

## Tabla de Contenido

1.	Introducción .....	1
1.1.	Motivación .....	1
1.2.	Marco Teórico .....	4
1.3.	Objetivos .....	10
2.	Metodología .....	11
2.1.	Técnicas de Biología Molecular .....	11
2.1.1.	Diseño de partidores .....	11
2.1.2.	Extracción de ADN plasmídico .....	11
2.1.3.	Reacción de polimerasa en cadena (PCR) .....	12
2.1.4.	Digestión con enzimas de restricción y Ligación .....	13
2.1.5.	<i>Gibson Assembly</i> .....	13
2.1.6.	Transformación de células quimiocompetentes .....	13
2.2.	Técnicas de Proteínas .....	14
2.2.1.	Cultivo e inducción .....	14
2.2.2.	Tratamiento con tripsina .....	15
2.2.3.	Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	15
2.2.4.	Curvas de liberación .....	16
3.	Resultados .....	17
3.1.	Etapas I y II .....	18
3.2.	Etapa III .....	23
3.3.	Etapa IV .....	26
4.	Discusiones .....	30
4.1.	Etapas I y II .....	30
4.2.	Etapa III .....	32
4.3.	Etapa IV .....	36
4.4.	Discusión General .....	42
5.	Conclusiones .....	45
6.	Bibliografía .....	46
7.	Anexos .....	48
7.1.	Recetas de <i>buffer</i> isotérmico 5X y Master Mix 2X .....	48
7.2.	Protocolos de obtención y transformación de células quimiocompetentes .....	48
7.3.	Recetas de medios de cultivo y <i>buffers</i> para proteínas .....	49
7.3.1.	Medio M9-CAGlu .....	49

7.3.2. Medio TB .....	50
7.3.3. PBS .....	50
7.3.4. Fosfato-acetato 10X .....	50
7.4. Protocolo de tratamiento con tripsina .....	51
7.5. Tratamiento con <i>BugBuster</i> ® .....	51
7.6. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las variantes generadas.....	51
7.7. Heurística para la inclusión de significancia estadística en curvas de liberación .....	54