

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Desarrollo de un Circuito Genético Sintético
Conformado por el Gen de la Proteína Verde
Fluorescente (GFP) y el Promotor *psp* de *Escherichia coli***

Proyecto de Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Felipe Gonzalo Tueros Farfán

Blgo. Alcides Guerra Santa Cruz Director del
proyecto de tesis

**Lima, Perú,
Diciembre de 2014**

Índice

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Índice..... | 2 |
| INDICE DE FIGURAS Y TABLAS | 3 |
| Introducción | 8 |
| Objetivos | 10 |
| Hipótesis y Variables | 11 |
| Antecedentes | 12 |
| Materiales y Métodos | 16 |
| Metodología | 16 |
| Cultivo de <i>Escherichia coli</i> HB101 K-12 | 16 |
| Construcción del plásmido recombinante | 16 |
| Transformación de <i>Escherichai coli</i> con el plásmido recombinante | 20 |
| Observación preliminar de la actividad del circuito sintético | 21 |
| Resultados: | 22 |
| Discusión..... | 28 |
| Conclusión | 31 |
| Recomendaciones | 32 |
| Referencia Bibliográfica | 32 |
| Anexos | 38 |

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Imagen 1. pGLO digerido con la enzima EcoRI</i> | 38 |
| <i>Imagen 2. Amplificación del gen de la GFP</i> | 38 |
| <i>Imagen 3. Colonias luego del clonamiento de la GFP en el vector TOPO</i> | 39 |
| <i>Imagen 4. Amplificación del gen de la GFP de las cepas I y B</i> | 39 |
| <i>Imagen 5. Plásmido sobre-expresor de GFP</i> | 40 |
| <i>Imagen 6. ADN genómico extraído de E. coli HB101K-12</i> | 40 |
| <i>Imagen 7. Amplificación del promotor psp de E. coli HB101K-12</i> | 41 |
| <i>Imagen 8. Digestión del vector TOPO+GFP con las enzimas SpeI y PciI</i> | 41 |
| <i>Imagen 9. Promotor psp digerido con las enzimas SpeI y PciI</i> | 42 |
| <i>Imagen 10. Vector TOPO+GFP corrido sin digerir (1), después de una doble digestión con las enzimas SpeI y PciI (2) y después de una digestión simple con PciI (3).</i> | 42 |
| <i>Imagen 11. Plasmido sobre-expresor de GFP corrido sin digerir (3), después de una doble digestión con las enzimas SpeI y PciI (2) y después de una digestión simple con PciI (1).</i> | 43 |
| <i>Imagen 12. Colonias obtenidas luego de la transformación genética con el vector TOPO ligado psp+gfp</i> | 43 |
| <i>Imagen 13. Colonias obtenidas luego de la transformación genética con el vector TOPO ligado psp+gfp</i> | 44 |
| <i>Imagen 14. Biblioteca genética</i> | 44 |
| <i>Imagen 15. Comprobación por PCR de la presencia del promotor en el plásmido</i> | 45 |
| <i>Imagen 16. Observación preliminar de la actividad del circuito genético sintético</i> | 45 |
| <i>Imagen 17. Flujoograma de la estrategia experimental, cajas azules: experimentos y cajas rojas: experimentos confirmativos.</i> | 46 |
| <i>Imagen 18. Secuencia y mapa del vector TOPO II de invitrogen. Naranja oscuro: Promotor Lac, Azul: Bgalactosidasa, Verde: Ori, Amarillo: Gen de resistencia a Kanamicina, Naranja claro: Gen de resistencia a Ampicilina y Rosado: F1 Ori (Ori de gran numero de copias).</i> | 47 |
| <i>Imagen 19. Secuencia y mapa del vector TOPOII de Invitrogen y el operon sintético psp:gfp. Naranja oscuro: Gen de resistencia a Ampicilina, Azul: B-galactosidasa, Verde: Proteina verde fluorescente (GFP), Amarillo: Gen de resistencia a Kanamicina, Rosado: F1 Ori (Ori de gran numero de copias), Rojo: Promotor Lac y Turquesa: Ori.</i> | 48 |

Dedicatoria

Dedico esta tesis a toda mi familia en especial a mis padres Gonzalo y Claudia, los cuales siempre me han brindado su apoyo incondicional y cariño, a mi hermana Lucia Tueros y a mi novia Carla Miranda.

Agradecimientos

A todas las personas que hicieron este proyecto posible en especial a mi familia, por siempre darme el aliento para seguir adelante.

A mi novia Carla por ser mi soporte y darme fuerzas en los peores momentos.

Al Profesor Alcides, por enseñarme el camino de un biólogo y por siempre guiarme en la vida profesional.

A Rodolfo Velasco, por brindarme su apoyo incondicional durante la investigación.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas por aportarme los conocimientos fundamentales para poder entender cuan maravilloso es estudiar la vida.

A Romeo Pomari, por siempre ayudarme durante la parte experimental.

A todos los miembros del Laboratorio de Microbiología en especial a Santiago, por siempre brindarme una mano con los experimentos.

A la Universidad Ricardo Palma, en especial al Señor Rector, Dr. Ivan Rodriguez Chavez y al Señor Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Dr. Tomas Agurto Saenz por ayudar al desarrollo de la ciencia y motivar la investigación en dicha casa de estudios.

A todos mis amigos que me escuchan cada vez que hablo de ciencia aunque no les interese mucho.

Al personal Administrativo de la Facultad de Ciencias Biológicas que siempre me ayudan con todos los trámites y nunca se cansan, Brendita, Violeta, Rafael, Iván y Aurelio.

Resumen

El aumento de la actividad minera en el Perú hace necesario el desarrollo de tecnologías rápidas y económicas de detección de contaminantes para su monitoreo y control. Implementando conocimientos de biología molecular y de la regulación génica podemos construir un circuito genético sintético que posibilite el monitoreo de sustancias tóxicas que generen estrés oxidativo como son los compuestos cianurados. El objetivo de esta investigación es desarrollar un circuito genético sintético conformado por el promotor de la proteína del shock por fagos (*psp*) de *Escherichia coli* y la secuencia codificante del gen de la proteína verde fluorescente (GFP). La construcción de dicho circuito se logró usando estrategias de clonamiento por topoisomerasas y clonamiento clásico con enzimas de restricción, se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar que todos los segmentos del circuito estén presentes en el vector. Los estudios preliminares de la actividad del nuevo circuito se realizaron transformando genéticamente células competentes de *E. coli*. La observación de dichas bacterias muestra una expresión de GFP continua, lo que indica que el circuito sintético está siendo activado sin estar en presencia de agentes de estrés oxidativo, lo que suponía una posible interacción con otros sistemas de regulación de estrés en la célula.

Abstract

Due to the increase of mining activity in Peru new technologies that can detect and monitor hazardous pollutants in a faster and cheaper way must be developed. Implementing molecular biology knowledge about genetic regulation we are able to construct a synthetic genetic circuit that can allow the monitoring of toxic substances that generate oxidative stress such as cyanide compounds. The objective of this research is to develop a synthetic genetic circuit from the promoter of the phage shock protein operon from *E. coli* and the complementary DNA of the green fluorescent gene (GFP). The construction of the circuit was achieved using classic cloning strategies with restriction enzymes and also more advanced strategies such as topoisomerase cloning, the polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm the presence of all the desired segments in the vector. Preliminary studies of the circuit activity were carried out by genetically transforming competent *E. coli* cells. The observation of the bacteria shows a continuous expression of GFP without any inducer, this indicates that the synthetic circuit is being activated through a possible interaction with other stress response pathway.

Introducción

La proteína verde fluorescente fue descubierta por Shimomura y colaboradores en 1962 como una proteína acompañante de la aequorina, la famosa proteína quimioluminescente de las medusas del género *Aequora*. Hoy en día ya se tiene secuenciado el gen de la proteína verde fluorescente perteneciente a la especie *Aequora victoria* y es muy usado para diferentes tipos de ensayos y experimentos científicos. Esta proteína tiene su pico de fluorescencia a λ 508 nm.

El operon de la proteína del shock por fagos (phage shock protein – (psp)) ayuda a asegurar la supervivencia de *Escherichia coli* en la fase estacionaria tardía y protege el sistema de fuerza motriz de protones de la célula frente factores adversos. Es fuertemente inducido por fagos filamentosos pIV y por porinas mutantes que no son bien instaladas en la membrana y también por otros tipos de estreses. La transcripción del operon es dependiente del factor σ^{54} . Este operon también se ve fuertemente inducido por ionoforos de protones como el CCCP (*Cianuro De Carbonilo M-Clorofenil Hidrazona*) y otros desacopladores como dinitrofenoles o ácidos grasos libres. También se conoce que los ionoforos de protones o protonoforos de ácidos débiles desacoplan la fosforilación oxidativa, transportando protones entre la bicapa de fosfolípidos en la membrana interna de la mitocondria. En las bacterias el efecto se daría a nivel de membrana plasmática. Existen diversas sustancias químicas que también causan un efecto adverso en la ruta de la fosforilación oxidativa, dentro de los cuales podemos encontrar compuestos cianurados comúnmente encontrados en sitios mineros, insecticidas como la rotenona y otros.

Los biosensores o bioreportadores son aquellos organismos que pueden detectar ciertos componentes de interés dentro de un determinado ambiente, el primer biosensor fue desarrollado por King y colaboradores en 1990, y desde su desarrollo la técnica ha sido perfeccionada y nuevos circuitos han sido creados, esto permitió un enorme crecimiento en la microbiología ambiental y biotecnología. Además de la capacidad de ser sensibles a cierto contaminante, estos biosensores dotan al investigador de un aspecto muy importante en la toxicología de contaminantes que ningún equipo por más sofisticado que sea puede hacerlo, estos biosensores permiten analizar cuanto del contaminantes es biodisponible y bioaccesible. Entendiendo por Biodisponibilidad, la fracción de la sustancia química en un sistema el cual es

libremente disponible para cruzar la membrana de un organismo, del medio al organismo en un determinado punto en el tiempo y Bioaccesibilidad, la fracción de la sustancia química que puede cruzar potencialmente la membrana de un organismo que tuviera acceso al mismo.

Los circuitos genéticos, son circuitos que involucran la activación de una serie de genes en conjunto, como es el caso del operon lactosa. El diseño de un circuito genético sintético involucra la creación de un circuito que no es posible encontrarlo en la naturaleza. Muchas veces estos circuitos sintéticos están creados a base de diferentes genes provenientes de diferentes organismos con el objetivo de manipular el metabolismo del organismo, estudiar los mecanismos traduccionales, monitorear los niveles de expresión, entre otras funciones. El diseño y creación de circuitos genéticos sintéticos es una herramienta muy poderosa tanto para el estudio de mecanismos fundamentales como también para la aplicación en áreas de relevancia.

Es así que teniendo un promotor el cual es sensible a sustancias contaminantes que generan estrés oxidativo como derivados de cianuro o insecticidas como la rotenona y un gen codificante de una proteína de fácil detección y cuantificación, es posible crear con la tecnología actual un circuito genético sintético que permita la detección de contaminantes que generen estrés oxidativo como los producidos en la actividad minera.

Objetivos

Objetivo general:

Desarrollar un circuito genético sintético conformado por el promotor del shock por fagos (*psp*) de *E. coli* y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) con posible aplicación en la biotecnología ambiental.

Objetivos específicos:

Amplificar y aislar el promotor del operon del shock por fagos (*psp*) de *E. coli* y el gen de la proteína verde fluorescente.

Construir un circuito genético conformado por el promotor del operón del shock por fagos de *E. coli* (*psp*) unido al gen de la proteína verde fluorescente.

Transformar genéticamente a cepas de *E. coli* HB101 K12 con el plásmido recombinante.

Comprobar la presencia del circuito genético en las bacterias por medio de PCR.

Hipótesis y Variables

Hipótesis general:

Si se logra clonar con éxito el gen de la proteína verde fluorescente y el promotor del shock por fagos de *E. coli* se podría construir un circuito genético sintético capaz de responder a stress oxidativo.

Hipótesis nula (H_0):

El circuito genético sintético puede ser construido con el gen de la proteína verde fluorescente y el promotor del shock por fagos de *E. coli*.

Hipótesis alternativa (H_a):

El circuito genético sintético no puede ser construido con el gen de la proteína verde fluorescente y el promotor del shock por fagos de *E. coli*.

Variable independiente:

Clonamiento del gen de la proteína verde fluorescente y el promotor del shock por fagos de *E. coli*.

Variable dependiente:

Construcción del circuito genético sintético.

Antecedentes

“Se descubrió que al infectar *Escherichia coli* con bacteriófagos Lambda se estimula la síntesis de groE, proteínas del shock por calor, involucradas en el crecimiento bacteriano. En el estudio se utilizaron distintos bacteriófagos lambda con distintas mutaciones. Los resultados también revelaron que la locación genética que inducía la producción de groE se encuentra entre los puntos terminales de las sustituciones de *bio69* y *bio262* del bacteriófago Lambda (**Kochan & Murialdo, 1982**)” ^{Ref-18}

“Se descubrió que existe un relación entre la respiración y luminiscencia de *Vibrio harveyi* en presencia del ionóforo de protones CCCP. El CCCP influye en la retoma de oxígeno afectando de esta manera la luminiscencia. Se probaron tres concentraciones de CCCP 0.1, 1 y 10 μM . (**Wada et al, 1992**).” ^{Ref-39}

“El operon phage shock protein (psp) fue descubierto al clonar fagos filamentosos IV, la sobreexpresión de la proteína PspA en las bacterias produjo una fracción importante en las proteínas totales. El operon consta de seis genes (pspA, pspB, pspC, pspD, pspE y pspF) y de varios marcos de lectura abiertos (ORFs), los cuales han podido ser expresados *in vivo* e *in vitro*. El operon también responde a una variedad de estreses ambientales y intracelulares. (**Model et al, 1997**).” ^{Ref-27}

“Se usó la fusión traduccional de genes *in vivo* en *Escherichia coli* para identificar un gen que es inducido por concentraciones nano molares de metales pesados como, Cadmio, Mercury y Zinc. También sugerimos que la fusión, la cual se encuentra en el terminal carboxilo, podría estar alterando a la funcionabilidad de la proteína. (**Babai & Ron, 1998**).” ^{Ref-3}

“Es posible reportar la expresión de la proteína del shock por fagos A cuando *E. coli* es expuesta a solventes orgánicos hidrofóbicos como n-hexano o cliclooctano. Los resultados muestran que estas bacterias tienen una fuerte reacción de estrés contra estos solventes, además la inserción

de plásmidos con el operon *psp* mejora la frecuencia de sobrevivencia de las células. **(Kobayashi *et al*, 1998)**”^{Ref-17}

“Se debe tomar en cuenta factores como las condiciones fisiológicas del organismo biosensor, cuando los mismos son destinados a aplicaciones ambientales. Alteraciones en rutas bioquímicas por compuestos encontrados en el ambiente pueden afectar la capacidad sensitiva de estos biosensores, dando como consecuencia resultados no confiables. **(Heitzer *et al*, 1998)**.”^{Ref-11}

“Fue posible desarrollar un biosensor de contaminantes ambientales a base de tolueno, logrando esto al incorporar el activador de transcripción *xyIR* del plásmido TOL de *Pseudomonas putida* a un plásmido reportero con el gen *luc*. La proteína *XyIR* es capaz de unirse con compuestos parecidos al tolueno y de esta manera activar la transcripción en su promotor. **(Willardson *et al*, 1998)**.”^{Ref-42}

“Las propiedades físicas y químicas de la proteína verde fluorescente son fundamentales para poder entender su importancia y la posible aplicabilidad de la misma en el desarrollo de tecnología. La proteína verde fluorescente fue aislada del género de medusas *Aequorea* y tiene su pico más alto de absorbancia a 508 nm de λ . **(Tsien R. Y., 1998)**.”

^{Ref-38}

“La proteína del shock por fagos E en *E. coli* es rodanasa. Una enzima mitocondrial capaz de detoxificar el cianuro en tiocianato. Análisis cinéticos del *PspE* revelaron que la catálisis ocurre por un mecanismo de desplazamiento doble como los descritos para otras rodanasas, de esta manera corroborando que *PspE* es una rodanasa. **(Adams *et al*, 2002)**.”^{Ref-1}

“La tolerancia de los microbios a metales pesados es relevante para poder discernir posibles mecanismos de detoxificación, mecanismos respiratorios, mecanismos de resistencia a antibióticos, ciclos biogeoquímicos, entre otros. El entendimiento de dichos procesos es vital para el desarrollo de nuevas alternativas para el empleo de la bioremediación en sitios contaminados. **(Spain A., 2003)**.”^{Ref-33}

“La cinética de activación y de detección de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aquorea victoria* y la proteína bioluminiscente de *Vibrio fischeri* (lux CDABE) se probaron como reporteras de la inducción de la respuesta SOS y del shock por calor. (Sagi *et al*, 2003).” Ref-31

“PspG es un gen físicamente no involucrado en el operon *psp*, pero es co-conservado y co-regulado con los genes del operon *psp*. PspG también es una proteína efectora del operon *psp*, la cual posee la capacidad de reducir la motilidad celular y es un nuevo miembro de las proteínas del shock por fagos. Esto se logró haciendo un perfil transcripcional del genoma para determinar el efecto global de la síntesis de pIV en *E. coli* (Loyd *et al*, 2004).” Ref-22

“El desarrollo de bioreporteros bioluminiscentes, tecnología de circuitos capaz de detectar luz es una alternativa viable y con gran alcance en el desarrollo de tecnologías que puedan cuantificar información acerca del ambiente, además para el empleo de esta tecnología se necesitan equipos simples que interpreten la información lumínica producida por estos organismos. (Nivens *et al*, 2004)” Ref-29

“La expresión de la phage shock protein A (PspA) en *Yersinia enterocolitica* es controlada por medio de promotores múltiples. Esta hipótesis se afianzo al construir mutantes nulos para *rpoN* y usando análisis de interposones de expresiones fusionadas al operon. Fue así como se identificaron sitios de inicio de la transcripción *RpoN* independientes localizados inmediatamente antes y después de *pspA* (Maxson & Darwin, 2006).” Ref-24

“Tradicionalmente se mide el riesgo de polución por el total de contaminante presente en un lugar determinado. Sin embargo la toxicidad del contaminante está estrechamente ligada a la biodisponibilidad del mismo, la cual puede diferir bastante de la cantidad total en el ambiente. Parámetros fisicoquímicos y biológicos influyen en el destino que pueda tener un contaminante determinado, por tal razón el empleo de Biosensores capaces de producir alguna señal al entrar en contacto con sustancias determinadas ofrece una interesante alternativa a enfoques de monitoreo ambiental. (Tecon & van der Meer, 2008)” Ref-36

“La aplicabilidad de bioreporteros en la microbiología ambiental y en la bioremediación es factible, como también los avances en las aplicaciones futuras de esta tecnología, haciendo

relevante el desarrollo de dicha tecnología. Esta tecnología promete ser una alternativa eficiente y de bajo costo para poder analizar ambientes en micro-escala, también es importante resaltar que tanto un bioreportero debe ser seguro, confiable y que pueda adoptar tecnología y rendir ante nuevos desafíos. **(Diplock et al, 2009)**” ^{Ref-9}

“El sistema *psp* evolucionó como una respuesta básica al ir incorporando genes de funciones sensoras, de señalización y efectoras gradualmente al operon. Además posee un rol importante en la respuesta fisiológica del organismo a diferentes tipos de estrés ambiental, como es el caso del pH, temperatura, osmolaridad y también por la presencia de fagos filamentosos. **(Huvet et al, 2010)** .” ^{Ref-12}

“Se desarrollaron dos variantes de dihidratasa de cianuro de *Bacillus pumilus* C1 con actividad enzimática mejorada en pH alto por mutagénesis no dirigida, para su empleo como enzimas más apropiadas para la degradación de cianuro en ambientes adversos de aplicaciones industriales. Estas variantes enzimáticas lograron soportar un pH de 10 sin perder actividad catalítica, estas enzimas tuvieron una sustitución de 3 aminoácidos comparadas con las enzimas silvestres (WT) **(Wang et al, 2011)**.” ^{Ref- 40}

Materiales y Métodos

Metodología

Cultivo de *Escherichia coli* HB101 K-12

El cultivo de la bacteria *E. coli* se realizará tanto en caldo como Agar Luria Bertanii, empleando tubos de ensayo y placas Petri. El medio de cultivo y los materiales pertinentes se esterilizarán a 121 grados Centígrados por 15 libras de presión por 15 minutos.

Construcción del plásmido recombinante

1) Aislamiento plasmídico del pGLO (kit de aislamiento plasmídico spin miniprep - QIAGEN).

Para aislar el plásmido pGLO se centrifugará un cultivo de 16 horas de bacterias transformadas con el pGLO a 8 000 rpm por 3 minutos, el pellet será resuspendido en 250 µl de Buffer P1. Una vez resuspendido el pellet de bacterias se le adicionará 250 µl del Buffer P2 y se invertirá el tubo delicadamente 6 veces, después se le añadirá 350 µl de buffer N3 y se volverán a invertir los tubos delicadamente 6 veces, luego se centrifugarán los tubos a 10 000 rpm por 10 minutos. Luego de centrifugar se llevará el sobrenadante a las columnas de spin QIAprep con ayuda de una micropipeta, se centrifugará a 13 000 rpm por 1 minuto, se descartará el líquido filtrado y se le adicionará 500 µl de Buffer PB a la columna, se centrifugará a 13 000 rpm por 1 minuto y se descartará el filtrado. Se adicionarán 750 µl de Buffer PE a la columna y se centrifugará a 13 000 rpm por 1 minuto, se descartará el filtrado y se volverá a centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto. La columna será transferida a un tubo de microcentrifuga esteril y se le adicionará 50 µl de agua grado PCR, se dejará reposar por 1 minuto y se llevará a centrifugación a 13 000 rpm por 1 minuto.

2) Amplificación de la secuencia codificante (cDNA) del gen de la proteína verde fluorescente (GFP). (Kit Platinum[®] Taq DNA Polymerase de Invitrogen).

Para la amplificación por PCR de la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente se diseñaron los siguientes primers: Forward Primer: 5'

TCTCCATACCCGTTTTTTTG 3' y Reverse Primer:

5'CTTGGCTGTTTTGGCGGATG 3'. Para una reacción de 50 μ l Se usarán los siguientes reactivos: 5 μ l de Buffer para PCR 10X (menos Mg), 1 μ l de 10mM de la mezcla de dNTP para una concentración final de 0.2mM de cada nucleótido, 1.5 μ l de 50mM MgCl₂ para una concentración final de 0.2mM, 1 μ l de cada primer a una concentración de 10 μ M para una concentración final de 0.2 μ M cada uno, 1 μ l de ADN plantilla (pGLO), 0.2 μ l de Platinum Taq ADN polimerasa para una concentración final de 1.0 unidad y 39 μ l de agua grado PCR. Las temperaturas y tiempos usados en el PCR serán los siguientes: 1) Etapa de pre-PCR a 94°C por 2 minutos. 2) Etapa de PCR – Desnaturalización: 94°C por 10 segundos, Hibridación: 55°C por 30 segundos, Extensión: 72°C por 1 minutos (25 ciclos). 3) Etapa post-PCR: 72°C por 10 minutos.

3) Inserción de la secuencia codificante (cDNA) de la GFP en el vector TOPO II. (TOPO TA cloning– Invitrogen).

Para el clonamiento del gen de la proteína verde fluorescente se usará el Kit de clonamiento TOPO TA cloning de Invitrogen. Para este paso se usará 4 μ l de producto de PCR fresco del gen de la proteína verde fluorescente, 1 μ l de solución salina (Salt Solution), agua grado PCR 1 μ l y 1 μ l de vector TOPO II. Se mezclarán los reactivos delicadamente y se dejarán incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se pondrá la reacción en hielo y se tomarán 2 μ l de la reacción para transformar genéticamente a bacterias *E. coli* competentes.

4) Aislamiento de ADN genómico de *Escherichia coli*.

El aislamiento de ADN genómico de *E. coli* se realizará usando el Kit de aislamiento de ADN genómico bacteriano de AxyPrep (AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit).

Para el aislamiento de ADN genómico de *E. coli* se centrifugará un cultivo de bacterias de 16 horas a 12 000g por 30 segundos, se descartará el sobrenadante y se resuspenderá el pellet en 150 μ l de Buffer S, conteniendo RNasas A. Se adicionará 20 μ l de lisozima y se mezclará bien, se dejará reposar a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionará 30 μ l de EDTA a 0.25 M (pH 8.0), se mezclará bien y se incubará en hielo por 5 minutos. Se adicionará 450 μ l de Buffer G-A y se llevará al vortex por 15 segundos. Después se calentará en Baño María a 65°C por 10 minutos. Se le adicionará 400 μ l de Buffer G-B, seguido de 1 ml de Buffer DV (preenfriado a 4°C). Se agitará vigorosamente y se centrifugará a 12 000g por 2 minutos. Se aspirará empleando una micro-pipeta la fase superior sin disturbar la interfase y se descartará. Se adicionará 1 ml de Buffer DV (preenfriado a 4°C) a la interfase y fase baja, se agitará vigorosamente hasta obtener homogeneidad y se centrifugará a 12 000g por 2 minutos. Se descartará la fase alta coloreada y se transferirá la fase baja a un filtro de spin, colocado en un tubo de microcentrifuga de 2 ml y se centrifugará a 12 000g por 1 minuto. Se descartará el filtro de spin y se adicionará 400 μ l de Buffer BV al filtrado y se mezclará bien. La mezcla se transferirá a una columna AxyPrep y se centrifugará a 12 000g por 1 minuto. Se descartará el filtrado y se le adicionará 500 μ l de Buffer W1 a la columna AxyPrep y se centrifugará a 12 000g por 1 minuto. Se descartará el filtrado y se le adicionará 700 μ l de Buffer W2 y se centrifugará a 12 000g por 1 minuto. Se descartará el filtrado y se le adicionará nuevamente 700 μ l de Buffer W2 y se centrifugará a 12 000g por 1 minuto. Se descartará el filtrado y se centrifugará por 1 minuto a 12 000g. Se transferirá la columna AxyPrep a un tubo de microcentrifuga estéril y adicionará 100 μ l de agua grado PCR al centro de la membrana del filtro AxyPrep, se dejará reposar por 1 minuto y se centrifugará a 12 000g por 1 minuto.

5) Amplificación del promotor del operón de la proteína del shock por fagos (*psp*).

(Kit Platinum[®] Taq DNA Polymerase de Invitrogen).

Para la amplificación por PCR del promotor del operón phage shock protein (*psp*) se diseñarán los siguientes primers con los respectivos sitios de corte para las enzimas de restricción *PciI* y *SpeI*: Forward Primer: 5' TTCCACATGTGTAAATTATCTTTGTATT 3' y Reverse Primer: 5'

CCGGACTAGTCCTGCTGAACTGTTAATAC 3'. Para una reacción de 50 µl se usarán los siguientes reactivos: 5 µl de Buffer para PCR 10X (menos Mg), 1 µl de 10mM de la mezcla de dNTP para una concentración final de 0.2mM de cada nucleótido, 1.5 µl de 50mM MgCl₂ para una concentración final de 0.2mM, 1 µl de cada primer a una concentración de 10 µM para una concentración final de 0.2 µM cada uno, 1 µl de ADN plantilla (pGLO), 0.2 µl de Platinum Taq ADN polimerasa para una concentración final de 1.0 unidad y 39 µl de agua grado PCR. Las temperaturas y tiempos a usar en el PCR serán los siguientes: 1) Etapa de pre-PCR a 94°C por 2 minutos. 2) Etapa de PCR – Desnaturalización: 94°C por 10 segundos, Hibridación: 49°C por 30 segundos, Extensión: 72°C por 20 segundos (30 ciclos). 3) Etapa post-PCR: 72°C por 10 minutos.

6) Doble digestión del vector TOPO II y del producto de PCR del promotor (*psp*) con las enzimas de restricción *PciI* y *SpeI*.

Se preparará un volumen total de 20 µl, de los cuales 3 µl serán del ADN plantilla (plásmido TOPO II conteniendo la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente – promotor *psp* amplificado por PCR) que se va a cortar, 13 µl de agua grado PCR, 2 µl de Buffer 10X y 1 µl de cada enzima de restricción.

7) Ligación del promotor (*psp*) con el vector TOPO conteniendo la secuencia codificante del gen de la proteína verde fluorescente (GFP), usando el Kit de T4 ligasas de Invitrogen. Para la ligación del plásmido TOPO II conteniendo la secuencia codificante del gen de la proteína verde fluorescente y el promotor *psp* amplificado por PCR se realizará una reacción de ligación de 20 µl. 4 µl de Buffer de Reacción de Ligasas 5X, un Ratio Molar de Inserto – Vector de 3:1, 1 unidad de T4 ligasas (0.2 µl) y 11.8 µl de agua grado PCR se mezclarán y se dejarán incubando a temperatura ambiente por 1 hora.

Luego se usarán 2 µl para transformar *E. coli* competentes.

Transformación de *Escherichia coli* con el plásmido recombinante

1) Obtención de células competentes de *Escherichia coli*

Se centrifugará un cultivo fresco de bacterias (10ml) a 5 600 rpm por 10 minutos, se descartará el sobrenadante y se resuspenderá el pellet en 5 ml de Cloruro de Calcio al 0.1M estéril, a continuación se procederá a centrifugar nuevamente el tubo a 1 000 rpm por 15 minutos. Se resuspenderá el pellet con 1 ml de Cloruro de Calcio al 0.1 M y se almacenarán las células competentes a -20 grados Centígrados.

2) Transformación genética de *Escherichia coli*

Se tomará 30 µl de células competentes, 250 µl de Cloruro de Calcio estéril al 0.1M y 2µl de plásmido y se mezclarán en un tubo de micro-centrífuga de 1.5 ml, se dejará reposando en hielo por 10 minutos. Se realizará el shock térmico pasando el tubo de micro-centrífuga al baño maría previamente calentado a 45 grados Centígrados por 50 segundos. Finalmente se añadirán 250 µl de caldo Luria y se dejará incubando a 37 grados centígrados por 1 hora.

3) Sembrado de bacterias transformadas

Se tomará 100 µl de bacterias transformadas con ayuda de una micro-pipeta y se depositará en una placa de Agar LB más Ampicilina, se esparcirán las bacterias en la placa con una asa de Drigalski. Una vez esparcidas las bacterias en el Agar se llevarán a incubar a la estufa a 37°C por 24 horas.

4) Elaboración de una biblioteca genética de cepas transformadas

Se tomarán 40 colonias y se repicarán en placas con Agar LB con las respectivas divisiones.

5) Confirmación por PCR de la presencia del operon sintético (psp::gfp)

Se realizara PCR a plásmidos extraídos de 10 de las 40 colonias seleccionadas utilizando el Forward primer (ttccacatgtGTAATTATCTTTGTATT) y reverse Primer CCGGACTAGTCCTGCTGAACTGTTAATAC para el promotor del operon phage shock protein. Para una reacción de 50 µl Se usaran los siguientes reactivos: 5 µl de Buffer para PCR

10X (menos Mg), 1 μ l de 10mM de la mezcla de dNTP para una concentración final de 0.2mM de cada nucleótido, 1.5 μ l de 50mM MgCl₂ para una concentración final de 0.2mM, 1 μ l de cada primer a una concentración de 10 μ M para una concentración final de 0.2 μ M cada uno, 1 μ l de ADN plantilla (plásmido psp:gfp), 0.2 μ l de Platinum Taq ADN polimerasa para una concentración final de 1.0 unidad y 39 μ l de agua grado PCR se usarán las siguientes especificaciones para la PCR: 1) Etapa de pre-PCR a 94°C por 2 minutos. 2) Etapa de PCR – Desnaturalización: 94°C por 10 segundos, Hibridación: 49°C por 30 segundos, Extensión: 72°C por 1.5 minutos (30 ciclos). 3) Etapa post-PCR: 72°C por 10 minutos.

Observación preliminar de la actividad del circuito sintético

1) Se sembraran en una placa con ampicilina una cepa de *E. coli* HB101K-12 (control), tres cepas con el plasmido pGLO, una cepa con el plasmido TOPO sin el promotor psp, dos cepas con el plasmido sintético y una cepa con el plasmido sobre expresor de la GFP.

Se incubaran en la estufa a 37°C por 24 horas.

Se visualizara la placa con en el transiluminador a 290 nm de longitud de onda.

Resultados:

i.- Construcción del plásmido recombinante

1) Aislamiento plasmídico del pGLO (kit de aislamiento plasmídico spin miniprep - QIAGEN).

Se logró extraer el plásmido pGLO usando el kit de aislamiento plasmídico spin miniprep de QIAGEN. Se verificó la presencia del plásmido extraído por medio de una electroforesis horizontal a 100 voltios por 30 minutos, usando un gel de Agarosa al 1%.

Por último se tiñó el gel usando bromuro de etidio.

El peso del plásmido obtenido es aproximado al peso teórico del pGLO (Imagen 1).

2) Amplificación de la secuencia codificante (cDNA) del gen de la proteína verde fluorescente (GFP). (Kit Platinum[®] Taq DNA Polymerase de Invitrogen).

Se amplificó el gen de la proteína verde fluorescente del pGLO usando los siguientes primers:

Forward Primer: 5' TCTCCATACCCGTTTTTTTG 3' y Reverse Primer: 5'CTTGGCTGTTTTGGCGGATG 3'. El producto de la amplificación de corrió en una electroforesis horizontal por 30 minutos a 100 voltios usando un gel de agarosa al 1%, por último se tiñó con bromuro de etidio por 10 minutos. El peso obtenido en la corrida electroforética corresponde con el peso teórico (858 pb) (Imagen 2). El programa usado para el PCR fue el siguiente: 1) Etapa de pre-PCR a 94°C por 2 minutos. 2) Etapa de PCR – Desnaturalización: 94°C por 10 segundos, Hibridación: 55°C por 30 segundos, Extensión: 72°C por 1 minutos (30 ciclos). 3) Etapa post-PCR: 72°C por 10 minutos.

3) Inserción de la secuencia codificante (cDNA) de la GFP en el vector TOPO II.

(TOPO TA cloning– Invitrogen).

Una vez clonado el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) en el vector TOPOII se incorporó el plásmido recombinante (TOPOII+GFP) a células de *E. coli* competentes, mediante una transformación por shock térmico.

Seguidamente a la transformación las bacterias fueron sembradas en placas LB suplementadas con Ampicilina, X-gal e IPTG, para poder realizar el debido “screening”.

En la placa (Imagen 3) podemos apreciar tres clases de colonias: Verdes, Azules y blancas. Las colonias verdes son bacterias que obtuvieron el plásmido recombinante TOPOII+GFP pero por anomalías genéticas aún bajo estudio, estas bacterias expresan la proteína verde fluorescente sin ningún tipo de inductor. Las colonias azules son bacterias que han incorporado el plásmido TOPOII mas no el plásmido recombinante TOPOII+GFP, son de color azul debido a que estas bacterias están expresando la β galactosidasa que hidroliza al X-gal y por consiguiente dota a la colonia un color azul. Las colonias blancas son aquellas bacterias que han incorporado el gen de la proteína verde fluorescente, por consiguiente el gen de la β -galactosidasa es truncado, interrumpiendo la hidrolisis del X-gal.

Se separaron 10 colonias blancas para estudios posteriores, a estas cepas se les denomino A, B, C, D, E, F, G, H, I, J. Se comprobó por medio de PCR que las cepas B e I poseían el gen de la proteína verde fluorescente. (Se tomaron las cepas B e I aleatoriamente) (Imagen 4).

El plásmido sobre expesor de proteína verde fluorescente también fue aislado siguiendo el protocolo de extracción de plásmido del pGLO, para futuras investigaciones y aplicaciones en el Laboratorio de Microbiología (Imagen 5).

4) Aislamiento de ADN genómico de *Escherichia coli*.

El aislamiento de ADN genómico de *E. coli* se realizó usando el Kit de aislamiento de ADN genómico bacteriano de AxyPrep (AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit). Se confirmó la extracción corriendo la muestra en un gel de agarosa al 1% por 30 minutos a 100 voltios. El peso estimado del genoma completo de *E. coli* es de 4641652 pares de bases.

5) Amplificación del promotor del operón de la proteína del shock por fagos (*psp*). (Kit Platinum[®] Taq DNA Polymerase de Invitrogen).

Se amplifico el promotor *psp* usando como base el ADN genómico aislado en el paso anterior. Se usaron los siguientes primers: Forward Primer: 5' TTCCACATGTGTAAATTATCTTTGTATT 3' y Reverse Primer: 5'

CCGGACTAGTCCTGCTGAACTGTTAATAC 3'. Luego de la amplificación el producto se corrió por 30 minutos a 100 voltios en un gel de agarosa al 2%. El peso del producto de PCR correspondió al peso teórico (176bp). (Imagen 7)

El programa usado para el PCR fue el siguiente: 1) Etapa de pre-PCR a 94°C por 2 minutos. 2) Etapa de PCR – Desnaturalización: 94°C por 10 segundos, Hibridación: 49°C por 30 segundos, Extensión: 72°C por 20 segundos (35 ciclos). 3) Etapa post-PCR: 72°C por 10 minutos.

6) Doble digestión del vector TOPO II y del producto de PCR del promotor (*psp*) con las enzimas de restricción PciI y SpeI.

Para la digestión del vector TOPOII+GFP se preparó un volumen total de 20 µl, de los cuales 8 µl fueron del ADN plantilla que se va a cortar (plásmido TOPO II conteniendo la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente), 13 µl de agua grado PCR, 2 µl de Buffer 10X y 1 µl de cada enzima de restricción (PciI y SpeI). Para la digestión del producto amplificado del promotor *psp* se usó: 10 µl de la mezcla de PCR, 18 µl de agua grado PCR, 2 µl de Buffer 10X y 1 µl de cada enzima de restricción (PciI y SpeI). En la Imagen 8 se puede apreciar la doble digestión del vector TOPOII+GFP con un peso aproximado de 4406 bp. En la imagen 9 podemos apreciar la doble digestión del producto amplificado del promotor *psp* con un peso aproximado de 156 bp.

En la Imagen 10 podemos confirmar que la doble digestión del vector TOPOII+GFP se ha llevado con éxito. En la fila número 1 se encuentra el vector TOPOII+GFP aislado de la cepa B, su peso estimado es de 4831 bp, pero su peso en el gel se muestra cercano a los 4 kb por encontrarse en su forma super enrollada. En la fila 2 se encuentra al mismo vector pero habiéndole realizado la doble digestión, peso aproximado 4406 bp. En la fila 3 podemos apreciar al mismo vector linearizado por la enzima PciI con un peso aproximado de 4831 bp, como podemos visualizar el vector de la fila 2 se encuentra en una posición de menor peso por haber perdido una secuencia de alrededor de 420 bp. Con este experimento corroboramos que la doble digestión se llevó con éxito.

El mismo experimento se realizó con el vector sobre-expresor de proteína verde fluorescente (Imagen 11). Este vector también fue doblemente digerido con éxito.

7) Ligación del promotor (*psp*) con el vector TOPOII + GFP, usando el Kit de T4 ligasas de Invitrogen.

Para la ligación del vector TOPOII + GFP y el promotor *psp* amplificado por PCR, se realizó una reacción de ligación de 20 μ l. 4 μ l de Buffer de Reacción de Ligasas 5X, un Ratio Molar de Inserto – Vector de 3:1, 1 unidad de T4 ligasas (0.2 μ l) y 11.8 μ l de agua grado PCR se mezcló y se dejó incubando a temperatura ambiente por 1 hora. Luego se usaron 2 μ l para transformar *E. coli* competentes.

ii.- Transformación de *Escherichai coli* con el plásmido recombinante

1) Obtención de células competentes de *Escherichia coli*

Se centrifugo un cultivo fresco de bacterias (10ml) a 8000 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de Cloruro de Calcio al 0.1M estéril, a continuación se procedió a centrifugar nuevamente el tubo a 8 000 rpm por 3 minutos. Se resuspendió el pellet con 100 μ l de Cloruro de Calcio al 0.1 M y se almacenaron las células competentes a -20 grados Centígrados hasta su uso.

2) Transformación genética de *Escherichia coli*

Se tomó 100 μ l de células competentes, 250 μ l de Cloruro de Calcio estéril al 0.1M y 2 μ l de plásmido y se mezclaron en un tubo de micro-centrífuga de 1.5 ml, se dejó reposando en hielo por 10 minutos. Se realizó el shock térmico pasando el tubo de micro-centrífuga al baño maría previamente calentado a 42 grados Centígrados por 50 segundos. Finalmente se añadieron 250 μ l de caldo Luria y se dejó incubando a 37 grados centígrados por 1 hora.

3) Sembrado de bacterias transformadas

Se tomó 100 µl de bacterias transformadas con ayuda de una micro-pipeta y se depositaron en una placa de Agar LB suplementada con Ampicilina, se esparcieron las bacterias en la placa con ayuda de una asa de Drigalski. Una vez esparcidas las bacterias en el Agar se llevaron a incubar a la estufa a 37°C por 24 horas. Este experimento se realizó por duplicado.

En las fotos (Imagen 12 y 13) podemos apreciar el crecimiento de 19 colonias en placas con agar LB suplementado con Ampicilina.

4) Elaboración de una biblioteca genética de cepas transformadas

Se tomaron las 19 colonias obtenidas y se repicaron en placas con Agar LB + Ampicilina con las respectivas divisiones.

En la fotografía (Imagen 14) podemos apreciar la biblioteca genética de las 19 colonias obtenidas luego de la transformación genética.

5) Confirmación por PCR de la presencia del operon sintético (*pspp::gfp*)

Para confirmar la construcción del operon sintético se amplificó el promotor *psp* de las cepas obtenidas de la ligación. Se siguió el protocolo establecido para la amplificación del promotor *psp*.

En la Imagen 15 podemos apreciar el producto amplificado del promotor *psp* de plásmidos aislados después de la ligación. Los PCR se llevaron a cabo por duplicado, en las filas 1 y 2 se observa la amplificación del promotor *psp* del plásmido aislado de la cepa 9, en las filas 3 y 4 se observa la amplificación del promotor *psp* del plásmido aislado de la cepa 10, en la fila 5 se observa el plásmido de la cepa 9 y en la fila 10 se observa el plásmido de la cepa 10.

Con este experimento podemos concluir que tanto el plásmido de la cepa 9 y el plásmido de la cepa 10 contienen el promotor *psp* y que los plásmidos de dichas cepas fueron extraídos con éxito.

iii.- Observación preliminar de la actividad del circuito genético sintético

La visualización al transiluminador de la placa con las cepas muestra como no hubo crecimiento alguno del control (cepa HB101K-12) ya que esta cepa no cuenta con un plásmido y por lo tanto no tiene el gen de la B-lactamasa el cual degrada el antibiótico en el medio. Se pueden observar también las tres cepas de E. coli conteniendo el pGLO, estas cepas no producen GFP ya que no existe presencia de arabinosa en el medio, es la arabinosa la que induce la expresión de la GFP en el pGLO. Por el contrario, las dos cepas que contienen el plásmido con el operon sintético conformado por el promotor *psp* y el gen de la proteína verde fluorescente muestran un alto nivel de expresión de GFP. La cepa con el plásmido sobre-expresor de GFP también muestra los mismos niveles.

Discusión

La construcción del circuito sintético conformado por el promotor del shock por fagos (*psp*) y la proteína verde fluorescente (GFP) se llevó con éxito. Los experimentos fueron llevados a cabo como explicado en la sección de materiales y métodos.

La amplificación del promotor *psp* de *Escherichia coli* tuvo el peso esperado según las aproximaciones teóricas de 156 bp, la electroforesis se puede apreciar en la imagen 9 en anexos. La secuencia definida corresponde a la región promotora del gen *pspA*, descrita por Weiner *et al*, en 2014. Los parámetros de la amplificación del promotor por PCR se tuvieron que optimizar bajando la temperatura de fusión de 52°C a 49°C, de esta manera mejorando la probabilidad de que las secuencias de los primers puedan flanquear las secuencias deseadas. A menudo se puede apreciar como es el caso, que cuando se emplean primers con secuencias de corte para enzimas de restricción, estas hacen que los primers tengan cierto porcentaje de rechazo a la hebra de la cual se quiere realizar amplificaciones. Esto es debido a que los nucleótidos de las secuencias de corte pueden no ser complementarias a las secuencias de nucleótidos encontrados en la hebra de ADN.

La clonación de la secuencia codificante de ADN (cADN) de la proteína verde fluorescente (GFP) también se llevó con éxito. El fragmento amplificado corresponde al cDNA de la GFP (720bp) mas, aproximadamente 138bp del plásmido pGLO. Se diseñaron los primers de esta manera para garantizar que el gen de la proteína verde fluorescente se encuentre intacto en el nuevo plásmido a construir, debido a que algunas veces por anomalías de la clonación o digestión se pueden perder ciertos segmentos o la clonación puede ser ineficiente. Se usó la estrategia de clonamiento por medio del empleo de ADN isomerasas en el kit “TOPO TA cloning” de Invitrogen, el cual no necesita de cortes con enzimas de restricción, esto facilitó en gran medida la adición de la secuencia de la proteína verde fluorescente. Se prefirió usar este kit para clonar la GFP debido a que segmentos grandes de ADN tienen menos eficiencia en ser clonados usando las técnicas de clonamiento clásico, es decir por el empleo de enzimas de restricción. También se aseguró de tener un tiempo de extensión más largo a la hora del PCR debido a que este clonamiento toma ventaja de la característica de la “Taq” polimerasa de dejar

residuos de adenina después del término de la secuencia, como lo especificado por Magnuson *et al*, en 1996. Estos residuos de adenina son complementarios a los residuos de timina que posee el vector linearizado y por tal motivo las ADN isomerasas pueden anclar el fragmento al vector TOPO.

En el caso de la doble digestión del promotor *psp* y del vector que contenía la GFP se produjeron algunos inconvenientes. Todo material genético que ha sido expuesto a endonucleasas tiene que ser posteriormente purificado y aislado, para que estas enzimas no interfieran en los futuros pasos de ligación. Esto supone mayor dificultad para garantizar una alta concentración de los productos deseados. Lamentablemente debido a la falta de un cuantificador de ADN, el proceso de corte se dificultó, ya que el proceso necesita de una cantidad ideal de ADN para que las enzimas de restricción puedan funcionar eficientemente, estas cantidades tuvieron que ser estimadas por ensayo y error lo que aumento el costo y prolongo el tiempo experimental, las imágenes 8, 9 y 10 se pueden apreciar los fragmentos digeridos del promotor *psp* y del vector con la secuencia de la GFP. La purificación de estas secuencias una vez digeridas fue por el método clásico de fenol, cloroformo y alcohol isoamilico, este proceso es altamente efectivo para reducir los contaminantes pero tiene una tasa pequeña de recuperación de material genético y aún más si en el proceso anterior se usaron pequeñas cantidades de DNA.

En el proceso de ligamiento la ADN ligasa reconoce sitios entre los nucleótidos de una hebra que no se encuentren unidos por medio de enlaces fosfodiester y realiza la unión respectiva para que se constituya la hebra. Una vez más, la dificultad por estimar la concentración exacta de ADN en las muestras de promotor y vector digeridos, hizo difícil el proceso de ligación, ya que la concentración de ADN de la muestra del vector debe superar en un ratio de 3 a 1 la concentración de la muestra del fragmento a ligar. Para corroborar que el proceso de ligación fue llevado con éxito se transformó células de *E. coli* HB101 K-12 competentes con la reacción de ligación. Estas bacterias fueron sembradas, aisladas y cultivadas para poder extraer y analizar la presencia del operon sintético (imágenes 13 y 14). En la imagen 15 podemos apreciar bandas que corresponden al peso del promotor *psp* amplificadas del plásmido extraído, lo cual garantizaría la incorporación del promotor *psp* al plásmido recombinante. Cabe mencionar, que la adición de este fragmento no significa que el operon sintético este construido correctamente, sería necesario secuenciar este plásmido para poder garantizar que ninguna mutación haya

ocurrido durante todo el proceso de clonamiento. Las mutaciones durante la amplificación del ADN son probables especialmente cuando no se usan ADN polimerasas de alta fidelidad como lo corrobora McInerney *et al*, en 2014 comparando la fidelidad de distintas ADN polimerasas. Los mapas y secuencias del vector TOPO y del plásmido construido se pueden apreciar en las imágenes 18 y 19.

Las cepas de bacterias obtenidas luego del clonamiento parecen no poseer ningún control sobre la expresión de la proteína verde fluorescente, ya que estas producen la proteína en condiciones normales (imagen 14 y 16), hipótesis preliminares indicarían que las bacterias en estas placas puedan estar sufriendo de algún tipo de stress, por la presencia de algún componente en el medio como la ampicilina. Miller *et al*, en 2004 sustenta que la presencia de antibióticos a base del anillo Beta lactamico induce estrés en *E. coli* y activa la maquinaria genética de respuesta a daños de ADN “SOS”. Esta activación podría estar relacionada con la activación del operon *psp* y de esta manera en la bacteria el circuito sintético se activaría para la expresión de la GFP. No es de sorprender que existan relaciones aún desconocidas entre distintos circuitos genéticos, ya que la complejidad que poseen las rutas de regulación genética hace difícil su estudio.

Más investigación es necesaria para poder discernir la actividad y la regulación del circuito sintético. De ser posible, este circuito no solo serviría como una novedosa aplicación dentro de la biotecnología ambiental para poder estimar concentraciones de agentes contaminantes que generen stress oxidativo, sino también como una técnica por la cual se pueda caracterizar la actividad génica microbiana, pudiendo de esta manera ver que genes están siendo activados por diferentes estímulos o condiciones como lo investigado por Chalfie *et al*, en 1997, donde sustenta las posibles aplicaciones de la proteína verde fluorescente como marcador de la actividad génica y como marcador de la localización de proteínas tanto en organismos procariotas como eucariotas.

Conclusión

El promotor del shock por fagos de *E. coli* y la secuencia codificante del gen de la proteína verde fluorescente se aislaron exitosamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los fragmentos tuvieron los pesos esperados según la bibliografía. Estas secuencias pudieron ser clonadas con éxito mediante el empleo de enzimas de restricción y topoisomerasas. La construcción del circuito genético se comprobó por medio de (PCR). La expresión de la proteína verde fluorescente sin ningún tipo de inductor indica que posiblemente el promotor *psp* esté siendo activado por medio de interacciones con otras rutas de regulación génica. La activación del circuito de respuesta al estrés por antibióticos beta lactámicos (SOS) puede estar causando la activación del operon *psp*, por lo tanto también activando el nuevo circuito genético y provocando la expresión de la proteína verde fluorescente.

Recomendaciones

Sin duda, el poder haber realizado con éxito la construcción de dicho circuito involucra que la Universidad Ricardo Palma cuenta con la tecnología necesaria para poder desarrollar una línea de investigación en dicha área de la biología molecular. Lamentablemente al momento de realizar dicho proyecto existieron muchas limitaciones tanto económicas como de equipamiento. Para futuros proyectos en biología molecular o genética molecular recomiendo la implementación de equipos de cuantificación de ADN, ya que son vitales para poder realizar los experimentos de una manera más eficiente, reduciendo el tiempo y el costo. Es importante resaltar que los equipos siempre se mantengan en óptimas condiciones, realizándoles mantenimiento y calibraciones como en el caso de los termocicladores, centrifugas, espectrofotómetros, etc.

La construcción o implementación de un espacio equipado que solo sea usado por personas que están investigando es muy importante, esto permitirá que los proyectos se realicen de una manera más eficiente, ya que no se comprometería la continuidad del proyecto con actividades educativas que se estén realizando.

Referencia Bibliográfica

Adams H., Teertstra W., Koster M., Tommassen J. PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. FEBS Letters. 2002;518:173-6.

Adams H, Teertstra W, Demmers J, Boesten R, Tommassen J. Interactions between Phage-Shock Proteins in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 2003;185(4):1174-80.

Babai R., Ron EZ. An *Escherichia coli* gene responsive to heavy metals. FEMS Microbiology Letters. 1998;167:107-11.

Benz R., Mclaughlin S. The Molecular Mechanism of Action of the Proton Ionophore FCCP (Carbonylcyanide p-Trifluoromethoxyphenylhydrazone). Biophysical Society. 1983;41:381-98.

Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. Current Opinion in Microbiology. 2003;6(3):206-12.

Biran I., Klimentiy L., Hengge-Aronis R., Ron EZ, Rishpon J. On-line monitoring of gene expression. Microbiology. 1999;145:2129-2133.

Bruckner, A.W. and G. Roberts (editors). 2008. Proceedings of the International Cyanide Detection Testing Workshop. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-40, Silver Spring, MD 164 pp.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 1994;263 (5148), 8-2-805.

Drahost D. J., Hendrix R. W. Effect of Bacteriophage Lambda Infection on Synthesis of groE Protein and Other *Escherichia coli* Proteins. Journal of Bacteriology 1982;149(3):1050-1-63.

Diplock EE, Alhadrami HA, Paton GI. Application of Microbial Bioreporters in Environmental Microbiology and Bioremediation. 2009;118:189-209.

Harms H., Wells M. C., Meer JRvd. Whole-cell living biosensors—are they ready for environmental application? *Applied Microbiology Biotechnology*. 2006;70:273–80.

Heitzer A., Applegate B., Kehrmeyer S., Pinkart H., Webb O. F., Phelps T. J., et al. Physiological considerations of environmental applications of lux reporter fusions. *Journal of Microbiological Methods*. 1998;33:45–57.

Huvet M, Toni T, Sheng X, Thorne T, Jovanovic G, Engl C, et al. The Evolution of the Phage Shock Protein Response System: Interplay between Protein Function, Genomic Organization, and System Function. *Molecular Biology and Evolution*. 2010;28(3):1141-55.

Jones S.E, Lloyd L.J, Tan K.K, Buck M. Secretion Defects That Activate the Phage Shock Response of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2003;185(22):6707-11.

Kaushal D, Ma L, Zhang G, Doyle MP. Green Fluorescent Protein Labeling of *Listeria*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 for Safety-Related Studies. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18083.

King J. M. H., DiGrazia P. M., Applegate B., Burlage R., Sanseverino J., Dunbar P., et al. Rapid, sensitive Bioluminescent Reporter Technology for Naphthalene Exposure and Biodegradation. *Science*. 1990;249:778-81.

King J. M, Digrazia PM, Applegate B, Burlage R, Sanseverino J, Dunbar P, et al. Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science*. 1990 Aug 17;249(4970):778-81.

Kobayashi H., Yamamoto M., Aono R. Appearance of a stress-response protein, phageshock protein A, in *Escherichia coli* exposed to hydrophobic organic solvents. *Microbiology*. 1998;144:353-9.

Kochan J., Murialdo H. Stimulation of groE Synthesis in *Escherichia coli* by Bacteriophage Lambda Infection. *Journal of Bacteriology*. 1982;149(3):1166-70.

Köhler S., Belkin S., Schmid R.D. Reporter gene bioassays in environmental analysis.

Fresenius J Anal Chem. 2000;366:769–79.

Layton A. C, Muccini M., Ghosh M. M. , S. SG. Construction of a Bioluminescent Reporter Strain To Detect Polychlorinated Biphenyls. Applied and Environmental Microbiology. 1998;64(12):5023–6.

Lei Y, Chen W, Mulchandani A. Microbial biosensors. Analytica Chimica Acta. 2006;568 (1-2):200-10.

Lloyd L, Jones S, Jovanovic G, Gyaneshwar P, Rolfe M, Thompson A, Hinton J, Buck M. Identification of a New Member of the Phage Shock Protein Response in *Escherichia coli*, the Phage Shock Protein G (PspG). Journal of Biological Chemistry. 2004;279(53):55707-14.

Lumjiaktase P, Aguilar C, Battin T, Riedel K, Eberl L. Construction of SelfTransmissible Green Fluorescent Protein-Based Biosensor Plasmids and Their Use for Identification of N-Acyl Homoserine-Producing Bacteria in Lake Sediments. Applied and Environmental Microbiology. 2010;76(18):6119-27.

Magnuson VL, Ally DS, Nylund SJ, Karanjawala ZE, Rayman JB, Knapp JI, Lowe AL, Gosh S, Collins FS. Substrate Nucleotide-Determined Non-Templated Addition of Adenine by *Taq* DNA Polymerase: Implications for PCR-Based Genotyping and Cloning. Biotechniques. 2004. 21:700-709

Maxson M. E. & Darwin A. J. Multiple promoters control expression of the *Yersinia enterocolitica* phage-shock-protein A (pspA) operon. Microbiology. 2006;152(4):1001-10.

McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. Molecular Biology International. 2014. Article ID 287430, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/287430

Mettler I., Mandala S., Taiz L. Characterization of In Vitro Proton Pumping by Microsomal Vesicles Isolated from Corn Coleoptiles. *Plant Physiology*. 1982;70:1738-42.

Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*. 2004; 305 (5690), 1629-1631.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144-8.

Model P., Jovanovic G., Dworkin J. The *Escherichia coli* phage-shock-protein (psp) operon. *Molecular Microbiology*. 1997;24(2):255-61.

Muthukrishnan A. B, Kandhavelu M, Lloyd-Price J, Kudasov F, Chowdhury S, Yli-Harja O, et al. Dynamics of transcription driven by the tetA promoter, one event at a time, in live *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*. 2012.

Nivens DE, McKnight TE, Moser SA, Osbourn SJ, Simpson ML, Saylor GS. Bioluminescent bioreporter integrated circuits: potentially small, rugged and inexpensive whole-cell biosensors for remote environmental monitoring. *Journal of Applied Microbiology*. 2004;96(1):33-46.

Paitan Y, Biran D, Biran I, Shechter N, Babai R, Rishpon J, et al. On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution. *Biotechnology Advances*. 2003;22(12):27-33.

Sagi E, Hever N, Rosen R, Bartolome AJ, Rajan Premkumar J, Ulber R, et al. Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2003;90(1-3):2-8.

Semple KT, Doick KJ, Wick LY, Harms H. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution*. 2007;150(1):166-76.

Spain A. Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergraduate Research*. 2003;2:1-6.

Strahl H, Hamoen LW. Membrane potential is important for bacterial cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(27):12281-6.

Shimomura O, Johnson F., Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1962;59(3):223-39.

Tecon R, van der Meer JR. Bacterial Biosensors for Measuring Availability of Environmental Pollutants. *Sensors*. 2008;8(7):4062-80.

Turek M., Ketterer L., Claßen M., Berndt H. K., Elbers G., Krüger P., et al. Development and Electrochemical Investigations of an EIS- (Electrolyte-Insulator-Semiconductor) based Biosensor for Cyanide Detection. *Sensors* 2007;7:1415-26.

Tsien R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annual Reviews of Biochemistry*. 1998;67:509-44.

Wada M., Kogure K., Ohwada K., Simidu U. Respiratory dependence of the CCCPresistant luminescence of *Vibrio harveyi*. *Journal of General Microbiology*. 1992;138:2525-9.

Wang L, Watermeyer J.M, Mulelu A.E, Sewell B.T, Benedik M.J. Engineering pHtolerant mutants of a cyanide dihydratase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;94(1):131-40.

Watanabe A, Yano K, Ikebukuro K, Karube I. Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1998;50:93±7.

Weiner L, Brissette JL, Model P. *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on σ^{54} and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes and Development*. 1991. 5:1912-1923.

Willardson B. M., Wilkins J. F., Rand T. A., Schupp J. M., Hill K. K., Keim P, et al. Development and Testing of a Bacterial Biosensor for Toluene-Based Environmental Contaminants. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(3):1006–12.

Zanzotto A, Boccazzi P, Gorret N, Van Dyk TK, Sinskey AJ, Jensen KF. In situ measurement of bioluminescence and fluorescence in an integrated microbioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006;93(1):40-7.

Anexos

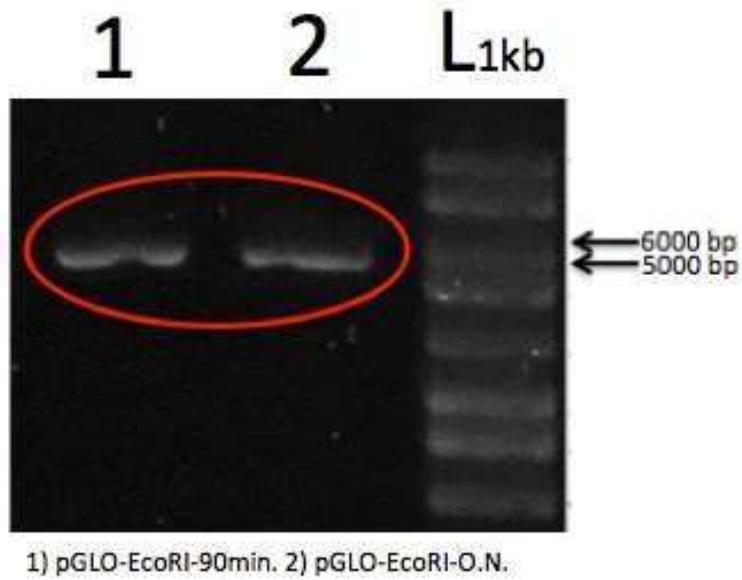


Imagen 1. pGLO digerido con la enzima EcoRI

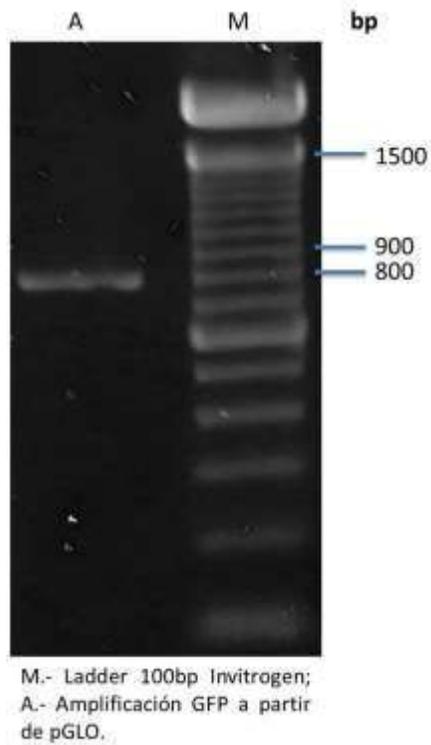


Imagen 2. Amplificación del gen de la GFP



Imagen 3. Colonias luego del clonamiento de la GFP en el vector TOPO

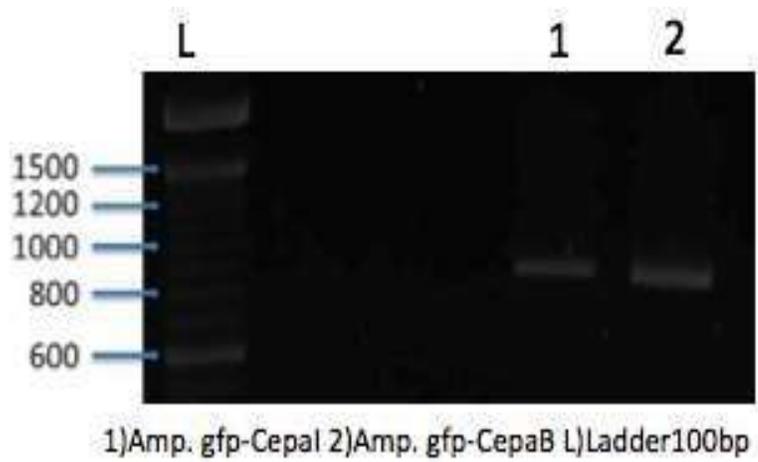


Imagen 4. Amplificación del gen de la GFP de las cepas I y B

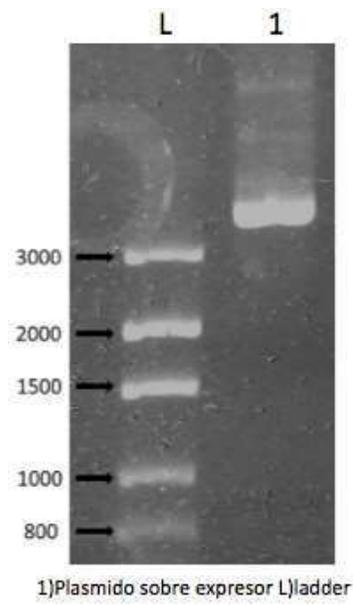


Imagen 5. Plásmido sobre-expresor de GFP

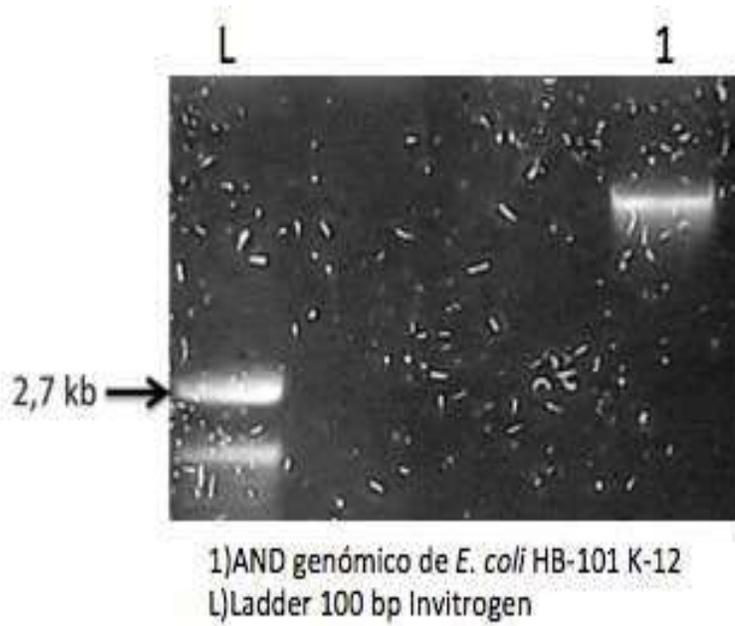


Imagen 6. ADN genómico extraído de *E. coli* HB101K-12

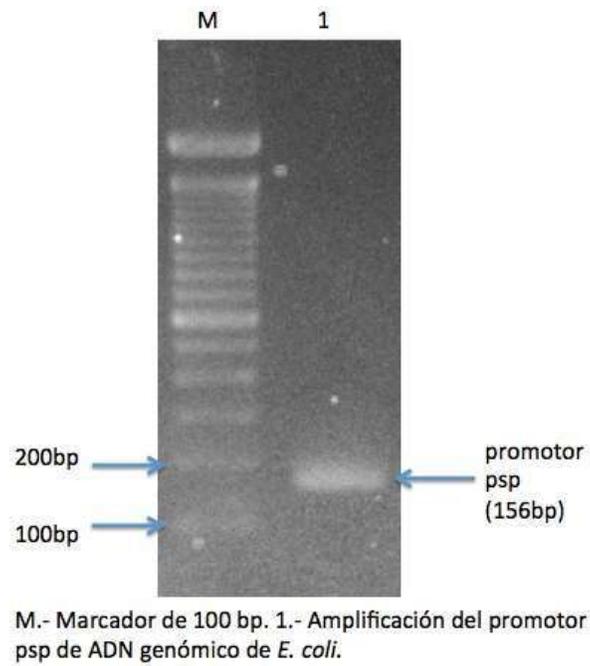


Imagen 7. Amplificación del promotor *psp* de *E. coli* HB101K-12

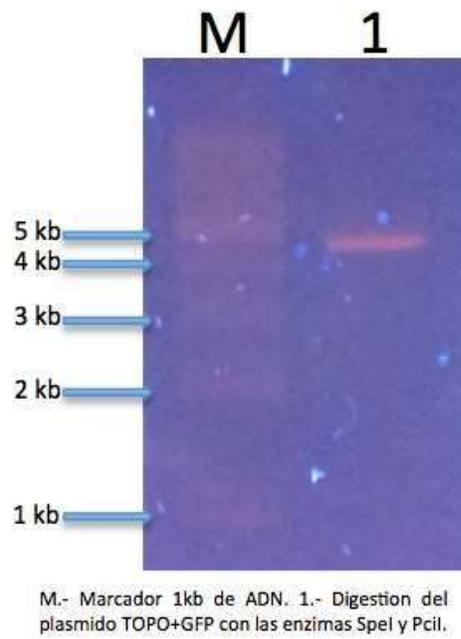


Imagen 8. Digestión del vector TOPO+GFP con las enzimas SpeI y PciI

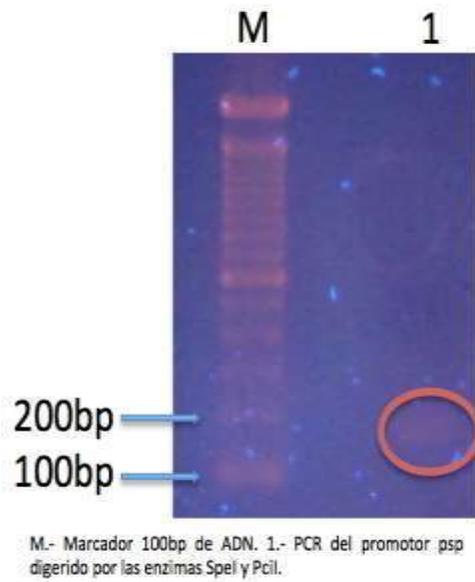


Imagen 9. Promotor *psp* digerido con las enzimas *SpeI* y *PciI*

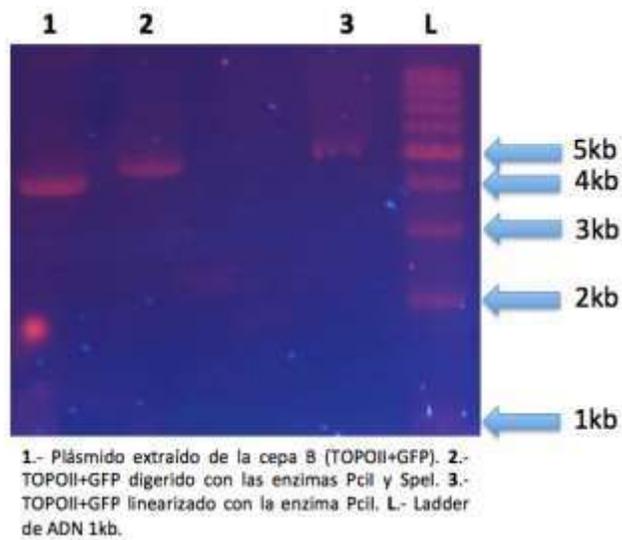


Imagen 10. Vector TOPO+GFP corrido sin digerir (1), después de una doble digestión con las enzimas *SpeI* y *PciI* (2) y después de una digestión simple con *PciI* (3).

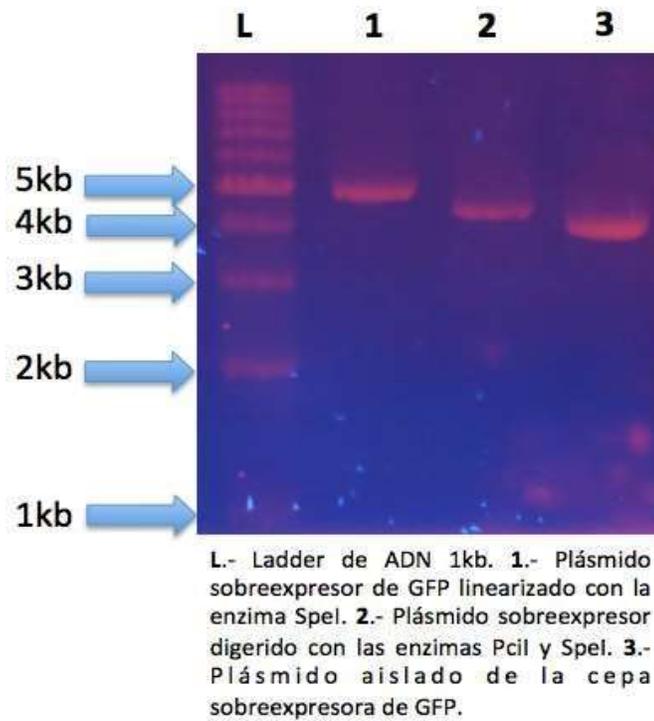


Imagen 11. Plasmido sobre-expresor de GFP corrido sin digerir (3), después de una doble digestión con las enzimas SpeI y PciI (2) y después de una digestión simple con PciI (1).

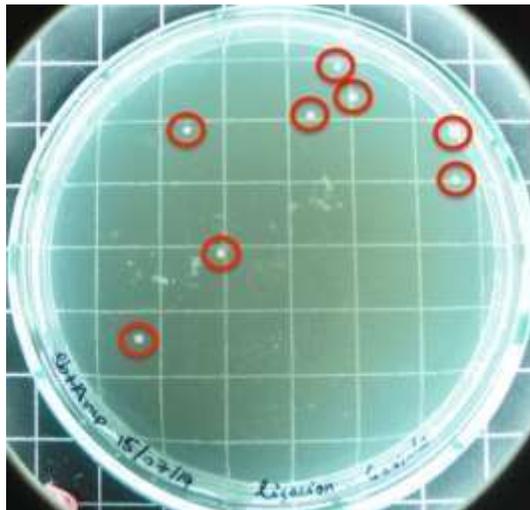


Imagen 12. Colonias obtenidas luego de la transformación genética con el vector TOPO ligado psp+gfp

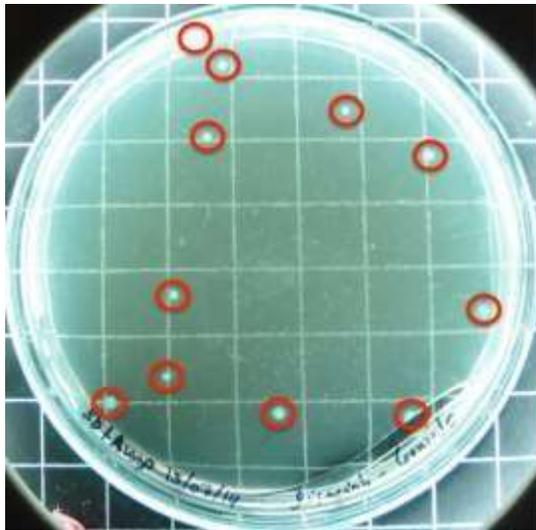


Imagen 13. Colonias obtenidas luego de la transformación genética con el vector TOPO ligado psp+gfp

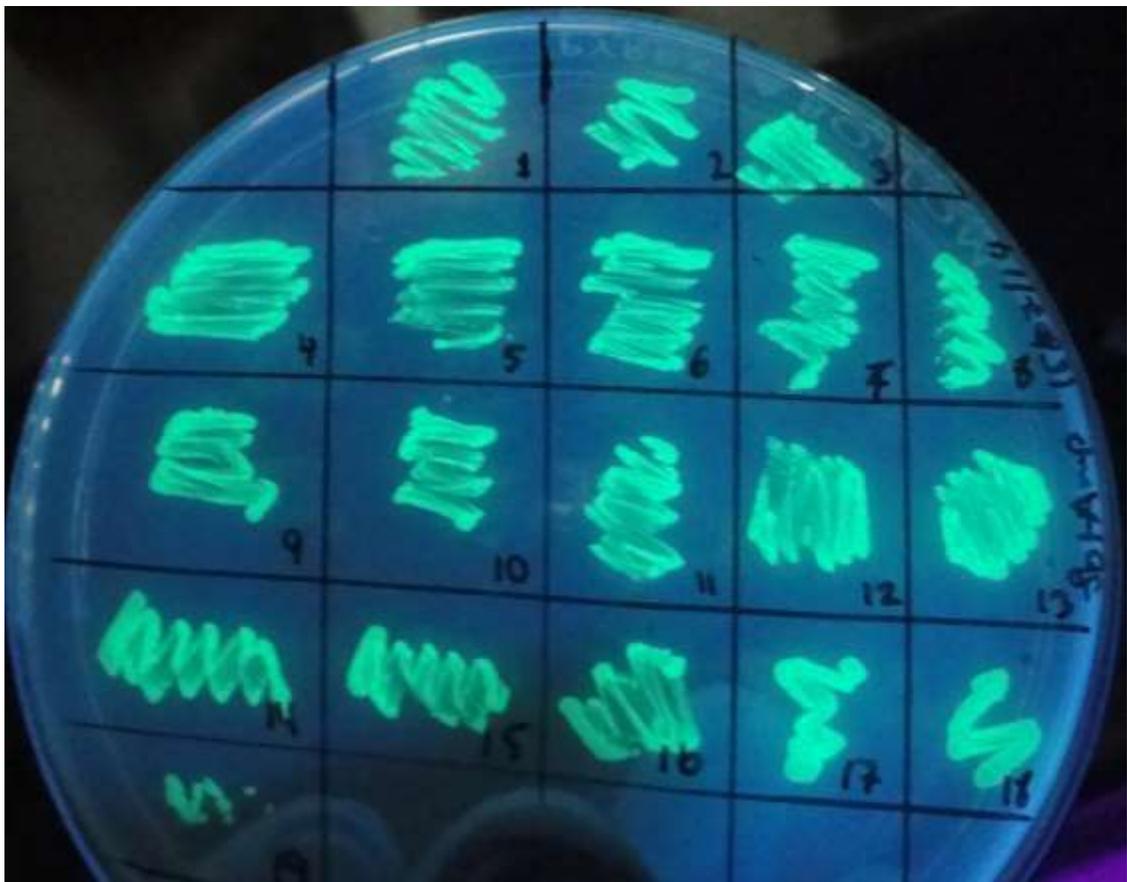


Imagen 14. Biblioteca genética

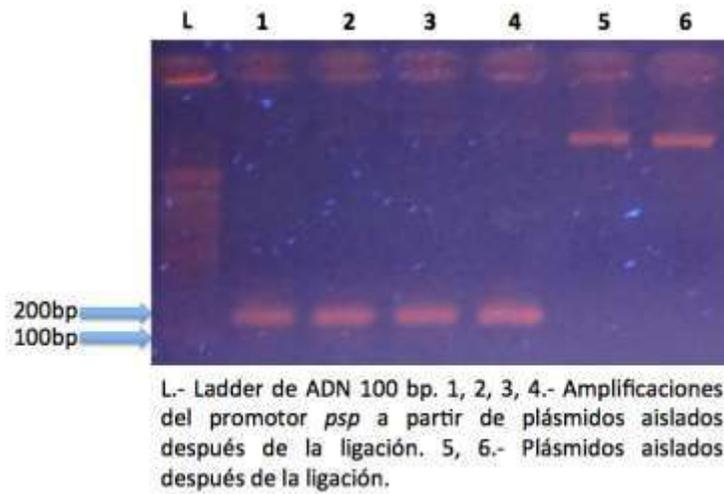


Imagen 15. Comprobación por PCR de la presencia del promotor en el plásmido

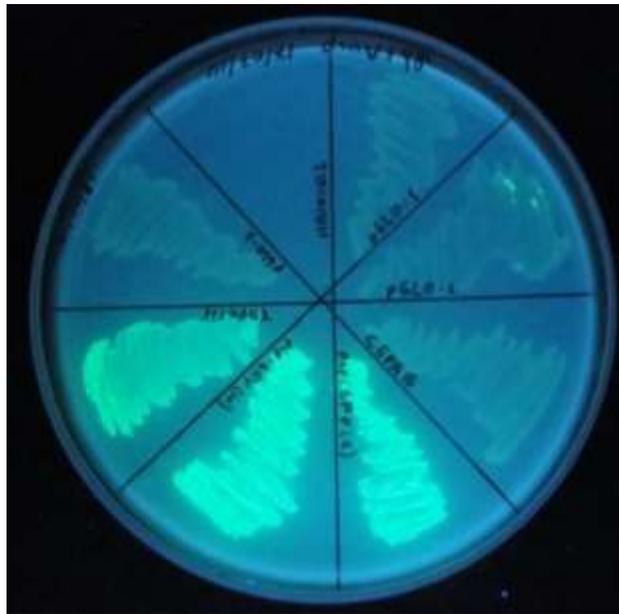


Imagen 16. Observación preliminar de la actividad del circuito genético sintético

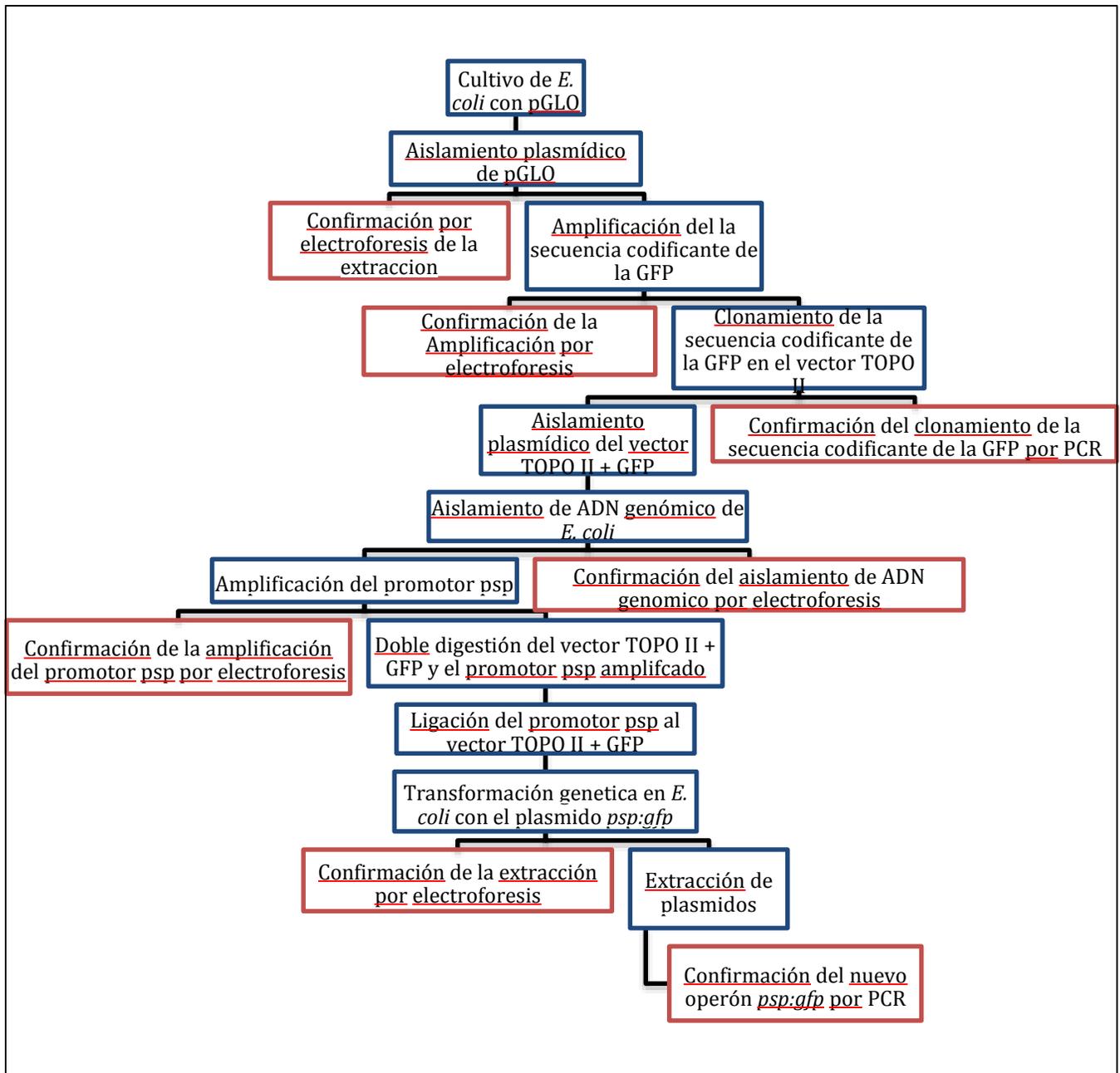


Imagen 17. Flujograma de la estrategia experimental, cajas azules: experimentos y cajas rojas: experimentos confirmativos.

```

1 AGCGCCCAATACGCAAAACCGCCCTCCCGCCGCGCTTCCCGGATTCATTAATGCAGCTGGCCAGCACAGGTTCCCGGACTGGAAAGCGGGCAGTGCACCCCAACGCAATTAATGTGAGTATAGCT
122 CACTCATTAGGCACCCAGCCGTTACACCTTAAGCTTCCCGCCGTAAGTGTGTGGAAATTTGTGAGCGGATAACAAATTCACACAGCAACAGCTATGACCAATGATTACCCCAAGCTATTT
243 AGGTGACACTATAGAAATACCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCCCGGATGCACATGATTAAGCGCCCGCCAGTGTGCTGAAATTCGCCCTTAAGGGCGAATTCGCGAGATGCCATCA
364 CACTGGCCGCGCCGTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGGCCCTAAGTGAAGTGGTATTACAAATTCACGGCCGCGCTTACAAACCTGGTGAATGGGAAACCCCTGGCCCTTACCCAAAC
485 TTAATCGCCCTTGCAGCACAATCCCGCTTCCCGAGCTGCCCTAATAGCCGAAGAGCCCGCCAGCCGATGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTTGAATGGCAATGGAGCCCGCTGTAGCCGC
606 GCATTAAGCCGCGCGCGGTGGTGGTTACCGCCAGCGTGACCCCTACACCTGCCAGGCGCTTAGCCCGCCCTCTCTTCCGCTTGTCCCTTCCCTTCGCGACCTTCGGCCGCTTCCGCC
727 GTCAAGCTCTAAMTCCGGGCTCCCTTAGGGCTCCGATTTAGTGCCTTACCGCCAGCTGGACCCCAAAAACCTTGATTAAGGGTGAAGGTTCCAGCTATGGGCCATCCCGCTGATAGACGGT
848 TTTTCCGCTTTGAGCTTGGAGTCCACCTTCTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAAACAACTCAACCCATATCCCGTGTATCTTTGSAATTAAGGGATTTTCCCGATTTCC
969 CCGTATGGTTAAAAAATGAGCTGATTAACAAAATTTAACGGAAATTTAACAAAATTCAGGGCCCAAGGGCTGCTAAAGGAAAGCGGAACACCTAGAAAGCCAGTCCCGCAGAAACGGTG
1090 CTGACCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGCAAGGGAAACCGAACCGCAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACAATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGG
1211 ACAGCAAGCAAGCCGAAATGCCAGCTGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAATTAACCTGGATGGCTTTCTTCCCGCCAAAGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTG
1332 ATCAAGAGCAGGATGAGGATCTTTCCGATGATTTGAACAAGATGGATTCACAGCAGGTTCTCCCGCCCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCAACAACAGACATCGGCTG
1453 CTCGATGCCCGCTGTTCGGCCGCTCAGCCGACAGGGCCCGCCGCTTCTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGGTCCCGTGAATGAACATGCAGGACGAGCCAGCCCGGCTATCGTGGCTGGCC
1574 ACGACGGGCTTCTTCCCGCAGCTGTGCTGACGTTTCACTGAAGCGGAAAGGACCTGGCTGCTATTTGGCGGAAAGTCCCGGGCAGGATCTCCCTGCAATCCCACTTGTCTCCGCGGAGA
1695 AAGTATCCACATGCGCTGAATGCGCCGCTGCAATACGCTTGAATCGGCTTACTTCCCAATTCGACCAACAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACCTACTCGGATGGAAAGCCGGCTCT
1816 TGTCCGATCAGGATGATCTGGAGAAAGGATCAGGGGCTCCCGCCAGCGGACGTTCTCCCAAGCTCAAGGGCCGATGCGCCGACGGCAGGATCTCCCTGACCACTTGGCTGATGCGGCTG
1937 TTTCCGAAATATCAATGGGAAATGGGCGCTTTCTGATATCAATCGACTGTGGCCCGGGTGGGTGTCCCGGACCGCTATCAGGACATAGGCTTGGCTGGATATGTCGAAAGCTTGGCTGAGAGCGCTT
2058 CCGCGGAAATGGGCTTCCCGCTTCTCTGCTTACGGTATCCCGCCCTCCCGGATTCGGCAGCCGCTTCCGCTTCTATCGCCCTCTTGGAGGATTTCTCTGAATTTGAAAAGGAAAGATATGAGT
2179 ATTCACACTTTCCGCTGCCCTTATTCCTTTTTTCCCGCCTTTTCCCTTCTCTGTTTTTCCCTCCGACAGAAACCGTGGTGAAGATGAAAAGATCGTGAAGATCACTTGGGTCACAGGATGG
2300 GTTACATCGAACTGAACTCAACAGCGGTAAAGATCTTGGCCCGAAAGACGTTTTCCAAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGATTAATTCGGCTATTTGA
2421 CCGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCGCATACACTATTTCCAGAAATGACTTGGTGTGAGTACTCACCGTGCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAAGAAATTAATCCAGTGTCT
2542 CCCATAACCATGAGTAAACACTGCGGCAACTTACTTCTGACAAAGTCCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCCTTTTTGCAACAGATGGGGATCATGTAACTCCGCTTGAATGCTTGGG
2663 AACCGGAGCTGAAATGAAGCCATACCAAAAGCAGGAGGTGACACCAACGATGCTTATGCAATGGCAACAGCTTCCGCAAACTATTAACATGGCGAATACTTACTCTAGCTTCCCGCCCAACA
2784 ATTAATAGACTGGATGGAGGGGATAAACTTGCAGGACCACTTCCGGCCCGCCCTTCCCGCTGGCTGGTTATTTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGGGGCTCCGGGTATCAAT
2905 GCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTATCTCACAGAGGGGAGTCCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATGCGTGAATAGGGGCTTCACTGATTAAGC
3026 ATGGGTAACCTCCAGACCAATTTACTCATATATCTTTAGATTTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAAGTCTTTTTGATTAATCCATGACCAAAATCCCTTA
3147 ACCTGAGTTTCTCCACAGGCTCAGACCCCTAGAAAGATCAAGGATCTTCTTGGATATCTTTTTCTTCCGCGTAACTGCGTGTGCAAAACAAAAGAAACCCCGCTACCGAGCG
3268 GTGGTTTTTTCGCGGATCAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAGGTAACTGGCTTCCAGCAGAGCCAGATACCAAAATCTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTATGAGCCACCACTTCAAGA
3389 ACTCTGAGCACCGCTACATACCTCCGCTGCTGCTAACTCTGTACCAATGCTGCTGCGCAGTGGCGTCAAGTGGTCTTCAAGCGGCTGGAGCTCAGACGATATGATCCGATTAAGCGCA
3510 CGCGTCCGCTGAAAGGGGGGTTCTGTCACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACGAACTCAGATACCTTACAGCCTGAGCTATGAGAAAGCCCGACCCCTTCCCGAAGGGAGAAAG
3631 CGGACAGGTATCCGGTAAAGCGCAGGCTTGGAAACAGGAGAGCCAGCGAGGCTTCCAGGGCGAAAGCCCTGGTATCTTTAATGCTGTGCGGCTTGGCCACCCCTGAGTATGAGGCTC
3752 GATTTTTGTGATGCTGCTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACCCGCAACCCGCGCTTTTTACGGTTCCTCGCCCTTTTGTGCGCTTTTTGCTCACAATCTTCTTCCGCTGATATCCCC
3873 TGATTTCTGGATAACGATATACCGCTTTGAGTGAAGCTGATACCGCTCGCCCGCCGAAACGAGCGGAGCCGAGTGAAGCGAGGAAAGCGGAAAG

```

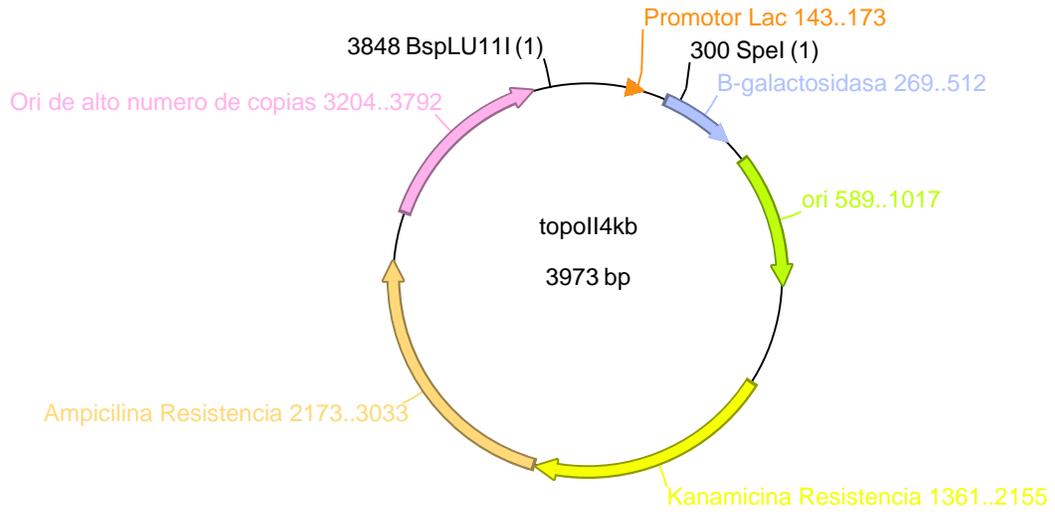


Imagen 18. Secuencia y mapa del vector TOPO II de invitrogen. Naranja oscuro: Promotor Lac, Azul: B-galactosidasa, Verde: Ori, Amarillo: Gen de resistencia a Kanamicina, Naranja claro: Gen de resistencia a Ampicilina y Rosado: F1 Ori (Ori de gran numero de copias).

