

# Tabla de contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
ANTIBIOGRAMA.....	4
MODELOS DE ESCALA GENÓMICA .....	5
ESTUDIO DE PERFIL METABÓLICO.....	6
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS ESPECIALIZADOS PRODUCIDOS POR <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34.....	6
PRESENTACIÓN DEL PROYECTO .....	7
OBJETIVOS .....	8
<b>2. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b> .....	<b>9</b>
2.1. MATERIALES.....	9
2.2. METODOLOGÍA .....	9
<i>Etapa preliminar: Identificación y selección de genes para sobreexpresión de metabolitos intermediarios</i> .....	9
<i>Primera etapa: Construcción de reservorios biológicos para los plásmidos recombinantes</i> .....	13
<i>Segunda etapa: Conjugación de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 con <i>Sle39830</i> y <i>Sle27500</i></i> .....	17
<i>Etapa Final: Comparación de la producción de metabolitos especializados entre <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 y <i>S. leeuwenhoekii</i> C34C2.</i> .....	20
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>22</b>
SELECCIÓN DE GENES PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS INTERMEDIARIOS.....	22
GENERACIÓN DE UN RESERVORIO BIOLÓGICO DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES .....	22
CONJUGACIÓN DE <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34 CON <i>SLE39830</i> Y <i>SLE27500</i> .....	24
<i>Transformación de <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002</i> .....	24
<i>Conjugación de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 con <i>E. coli</i> ET12567/PUZ8002 <i>sle39830-pIJ10257</i> y <i>E. coli</i> ET12567/PUZ8002 <i>Sle27500-pIJ12551</i></i> .....	24
COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ESPECIALIZADOS ENTRE <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34 Y <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34 C2.....	26
<i>Análisis de la actividad antibiótica contra <i>M. luteus</i> obtenida para cada cepa de <i>S. leeuwenhoekii</i></i> .....	26
<i>Comparación del crecimiento de los cultivos de cada cepa de <i>S. leeuwenhoekii</i></i> .....	28
<i>Comparación de diferencias en abundancia de metabolitos especializados mediante el análisis de perfiles metabólicos</i> .....	31
<i>Factores que afectan la producción de proteínas recombinantes</i> .....	44
<i>Análisis de las rutas metabólicas relacionadas con el precursor clave (S)-2-methylmalonyl-CoA</i> .....	46
<i>Posibles estrategias para impulsar la producción de metabolitos especializados en <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 C2</i> .....	49
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>56</b>
<b>6. ANEXOS</b> .....	<b>66</b>
A. RUTA METABÓLICA DE PRODUCCIÓN DE CHAXAMICINAS Y CHAXALACTINAS .....	66
B. PERFILES METABÓLICOS Y PATRONES DE FRAGMENTACIÓN PARA METABOLITOS ESPECIALIZADOS DE <i>S. LEEUWENHOEKII</i> C34 EN DISTINTOS MEDIOS.....	68
1. <i>Perfiles metabólicos</i> .....	68
2. <i>Patrones de fragmentación</i> .....	69
C. EQUIPOS Y REACTIVOS.....	71
1. <i>Amplificación y purificación de DNA</i> .....	71

2.	<i>Gibson Assembly</i> .....	71
3.	<i>Digestiones</i> .....	72
4.	<i>Transformaciones</i> .....	72
5.	<i>Conjugaciones</i> .....	73
6.	<i>Cultivos de S. leeuwenhoekii C34</i> .....	73
7.	<i>Extracción de proteínas</i> .....	74
8.	<i>Bioensayos</i> .....	74
9.	<i>Peso seco</i> .....	74
D.	MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	75
1.	<i>Medios líquidos</i> .....	75
2.	<i>Medios Sólidos</i> .....	75
3.	<i>Antibióticos</i> .....	76
E.	CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y PARTIDORES.....	77
F.	PROTOCOLOS.....	82
1.	<i>Amplificación de genes</i> .....	82
2.	<i>Purificación de DNA</i> .....	82
3.	<i>Extracción y purificación de plásmido</i> .....	83
4.	<i>Digestión de genes y plásmidos con enzimas de restricción</i> .....	83
5.	<i>Ligación</i> .....	83
6.	<i>Gibson assembly</i> .....	84
7.	<i>Generación de bacterias (E. coli DH5α / E. coli ET12567/pUZ8002) quimiocompetentes con cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)</i> .....	85
8.	<i>Transformación bacteriana</i> .....	85
9.	<i>PCR de Colonias</i> .....	86
10.	<i>Stock en glicerol</i> .....	86
11.	<i>Conjugación bacteriana</i> .....	86
12.	<i>Cultivo en medio líquido de S. leeuwenhoekii C34</i> .....	87
13.	<i>Extracción de DNA genómico</i> .....	88
14.	<i>Extracción de proteínas</i> .....	89
15.	<i>Medición de peso seco</i> .....	89
16.	<i>Bioensayos</i> .....	90
G.	EJEMPLOS DE CÁLCULO.....	91
1.	<i>Cálculo de DNA para la ligación</i> .....	91
2.	<i>Prueba de hipótesis para diferencias de medias para muestras pequeñas</i> .....	91
H.	RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN.....	94
1.	<i>Secuenciación de Sle39830-pIJ10257</i> .....	94
2.	<i>Secuenciación de Sle27500-pIJ12551</i> .....	95
I.	INFORMACIÓN ADICIONAL SOBRE EL ANÁLISIS DE PERFILES METABÓLICOS.....	97
1.	<i>Datos estadísticos y pruebas de hipótesis</i> .....	97