamma_3 = 5$ $\gamma_1 = 500; \gamma_2 = 500; \gamma_3 = 5$ $\beta_1 = 100; \beta_2 = 100; \beta_3 = 100$ $\beta_1 = 1000; \beta_2 = 1000; \beta_3 = 100$ $\beta_1 = 1000; \beta_2 = 100; \beta_3 = 100$ $\beta_1 = 100; \beta_2 = 100; \beta_3 = 1000$	$\gamma_1 = 50; \gamma_2 = 50; \gamma_3 = 50$ $\gamma_1 = 50; \gamma_2 = 50; \gamma_3 = 500$ $\gamma_1 = 500; \gamma_2 = 500; \gamma_3 = 500$ $\gamma_1 = 500; \gamma_2 = 500; \gamma_3 = 50$ $\beta_1 = 10; \beta_2 = 10; \beta_3 = 10$
No oscilante	
$\beta_1 = 1000; \beta_2 = 1000; \beta_3 = 1$ $\beta_1 = 1000; \beta_2 = 1000; \beta_3 = 10$ $\beta_1 = 1000; \beta_2 = 1; \beta_3 = 10$ $\beta_1 = 1000; \beta_2 = 10; \beta_3 = 100$ $\beta_1 = 1000; \beta_2 = 10; \beta_3 = 10$ $\beta_1 = 1000; \beta_2 = 1; \beta_3 = 1$ $\beta_1 = 1000; \beta_2 = 1; \beta_3 = 100$ $\beta_1 = 100; \beta_2 = 100; \beta_3 = 1$ $\beta_1 = 100; \beta_2 = 100; \beta_3 = 10$ $\beta_1 = 10; \beta_2 = 10; \beta_3 = 1$ $\beta_1 = 10; \beta_2 = 10; \beta_3 = 100$ $\beta_1 = 10; \beta_2 = 10; \beta_3 = 1000$ $\beta_1 = 1; \beta_2 = 1; \beta_3 = 1$ $\beta_1 = 1; \beta_2 = 1; \beta_3 = 10$ $\beta_1 = 1; \beta_2 = 1; \beta_3 = 100$ $\beta_1 = 1; \beta_2 = 1; \beta_3 = 1000$	

Primero, se nota que si bien la razón γ entre el tiempo de degradación de los represores y el de sus ARNm respectivos es un parámetro limitante para el mantenimiento de las oscilaciones en el tiempo, nunca lleva a un sistema no oscilante. En cambio, la expresión basal β_0 es un parámetro crítico, pues basta con que uno de los represores tenga una razón β/β_0 inferior o igual a 10 para que el sistema pierda la capacidad de oscilar.

Otro caso crítico es el del sistema cuyas oscilaciones se amortiguan en el tiempo. Esta dinámica se da en el caso de que ningún represor tenga una vida media del mismo orden de magnitud que la de su propio ARNm, es decir en el caso que sea por lo menos diez veces mayor, para cada uno de los represores. También se da en el caso de que los tres promotores tengan una expresión basal fuerte o sean igual de débiles.

En todos los otros casos, el sistema permanece inestable, manteniendo de esta forma las oscilaciones, aunque no necesariamente las concentraciones de los represores varíen en el mismo rango de valores. El caso ideal de un represilador funcionando con concentraciones de represores similares se da cuando al menos uno de los represores tiene una vida media comparable a la de su ARNm. En el caso estudiado, si el ARNm se degrada en 2 min el sistema tiene un comportamiento cerca del ideal si al menos una de las proteínas se degrada en 10 min. Los gráficos correspondientes a cada una de las condiciones probadas con el programa se encuentran en el **Anexo 16**.

5.3.2 Sistema electrónico

En este caso se consideró siempre $R_1 = R_2 = R_3 = R$ y $C_1 = C_2 = C_3 = C$, pues los resistores y los condensadores son componentes electrónicos estándares y por lo tanto basta con comprar tres resistores iguales para asegurarse de que cada módulo electrónico se comporte de la misma manera que los otros dos, si es que se usan también los mismos tres OPAMPs.

Por lo anterior, se probaron varios valores del par (R;C) para determinar su efecto sobre el comportamiento del sistema. Esto permitió confirmar que el parámetro relevante es la constante de tiempo $T = R \cdot C$, más que el valor de R y C en sí. Se varió T entre 10^{-5} s y 10^2 s, aumentando un orden de magnitud cada vez. Se pudo observar que T no afecta el carácter oscilatorio del sistema sino su frecuencia, como se puede notar en la **Fig. 62**.

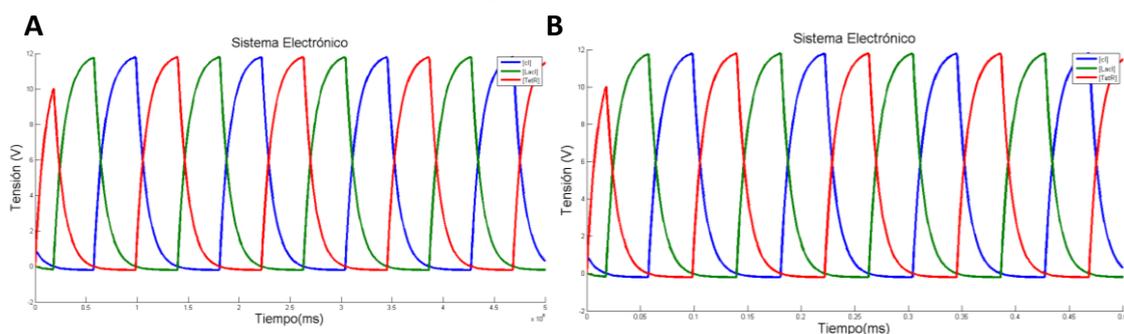


Fig. 62 - Efecto de la constante T sobre la dinámica de las oscilaciones. A: Respuesta del sistema electrónico con $T = 100$ s. La escala de tiempo está en $\cdot 10^6$ ms, es decir en miles de segundos. B: Respuesta del sistema electrónico con $T = 10^{-5}$ s. La escala de tiempo está en ms.

Luego se fijaron el resistor y el condensador a $R = 1000 \Omega$ y $C = 1 \mu\text{F}$, respectivamente, que son los valores para los cuales se había obtenido un comportamiento oscilatorio en la prueba experimental.

Como no se podía estudiar la influencia del tipo de OPAMP con Matlab, se restringió el análisis de sensibilidad a las tensiones de alimentación de los amplificadores operacionales, para determinar en qué condiciones se lograba generar el comportamiento esperado. Resultó que el único valor crítico de tensión, para ambos parámetros, fue 0 V, valor en el cual se pierde el carácter oscilatorio, como se muestra en la **Fig. 63**.

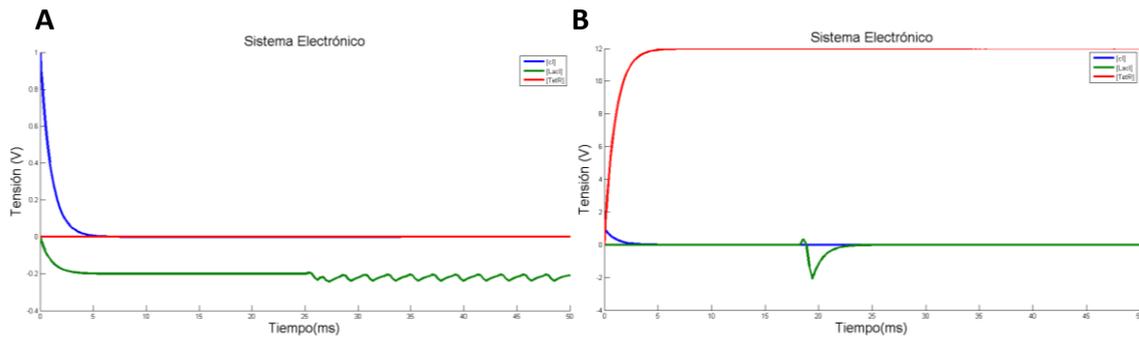


Fig. 63 – Efecto de las tensiones de alimentación de los OPAMPs sobre la dinámica oscilatoria del sistema, cuando una de ellas es nula. A: Respuesta del sistema electrónico para $V_{cc+} = 0\text{ V}$ y $V_{cc-} = -0,2\text{ V}$. B: Respuesta del sistema electrónico para $V_{cc+} = 12\text{ V}$ y $V_{cc-} = 0\text{ V}$.

Fuera de este valor crítico, se puede notar que la variación de las tensiones de alimentación sólo afecta la amplitud y la frecuencia de las oscilaciones, como se puede apreciar en la Fig. 64.

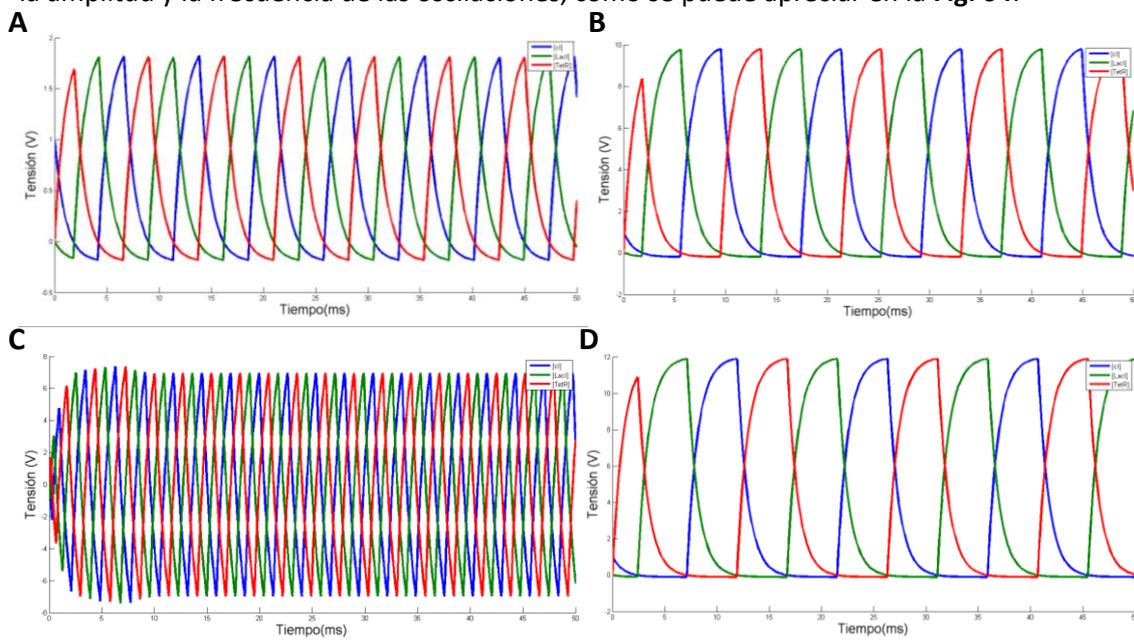


Fig. 64 - Efecto de las tensiones de alimentación de los OPAMPs sobre la dinámica oscilatoria del sistema. A: Respuesta del sistema para $V_{cc+} = 2\text{ V}$ y $V_{cc-} = -0,2\text{ V}$. B: Respuesta del sistema para $V_{cc+} = 10\text{ V}$ y $V_{cc-} = -0,2\text{ V}$. C: Respuesta del sistema para $V_{cc+} = 12\text{ V}$ y $V_{cc-} = -12\text{ V}$. D: Respuesta del sistema para $V_{cc+} = 12\text{ V}$ y $V_{cc-} = -0,1\text{ V}$.

Luego se quiso comprobar experimentalmente los resultados obtenidos y si bien se encontró que la tensión V_{cc+} no tenía mayor influencia sobre el sistema a parte de lo que se había observado con la simulación, se encontró que el valor crítico de V_{cc-} no era 0V sino -1,7V, valor para el cual el sistema respondió como se muestra en la Fig. 65.



Fig. 65 - Respuesta del sistema electrónico cuando la tensión V_{cc} alcanza el valor umbral por sobre el cual se pierden las oscilaciones, en este caso $V_{cc} = -1,7$ V. Se visualizan las salidas de dos de los tres módulos.

5.4 Actividad pedagógica

En el marco del Trabajo Guiado BT5402, se diseñó una actividad pedagógica para el curso de Biología para Ingenieros y Científicos (código BT3402) de la FCFM, electivo transversal a todas las carreras y accesible en particular desde Plan Común. El contenido formal de la actividad se puede encontrar en el **Anexo 17**.

A continuación se describen los objetivos de la actividad:

- Generales:
 - Entender los principios ingenieriles en los cuales se basa a Biología Sintética, identificar las analogías entre distintas disciplinas científicas como la biología, la electrónica y la informática y entender el rol de un modelo matemático.
- Específicos:
 - Inferir la estructura de los circuitos genéticos implementados en el chasis biológico y representarla mediante legos.
 - Analizar la sensibilidad de los parámetros del modelo matemático del represilador y concluir acerca del equilibrio del sistema.
 - Establecer analogías entre Biología, Electrónica e Informática comentando acerca de las similitudes y diferencias observables entre cada sistema.

Esta propuesta de actividad aún no se ha podido probar por los tiempos de la memoria pero se podría implementar en la próxima edición del curso, en cuanto se resuelvan los problemas ligados a la generación del represilador en el laboratorio.

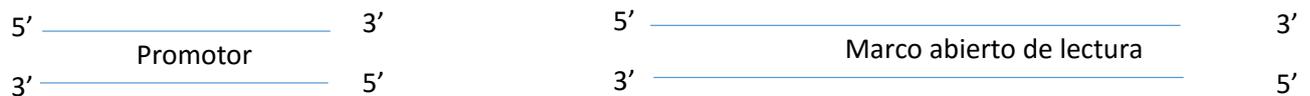
6. Discusión

Esta sección se estructura en dos partes: primero una reflexión sobre los elementos más relevantes que fallaron en el proceso de construcción de los distintos osciladores y luego un análisis crítico sobre algunos métodos que se usaron para lograr los distintos constructos. Esta segunda parte se acompaña de propuestas para evitar reproducir los mismos errores en el futuro.

6.1 Elementos que fallaron en la construcción de los osciladores

Primero, se tiene que analizar por qué los distintos RBS fueron diseñados al revés y cómo deberían haber quedado.

El objetivo era, a partir de las hebras de ADN siguientes:



Obtener el fragmento unido siguiente:



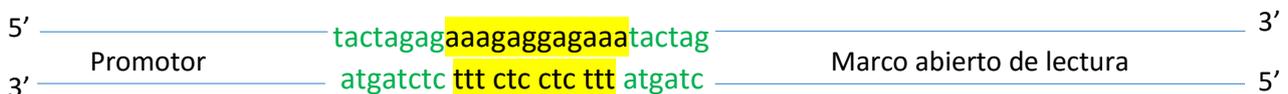
Por convención se llamará hebra sentido la hebra de arriba 5'-3' y hebra antisentido la hebra de abajo 3'-5'.

Para lograr el ensamblaje propuesto se diseñaron partidores que además de flanquear los extremos de cada parte genética, poseían una cola conteniendo la secuencia del RBS a insertar.

Esta secuencia es la siguiente: **tactagagaaagaggagaaa**tactag

Se destacó en amarillo la secuencia del RBS, extraída directamente desde el vector del kit iGEM que contiene la secuencia RBS-RFP-Terminador y que sirve de vector receptor para cada uno de los módulos genéticos del represilador de esta memoria. En verde se presentan los espaciadores que separan el promotor del RBS por una parte (secuencia de la izquierda) y el RBS del marco abierto de lectura por otra parte (secuencia de la derecha). Nuevamente, el largo y la secuencia de estos espaciadores fueron copiados desde espaciadores existentes en los vectores del kit iGEM para asegurar que los procesos de transcripción y traducción se llevan a cabo correctamente.

Por lo tanto se hubiera tenido que diseñar los partidores para que el fragmento unido tuviera la estructura siguiente:



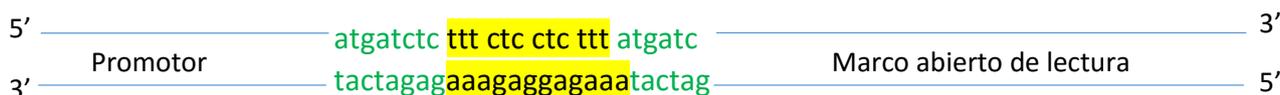
Es decir, los partidores deberían haber tenido la estructura siguiente:



El partididor reverso que se une al final de la secuencia del promotor es complementario a la hebra sentido por lo que su secuencia y la de su cola, escrita por convención en el sentido 5'-3', tiene que ser el reverso-complementario de la de la hebra sentido.

El partididor directo que se une al inicio de la secuencia del marco abierto de lectura es complementario a la secuencia de la hebra antisentido, por lo que la secuencia del partididor y de su cola, escrita en la convención 5'-3', tiene que ser la misma que la hebra sentido.

Si bien se diseñaron correctamente la parte de los partididores que se une por complementariedad a los extremos del promotor y del marco abierto de lectura, por una confusión de hebras se diseñó la cola del partididor reverso del promotor con la secuencia de la hebra sentido y la del partididor directo del ORF con la secuencia de la hebra antisentido. Por lo tanto, finalmente el fragmento quedó unido de esta forma:



Como se puede ver, el resultado de este diseño es que la secuencia que se insertó finalmente es la complementaria a la que se quería insertar inicialmente y no es reconocida como una secuencia de RBS. Por lo tanto, no se pudo llevar a cabo el proceso de traducción, justificando de esta forma que no se hayan expresado ninguno de los represores deseados en el gel de proteínas de la **Fig. 26**.

En relación al ensamblaje de los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl por el método de Ensamble 3A, es posible advertir que ninguna de las colonias transformantes era recombinante, mientras que el mismo protocolo disponible en la página de iGEM predice que el 97% de las colonias probadas debería serlo^[82]. Experiencias previas con este protocolo han mostrado que el éxito del ensamblaje de ADN mediante este método es aleatorio, lo que podría deberse a varios factores: primero, quizás el protocolo no está todavía estandarizado como para permitir una buena reproducibilidad de ensamblajes exitosos. Segundo, el éxito de la operación depende altamente de la calidad de las enzimas que se estén usando: en el caso de ocupar enzimas de restricción de uso común, como fue el caso en esta memoria, es probable que la calidad y la eficiencia de éstas se vea afectada por las frecuentes aperturas y cierres de los tubos que las contienen, además de la posibilidad de que se rompa la cadena de frío en uno de estos usos. Luego, el protocolo está diseñado para que no sea necesario purificar los productos de cada digestión para realizar la ligación, pero probablemente se aumentaría la probabilidad de éxito del ensamblaje si se realizara esta etapa, aunque esto requiera de más tiempo. Cabe destacar que se usan 200 ng de ADN para la digestión, lo cual es poco en comparación con otros protocolos que recomiendan hasta 1 µg^[83]. Si a esto se suma que las enzimas pueden no cortar con una eficiencia del 100%, entonces las proporciones del ensamblaje cambian y la cantidad total de ADN de interés en juego en la reacción de ligación disminuye, lo cual aumenta la probabilidad de generar falsos positivos.

Otro elemento que es necesario discutir es el resultado de la secuenciación de las muestras llevando el inserto Ptet-cl-Pcl-Lacl. No se pudo explotar los electroferogramas puesto que salieron ilegibles, como en el ejemplo de la **Fig. 66-A**. En particular, alineando la secuencia resultante con la secuencia esperada, el programa BLAST no encontró ninguna correspondencia. Esto indica que los partididores probablemente no se alinearon. Como flanqueaban zonas internas de la secuencia insertada en el vector, significa que posiblemente la bacteria aceptó el vector receptor, sin embargo este último no tenía la secuencia deseada. Llama la atención que el partididor que se haya mandado a sintetizar para la reacción de secuenciación sea el mismo que se utilizó para realizar el PCR de colonias que pareció comprobar el éxito del ensamblaje. En todo caso, para las secuenciaciones siguientes, sería recomendable utilizar partididores universales, ya sea de la misma base de la empresa (Macrogen) que realiza el servicio de secuenciación, o del set de partididores universales de iGEM, como para las

muestras que llevan como inserto cada uno de los tres módulos del represilador en forma independiente y cuya secuenciación fue exitosa, como se muestra en la **Fig. 66-B**.

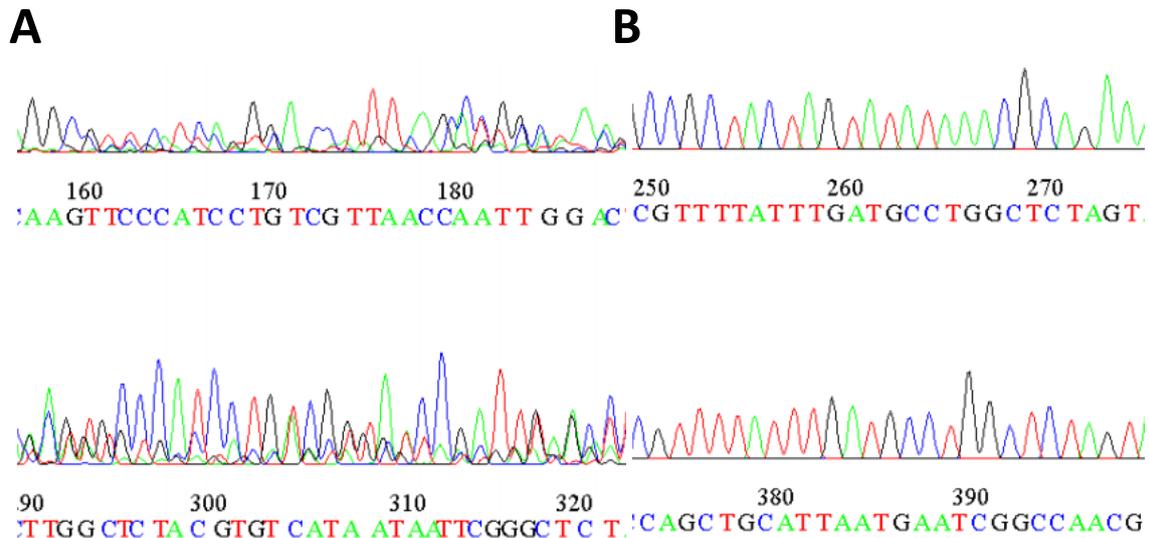


Fig. 66 - Ejemplos de resultados de secuenciación. **A:** Extracto de un electroferograma develando la reacción de secuenciación fallida. **B:** Extracto de un electroferograma en el cual la reacción de secuenciación se llevó a cabo exitosamente.

Por otra parte, cabe destacar que los ensayos de digestión relativos al ensamblaje Ptet-cl-Pcl-LacI en pET22b, realizados en paralelo o después de la secuenciación, entregaron todos como resultado que el inserto deseado no estaba presente, mientras que los geles de electroforesis aseguraban por su parte que el ensamblaje entre los fragmentos lineales Ptet-cl y Pcl-LacI había sido exitoso. El problema viene por lo tanto de la ligación en el vector receptor, que se hizo también por Gibson Assembly. Puede que en ese caso, las proporciones no hayan sido adecuadas, pues se ligaron los dos fragmentos en proporción 1:1 por el tamaño del inserto (~2400 pb) con respecto al del vector linealizado (~5000 pb) pero quizás habría resultado mejor la reacción si se hubiera introducido el inserto en proporción 2:1 con respecto al vector.

Cabe mencionar que si bien se logró en laboratorio reproducir el oscilador electrónico diseñado por A. Wagemakers, falta realizar nuevas pruebas con la inserción de LEDs para determinar definitivamente si se podrían utilizar como reporteros del comportamiento de la tensión de salida de cada módulo. De ser positivo ese resultado, se podrían probar otros valores de parámetros R y C para alcanzar una frecuencia oscilatoria del orden del segundo y permitir que el ojo distinga la frecuencia de encendido de los LEDs. Si se lograra esto, el uso de un osciloscopio se volvería facultativo, lo cual es deseable pensando en instituciones educacionales que no tienen los recursos necesarios para equiparse de esta máquina: una unidad, incluso de los osciloscopios más sencillos y baratos, cuesta cerca de \$ 300.000^[84].

6.2 Análisis crítico de las metodologías utilizadas

Primero, se realizó un análisis crítico de las reacciones de Gibson Assembly realizadas con partidores que alinean en zonas estándares del BioBrick como las zonas de prefijo y sufijo. El objetivo de la operación era construir el fragmento Ptet-cl-Pcl-Lacl a partir de Ptet-cl y Pcl-Lacl para luego unir el nuevo fragmento en el vector de expresión pET22b. Inicialmente, se tenían los fragmentos Ptet-cl y Pcl-Lacl ligados cada uno en el vector pSB1C3.

Cada fragmento viene flanqueado de los dos sitios estándares prefijo y sufijo, pues inicialmente se quería realizar el ensamblaje por enzimas de restricción con el método del Ensamble 3A, que se recuerda brevemente en la **Fig. 67**.

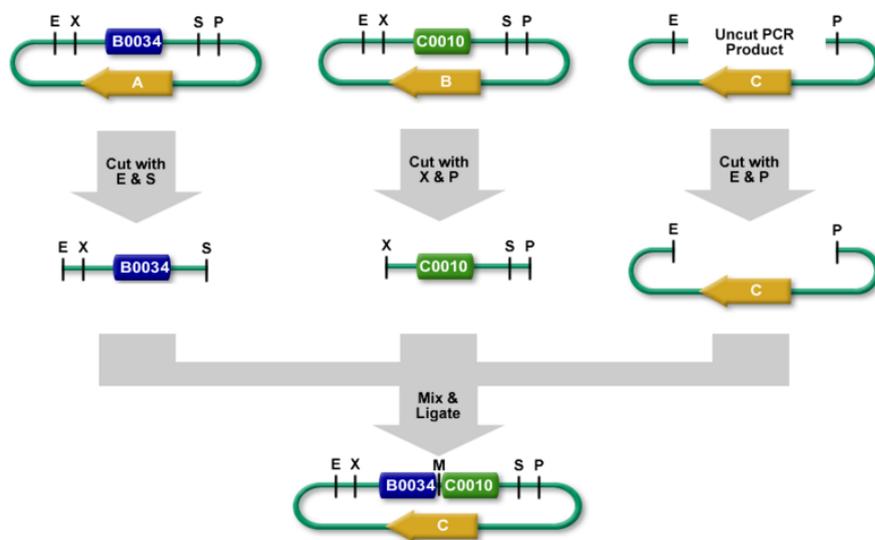


Fig. 67 - Principio de funcionamiento del Ensamble 3A. Adaptado de iGEM (parts.igem.org).

Sin embargo, por los resultados negativos obtenidos con este método, se decidió llevar a cabo la unión por Gibson Assembly, técnica que permite un ensamblaje fácil y rápido a condición de tener partidores diseñados para el ensamblaje específico que se quiere lograr. Los partidores que se usaron fueron los diseñados en el marco de otro proyecto usando partes genéticas con el mismo estándar y que tenían como función:

1. Unir el sufijo de un fragmento al prefijo de otro fragmento, generando un módulo "Prefijo-Frag1-Sufijo-Prefijo-Frag2-Sufijo"
2. Amplificar un fragmento entre su prefijo y su sufijo
3. Unir los sitios prefijo y sufijo de un fragmento al vector pET22b

No hubo mayor problema para amplificar de manera independiente cada módulo ni para unirlos mediante sus zonas de prefijo-sufijo. Sin embargo, cuando se quiso amplificar sólo el ensamblaje resultante, después de haberlo purificado, se volvieron a generar los amplificados de las dos partes individuales, puesto que el diseño había llevado a insertar entre los dos fragmentos las secuencias enteras del prefijo y del sufijo, conllevando a la unión inespecífica de los *primers* en todos los sitios posibles, flanqueando el inserto de interés y cada parte individual. Como la amplificación por PCR se realiza de manera exponencial y que cada fragmento individual se amplifica más rápido que el ensamblaje de interés, la reamplificación de este último lleva en realidad a la reamplificación masiva de las partes individuales y en mucho menor proporción a la reamplificación del fragmento de interés, lo cual dificulta bastante su posterior ligación en el vector pET22, puesto que por la estandarización de

los sitios, se pueden unir los tres fragmentos (módulo PTet-cl, módulo Pcl-Lacl y módulo Ptet-cl-Pcl-Lacl) con mayor probabilidad hacia los fragmentos no ensamblados. Las Fig. 68 y 69 resumen la situación descrita.

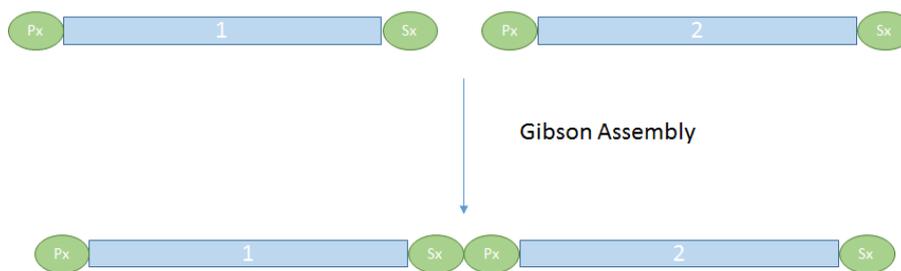


Fig. 68 - Resultado del ensamblaje por Gibson Assembly de dos fragmentos que llevan los extremos estandarizados con Prefijo (Px) y Sufijo (Sx).

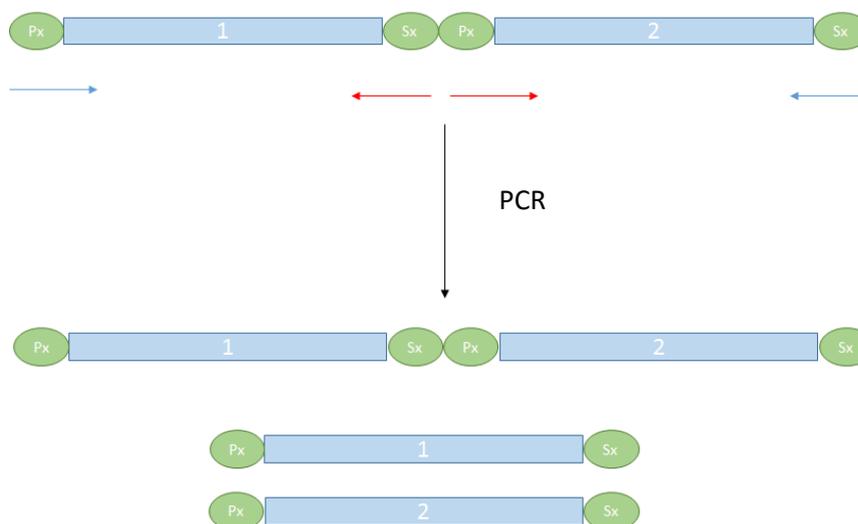


Fig. 69 - Resultado de la reamplificación del constructo unido por Gibson Assembly "1+2" de la Fig. 68, con el partidor directo que se une en el prefijo y el partidor reverso que se une en el sufijo. Se nota que como estos sitios aparecen más de una vez en el constructo "1+2", los partidores se unen inespecíficamente, llevando a la amplificación de tres fragmentos en vez de uno.

Otra metodología cuestionable que se utilizó es el uso del PCR de colonias como método de verificación del éxito de una construcción genética. Si bien entregó buenos resultados para los módulos independientes PlacI-TetR, Ptet-cl y Pcl-Lacl, para el ensamblaje de mayor complejidad Ptet-cl-Pcl-Lacl el resultado positivo del método fue invalidado dos veces por ensayos de digestión posteriores. Probablemente jugó en contra el hecho de haber utilizado partidores de los cuales al menos uno podía unirse en dos sitios del constructo a validar: al reducirse la especificidad de unión, aumenta la probabilidad de interpretación errónea del patrón de amplificación. Aun así, si el PCR de colonias es un buen método para identificar posibles colonias recombinantes, parece imprescindible realizar un ensayo de digestión sobre las colonias seleccionadas por PCR colonia con el fin de validar el buen ensamblaje del constructo genético de interés.

Para la construcción de la totalidad de los distintos módulos se utilizó la reacción de Gibson Assembly. Cabe destacar que la reacción en sí nunca falló, sino que las dificultades se relacionaron con la purificación o la reamplificación del ensamblaje deseado. Esto hace del Gibson Assembly un método referente para el ensamblaje de fragmentos lineales de ADN. Se probó que siempre que no se ligaron más de dos fragmentos al mismo tiempo la reacción funcionó, excepción hecha de la ligación del módulo Ptet-cl-Pcl-LaCl en pET22b, probablemente por problemas de proporción de fragmentos a ligar, como ya se comentó. La única vez que se ensamblaron tres fragmentos simultáneamente, el PCR de colonias identificó una sola posible colonia recombinante que fue invalidada por ensayo de digestión posterior. Si el Gibson Assembly está hecho para ensamblar, en la teoría, hasta siete fragmentos en una reacción, las condiciones operatorias cambian cuando se ligan más de tres fragmentos: no se prepara el mismo Master Mix y las proporciones entre fragmentos cambian ^[85]. Sin embargo, en el caso de tres fragmentos, la reacción debiese haberse podido llevar a cabo en las mismas condiciones que el ensamblaje con dos fragmentos, por lo que habría que probar nuevamente la técnica. Una prueba no es suficiente para presumir de la efectividad de un método.

Para simular el sistema electrónico, se ocuparon dos programas: Matlab y LTSpice IV. Se esperaba que LTSpice entregara una simulación más realista que Matlab por basarse en componentes reales, sin embargo la evidencia experimental invalidó la simulación del programa electrónico para acercarse a lo previsto por la simulación de Matlab. Una razón que se invocó es que como LTSpiceIV simuló el sistema con un OPAMP que no era exactamente el que se ocupa en la realidad, esta diferencia pudo haber afectado el resultado de la simulación. Sin embargo, no debería haber afectado tanto puesto que ambos OPAMP (de la simulación y del trabajo de A. Wagemakers) son universales (la iniciales "UA" en "UA741" significan "*Universal Amplifier*"). Otra posibilidad es que se simuló la alimentación de los OPAMPs con dos fuentes de poder distintas, una entregando una tensión positiva y la otra, negativa. En la práctica se usa una sola fuente de poder con diferencia de potencial entre polo positivo y negativo, que se puede controlar manualmente. Quizás esta diferencia de diseño en el programa electrónico afectó también el resultado de la simulación: LTSpiceIV no tiene fuentes de poder que puedan tener un potencial negativo en el polo negativo (es necesariamente 0, sólo se puede manipular el valor de la tensión del polo positivo).

6.3 Comparación del represilador con el oscilador electrónico

Se puede establecer una analogía sobre dos planes para ambos sistemas. Primero, los dos exhiben un comportamiento oscilatorio auto mantenido y controlable en el tiempo, que proviene de una similitud funcional entre los componentes electrónicos y los elementos genéticos que constituyen el represilador: los amplificadores operacionales se comportan de manera parecida a un promotor y la tensión de salida de cada módulo electrónico corresponde a la concentración de un represor del oscilador genético. Segundo, los modelos matemáticos que rigen el comportamiento de cada sistema contienen ecuaciones cuyos términos tienen equivalentes en el modelo del otro oscilador. El detalle se expuso en la **Tabla 2** de la sección de Antecedentes. Por lo tanto, existe una fuerte analogía entre el represilador y el oscilador electrónico.

6.4 Aplicabilidad de la memoria

Además de haber diseñado una actividad para el curso de BIC, se tiene desde algunos meses el contacto de una persona, el Sr. Aldo Medina, trabajando en un proyecto piloto de educación y cultura CTI (Ciencias, Tecnología e Innovación). Este proyecto, impulsado desde la Subcomisión Cultura de la Comisión Presidencial Ciencias para el Desarrollo de Chile tiene su oficina basada en Santiago pero actúa en la comuna de San Joaquín y en la región de los Ríos^[86]. Lo que propone este proyecto es relacionar colegios de zonas vulnerables con personas o grupos que proponen un taller en torno a temas de CTI. El Sr. Medina se mostró interesado por la propuesta de una actividad pedagógica basada

en las analogías que existen entre sistemas biológicos y electrónicos, en particular abordada desde la temática de un oscilador. Quedó a la espera de otro encuentro cuando el trabajo estuviera terminado y el sistema operativo. Ofreció su colaboración para hacer entrar esta propuesta en el programa piloto^[86].

7. Conclusiones y proyecciones

7.1 Conclusiones

Si bien no se logró completar en su totalidad el objetivo general de esta memoria, se tienen avances importantes en cada uno de los sistemas a construir. Primero, se logró parcialmente la construcción del represilador: se ensambló exitosamente el plásmido pSB1C3 con el módulo P_{Lacl}-TetR-RFP y el RBS correcto, mientras que el plásmido pET22b con el módulo P_{tet-cl}-P_{cl-Lacl} aún no se vuelve a ensamblar. Sin embargo, se logró regenerar los fragmentos lineales P_{tet-cl} y P_{cl-Lacl} con los RBS correctos y se tiene una concentración suficiente del vector linealizado y del módulo P_{tet-cl} para proceder a un ensamblaje por Gibson Assembly; falta lograr la reamplificación del módulo P_{cl-Lacl}. Segundo, se logró replicar el oscilador electrónico del trabajo de A. Wagemakers, tanto en la teoría como en la práctica, aunque no se alcanzó a probar el efecto de los LEDs en laboratorio. Se logró simular el comportamiento de los dos sistemas en distintas condiciones y analizar la sensibilidad de los parámetros claves del modelo.

Para concluir acerca del cumplimiento de los objetivos específicos de la memoria, cabe destacar que se pudo demostrar que existe una fuerte analogía entre el comportamiento del sistema biológico y del sistema electrónico, tanto acerca de las partes que los constituyen como de los modelos matemáticos que los representan. Se completó parcialmente la construcción del represilador y el sistema electrónico se implementó exitosamente en laboratorio, aunque falte mejorar el diseño de la actividad reportera de los LEDs. Finalmente, se diseñó una actividad pedagógica para el curso de BIC y se estableció un contacto con el programa piloto de Cultura CTI.

Para mejorar el trabajo de esta memoria se propone definir estrategias para elaborar un kit conteniendo el material de esta memoria, que se pueda aprovechar por instituciones educacionales de manera más libre. Es decir, que la explotación del material generado no dependa de una actividad pedagógica específica, sino que se puedan diseñar varias a partir del contenido del kit. Una fuente de inspiración podría ser los laboratorios portátiles de Biología Molecular y Genómica, aprovechando que se tiene el contacto del Sr. Jorge E. Allende.

7.2 Proyecciones

Para cada eje de trabajo de esta memoria, se proponen estrategias para completar los objetivos y llevar el material generado a una aplicación concreta.

En el caso del represilador, se propone el plan de acción siguiente: volver a amplificar el módulo P_{cl-Lacl} con los partidores Prefijo_Sufijo_Fwd y VR_pET22b; realizar un Gibson Assembly de tres fragmentos simultáneos: pET22b linealizado, P_{tet-cl} y P_{cl-Lacl}; transformar *E. coli* quimiocompetentes con el vector recién ensamblado y cultivar las células en placa con ampicilina; realizar un PCR de colonias para identificar potenciales colonias recombinantes; realizar miniprep de estas colonias y hacer un ensayo de digestión para comprobar el éxito del ensamblaje; mandar a secuenciar ambos plásmidos construidos con los RBS correctos; transformar *E. coli* quimiocompetentes con los dos plásmidos del represilador y cultivar las células en placas con cloranfenicol y ampicilina; aislar una bacteria y monitorear su fluorescencia. Se estima que el conjunto de este trabajo podría realizarse dentro de dos meses y que la etapa limitante, una vez construido el plásmido faltante, será el monitoreo de la fluorescencia de las bacterias transformadas con el represilador.

Para mejorar el sistema electrónico, se propone volver al laboratorio para determinar el efecto de la inserción de los LEDs, en serie y en paralelo, sobre la dinámica oscilatoria y probar varios sets de resistencias y condensadores para modificar la frecuencia de las oscilaciones. Si los LEDs destruyen la

dinámica del oscilador se tendrá que evaluar dos alternativas: implementar la actividad pedagógica, en primera instancia, en colegios que tengan acceso a osciloscopios; estudiar de qué forma se podría modificar el circuito electrónico para eliminar el efecto de los LEDs sin afectar la analogía del sistema con el circuito genético. El estudio del efecto de los LEDs se puede realizar en menos de una semana en el laboratorio de electrónica de la Facultad.

En cuanto a la simulación informática, podría en el futuro ajustarse a los parámetros experimentales de ambos sistemas biológico y electrónico. Este trabajo es más arduo en el caso del sistema biológico y se estima a por lo menos un mes el tiempo necesario para realizar este ajuste. Efectivamente, por una parte se necesita medir la expresión basal de todos los promotores, lo cual pasa por medir la cantidad de represores producidos en ausencia y en presencia de sus represores respectivos, para los promotores Ptet y Pcl. Para el promotor PLacl, se tendrá que medir la cantidad de represor TetR y de proteína RFP con y sin inducción por IPTG. Por otra parte, se necesita medir en cuanto tiempo se degradan cada uno de los represores. Se asumirá, en primera instancia, que la vida media de todos los ARNm es de 2min, para tener una aproximación del parámetro γ .

A modo de conclusión, el trabajo presentado en esta memoria buscar sentar las bases para la fabricación de un kit pedagógico basado en Biología Sintética, de desarrollo abierto, que pueda ser llevado a instituciones educacionales con pocos recursos para contribuir de esta forma a combatir la desigualdad del acceso a medios de enseñar la ciencia de forma más cercana y basada en experiencias.

8. Bibliografía

- [1] M. B. Elowitz y S. Leibler. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, Vol.403, N°6767, pp. 335-338. 2000.
- [2] B. Hobom. Gene surgery: on the threshold of synthetic biology. *Medizinische Klinik*, Vol. 75, N° 24, pp. 834-841. 1980.
- [3] S. S. Benner. Synthetic biology. *Nature reviews. Genetics*. pp. 533-543. 2005.
- [4] D. E. Cameron, C. J. Bashor y J. J. Collins. A brief history of synthetic biology. *Nature reviews. Microbiology*. Vol.12, N°5, pp. 381-90. 2014.
- [5] C. A. Hutchison et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*, Vol.351, N°6280. 2016.
- [6] European Commission. Synthetic Biology: Applying Engineering to Biology. Report of a NEST High-Level Expert Group. RTD Info. 2005.
- [7] OpenWetWare. Synthetic Biology Community. [En línea] < <http://syntheticbiology.org/> > [Consulta: 13/07/2016].
- [8] C. Parmesan y G. Yohe. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, Vol.421, N° 6918, pp. 37-42. 2003.
- [9] P. Reiter. Climate change and mosquito-borne disease. *Environmental Health Perspectives*, Vol.109, SUPPL.1., pp. 141-161. 2001.
- [10] A. Githeko et al.. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ*, Vol.78, N°9., pp. 1136-1147. 2000.
- [11] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Climate change, water and food security. *FAO Water Reports*, pp. 175. 2011.
- [12] High Level Panel on Global Sustainability. Sustainable Development : From Brundtland to Rio 2012. International Institute for Sustainable Development, pp. 26. 2010.
- [13] Salud Pública de México. La biología sintética: Las implicaciones de un nuevo campo para la salud ambiental. *Environmental Health Perspectives*, Vol.118, N°3., pp. A118-A123. 2010.
- [14] WIRED. D. Alba. Startup Says It's the First to Make Synthetic Spider Silk. [En línea]. <<http://www.wired.com/2015/06/bolt-threads-spider-silk/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [15] MIT Technology Review. K. Bourzac. Spinning Synthetic Spider Silk. [En línea]. <<https://www.technologyreview.com/s/541361/spinning-synthetic-spider-silk/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [16] J. R. Kirby, «Synthetic biology: Designer bacteria degrades toxin,» *Nature Chemical Biology*, Vol.6, p. 398–399, 2010.

- [17] L. D'Espaux et al.. Synthetic biology for microbial production of lipid-based biofuels. *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol.29, pp. 58–65. 2015.
- [18] M. S. Ferry, J. Hasty y N. A. Cookson. Synthetic biology approaches to biofuel production. *Biofuels*, Vol.3, N°1, pp. 9–12. 2012.
- [19] J.Craig Venter Institute. Hydrogen from Water in a Novel Recombinant Cyanobacterial System. [En línea] <<http://www.jcvi.org/cms/research/projects/hydrogen-from-water-in-a-novel-recombinant-cyanobacterial-system/overview/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [20] Biotechnology Industry Organization. Current Uses of Synthetic Biology for Renewable Chemicals, Pharmaceuticals and Biofuels. 2013. [En línea]. <<https://www.bio.org/sites/default/files/files/Synthetic-Biology-and-Everyday-Products-2012.pdf>> [Consulta: 13/07/2016].
- [21] The Royal Society Publishing. Z. Kis et al.. Mammalian synthetic biology: emerging medical applications. 2015. [En línea] <<http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/12/106/20141000>> [Consulta: 13/07/2016].
- [22] E. Fesenko y R. Edwards. Plant synthetic biology: a new platform for industrial biotechnology. *Journal of Experimental Botany*, Vol.65, N°8, pp. 1927-1937. 2014.
- [23] A. Bensussen y A. Meneses-Acosta. *Biología Sintética: La Próxima Revolución Industrial*. BioTecnología, Vol. 17, N° 3 , pp. 29-42. 2013.
- [24] Expansión. G. Chávez. El diseño en 4d construye la próxima revolución industrial. 2015. [En línea] <<http://expansion.mx/tecnologia/2015/08/08/el-diseno-en-4d-construye-la-proxima-revolucion-industrial>> [Consulta: 13/07/16]
- [25] INAPI. Paz Osorio Delgado. Taller de propiedad intelectual. Santiago. Febrero 2016.
- [26] iGEM. [En línea] <<http://igem.org>> [Consulta: 13/07/2016]
- [27] Boston University. College of Engineering. M. Dwortzan. Scaling Up Synthetic Biology: ECE Researchers Develop Powerful New Software Tools. [En línea] <<http://www.bu.edu/phpbin/news-cms/news/?dept=666&id=62217>> [Consulta: 13/07/2016].
- [28] Bio-It World. Allied Market Research. Synthetic Biology Market is Expected to Reach \$38.7 Billion, Globally, by 2020. 2014. [En línea] <[http://www.bio-itworld.com/Press-Release/Synthetic-Biology-Market-is-Expected-to-Reach-\\$38-7-Billion,-Globally,-by-2020---Allied-Market-Research/](http://www.bio-itworld.com/Press-Release/Synthetic-Biology-Market-is-Expected-to-Reach-$38-7-Billion,-Globally,-by-2020---Allied-Market-Research/)> [Consulta: 13/07/2016].
- [29] Editas Medicine. [En línea] <<http://www.editasmedicine.com/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [30] Synenergene. [En línea] <<https://www.synenergene.eu/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [31] J. Craig Venter Institute. [En línea] <<http://www.jcvi.org/cms/home/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [32] SynBERC. [En línea] <<https://www.synberc.org/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [33] BioBricks Foundation. [En línea] <<http://biobricks.org/>> [Consulta: 13/07/2016].

- [34] OpenWetWare. [En línea] <http://openwetware.org/wiki/Main_Page> [Consulta: 13/07/2016].
- [35] Etc Group. [En línea] <<http://www.etcgroup.org/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [36] ERASynbio. [En línea] <<https://www.erasynbio.eu/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [37] Institute of Microbiology. [En línea] <<http://english.im.cas.cn/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [38] Biomass. [En línea] <<http://bioenfapesp.org/bssb/index.php>> [Consulta: 13/07/2016].
- [39] Universidad Mayor. Universidad Mayor se adjudica fondos para promoción de la biología sintética en Chile. 2013. [En línea] <http://www.umayor.cl/diariomayor/v2/index.php?option=com_content&view=article&id=2361:universidad-mayor-se-adjudica-fondos-para-promocion-de-la-biologia-sintetica-en-chile&catid=24:genomica> [Consulta: 13/07/2016].
- [40] BioBioChile. B. Ahumada. Chile será sede del concurso más importante del mundo sobre Biología Sintética. 2013. [En línea] <<http://www.biobiochile.cl/2013/10/04/chile-sera-sede-el-concurso-cientifico-del-mundo-mas-importante-sobre-biologia-sintetica.shtml>> [Consulta: 13/07/2016].
- [41] Competencia iGEM 2015. Equipo Sh Hostos Chile. Silisform. [En línea] <http://2015.igem.org/Team:Liceo_Eugenio_Hostos> [Consulta: 13/07/2016].
- [42] Competencia iGEM 2015. Equipo Colegio Emelina U. UV Wristband. [En línea] <http://2015.igem.org/Team:Colegio_EmelinaU> [Consulta: 13/07/2016].
- [43] Competencia iGEM 2015. Equipo San Andrés. Gluten's Job. [En línea] <http://2015.igem.org/Team:San_Andres> [Consulta: 13/07/2016].
- [44] Competencia iGEM 2014. Equipo UMayor-Chile, Universidad Mayor. Troy Horse Project. [En línea] <<http://2014.igem.org/Team:UMayor-Chile>> [Consulta: 13/07/2016].
- [45] Competencia iGEM 2013. Equipo UC_Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile. Whateverisome. [En línea] <http://2013.igem.org/Team:UC_Chile> [Consulta: 13/07/2016].
- [46] Competencia iGEM 2012. Equipo UC_Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile. Luxilla Biolamp. [En línea] <http://2012.igem.org/Team:UC_Chile/Cyanolux/Project_short> [Consulta: 13/07/2016].
- [47] Competencia iGEM 2015. Equipo UChile-OpenBio, Universidad de Chile. PLA Project. [En línea] <<http://2015.igem.org/Team:UChile-OpenBio>> [Consulta: 13/07/2016].
- [48] Plataforma Arquitectura. C. Cabezas. Charla de Ron Weiss: “Biología Sintética: desde partes a módulos a aplicaciones terapéuticas”/ UAI-Chile. 2013. [En línea] <<http://www.plataformaarquitectura.cl/cl/02-231481/charla-de-ron-weiss-biologia-sintetica-desde-partes-a-modulos-a-aplicaciones-terapeuticas-uai-chile>> [Consulta: 13/07/2016].
- [49] Univerisdad Adolfo Ibañez. La Biología sintética nos permite tratar la biología como un ambiente programable y perseguir usos específicos. 2013. [En línea] <<http://www.uai.cl/noticias/la-biologia-sintetica-nos-permite-tratar-la-biologia-como-un-ambiente-programable-y-perseguir-usos-especificos>> [Consulta: 13/07/2016].

- [50] Diario Financiero. Vamos al Lab! convocó a 11 empresas para debatir sobre biología sintética. 2013. [En línea] <<https://www.df.cl/noticias/empresas/innovacion-y-sustentabilidad/vamos-al-lab-convoco-a-11-empresas-para-debatir-sobre-biologia-sintetica/2013-10-04/182215.html>> [Consulta: 13/07/2016].
- [51] SOFOFA. Vamos al Lab! convocó a 11 empresas para debatir sobre biología sintética. [En línea] <<http://web.sofofa.cl/noticia/vamos-al-lab-convoco-a-11-empresas-para-debatir-sobre-biologia-sintetica/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [52] Pontificia Universidad Católica de Chile. Encuentro UC destaca nuevas áreas de desarrollo de la Biología Sintética. 2014. [En línea] <<http://www.ing.uc.cl/encuentro-uc-destaca-nuevas-areas-de-desarrollo-de-la-biologia-sintetica/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [53] Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Genome Editing and Synthetic Biology. 2016. [En línea] <<http://www.sbbmch.cl/?p=3320>> [Consulta: 13/07/2016].
- [54] Milenio Iniciativa Científica. Núcleo Milenio en Biología Sintética y Biología de Sistemas Vegetales – BSSV. [En línea] <<http://www.iniciativamilenio.cl/bssv/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [55] Milenio Iniciativa Científica. Qué es Milenio?. [En línea] <<http://www.iniciativamilenio.cl/que-es-milenio/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [56] Núcleo Milenio De Biología Sintética & Biología De Sistemas Vegetales. [En línea] <<http://www.genomicavegetal.cl/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [57] Asembio. [En línea] <<http://www.asembio.cl/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [58] Kaitek Labs. [En línea] <<http://www.kaiteklabs.com/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [59] P. B. Alberts. La responsabilidad de las Academias de Ciencias, las Universidades y Sociedades Científicas en el Mejoramiento del Aprendizaje de Ciencias al nivel Escolar de Parvularia a Educación Media. Santiago. 14 de abril, 2016.
- [60] Gobierno de Chile. Ministerio de Educación. Enseñanza Media. [En línea] <<http://www.curriculumlineamineduc.cl/605/w3-propertyname-623.html>> [Consulta: 13/07/2016].
- [61] Gobierno de Chile. Ministerio de Educación. Trabajo: Curriculum y Temas sociales. Cómo trabajar la Convivencia Escolar a través de los Objetivos Fundamentales Transversales en los planes y programas del MINEDUC. 2007. [En línea] <http://portales.mineduc.cl/usuarios/convivencia_escolar/doc/201103041321430.MINEDUC.%20EI_Trabajo_Como_trabajar_la_convivencia_escolar_a_traves_de_los_objetivos_funda_transversales.pdf> [Consulta: 13/07/2016].
- [62] S. J. McNamee, J. Robert y K. Miller. The Meritocracy Myth. Sociation Today, Vol.2, N°1. 2004.
- [63] J. E. García-Huidobro. Desigualdad educativa y segmentación del sistema escolar. Consideraciones a partir del caso chileno. Rev. Pensamiento Educativo, Vol. 40, N° 1, pp. 65-85. 2007.
- [64] A. Ruffinelli y A. Guerrero. Círculo de segmentación del sistema educativo chileno: destino laboral de egresados de Pedagogía en Educación Básica. Calidad en la educación, N°31, pp. 20-44. 2009.

- [65] Pulso. A. Mizala. Estratificación de la educación en Chile. [En línea] <<http://www.pulso.cl/noticia/opinion/2012/10/4-12192-9-estratificacion-de-la-educacion-en-chile.shtml>> [Consulta: 13/07/2016].
- [66] J. E. Allende. La Experiencia del RELAB en el uso del Laboratorio Portátil de Biología Molecular y Genómica en el Aprendizaje de Biología Molecular por alumnos de enseñanza media. Santiago. 15 de abril, 2016.
- [67] M. W. Nirenberg. The Genetic Code: II. Scientific American, Vol. 208, pp. 80-94. 1963.
- [68] Estrem et al.. Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. Genes and Development, Vol.13, N°16, pp. 2134–2147. 1999.
- [69] Registry of Standard Biological Parts. Help:Parts. [En línea] <<http://parts.igem.org/Help:Parts>> [Consulta 13/07/2016].
- [70] B. Canton, A. Labno y D. Endy. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. Nature Biotechnology, Vol.26, , pp. 787 - 793. 2008.
- [71] Registry of Standard Biological Parts. [En línea] <http://parts.igem.org/Main_Page> [Consulta: 13/07/2016].
- [72] Registry of Standard Biological Parts. Help:BioBrick Prefix and Suffix. [En línea] <http://parts.igem.org/Help:BioBrick_Prefix_and_Suffix> [Consulta: 13/07/2016].
- [73] H. M. Sauro. Modularity defined. Molecular Systems Biology, Vol.4, pp. 166. 2008.
- [74] F. Federici et al.. Synthetic Biology: Opportunities for Chilean Bioindustry and education. Biological Research. Vol.46, N°4, pp. 383-393. 2013.
- [75] J. J. Y. Teo, S. S. Woo y R. Sarpeshkar. Synthetic Biology: A Unifying View and Review Using Analog Circuits. IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, Vol.9, N°4, pp. 453-474. 2015.
- [76] A. Loinger y O. Biham. Stochastic simulations of the repressilator circuit. Physical Review E76, 051917. APS Physics. 2007.
- [77] Pokhilko et al..The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops. Molecular Systems Biology, Vol.8, pp. 574. 2012.
- [78] J. Garcia-Ojalvo, M. B. Elowitz y S. H. Strogatz. Modeling a synthetic multicellular clock: Repressilators coupled by quorum sensing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 101, N°30, pp. 10955–10960. 2004.
- [79] A. Wagemakers. Electronic Modelling of Complex Dynamics. Universidad Rey Juan Carlos. Departamento de Física. Madrid, 2008.
- [80] Electrónica Unicrom. Proceso de descarga de un capacitor / condensador en un circuito RC. [En línea] <<http://unicrom.com/proceso-de-descarga-de-un-capacitor-en-un-circuito-rc/>> [Consulta: 13/07/2016].

- [81] Elementos Electrónicos. 2012. [En línea] <<http://elementoselectronicos4im8-cae.blogspot.cl/2012/02/voltaje-necesario-para-cada-color-de.html>> [Consulta: 13/07/2016].
- [82] Registry of Standard Biological Parts. Help:Assembly / 3A Assembly. [En línea] <http://parts.igem.org/Help:Assembly/3A_Assembly> [Consulta: 13/07/2016].
- [83] New England BioLabs. Optimizing Restriction Endonuclease Reactions. [En línea]. <<https://www.neb.com/protocols/2012/12/07/optimizing-restriction-endonuclease-reactions>> [Consulta: 12-07-2016].
- [84] SoloStocks. Venta de osciloscopio al por mayor. [En línea] <http://www.solostocks.cl/venta-productos/osciloscopio_b> [Consulta: 13/07/2016].
- [85] New England BioLabs. Gibson Assembly® Master Mix: Instruction Manual. [En línea] <<https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/0AA961B294E444AFBEDD5C4A904C76E6/Datacards%20or%20Manuals/ManualE2611.pdf>> [Consulta: 13/07/2016].
- [86] A. Medina. Reunión explicativa sobre el proyecto piloto Educación y Cultura CTI. [Entrevista]. Santiago.13 de enero, 2016.
- [88] K. B. Mullys. Process For Amplifying Nucleic Acid Sequences. Estados Unidos Patente 4,683,202. 1987.
- [89] J. J. Collins, T. S. Gardner y C. R. Cantor. Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli. Nature, Vol.403, N°6767, pp. 339-342. 2000.
- [90] D. V. Doren, S. Koenigstein y T. Reiss. The development of synthetic biology : a patent analysis. System Synthetic Biology. Vol.7, pp. 209–220. 2013.
- [91] SynBioBeta. These Synthetic Biology Companies Have Raised Half a Billion Dollars in 2015. 2015. [En línea] <<http://synbiobeta.com/these-synthetic-biology-companies-have-raised-half-a-billion-dollars-in-2015/>> [Consulta: 13/07/2016].
- [92] Revista Akademeia. L. Vega. Currículum y objetivos fundamentales transversales en Chile. Resultados y Proyecciones. 2010. [En línea] <<http://www.revistaakademeia.cl/?p=740>> [Consulta: 02/06/2016].
- [93] Biología Sintética one-oh-one. El ensamblaje BioBrick estándar. 2015. [En línea] <<http://biosintetica101.org/4-estandares-de-ensamblaje/4-3-el-ensamblaje-biobrick-estandar/>> [Consulta: 13/07/2016].

9. ANEXOS

Anexo 9.1 – Partidores utilizados a lo largo de la memoria

Amplificación del promotor P_{Lacl} con colas a pSB1C3 y al ORF de TetR:

pSB1C3_VF2_univ: 5' gcc cga tca act cga g **tgccacctgacgtctaagaa** 3'

Largo (**partidor**): 20 bp

Ta = 58,4 [°C]

Largo (**cola**): 16 bp

Ta = 53,5 °C

TetR_P_{Lacl}_RV: 5' **tttctctctttctctagta** **tgtgctcagtatctgttatcc** 3'

Largo (**partidor**): 22 bp

Ta = 58,4 [°C]

Largo (**cola**): 20 bp

Ta = 52,3 [°C]

Amplificación del ORF de TetR con colas a P_{Lacl} y al ORF de la RFP:

P_{Lacl}_TetR_FW: 5' **atctctttctcctctttatgac** **atg tcc aga tta gat aaa agt aaa gt** 3'

Largo (**partidor**): 26 bp

Ta = 58,4 [°C]

Largo (**cola**): 20 bp

Ta = 52,3 [°C]

RFP_TetR_RV: 5' **att tct cct ctt tct cta gta** **gtg atc tac act agc act atc a** 3'

Largo (**partidor**): 21 bp

Ta = 58,4 [°C]

Largo (**cola**): 21 bp

Ta = 53,4 [°C]

Amplificación del promotor P_{tet} con colas a pSB1C3 y al ORF de cl:

pSB1C3_VF2_univ: 5' gcc cga tca act cga g **tgccacctgacgtctaagaa** 3'

Largo (**partidor**): 20 bp

Ta = 58,4 [°C]

Largo (**cola**): 16 bp

Ta = 53,5 °C

cl_PTet_RV: 5' **ca taa aga gga gaa aga gat cat** **gtg ctc agt atc tct atc act** 3'

Largo (**partidor**): 21 bp

Ta = 57,5 [°C]

Largo (**cola**): 23 bp

Ta = 52,3 [°C]

Amplificación del ORF de cl con colas al promotor Ptet y al vector pSB1C3:

PTet_cl_FW:5' a tct ctt tct cct ctt tat gatc atg agc aca aaa aag aaa cca tta ac 3'

Largo (partidor): 26 bp

Ta = 60,1 [°C]

Largo (cola): 23 bp

Ta = 52,3 [°C]

pSB1C3_cl_RV:5' tga tgc ctg gct cta gta gcg atc tac act agc act atc 3'

Largo (partidor): 21 bp

Ta = 59,5 [°C]

Largo (cola): 17 bp

Ta = 53,8 [°C]

Amplificación del promotor Pcl con colas al vector pSB1C3 y al ORF de LacI:

pSB1C3_VF2_univ:5' gcc cga tca act cga g tgccacctgacgtctaagaa 3'

Largo (partidor): 20 bp

Ta = 58,4 [°C]

Largo (cola): 16 bp

Ta = 53,5 °C

LacI_Pcl_RV:5' ca taa aga gga gaa aga gat cat gca acc att atc acc gcc a 3'

Largo (partidor): 19 bp

Ta = 57,5 [°C]

Largo (cola): 23 bp

Ta = 52,3 °C

Amplificación del ORF de LacI con colas al promotor Pcl y al vector pSB1C3:

Pcl_LacI_FW:5' at ctc ttt ctc ctc ttt atg atc atg gtg aat gtg aaa cca gta ac 3'

Largo (partidor): 23 bp

Ta = 59,2 [°C]

Largo (cola): 23 bp

Ta = 52,3 °C

pSB1C3_LacI_RV:5' tga tgc ctg gct cta gta gag atc tac act agc act atc a 3'

Largo (partidor): 22 bp

Ta = 58,4 [°C]

Largo (cola): 18 bp

Ta = 53,8 [°C]

Amplificación del vector pSB1C3:

pSB1C3_RV_univ:

5' ctc gag ttg atc ggg cac 3'

Largo: 18 bp

Ta = 58,4 [°C]

pSB1C3_RFP_FW:

5' tac tag aga aag agg aga aat act 3'

Largo: 22bp

Ta = 58,3 [°C]

pSB1C3_FW_univ:

5' TAC TAG AGC CAG GCA TCA AAT A 3'

Largo: 22bp

Ta = 58,4 [°C]

Partidores estándares utilizados inicialmente para realizar el ensamblaje de P_{tet}-cl con P_{cl}-Lacl en pET22b. Proveniencia: proyecto PLA – iGEM.

Amplificación del pet22: Desde después del terminador T7 hasta antes del promotor T7.

pET22_pos_T7_fwd: 5' ccgctgcag ctgaaaggaggaactatatcc 3'

Largo (partidor): 21 bp

Ta = 57.5°C

Largo (cola): 9 bp

Ta: 58,4 °C

pET22_pre_T7_rev: 5' cgcgaaattc atttcgcgggatcgagatc 3'

Largo (partidor): 19 bp

Ta = 57.5°C

Largo (cola): 9 bp

Ta 56,3 °C

Unión de prefijo y sufijo al pET22:

Prefix_pET22_fwd: 5' ccgcgaaat gaattcgcggccgcttc 3'

Largo (partidor): 17 bp

Ta = 57.3°C

Largo (cola): 9 bp

Ta = 58,4°C

Sufix_pET22_rev 5' tcctttcag ctgcagcggccgcta 3'

Largo (partidor): 15 bp

Ta = 54.2 °C

Largo (cola): 9 bp

Ta = 56,3°C

Unión entre sufijo y prefijo:

Prefijo_sufijo_fwd: 5' cgctgcag gaattcgcggccgctt 3'

Largo (partidor): 16 bp

Ta = 53,5 °C

Largo (cola) : 8 bp

Ta = 57,3°C

Prefijo_sufijo_rev: 5' cgcgaaattc ctgcagcggccgct 3'

Largo (partidor): 14 bp

Ta= 52,7 °C

Largo (cola) : 9 bp

Ta = 57,3°C

Partidores específicos para realizar el mismo ensamblaje Ptet-cl + Pcl-Lacl en pET22b:

Unión entre Ptet-cl y Pcl-Lacl :

Pcl _ cl_Rev: 5' ggccgcaaa gta tat aaa cgc aga aag gcc c 3'

Largo (partidor): 22 bp

Ta = 60,1 °C

Largo (cola): 9 bp

Ta (cola) = 51,4°C

cl _Pcl _Fwd: 5' tttatatac ttc gcg gcc gct tct ag 3'

Largo (partidor): 17 bp

Ta = 57,3 °C

Largo (cola): 9 bp

Ta = 51,4 °C

Unión entre Ptet-cl-Pcl-Lacl y pET22b :

pET22_Ptet_Fwd : 5' ctcgatcccgcgaaat gag tcc cta tca gtg ata gag 3'

Largo (partidor): 21 bp

Ta = 59,5 °C

Largo (cola): 16 bp

Ta= 50,6°C

pET22_Lacl_Rev : 5' cgg gct ttg tta gca g ctg cag cgg ccg cta c 3'

Largo (partidor): 16 bp

Ta = 58,4°C

Largo (cola): 16 bp

Ta = 50,6°C

Para amplificar el vector pET22b:

pET22_Rev: 5' atttcgcgggatcgagatctc 3'

Largo: 21 bp

Ta = 61,2 °C

pET22_Fwd: 5' ctgctaacaagcccgaagg 3'

Largo : 21 bp

Ta = 61,2 °C

Reconstrucción de los ORFs con RBS correctos. Tienen las mismas características que los partidores con RBS erróneo, pues sólo se cambió el orden de escritura de la cola, no su contenido.

Reconstrucción PLacl-TetR:

TetR_PLacl_RV: 5' gtatttctccttttcttagta tggctcagtatcttgttatcc 3'

PLacl_TetR_FW: 5' tagagaaaggaggagaaatactag atgtccagattagataaaagtaaagt 3'

Reconstrucción Ptet-cl:

cl_PTet_RV: 5' gtatttctccttttcttagta tggctcagtatcttctatcact 3'

PTet_cl_FW: 5' tagagaaaggaggagaaatactag atgagcacaagaaaccattaac 3'

Reconstrucción pcl-Lacl:

Lacl_Pcl_RV: 5' gtatttctccttttcttagta gcaaccattatcaccgcca 3'

Pcl_Lacl_FW: 5' tagagaaaggaggagaaatactag atggatgaatgtgaaaccagtaac 3'

Unión a vectores receptores:

Unión a pSB1C3:

pSB1C3_Fwd: 5' cag atg gag ttc tga ggt cactactggatctatcaacagg 3'

Largo (partidor): 22 bp

Ta = 58,4 °C

Largo (cola): 18 bp

Ta = 53,8 °C

pSB1C3_Rev: 5' ACCTCAGAACTCCATCTGGAT 3'

Largo: 21 bp

Ta = 59,5 °C

Unión a pET22b:

VF2_pET22b: 5' ctc gat ccc gcg aaa t tgccacctgacgtctaagaa 3'

Largo (partidor): 20bp

Ta = 58,4 °C

Largo (cola): 16 bp

Ta = 50,6 °C

VR_pET22b: 5' cgg gct ttg tta gca g at tac cgc ctt tga gtg agc 3'

Largo (partidor): 20bp

Ta = 58,4 °C

Largo (cola): 16 bp

Ta = 50,6 °C

Anexo 9.2 – Preparación de células quimiocompetentes

1.- Preparación de Células Quimiocompetentes:

Materiales:

0,1 M CaCl₂ (para 300 mL --> 3,3g CaCl₂ x2H₂O)

0,1 M MgCl₂ (para 100 mL --> 1 g MgCl₂ x6 H₂O)

85% v/v + 15% glicerol (para 50 mL = 42,5 mL CaCl₂ 0,1M + 7,5 mL glicerol)

Métodos:

- Iniciar el precultivo de *E. coli* en medio LB (3mL) a 37 °C, overnight.
- Inocular LB nuevo a una razón de 1/100 con el precultivo.
- Esperar la OD_{600nm} = 0,2-0,3 (90mn aprox).
- Incubar en hielo por 10 mn.
- Centrifugar 10 mn a 3000 rpm a 4°C.
- Resuspender el pellet en MgCl₂ 0,1 M a 1/4 del volumen del cultivo inicial.
- Incubar 5 mn en hielo.
- Centrifugar 10 mn a 4000 rpm a 4°C.
- Resuspender en CaCl₂ 0.1 M 1/20 del cultivo inicial. Incubaron 20 min en hielo.
- Centrifugar por 10 min a 4000 RPM
- Resuspender el pellet en (85% v/v CaCl₂ 0,1 M , 15% glicerol) a 1/50 del volumen inicial del cultivo.
- Alicuotar en fracciones de 50 µL en tubos de 1,5 mL y guardar a -80°C.

2.- Quimiotransformación:

- Mezclar 100 uL de células quimiocompetentes con 5 uL de ligación.
- Dejar en hielo por 20 mn.
- Incubar a 42°C por 55" - 1'
- Dejar en hielo por 3 min
- agregar 900 µL de medio LB

Anexo 9.3 – Resuspensión y replicación de las partes del kit iGEM

Nota: Se estiman 2-3 [ng] de ADN en cada pocillo, por lo que se asume que se transformará con 200-300 [pg/ul]. Además, las placas del Kit contienen ADN liofilizado, por lo que es estable a temperatura ambiente. No obstante, una vez el ADN es resuspendido en cualquiera de sus pocillos, se recomienda almacenar las placas con su cubierta plástica a -20 [°C].

Materiales:

- el kit iGEM,
- puntas p10
- micropipeta p10
- agua libre de nucleasas o estéril

Métodos:

1. Seleccionar la placa e identificar el pocillo del *biobrick* registrado.
2. Con la pipeta a utilizar, perforar la cubierta de aluminio correspondiente sólo al pocillo que contiene el *biobrick* deseado. Asegurarse de orientar correctamente la placa.
3. Añadir 10 [ul] de agua destilada al pocillo. Pipetear arriba y abajo un par de veces por todo el pocillo. Dejar reposar por 5 [min] para asegurarse de resuspender completamente el contenido. La solución se volverá rojiza si se efectuó correctamente. Aspirar completamente y traspasar a un tubo de microcentrífuga rotulado con el código del *biobrick*. Almacenar a -20 [°C].
4. Transformar con 1 [ul] del ADN resuspendido las células competentes a usar y plaquear en agar con el antibiótico apropiado. Dejar crecer por una noche.
5. Picar una colonia para realizar un cultivo líquido (nuevamente con el antibiótico adecuado) y dejar crecer por 16 [h].
6. Realizar un stock de glicerol del cultivo y almacenar a -80 [°C]. Luego continuar con la extracción del ADN mediante miniprep.
7. Cuantificar concentración de ADN.

Anexo 9.4 - Plaqueo por método de extensión

Materiales:

- Vaso precipitado con etanol 70% y rastrillo artesanal de pipeta pasteur
- Placas Petri plásticas o de vidrio
- Medio LB agar previamente calentado y homogeneizado.
- Puntas autoclavadas p10, p200

Métodos

- 1.- Verter el agar en las placas (con o sin antibiótico, según corresponda) y esperar unos 10 minutos a que gelifique.
- 2.- Si no se tiene un rastrillo se puede preparar uno utilizando una pipeta pasteur ; se va torciéndola bajo mechero, generando un ángulo de 60° para formar un triángulo; es importante que la base del triángulo quede lisa y uniforme para un correcto plaqueo.
- 3.- Agregar los volúmenes correspondientes (generalmente 100µ de cultivo) sobre la placa (bajo mechero o en campana).
- 4.- Flamear el rastrillo y esperar que enfríe. Posteriormente estirar en forma concéntrica girando la placa con la mano; estirar el caldo alicuotado hasta que se seque el medio de cultivo y luego guardar la placa en forma invertida para evitar deshidratación.
- 5.- Rotule según corresponda (fecha, componentes de medio selectivo, muestra transformación, volumen cargado) Ex: LB - Cloranfenicol - 1-/07/2015 - Muestra 1.
- 6.- Incubar a 37°C durante 16 horas.

Anexo 9.5 - Cultivo líquido y Stock en glicerol

Cultivo líquido

- Usar tubos falcon de 15 mL o tubos de ensayo de vidrio estériles..
- Agregar 5 mL de medio LB autoclavado y el antibiótico con la concentración correspondiente: ampicilina 10mg/mL o cloranfenicol 25 mg/mL. En ambos casos, para esas concentraciones stock, se agrega 1 μ L de antibiótico por cada 1mL de medio LB.
- Picar cuidadosamente una colonia con la punta de una pipeta y soltarla dentro del tubo, evitando que la pipeta toque las paredes del tubo. Asegurarse de cerrar bien la tapa del tubo y rotular.
- Incubar a 37 °C durante 16 horas.

Stock en glicerol

- Tomar 700 μ l del cultivo líquido crecido y mezclar con 300 μ l de glicerol 80% (total 1 mL) por inversión en un tubo de 1.5 [ml].
- Almacenar el stock a -80 °C.

Anexo 9.6 – Miniprep

Materiales:

- Kit de lisis alcalina para miniprep, que contiene: solución de resuspensión, solución de lisis, solución de neutralización, solución de lavado, solución de elución.
- Agua estéril.
- Tubos Eppendorf de 1,5 [mL] estériles.
- Columnas de purificación
- Pellets de células, cultivadas previamente.
- Puntas y micropipeta p1000.

Procedimiento:

1. Resuspender el pellet en 250 μ L de solución de resuspensión, por agitación mediante vortex. Verificar que todas las células estén resuspendidas.
2. Agregar 250 μ L de solución de lisis, mezclar por inmersión, 4-6 veces, hasta que la mezcla se vea viscosa.
3. Agregar 350 μ L de solución de neutralización. Mezclar por inmersión suave, 4-6 veces.
4. Centrifugar a 14.000 rpm por 5-10 mn.
5. Traspasar hasta 800 μ L de sobrenadante a una columna de purificación.
6. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 min. Eliminar el contenido del tubo colector y volver a colocarlo bajo la columna.
7. *Opcional:* Añadir 700 [μ L] de solución lavado con isopropanol en el caso de células con actividad de nucleasas alta (ej: *E. coli* BL21DE3). Centrifugar a 14.000 rpm por 1 min. Eliminar el contenido del tubo colector y volver a colocarlo bajo la columna.
8. Lavar el DNA con 500 μ L de solución de lavado.
9. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 min. Eliminar el contenido del tubo colector y volver a colocarlo bajo la columna
10. Repetir los pasos 8 y 9.
11. Centrifugar nuevamente a 14.000 rpm durante 1 mn para eliminar los restos de la solución de lavado.
12. Transferir la columna (sin el tubo colector) a un tubo de 1,5mL estéril.
13. Agregar 20-50 μ L de solución de elución o de agua estéri y dejar a temperatura ambiente durante 2-5m.
14. Centrifugar por 2 min a 14.000 rpm y desechar la columna.
15. Cuantificar la solución eluida y guardar a -20 °C.

Anexo 9.7 - Resuspensión partidores

Metodología:

- Se debe registrar la cantidad de [nmoles] rotulada en cada tubo
- Se debe añadir un volumen de H₂O igual a [nmoles x 10]
- Se prepara una solución a 5 [uM] para usar en la reacción de PCR, mezclando 5 ul de stock + 95 ul de H₂O en un tubo de 0,6 ml.

Ejemplo: Partidor con 29.8 nmol: se deben añadir 298 ul de H₂O para obtener una concentración stock de 100 uM

Anexo 9.8 – Preparación del cóctel para reacción de PCR

Para las enzimas DNA Pol ymerase Phusion o KOD, en un tubo de 0,2 mL agregar:

5X Phusion HF o GC Buffer	10 uL
2 mM dNTP*	5 uL
5 uM FW primer	5 uL
5 uM RW primer	5 uL
Template DNA	1 uL
DNA polymerase	0.5 uL
<u>Nuclease Free Water</u>	<u>23.5 uL</u>
TOTAL	50 uL

**Preperación stock de dNTP*

En tubo de 0,2 ml agregar 2 ul de cada dNTP a 100 uM y 92 ul de H₂O esteril.

***Preparación solución primer 5 uM*

Ver Anexo 7.

Programa para 30 ciclos:

Start: 94°C x 2mn

Inicio del ciclo

Denature: 94°C x 15 s

Annealing: Ta °C x 35 s

Extension: 72°C x (30-60 s por 1000bp)

Fin del ciclo

Para la enzima DNA Taq Polymerase, en un tubo de 0,2 mL agregar:

5X Green Buffer	4 uL
MgCl ₂	3,2 uL
2 mM dNTP*	2 uL
5 uM FW primer	2 uL
5 uM RW primer	2 uL
Template DNA	0,6 uL
DNA polymerase	0.1 uL
<u>Nuclease Free Water</u>	<u>6,1 uL</u>
TOTAL	20 uL

Programa para 30 ciclos:

Start: 95°C x 2mn

Inicio del ciclo

Denature: 95°C x 30 s

Annealing: Ta °C x 30 s

Extension: 72°C x (60 s por 1000bp)

Fin del ciclo

Extension: 72°C x 5mn

Anexo 9.9 – Protocolo de purificación en gel

El siguiente protocolo es para el kit **GeneJET Gel Extraction Kit**.

Todas las etapas de purificación son realizadas a temperatura ambiente.

Todas las centrifugaciones se realizan en una centrifuga de mesa a 12.000g (que corresponde a un rango de 10.000 - 14.000 rpm, dependiendo del rotor de la centrifuga)

- 1.- Cortar la banda del gel utilizando un bisturí, tratando de cortar el tamaño más pequeño posible para reducir en lo posible la cantidad de gel a purificar y deposítelo en un tubo de 1.5 mL. (si el material genético a purificar va a ser posteriormente secuenciado, es importante disminuir en lo posible el uso excesivo del transiluminador UV, para evitar la formación de dímeros de timina y provocar mutaciones)
- 2.- Agregar un volumen de 1:1 del **binding buffer**. Ejemplo: agregue 100 uL de buffer por cada 100 mg de gel de agarosa (para esto debe pesar su tubo en la balanza analítica, utilizando como referencia TARE un tubo eppendorf vacío). En el caso de trabajar con geles de mayor porcentaje de concentración (1,5 - 2%) deberá agregar 2 volúmenes de **binding buffer** por cada 100 mg de gel.
- 3.- Incubar el gel a 50 - 60°C durante 10 minutos, hasta que el gel se disuelva completamente. Asegurarse que el gel esté completamente disuelto y agitar con vortex si es necesario. Se debe chequear que el color de la solución torne de un color amarillo, lo que indica que se encuentra en el pH óptimo para la unión del DNA a la columna de purificación del kit. Si la solución es naranja o violeta, se deberá agregar 10 uL de acetato de sodio 3 M a pH 5,2 y mezclar. El color deberá volverse amarillo.
- 4.- Opcionalmente, si es que el tamaño del fragmento a purificar es menor a 500 bp o mayor 10 kb, agregar 1 volumen de isopropanol a la solución de gel diluido.
- 5.- Transferir hasta 800 uL de la solución a la columna morada del kit. Centrifugue por 1 min a 14.000 rpm. Si es que la solución posee más de 800 uL, repetir este paso con la solución remanente.
- 6.- Agregar 700 uL de la solución **Wash Buffer**, reposar 1 min la columna y luego centrifugar por 1 min a 14.000 rpm. Descarte del flujo del tubo colector y vuelta a ponerlo en la columna.
- 7.- Agregue nuevamente 700 uL de la solución **Wash Buffer**, espere reposar 1 min la columna y luego centrifugar por 1 min a 14.000 rpm. Descartar el flujo del tubo colector y volver a ponerlo en la columna.
- 8.- Centrifugar nuevamente por 1 min a 14.000 rpm (sin agregar nada) con el fin de secar la columna. Descartar lo que pueda quedar en el tubo colector si es necesario.
- 9.- Transferir la columna a un tubo eppendorf nuevo (previamente rotulado) y agregar 20-50 uL de la solución **Elution Buffer** cuidadosamente, apuntando con precisión al centro de la columna y reposar por 3 min. En este paso es clave que el buffer de elución quede totalmente absorbido en la membrana y que no quede en las paredes o en el marco de goma que sujeta la membrana, de lo contrario se reducirá dramáticamente la concentración final obtenida.
- 10.- Centrifugar por 1 min a 14.000 rpm, rescatando la solución eluida en el tubo eppendorf nuevo.
- 11.- Cuantificar, rotular y almacenar -20°C.

Anexo 9.10 – Protocolo para realizar reacciones de Gibson Assembly

Preparación del Master Mix 2X para reacción de Gibson Assembly.

5X isothermal buffer	10 uL
T5 exonuclease	0,2 uL
Phusion DNA Pol	0,6 uL
DNA Taq ligase	5 uL
Agua s/n nucleasas	9,2 uL

TOTAL	25 uL

Se alícuota este volumen en 5 tubos de 0,2 mL que se almacenan a -20 C.

El rango permitido teórico (NEB) para realizar ensamblajes mediante Gibson Assembly es una cantidad total de ADN entre 0,02-0,5 pmol. En la práctica, se lograron ensamblajes con una cantidad de 0,8 pmol pero la reacción perdió en eficiencia bajo 0,1 pmol.

Para determinar la cantidad de ADN en [pmol/μL] de una muestra a partir de su concentración en [ng/μL], se ocupa la formula siguiente:

$$[\text{pmol}/\mu\text{L}] = [\text{ng}/\mu\text{L}] * 1000 / (\text{largo [bp]} * 650),$$

650 siendo el peso molecular del ADN en g/mol.

A los 5 μL del Master Mix, se agregan los dos fragmentos a ensamblar y agua estéril si necesario para que el volumen total de reacción sea de 10 μL.

Los fragmentos se mezclan en proporción 1:1, salvo si uno mide 200bp o menos, aquel caso se tiene que multiplicar por 5 la cantidad del fragmento pequeño. En el caso de una ligación en un vector, se mezcla 2 a 3 veces más de inserto que de vector.

Anexo 9.11 - Electroforesis de ADN con GelRed

- Pesar la cantidad de agarosa correspondiente a la resolución del gel que se quiere tener. Ej: pesar 1g de agarosa para un gel a 1% de agarosa.
- Agregar 100 mL del buffer TAE 1X.
- Calentar en microondas para que se disuelva totalmente el polvo de la agarosa en el buffer TAE.
- Dejar enfriar hasta aproximadamente 60°C.
- Agregar 3 uL de gelRed y agitar hasta que se homogeneice
- Cargar en cama. Si es que va a purificar muestra debe limpiar todo el material.
- Cargar 3-5 uL del marcador de peso molecular deseado (ej: 1kbp Plus Ladder) y en los otros pocillos cargar alrededor de 5 uL de muestra.
- Correr el gel a 90 V (en el caso de las cámaras medianas), durante 40 min. Si se ocupa la cámara más pequeña no sobrepasar 45-50V. Las cámaras más grandes pueden aguantar hasta 120V.

Anexo 9.12 – Protocolo para realizar PCR colonia

1.- Diluir una picadura de colonia en 30 uL de agua destilada estéril e incubarla a 100 °C por 10 min. Luego agitar en vortex y realizar un spin con la microcentrífuga.

2.- Preparar un cocktail PCR con la enzima de baja fidelidad Go Taq Green. Se ejecuta el protocolo optimizado de 20 uL Go taq Green que se describe a continuación:

Master Mix (para 20 reacciones)

- 5X Buffer Green 80 uL

- Mg Cl₂ 64 uL

- dNTP 40 uL

- H₂O 122 uL

Total 306 uL (15.3 uL para cada reacción)

3.- En cada tubo, mezclar:

15,3 µL del Master Mix

2,0 µL de primer FW a 5mM

2,0 µL de primer RV a 5mM

0,6 µL de templado

0,1 µL de la enzima Go Taq

TOTAL : 20µL

El programa es el mismo que el mencionado en el **Anexo 8**.

Anexo 9.13 – Ensayos Digestión

Se describe a continuación la metodología para digerir fragmentos de ADN según el método del ensamble 3A, que sirve para cualquier ensayo de digestión doble (o secuencial, según aplica).

A. Digestión doble con EcoRI y PstI

Templado ADN	X	[ul] (criterio: 200 ng)
Buffer NEB 3.1 10X	2	[ul]
EcoRI	1	[ul]
PstI	0,5	[ul]
H2O	16,5-X	[ul]

TOTAL 20 uL

B. EcoRI and SpeI (recomendado hacer digestión secuencialmente)

1. SpeI

Templado ADN	X	[ul] (criterio: 200 ng)
Cut Smart Buffer 10X	2	[ul]
SpeI	0,5	[ul]
H2O	17,5-X	[ul]

TOTAL 20 uL

2. EcoRI

Templado ADN	X	[ul] (criterio: 200 ng)
NEB Buffer 3.1 10X	2	[ul]
EcoRI	0,5	[ul]
H2O	17,5-X	[ul]

TOTAL 20 uL

C. XbaI and PstI

Templado ADN	X	[ul] (criterio: 200 ng)
Buffer NEB 3.1 10X	2	[ul]
XbaI	0,75	[ul]
PstI	0,5	[ul]
H2O	15,75-X	[ul]

TOTAL 20 uL

- Incubar todas las reacciones por 2 hrs a 37°C. Luego inactivar las enzimas por 20 min a 80°C.

En el caso del ensamble 3A, después se procede a la ligación de la manera siguiente:

- Agregar 25 ng de plásmido receptor
- Agregar una cantidad equimolar del primer fragmento digerido (BioBrock A)
- Agregar una cantidad equimolar del segundo fragmento digerido (BioBrock B)
- Agregar 1 µL de buffer de la T4 DNA ligase.
- Agregar 0,5 µL de enzima T4 DNA Ligase.
- Agregar agua estéril para completar los 10 µL.
- Incubar a 16°C toda la noche.
- Inactivar a 80°C durante 20mn

Anexo 9.14 – Electroforesis de proteínas

1.- Preparación del gel

- Armar el soporte del gel con dos placas de vidrio colocadas paralelamente en el monta-placas. Las bases de cada placa tienen que estar a la misma altura para que no se filtre el contenido del gel. Para eso se prueba con agua. Si el nivel de agua no baja, se seca el contenido de las placas sin desarmar el montaje y se sigue con el protocolo.
- Preparar el gel de resolución de acuerdo a las indicaciones estandarizadas y según el tamaño de la proteína que se quiere resolver. Agregar al final el agente polimerizante. Completar con agua destilada hasta arriba de las placas para que el nivel del gel permanezca horizontal
- Dejar polimerizar durante 40mn o más. Sacar la capa de agua que se había agregado anteriormente.
- Preparar el gel concentrador de acuerdo a las especificaciones del protocolo.
- Introducir el peine y dejar polimerizar encima del gel de resolución.
- Sacar las placas del soporte y colocarlas en la cama.
- Colocar la cama en la cámara de electroforesis y sacar el peine.

2.- Preparación de la muestra

En el caso de esta memoria se prepararon las muestras de la manera siguiente.

- Centrifugación de las muestras.
- Por cada 850 μ L de células, agregar 50 μ L de buffer de carga 5X
- Calentar a 95°C durante 5-10mn.
- Centrifugar de nuevo las muestras después

3.- Corrida del gel

- Cargar en los pocillos las muestras preparadas en el punto 2.- y agregar si necesario más buffer de carga para asegurarse que las muestras caigan al fondo del pocillo.
- Agregar 3 μ L de marcador de peso molecular a los extremos del gel.
- Correr a 200V durante 45mn

4.- Revelación del gel

- Una vez el gel corrido, se desmonta el sistema y se sacan las placas de vidrio, despegándolas con agua destilada.
- Se baña el gel en solución de tinción azul y se deja agitando hasta toda una noche.
- Se recicla o se bota la solución de tinción y se agrega la solución de destinción para sacar lo que queda de la solución azul. Se deja agitando una hora.
- Se limpia con agua destilada el gel y se revela en el transiluminador de proteínas.

Anexo 9.15 – Resultados de secuenciación

Tanto para el módulo PLacl-TetR como para los módulos Ptet-cl y Pcl-Lacl, la secuencia determinada resultó fidedigna a la esperada, menos en la zona del RBS. Se muestra un ejemplo de este resultado en la **Fig. A**.

```
>Query_51037 No definition line found
Length=1306

Score = 1166 bits (631), Expect = 0.0
Identities = 681/704 (97%), Gaps = 7/704 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 1
AGTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCACATGA 60
|||||
AGTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGCAC-T-A 196
Subject 137

Query 61
TCT--CTTTCTCCTCTTTATGAT-CATGAGCACAAAAAGAAA-CATTAACACAAGAGCA 116
||
CTAGAGAAAAGAGGAGAAA TACTAGATGAGCACAAAAAGAAAACCATTAACACAAGAGCA | 255
```

Fig. A – Zona de la secuencia donde existe fuerte discrepancia entre la secuencia esperada y la secuencia analizada (cuadro rojo). Esta zona corresponde a la secuencia del RBS, con los espaciadores anterior y posterior. El porcentaje de homología es globalmente alto (círculo rojo), los 3% de diferencia corresponden mayormente a la mala secuencia del RBS. Ejemplo sacado del resultado de la secuenciación del módulo Ptet-cl.

Ninguna de las muestras con el inserto Ptet-cl-Pcl-Lacl se logró secuenciar, como se nota en la **Fig. B**.

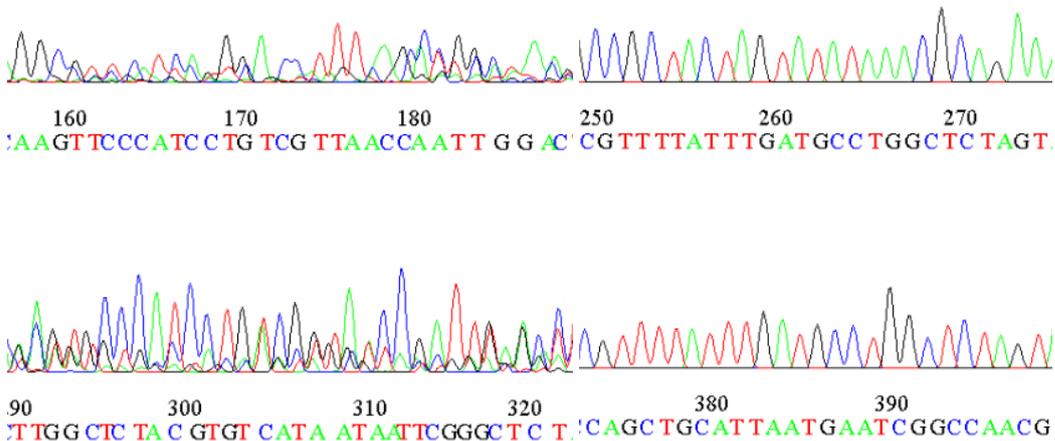


Fig. B – Comparación de dos electroferogramas. A la izquierda, una reacción de secuenciación que fracasó, donde probablemente los partidores no encontraron donde unirse. A la derecha, una secuenciación exitosa.

Todos los electroferogramas de las muestras con la suma de los insertos Ptet-cl + Pcl-Lacl se ven como en el lado izquierdo de la **Fig. B**. Al contrastar la secuencia obtenida con la esperada, el programa BLAST no encontró correspondencia relevante.

Anexo 9.16 – Gráficos obtenidos a partir del análisis de sensibilidad de los parámetros del represilador

Se indican en las **Fig. C-G** las condiciones que se probaron para realizar el análisis de sensibilidad. Arriba de cada gráfico se indica el parámetro que se varió: C corresponde a γ y b corresponde a β . Los números 1, 2 y 3 corresponden al número del módulo genético.

Por ejemplo: C1 = 5 C2 = 5 C3 = 50 corresponde a las condiciones:

γ (constructo 1) = 5;

γ (constructo 2) = 5;

γ (constructo 3) = 50.

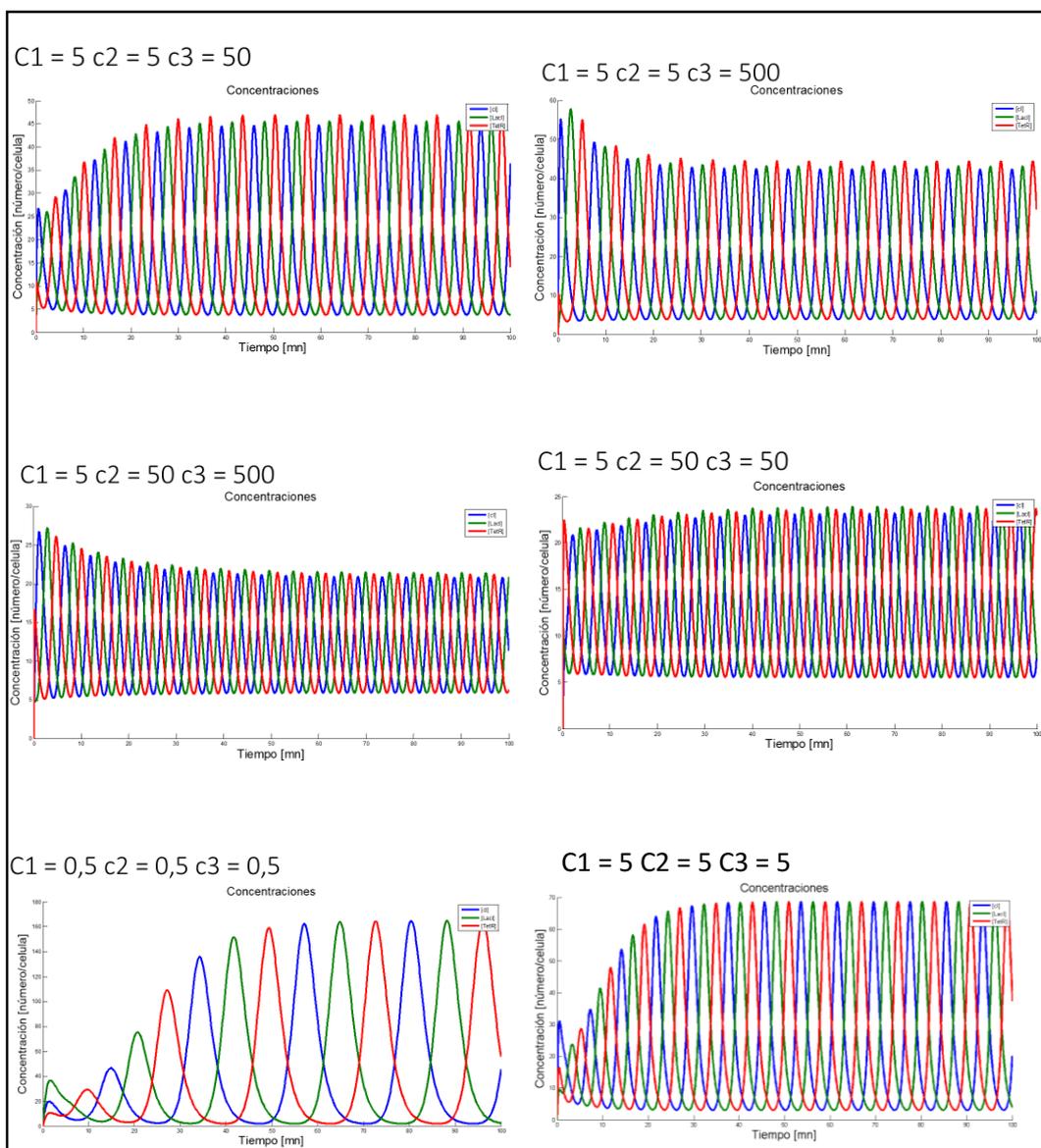


Fig. C – Condiciones en las cuales se puede observar un comportamiento oscilatorio con concentraciones similares de represores.

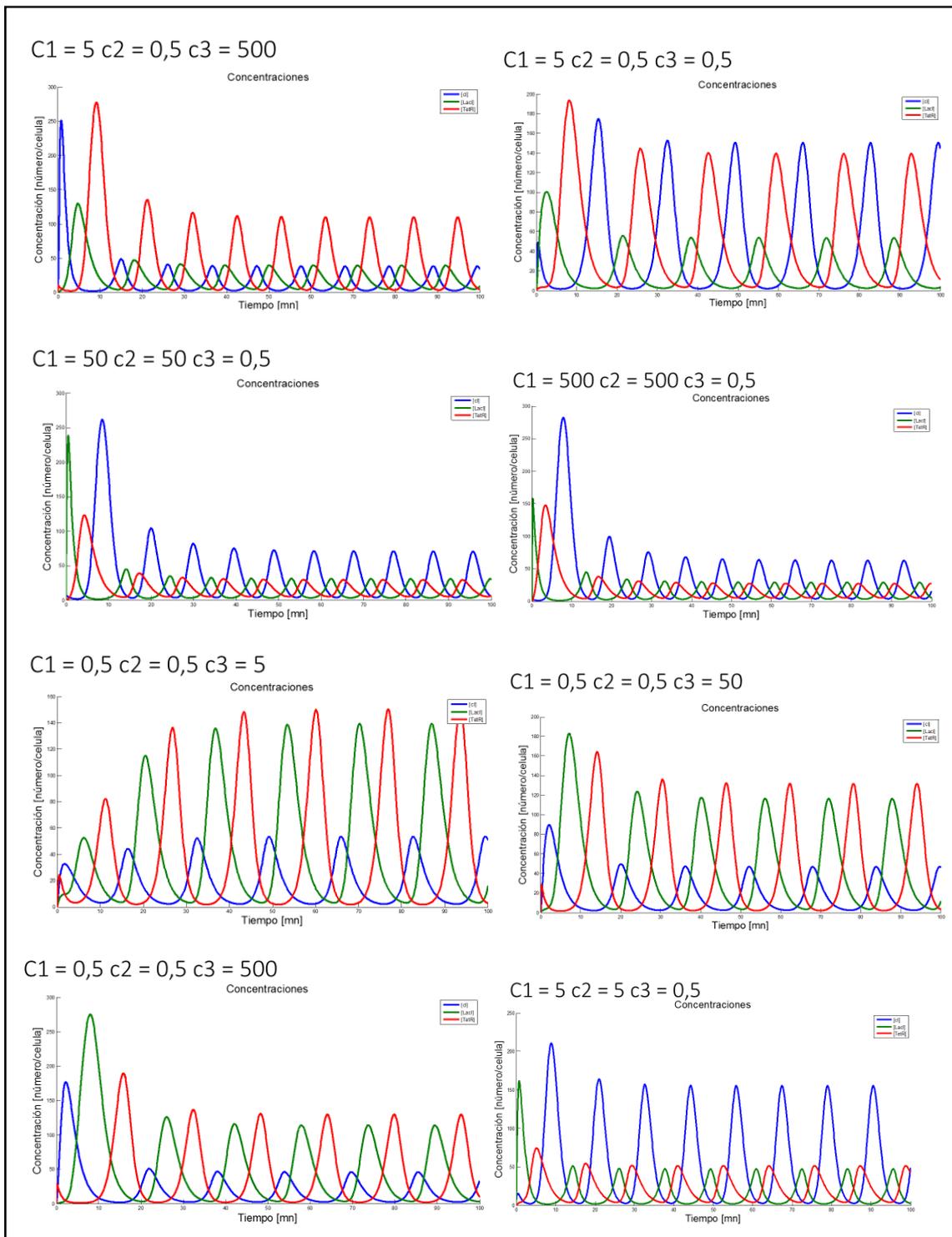


Fig. D – Condiciones en las cuales se observar un comportamiento oscilatorio con prevalencia de un represor.

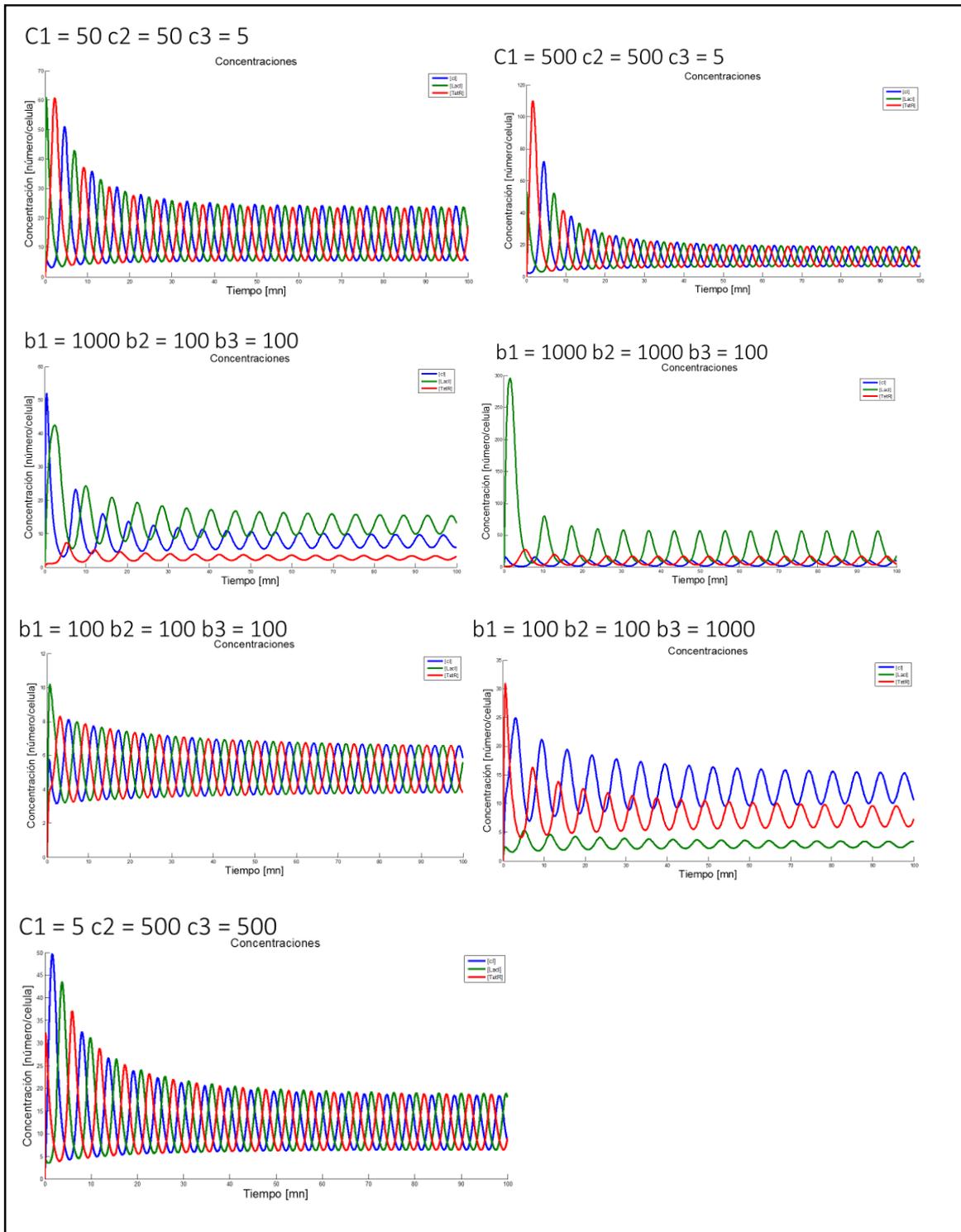


Fig. E – Condiciones en las cuales se observa un comportamiento oscilatorio pseudo-amortiguado.

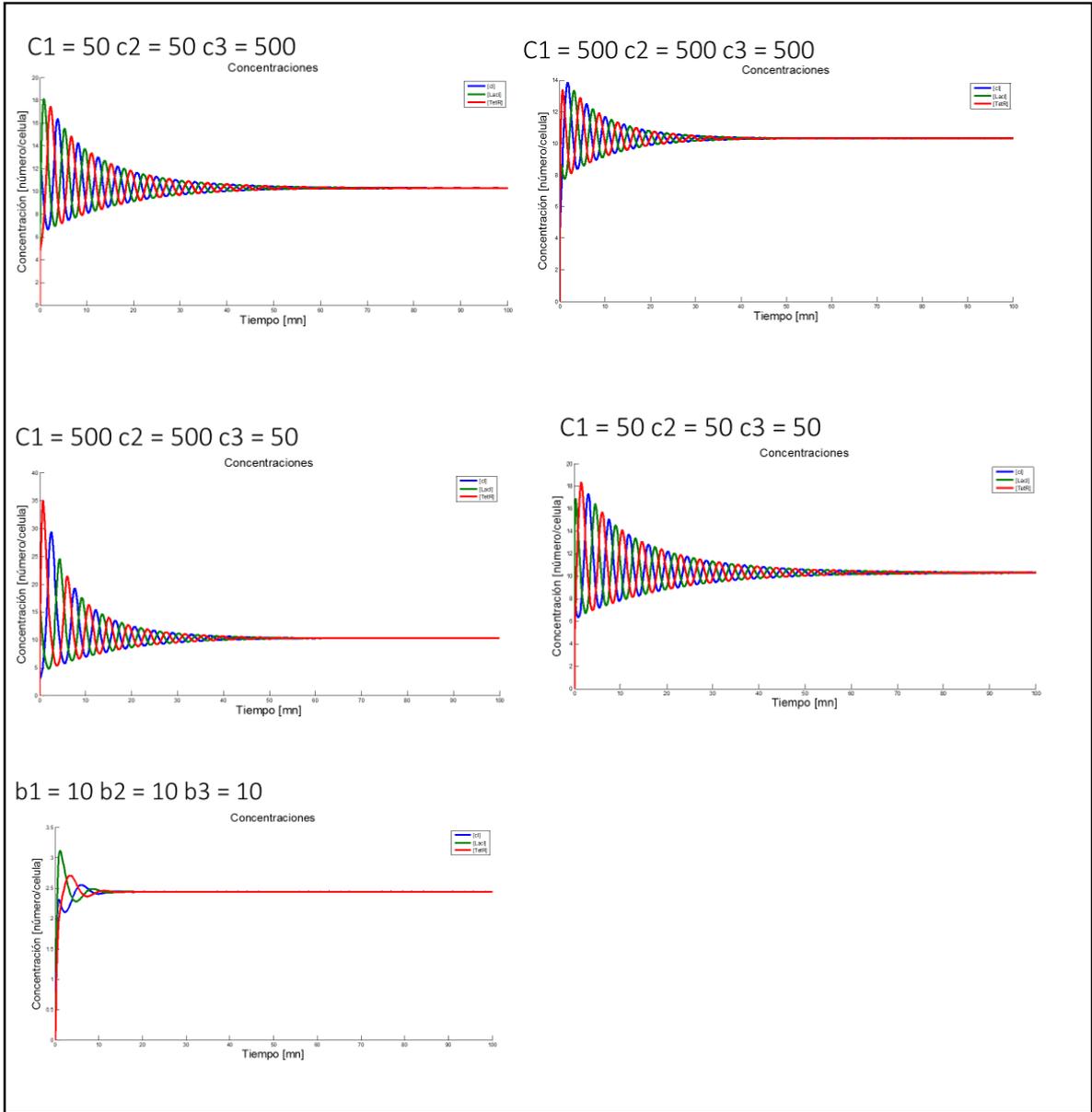
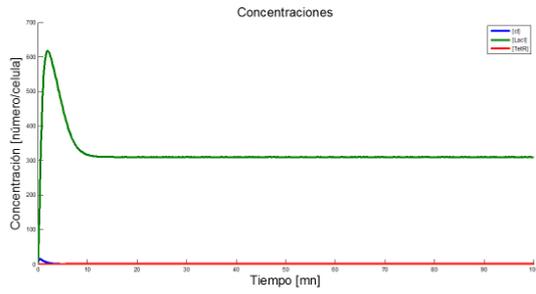
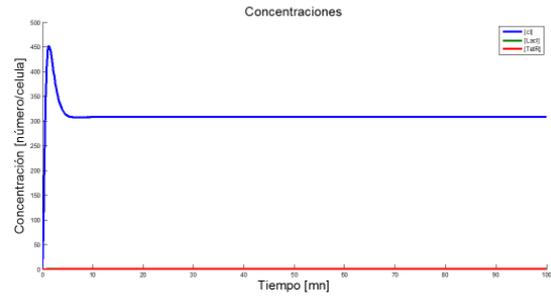


Fig. F – Condiciones en las cuales se observa un comportamiento oscilatorio amortiguado.

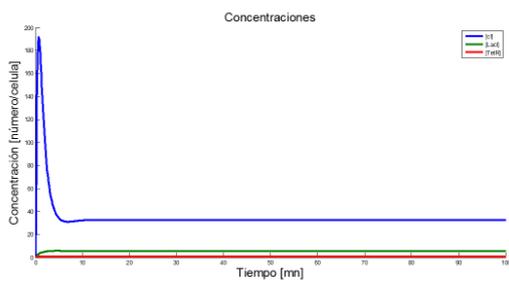
$b_1 = 1000$ $b_2 = 1000$ $b_3 = 1$



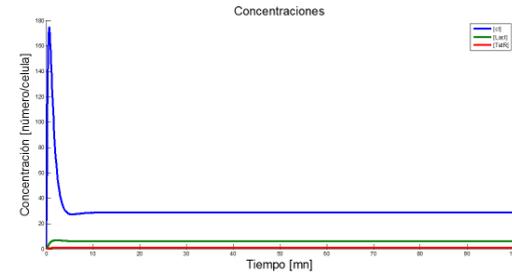
$b_1 = 1000$ $b_2 = 1$ $b_3 = 10$



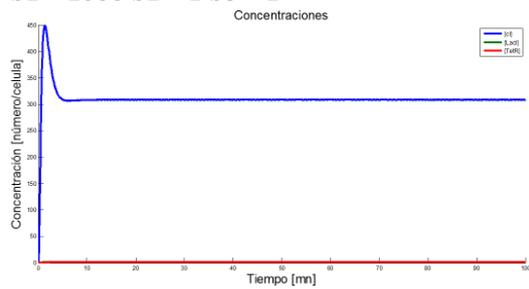
$b_1 = 1000$ $b_2 = 10$ $b_3 = 100$



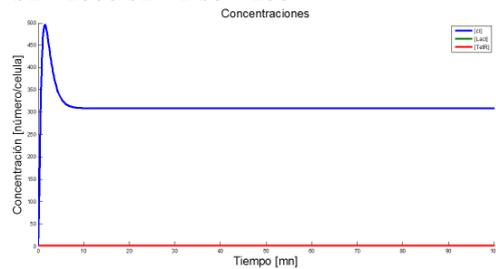
$b_1 = 1000$ $b_2 = 10$ $b_3 = 10$



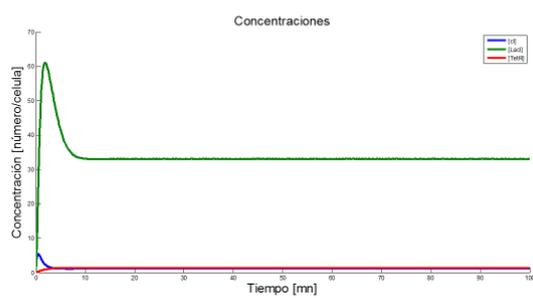
$b_1 = 1000$ $b_2 = 1$ $b_3 = 1$



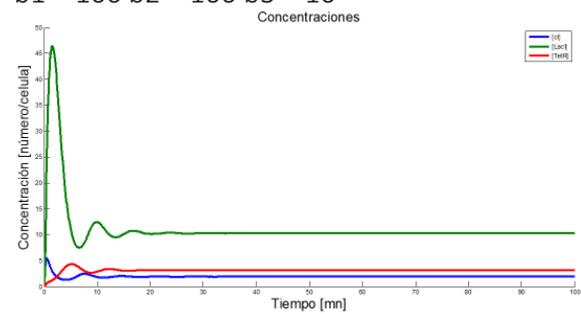
$b_1 = 1000$ $b_2 = 1$ $b_3 = 100$



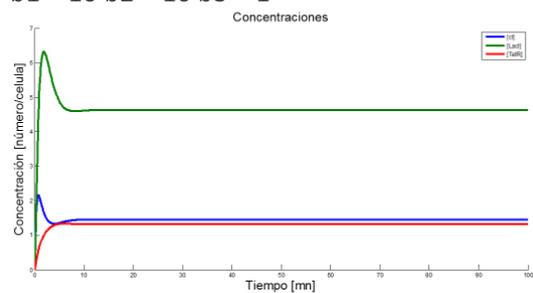
$b_1 = 100$ $b_2 = 100$ $b_3 = 1$



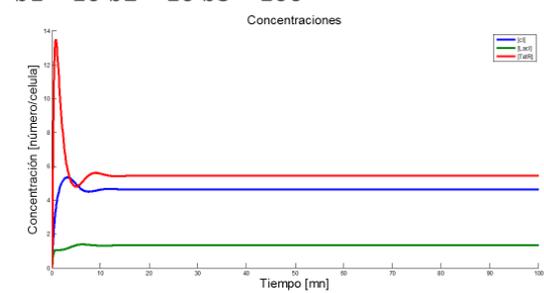
$b_1 = 100$ $b_2 = 100$ $b_3 = 10$



$b_1 = 10$ $b_2 = 10$ $b_3 = 1$



$b_1 = 10$ $b_2 = 10$ $b_3 = 100$



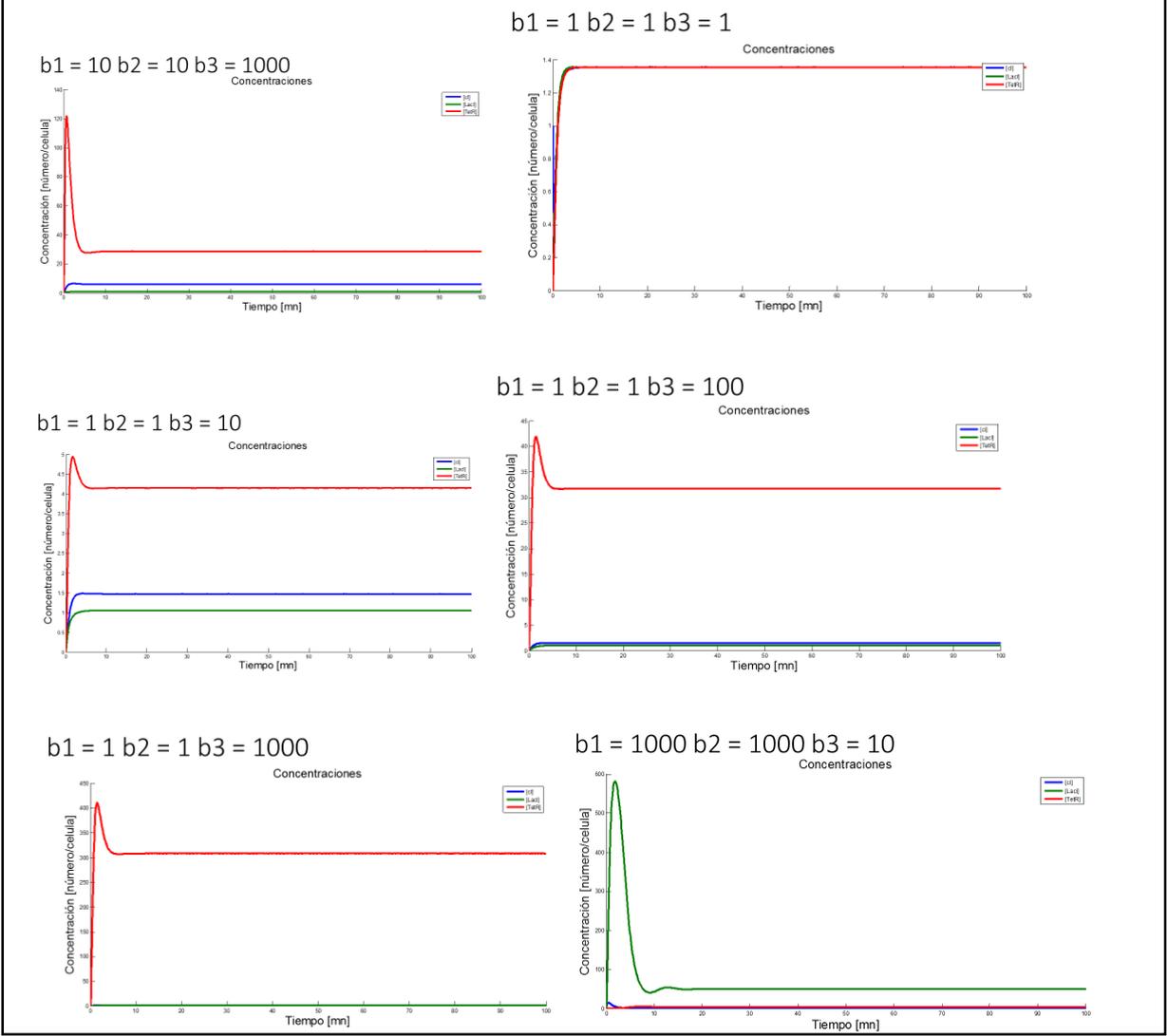


Fig. G – Condiciones en las cuales se observa un comportamiento no oscilatorio.

Anexo 9.17 – Propuesta de actividad pedagógica para el curso de BIC

Objetivos

Generales:

Entender los principios ingenieriles en los cuales se basa a Biología Sintética, identificar las analogías entre distintas disciplinas científicas como la biología, la electrónica y la informática y entender el rol de un modelo matemático.

Específicos:

- o Inferir la estructura de los circuitos genéticos implementados en el chasis biológico y representarla mediante legos.
- o Analizar la sensibilidad de los parámetros de los modelos matemáticos y concluir acerca del equilibrio del sistema.
- o Establecer analogías entre Biología, Electrónica e Informática comentando acerca de las similitudes y diferencias observables entre cada sistema.

Antecedentes

Mediante una corta charla, se explicará a los alumnos qué es la Biología Sintética, sus principios y aplicaciones.

Se presentarán también las principales partes genéticas – promotor, sitio de unión a ribosoma, secuencia codificante y terminador - y sus funciones asociadas.

Dinámica de la actividad

Parte 1

Se muestra a los alumnos la maqueta del circuito electrónico en funcionamiento y un vídeo acelerado de las oscilaciones del sistema biológico, junto con placas de cultivo con las bacterias modificadas con el represilador. Además, se les entrega los archivos de la simulación que vienen adjuntos [en el informe del trabajo guiado], permitiendo acceder a más información acerca del fenómeno que están observando.

Se pide a los alumnos inferir, a partir de la observación de los osciladores y de las simulaciones, la estructura del constructo genético que se insertó en las bacterias. Se detallan las convenciones y reglas del juego en el [informe del trabajo guiado].

Parte 2

Una vez el circuito armado, se pide a los alumnos estudiar el código de la simulación del represilador. Al respecto, los alumnos tendrán que responder las preguntas siguientes: ¿Qué efecto tiene el tiempo de degradación de una proteína con respecto a él del ARNm sobre la estabilidad del sistema?

¿Cómo se ve afectada la estabilidad del sistema si los tres promotores tienen una expresión basal fuerte?

¿Qué importancia tiene que los promotores sean débiles o fuertes?

Conclusión

En base a lo que observaron de los comportamientos de los sistemas biológicos y electrónicos, se pide a los alumnos que establezcan analogías entre estas dos disciplinas, resaltando las semejanzas y diferencias que notaron a lo largo de la actividad. Se pide también que concluyan acerca del papel de los modelos matemáticos en los cuales se basaron las simulaciones.

Anexo 9.18 – Recursos utilizados durante la memoria

Recursos informáticos	Tipo
MatLab	Licencia propia
Ape	Libre
LTSpiceIV	Libre
Oligocalc	Libre
NEBicalculator http://nebicalculator.neb.com/#!/ligation	Libre
NEBuilder Assembly Tool http://nebuilder.neb.com/	Libre
Bioinformatics Reverse Complement http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html	Libre
Protein Translator: http://web.expasy.org/translate/	Libre
Protein Molecular Weight Calculator: http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html	Libre
BLAST http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Libre

Servicios	Costo [CLP]
Síntesis química de partidores	310 000
Secuenciación	62 000

Asesores	Rol
Miguel Patiño	Coordinador del laboratorio de electrónica de la FCFM
Diego Bastias	Alumno memorista del DIE
Jose Duguet	Doctorado del CeBiB
Diego Lagos	Magíster del CeBiB

Recursos físicos
DNA Phusion Polimerasa
5x Buffer Phusion Polimerasa
dNTPs
EcoRI
SpeI
PstI
XbaI
NEBuffer 3.1
CutSmart Buffer 10X
Isothermal Buffer 5X
T5 exonucleasa
DNA Taq Ligasa
LB medio
Agar
Agarosa
Ampicilina
Cloranfenicol