

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 testeado 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