



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Construcción sintética de una proteína anticongelante
inducida por un choque frío:
Un modelo en *Escherichia coli*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

LOURDES VIRIDIANA SOTO ROBLES



DIRECTOR DE TESIS:

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del alumno:

Soto

Robles

Lourdes Viridiana

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304211029

Datos del tutor:

Dr.

Becerra

Bracho

Arturo Carlos II

Datos del sinodal 1

Dra.

Segal

Kischinevzky

Claudia Andrea

Datos del sinodal 2

Dr.

Pérez

Zamorano

Bernardo

Datos del sinodal 3

Lic.

Sánchez

Domínguez

Mario

Datos del sinodal 4

M.en C.

Ramírez

Corona

Fabiola

La vida es aquello que te pasa mientras estás ocupado haciendo otros planes.

John Lennon

“Life is what happens to you while you're busy making other plans”

*A mis padres y mis hermanas por estar conmigo
mientras la vida pasa.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi institución, la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todo un sistema educativo que me lleno de conocimientos y sobre todo a las personas que hacen y han hecho posible este acceso.

A mis maestros por ser mi guía en este mar de conocimientos.

A mis tutores oficiales y no oficiales:

Fabiola Ramírez Corona, Mario Sánchez Domínguez y Arturo Carlos Il Becerra Bracho, los que me ayudaron en el proceso de mi tesis. A Fabi por su apoyo técnico en el montaje de todos mis experimentos, por su asesoría teórica y por su confianza. A Mario por su gran ayuda teórica para realizar cada fase de mis experimentos y por reunirse conmigo a discutir cada experimento y planear cada fase. A mi tutor oficial Arturo por su apoyo y su confianza y por su ayuda cuando yo metía la pata.

A mi jurado, al Dr. Bernardo Pérez Zamorano por sus críticas que me ayudaron a mejorar, a la Dra. Claudia Segal Kischinevzky por sus precisas correcciones y consejos en el laboratorio y por ser mi profesora en el Taller de Biología Sintética.

Al taller de Biología Sintética, a los profesores y compañeros, en donde cambiamos nuestros enfoques y en donde el iGEM amplió mi mente. A Chucho por ser mi compañero de laboratorio y compartir su conocimiento, porque aprendimos mucho incluso de los errores y vencimos los obstáculos.

A todas las personas que han estado conmigo a lo largo de mi vida y que me han brindado de su ayuda o de su cariño y sobre todo muchísimas gracias a las personas que se encuentran conmigo hoy, por compartir buenos y no tan buenos momentos, esperando que permanezcan a mi lado y poder seguir compartiendo valiosos recuerdos.

A mi familia, a mis tíos por ser mis amigos y por ser parte de mi inspiración, a mi madrina porque sé que siempre cuento con ella.

A mis hermanas por siempre brindarme su cariño:

A mi Shiquitinaaaa Vale por estar tan loca que me hace ser su fan.

A Tania Michelle Soto Robles por ser mi mejor amiga.

A mi padre por apoyarme con mis decisiones e intentar cuestionarlas lo menos posible, es un acto de confianza que agradezco mucho, al igual que agradezco su cariño y su gran apoyo.

A mi madre por darme la vida y estarse preocupando siempre por mí, por todo su gran apoyo las palabras son pocas para expresarle todo lo que ha hecho por mí, ya que a ella le debo lo que soy.

Y finalmente...

A la vida por permitir que los dinosaurios se extinguieran y los mamíferos se expandieran, ya que con ello y muchos eventos de especiación yo estoy aquí.

Índice

Resumen	8
Abreviaturas	10
I. Introducción	11
1.1. Respuesta a un choque frío.	11
1.1.1. Proteínas inducidas por frío, CIPs.	12
1.1.2. Proteínas de choque frío, CspA.	13
1.1.2.1. Proteína CspA y el gen <i>cspA</i> .	14
1.1.2.2. Promotor <i>cspA</i> .	14
1.1.2.3. El papel de CspA en la transcripción y traducción.	15
1.2. Respuesta a la congelación	17
1.2.1. Estrategias generales al congelamiento	17
1.2.2. Proteínas anticongelantes, AFPs.	18
1.2.2.1. Mecanismos de acción de las AFPs	19
1.2.2.2. Aspectos evolutivos	21
II. Hipótesis	23
III. Objetivos	23
3.1. Objetivo general	23
3.2. Objetivos particulares	23
IV. Materiales y métodos	24
4.1. Construcción del plásmido	24
4.1.1. Secuencias	24
4.1.1.1 Vector	24
4.1.1.2. Inserto	25
4.1.1.3. Oligos	26
4.1.2. Obtención del vector	26
4.1.3. Obtención del inserto	28
4.1.4. Ligación VECTOR + INSERTO	30
4.1.5. Medios de cultivo y conservación de las cepas	32
4.2. Experimentos para el modelo de crecimiento bacteriano bajo un choque frío y un evento de congelación.	33
4.2.1. Fase I	33
4.2.2. Fase II	35
4.2.3. Fase III	36

V. Resultados	37
5.1. Comprobación previa al modelo	37
5.1.1. Comprobación de obtención del vector	37
5.1.2. Comprobación de obtención del inserto	38
5.1.3. Comprobación de obtención de la ligación VECTOR + INSERTO	40
5.2. Experimentos modelo	41
5.2.1. Fase I	41
5.2.2. Fase II	43
5.2.3. Fase III	45
VI. Análisis de resultados	47
6.1. Fase I	47
6.1.1. Crecimiento poblacional en <i>E. coli</i> , cepa silvestre	47
6.1.2. Crecimiento poblacional en <i>E. coli</i> , cepa modificada	50
6.1.3. Crecimiento teórico en <i>E. coli</i>	52
6.2. Fase II	53
6.2.1. Choque frío en <i>E. coli</i> , cepa silvestre	53
6.2.2. Análisis de recuperación	56
6.2. Fase III: Recuperación después de la congelación	59
VII. Conclusiones y Discusión	61
7.1. Discusión	61
7.2. Conclusiones específicas	63
VIII. Anexos	64
8.1. Anexo I: Soluciones y Protocolos	64
8.2. Anexo II: Modelo	76
8.3. Anexo III: Primer intento por comprobar la expresión	80
IX. Referencias	81

Resumen

Desde el descubrimiento de la estructura molecular del DNA han pasado más de 50 años y los avances son cada vez mayores. Hoy en día las ciencias biológicas y la ingeniería parecen estar dispuestas a cruzar las fronteras disciplinarias hacia un objetivo en común [1].

La biología sintética ha surgido de la biología como una disciplina basada en la cuantificación [1] y se entiende como el diseño de sistemas biológicos utilizando principios de ingeniería [2]; otros autores definen a la biología sintética como la bioingeniería de formas de vida que no existen en la naturaleza [3]. La tecnología que impulsa la biología sintética no es nueva ni lo es el concepto del diseño de nuevas moléculas biológicas. Lo que es nuevo es el énfasis en el comportamiento del sistema [1].

La biología sintética emplea gran parte de las mismas técnicas y equipos de las ciencias biológicas pero en lugar de investigar y realizar nuevos descubrimientos, un biólogo sintético busca mejorar los planos genéticos de organismos existentes, para diseñar y crear nuevos dispositivos y sistemas biológicos.

Los microorganismos, en particular, son pequeños, fácilmente de controlar y gran parte de su maquinaria es conocida. A medida que el costo de la secuenciación y la síntesis de DNA siguen bajando, las ideas ambiciosas de la biología sintética son cada vez más alcanzables [4].

Para diseñar estos nuevos sistemas, los biólogos sintéticos recurren a los sistemas naturales para encontrar las unidades funcionales de DNA o sintetizar unidades que no existen naturalmente. Estas unidades funcionales son probadas y caracterizadas y pueden convertirse en componentes en un dispositivo o en un sistema biológico [4].

La biología sintética parece ser una manera eficiente de resolver muchos problemas, ya que, el objetivo es simplificar y estandarizar el proceso de creación. Al simplificar y estandarizar la biología, se puede pasar a utilizar los componentes sin tener que gastar tiempo investigando cada componente individual, [4] una herramienta para simplificar es la modelación del sistema la cual nos ayuda a predecir y cuantificar.

En ésta tesis se intenta entender algunas de las adaptaciones que presentan los organismos a bajas temperaturas desde el análisis del sistema y no sólo el de la molécula, es decir desde un enfoque de la biología sintética. En esta tesis se elaboró un modelo matemático, el cual fue construido a lo largo de los experimentos, este modelo permitió la realización de cada siguiente fase de forma más sencilla.

En este trabajo se introdujo el gen que codifica una proteína anticongelante (AFP, antifreeze protein) del tipo III de un pez en una cepa de *Escherichia coli*, la cual de manera natural no contiene proteínas anticongelantes. Diferentes AFPs parecen tener un punto de desnaturalización a temperaturas no muy altas y su estabilidad esta cerca de los 0°C [5], por esta razón para evitar la desnaturalización de dicha proteína se decidió expresarla en condiciones frías, utilizando específicamente las ventajas del promotor de una proteína cold shock A, *cspA*.

Sin embargo, a pesar de que se contaba con el gen de la AFP de manera estandarizada para la biología sintética, debido a que se utilizó un vector comercial que contiene la secuencia del promotor *cspA* de *E. Coli*, se tuvo que rediseñar los extremos del gen para poderlos empatar con los del vector sin afectar su marco de lectura.

Al someter la bacteria a condiciones de congelamiento se espera que la proteína anticongelante le dé una ventaja que se vea reflejada en la sobrevivencia, los resultados obtenidos en una serie de experimentos fueron de cierta forma inesperados, sin embargo se concluyó que efectivamente tuvo un cambio en su crecimiento después de haber sido sometida a condiciones de congelamiento y posteriormente regresada a su temperatura óptima, 37°C.

Palabras clave:

Proteína anticongelante, promotor *cspA*, choque frío, congelación, crecimiento bacteriano.

Abreviaturas

AFP:	Antifreeze protein o proteína anticongelante
CIPs:	Proteínas inducidas por frío
Csps:	Cold shock proteins o proteínas de choque frío
DB:	Down box
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DO:	Densidad óptica
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
Gln:	Glutamina
INA:	Agentes de nucleación de hielo
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero
rRNA:	Ácido ribonucleico ribosomal
No-CIPs:	Proteínas no inducidas por frío
(p)ppGpp:	Guanosina pentafofato
pb:	Pares de bases
PCR:	Polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa
RNA:	Ácido ribonucleico
TH:	Histéresis térmica
UTR:	Untranslated región o región no traducida

I. Introducción

Todos los organismos han desarrollado diversas estrategias para responder al estrés ambiental generado por la radiación ultravioleta, cambios en el pH, salinidad, disponibilidad de oxígeno, disponibilidad de diferentes nutrientes, cambios en la presión o en la temperatura [6-8].

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes para la vida, ya que influye directamente en las propiedades tanto estructurales como funcionales de los componentes celulares [9] y una de las perturbaciones más comunes precisamente es el cambio de temperatura [7].

Cuando los cambios en el ambiente están fuera de los rangos fisiológicamente favorables del organismo, han sido observadas respuestas específicas en los organismos que le permiten sobrevivir a diferentes condiciones y minimizar el efecto en los cambios celulares [6]. Diversas investigaciones están siendo desarrolladas a lo largo del mundo para dilucidar la bioquímica y la base genética de la tolerancia al frío de los organismos [10].

1.1. Respuesta a un choque frío.

Un claro ejemplo en investigación sobre condiciones frías es análisis de la respuesta de los organismos a un choque frío. Diversos autores lo definieron como el cambio de temperatura de 310°K (37°C) a 288°K (15°C) en pocos minutos [6], bacterias, arqueas y eucariontes muestran una respuesta a esta variación [11, 7].

Algunas de las consecuencias ante un choque frío son: incremento en la compactación y torcimiento del DNA [12], disminución en la fluidez de la membrana [13], bloqueo parcial de la traducción [6], disminución de la concentración en (p)ppGpp y aumento en la concentración de azúcares como la trehalosa [12].

En bacterias, el estrés que sufren debido a un choque frío conlleva a una disminución en la fluidez de la membrana y un bloqueo de la traducción [8]. Cuando la temperatura baja, la membrana celular pasa a una fase de transición de estado fluido a uno no fluido, esta fase de transición depende de la composición de los ácidos grasos [13].

La fluidez de la membrana puede ser preservada a bajas temperaturas introduciendo ácidos grasos con bajo punto de fusión. En la naturaleza muchos organismos han desarrollado mecanismos para cambiar la composición de ácidos grasos de sus membranas en respuesta a un choque frío [13, 8].

1.1.1. Proteínas inducidas por frío, CIPs.

Existe un bloqueo en la traducción, sin embargo no ocurre en todos los transcritos [6]. Cuando un cultivo en fase exponencial de *E. coli* es transferido de 37°C a una temperatura por debajo de 20°C [14-17], el crecimiento celular se detiene por un periodo de aclimatación que puede ser de una hora a más, dependiendo de la temperatura a la que sea llevada. Una drástica reprogramación de la expresión de los genes toma lugar durante la fase de aclimatación [12], por lo que la síntesis de un grupo de proteínas (proteínas inducidas por frío o CIPs) es inducida inmediatamente después del descenso de temperatura, y simultáneamente la producción del resto de las proteínas es transitoriamente inhibida (proteínas no inducidas por frío o no-CIPs) [6], probablemente en el paso de iniciación de la traducción [8]. Se ha reportado en la cepa W3110 de *E. coli* un periodo de 4 hr en el que detiene su crecimiento cuando es llevada de 37°C a 10°C [14].

Al final de la fase de aclimatación la síntesis de CIPs decrece a un nivel constante y las células restablecen la maquinaria de producción del resto de las proteínas (Figura 1) [6], debido a que los ribosomas no adaptados pasan a ser a ribosomas adaptados, puesto que adquieren factores ribosomales de choque frío, tales como RbfA y CsdA, los cuales fueron producidos durante la fase de aclimatación. Estos ribosomas adaptados al frío son ahora capaces de traducir mRNA no inducibles por frío [7].

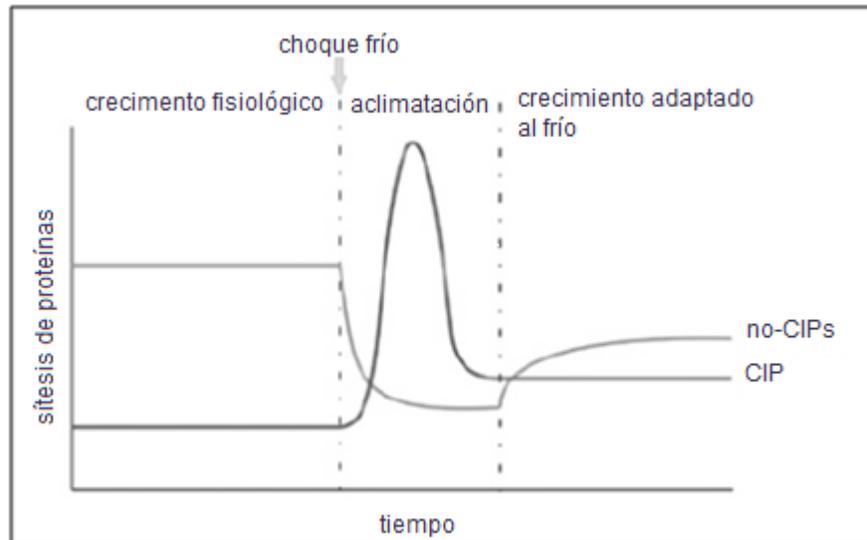


Fig.1. Vista esquemática de los patrones de expresión bajo un choque frío [6].

La fase de aclimatación inicia directamente después de un choque frío, existe un incremento de la expresión de proteínas inducidas por frío (CIPs) mientras ocurre una transitoria inhibición de proteínas no inducidas por frío (non-CIPs). Al término de la fase de aclimatación la síntesis de proteínas non-CIPs es restaurada con un nuevo patrón adaptado al frío [6].

Las proteínas inducidas por frío son nombradas por algunos autores como proteínas de choque frío o Csps (*cold shock proteins*), sin embargo en este trabajo se mencionará como Csps sólo a un grupo de proteínas homólogas.

Estas CIPs son convencionalmente clasificadas en dos grupos basados en sus patrones de expresión. La clase I es expresada en bajos niveles a 37°C, pero son dramáticamente inducidas bajo un choque frío. La clase I incluye a CspA, CspB, CspG, CspI, CsdA, RbfA, NusA y PNP [8].

La clase II es expresada a 37°C y son moderadamente inducidas bajo un choque frío, incluyendo genes como IF-2, H-NS, RecA, GyrA, Hscs66, HscB, entre otros [8].

1.1.2. Proteínas de choque frío, Csps.

Las proteínas de choque frío o Csps, comprenden una pequeña familia de proteínas altamente conservadas [6]. Diversas proteínas pertenecientes a este pequeño grupo no sólo han sido reportadas en *E. coli*, sino también en otras bacterias, incluyendo mesófilas como *Bacillus subtilis*[8].

Las Csp's mejor estudiadas son las de *E. coli*. Nueve miembros de esta familia de proteínas han sido identificadas y nombradas alfabéticamente de CspA a CspI, en donde CspA, CspB, CspG y CspI son altamente inducibles por frío [6]. El tamaño de cada una varía de 64 a 74 residuos de aminoácidos, mientras que las identidades entre cada dos proteínas varían de 29 a 83% [8].

1.1.2.1. Proteína CspA y el gen *cspA*.

Dentro de las Csp's, CspA es la más abundante y la mejor caracterizada, conforman el 13% del total de las proteínas en el citoplasma después de un choque frío [18]. Originalmente identificada como una proteína citoplasmática de 7.4kDa con 70 aminoácidos, ha sido purificada y su estructura tridimensional determinada a través de cristalografía de rayos X, que muestra una conformación de barril beta con cinco hojas en anti-paralelo [19].

Su función es diversa, ya que está involucrada en la transcripción, traducción e incluso juega un importante papel en el correcto plegamiento de las proteínas [6], sin embargo no tiene la actividad anticongelante asociada a las proteínas anticongelantes [20].

Un ejemplo de las funciones de CspA es el gen *gyrA* (la subunidad A de la girasa), ya que es sensiblemente activado por CspA, lo que sugiere un incremento en los niveles de expresión de la girasa que ayudan a la adaptación de la célula a temperaturas bajas [6].

En *E. coli* *cspA* se expresa bajo condiciones favorables, es decir 37°C, durante la fase exponencial temprana en donde la concentración de CspA es de ≥ 50 microM [21]. Cuando un cultivo de *E. coli* en la etapa exponencial a 37°C es transferido a 15°C ó 10°C la tasa de producción de CspA alcanza un 13% de la producción de las proteínas citoplasmáticas totales y su concentración alcanza los 100microM [6]. Después de un choque frío los niveles mRNA de *cspA* alcanzan los niveles máximos entre 45 a 75 minutos y comienza su decrecimiento a los 120 minutos, luego de haber sido llevado a 10°C [20].

1.1.2.2. Promotor *cspA*.

El gen *cspA* tiene un fuerte promotor equipado con un elemento *UP* (Figura 2), además de una secuencia extendida a las -10pb la cual es reconocida tanto a 37°C como a 15°C. El promotor *cspA*

está equipado con dos características: una es la presencia de una secuencia rica en AT inmediatamente río arriba de la región -35, llamada elemento UP, el cual es reconocido por la subunidad alfa de la RNAPolimerasa confiriéndole una fuerte actividad en la transcripción [8]. La segunda es la presencia de un motivo TGN inmediatamente río arriba de la región -10. Se propuso que esto junto con la región -10 constituyen una región llamada región -10 extendida y si un promotor contiene la región -10 extendida, la región -35 se convierte en una región prescindible [22].

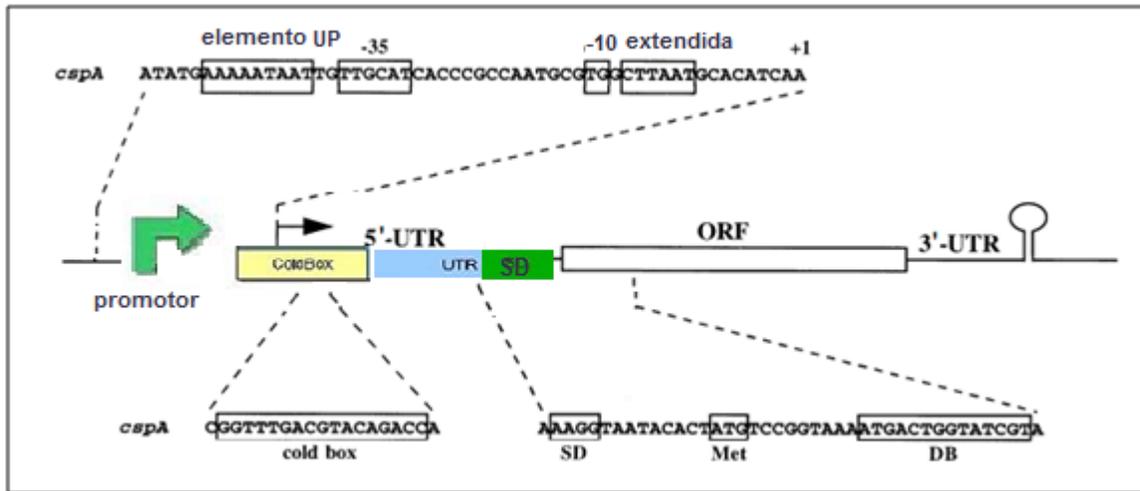


Fig.2. Representación del promotor *cspA*.

Cuando el promotor de *cspA* fue reemplazado con el promotor del gen *lpp*, un fuerte promotor constitutivo de una de las principales proteínas externas de membrana, la expresión fue inducida por un choque frío indicando que la inducción no sólo depende del promotor. Sin embargo la expresión a 15°C es mayor con el promotor *cspA* que con el promotor *lpp*, sugiriendo que el promotor *cspA* es uno de los más fuertes promotores de *E. coli* [8].

1.1.2.3. El papel de CspA en la transcripción y traducción.

La primera pista de que las CspA son capaces de regular la respuesta a un nivel transcripcional fue dada por Dersch et al, en donde propusieron que cierta secuencia de nucleótidos sería requerida para una adaptación eficiente a ambientes fríos en *E. coli* K-12 [24].

La baja producción de CspA a 37°C es parcialmente atribuida a la extrema inestabilidad del mRNA de *cspA* a esta temperatura [20]; ya que el gen de CspA es altamente transcrito, pero su mRNA no puede ser eficientemente traducido debido a que el mRNA de *cspA* es extremadamente inestable a 37°C, se piensa que es debido a la formación de una estructura secundaria en el mRNA [6]. Se ha determinado que tiene una vida media menor de 12 segundos [7]. Sin embargo, bajo condiciones frías, el mRNA adquiere una mayor estabilidad en sus estructuras secundarias previamente formadas, lo que resulta una traducción eficiente [6, 7].

Cuando *E. coli* sufre un choque frío el mRNA de *cspA* pasa de formar una estructura secundaria a un RNA extendido lo que reduce el anclaje de RNAsas y permite la traducción, ya que las estructuras secundarias pueden enmascarar la secuencia Shine-Dalgarno [6]. La estabilización del mRNA de *cspA* es dramática, ya que ha mostrado una vida media superior a los 20 min. [7].

CspA puede regular su propia expresión por la unión a una región 5' no traducida, también conocida como UTR, por sus siglas en inglés (5' untranslated región) de su propio mRNA, facilitando la traducción de *cspA* a bajas temperaturas [6].

La UTR es una región de 159pb [6] y es una de las características exclusivas de los genes *cspA*, *cspB*, *cspG* y *cspI* que, como se mencionó previamente, son inducibles por un choque frío. La UTR está altamente conservada en estos genes y dentro de esta región se encuentra una secuencia de 11 pb llamada *cold box* sumamente conservada en estos genes [7], que forma una estructura de tallo, *stem-loop* [8], a la cual la proteína CspA se une; la interacción de CspA y su mRNA se debe a la unión preferente a la región poli U de esta *cold box* [6].

La eliminación de la UTR ha mostrado que esta región es la responsable de la inestabilidad del mRNA de *cspA* a 37°C [7]. La sustitución de tres nucleótidos dentro de la región UTR ha dado como resultado la expresión constitutiva de *cspA* a 37°C [25].

Una secuencia localizada 14 bases río abajo del codón de iniciación fue denominada como *down box*, DB [7], originalmente propuesta como una señal independiente de traducción, además de la secuencia Shine Dalgarno (SD) [8].

La secuencia DB es complementaria a la región anti-DB del 16S rRNA. La formación de un complejo entre DB de la secuencia del mRNA y la secuencia anti-DB del rRNA de la 16S es responsable del incremento en la traducción [8]. Cuando la secuencia DB fue eliminada del gen *cspA* y la inducción de CspA no fue observada bajo un choque frío [26].

1.2. Respuesta a la congelación.

En la actualidad existe la tecnología necesaria para enfriar sustancias sin llevarlas a un punto de congelación. Las gotas de agua de varios micrómetros de diámetro pueden ser refrigeradas hasta unos -40°C en ausencia de agentes de nucleación de hielo (*INA*) en el agua. Cuando el diámetro de la gota es del orden de nanómetros, el agua puede ser enfriada hasta -70°C . Sin embargo, incluso la nucleación de hielo (homogénea) se produce sin *INA*. En la naturaleza, en el agua están presentes diferentes *INA* no identificados, especialmente de origen biológico, por lo tanto, en la mayoría de los casos, la nucleación de hielo (en este caso heterogénea) catalizada por los *INA* se observa a temperaturas mucho más altas [27].

Esta nucleación heterogénea de hielo a temperaturas relativamente altas es un problema grave en tecnologías biológicas e ingenieriles. Por ejemplo, en la tecnología de vitrificación para la criopreservación de sustancias biológicas, tales como células, tejidos y órganos, la nucleación heterogénea de hielo debe evitarse durante el enfriamiento hasta que la temperatura de transición vítrea es alcanzada. En alimentos congelados, la nucleación de hielo a temperaturas relativamente alta, en general, forma partículas de hielo de gran tamaño, que a menudo deterioran la calidad de los alimentos congelados y por lo tanto debe ser evitado [27].

Existen diversos organismos que sobreviven a temperaturas donde ocurre la nucleación de hielo. A continuación se presentan algunos ejemplos de cómo los organismos han resuelto dicha problemática.

1.2.1. Estrategias generales a la congelación.

El crecimiento de bacterias en temperaturas inferiores a los 0°C en los glaciares, en las regiones polares y en refrigeradores es un fenómeno conocido [10]. Sin embargo, la adaptación a climas inhóspitos no sólo ha sido estudiada en procariontes. Los fluidos del cuerpo de algunas ranas e insectos hibernantes contienen azúcares tales como glucosa y fructosa o alcoholes como manitol, glicerol y aminoácidos como alanina y prolina, los cuales se cree que estabilizan a las proteínas y membranas celulares ante una baja temperatura y por ello han sido llamados crioprotectores. Los crioprotectores como la glicina-betaína (GB) de las bacterias están empezando a ser entendidos [10] y estudiados como agentes protectores en los procesos de congelación y descongelación [28].

Ciertas plantas leñosas de hibernación pueden tener un fluido celular hasta en -50°C , algunos insectos también pueden mantener fluidos sus tejidos hasta en -54°C y esto se atribuye a la presencia de alcoholes polihídricos. Pero el sobre-enfriamiento es una estrategia muy arriesgada ya que la congelación espontánea y repentina puede causar lesiones en los tejidos [10].

En ciertas regiones marinas y en cierto tiempo del año, las condiciones se vuelven extremadamente inhóspitas. Durante los meses de invierno la temperatura del agua se acerca a su punto de congelación; aunque la formación de hielo es un fenómeno común en invierno dependiendo de la latitud, puede formarse incluso en primavera, ya que con un incremento de la latitud hay un incremento general en el volumen de agua bajo cero. Otro factor es la profundidad, la cual juega un papel importante en el potencial de letalidad en los ambientes marinos durante el invierno. Así, han evolucionado una variedad de estrategias para evitar el daño por el frío y la muerte [29].

Algunas especies de peces tales como *Salmo solar*, *Mallotus villosus*, *Cyclopterus lumpus* y *Salvelinus alpinus* evitan el problema de las bajas temperaturas y del hielo llevando a cabo amplias migraciones lejos de las áreas de peligro durante el invierno. Individuos de especies como *Myoxocephalus octodecemspinosus* y *Tautoglabrus adspersus*, sobreviven en aguas litorales poco profundas mediante la selección de microhábitats protegidos, tales como cuevas y grietas. Algunas especies reducen el riesgo del contacto con el hielo excavando dentro de los sedimentos del fondo [29]. Sin embargo, existen especies que son capaces de producir proteínas anticongelantes, las cuales proporcionan una estrategia segura para evitar que los organismos que las tienen se congelen a temperaturas bajo cero, es decir sin daños en los tejidos [10] y sin cambios en su comportamiento.

1.2.2. Proteínas anticongelantes, AFPs.

Las AFPs han sido encontradas en vertebrados, invertebrados, plantas, bacterias y hongos [30]; la mayor diversidad de AFPs encontrada hasta la fecha es en peces teleósteos, las cuales han sido ampliamente estudiadas [31].

Los peces teleósteos están en riesgo por la congelación de mares fríos [31] y la capacidad de algunas especies de producir AFPs, les han facilitado su colonización en zonas muy frías. A la fecha han sido descritos cinco grupos diferentes de AFPs (Tipos I-IV y las glicoproteínas

anticongelantes) (Tabla 1) [29].

Proteína	Tamaño	Características	Similitud con otras proteínas	Referencias
Tipo I	3-5 kDa	Alfa hélice, algunos motivos repetidos	No encontradas	28, 31
Tipo II	14-24 kDa	Globular, algunas son dependientes de calcio	Lectinas tipo C	28, 31
Tipo III	7 kDa.	Globular con una superficie plana	Sintetasa de ácido siálico (SAS).	28, 31,32
Tipo IV	12.3 kDa	17% Glutamina, 4 hélices en anitparalelo	Apolipoproteína	28, 31
AFGP	2.7-32 kDa	Polímeros de Thr, Ala, Ala con un disacárido en cada Thr	No encontrada	28, 31

Tabla 1. Características de los cinco grupos de AFPs

Las AFPs fueron identificadas por DeVries y Wohlschlag en 1969 [29]. Hoy en día se sabe que tienen un papel evitando la formación de cristales de hielo [35]. Algunos autores les han atribuido un papel como crioprotectores, el cual tiene que ver con un incremento en la tolerancia de los organismos a bajas temperaturas, disminuyendo el daño por hipotermia en la ausencia de hielo [29, 36]; este último papel está empezando a ser mejor entendido.

1.2.2.1, Mecanismos de acción de las AFPs

Sabemos que los solutos disueltos en el agua provocan una disminución en su punto de congelación. Por lo tanto el agua de mar en las regiones frías se congela no a 0°C sino a -1.9°C, debido al sodio y otras sustancias disueltas en ella. Con el fin de resistir la congelación de su sangre, los peces que habitan en estos ambientes hostiles (por ejemplo en el Ártico y en el Antártico) deben tener el punto de congelación de sus fluidos por debajo de esta temperatura [10]. Sin embargo, los niveles de solutos en los fluidos corporales de peces teleósteos desciende el punto de congelación del pez entre -0.6 y -0.8°C dependiendo de la salinidad [29].

Las encargadas de descender aun más el punto de congelación son las AFPs, que provocan un decremento de 0.5°C más del punto de congelación. El decremento provocado por los solutos de bajo peso molecular es de naturaleza coligativa [10]. En otras palabras, depende de la concentración de las partículas de soluto disueltas. El agua destilada, que no contiene solutos, se congela a 0°C [29]. Sin embargo, las AFPs poseen la propiedad única de bajar el punto de congelación del agua (en la presencia de cristales de hielo), sin alterar significativamente el punto de fusión, lo que indica que el fenómeno no es coligativo (si se tratara de un fenómeno coligativo no habría diferencia entre el punto de congelación y el punto de fusión) [30]. La diferencia entre punto de fusión y punto de congelación es llamada histéresis térmica o *TH* por sus siglas en inglés [37] y es ampliamente utilizada como un indicador de la actividad de las AFPs [35].

De acuerdo con el mecanismo de inhibición de la absorción propuesta por Raymond y DeVries, la unión entre las AFPs y la superficie de los cristales de hielo hace al cristal crecer con frentes convexos (Figura 3). Este patrón es termodinámicamente desfavorable, lo que a su vez conduce al efecto anticongelante [10]. Estudios recientes han demostrado que las AFPs se unen preferencialmente más a los cristales y al hielo que a las moléculas de agua, sin embargo el proceso aun no es del todo claro [38].

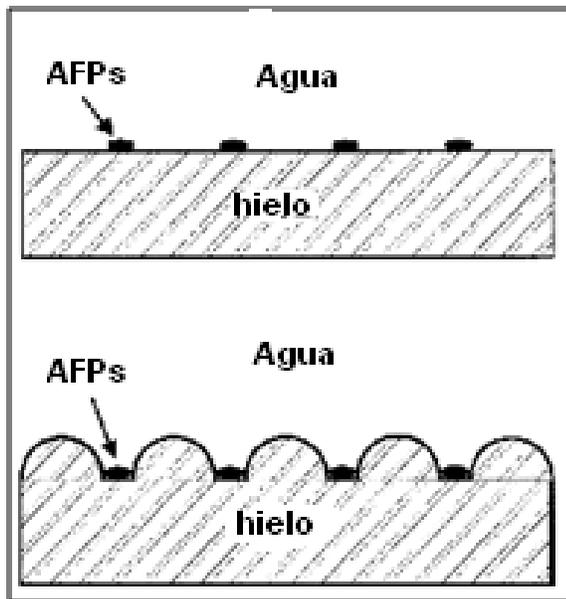


Fig.3. Modelo de la interacción entre AFPs y el hielo [30].

Las proteínas anticongelantes se unen a la superficie de los cristales de hielo, lo que causa un crecimiento de los frentes de manera convexa.

Las AFPs inhiben la recrystalización [35], evitando el crecimiento de cristales de hielo de tamaño que se produce a expensas de los cristales más pequeños [10]. Las proteínas anticongelantes se unen al hielo en una manera definida geoméricamente, deteniendo el crecimiento en direcciones específicas, por lo que alteran la morfología del hielo (Figura 4) [31].

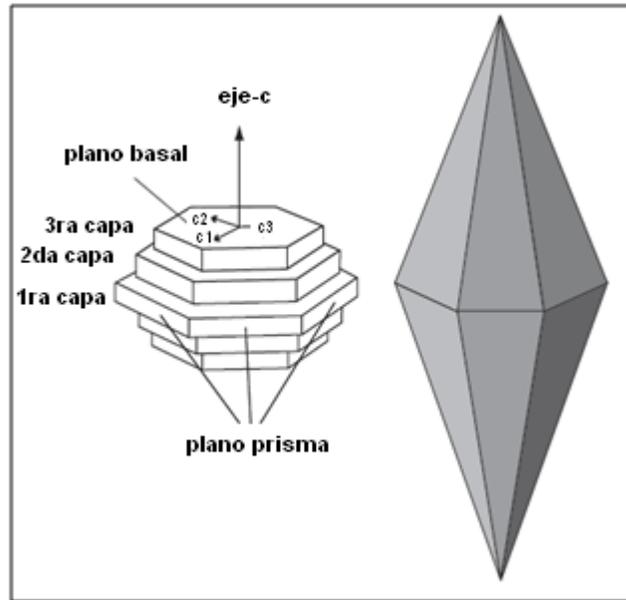


Fig.4. Esquema de crecimiento de un cristal de hielo producido por una AFP III [39]

El origen de un hielo bipirámide es una unidad hexagonal generado en agua superenfriada bajo una presión de 10013hPa. Un esquema de transición de una unidad hexagonal a un hielo pirámide en la presencia de AF. Cuando las AFPs están presentes inhiben el crecimiento a lo largo de los ejes 1, 2, y 3 del eje C.

1.2.2.2. Aspectos evolutivos.

En peces han sido identificados cinco tipos estructurales de AFPs. Estas proteínas son extremadamente diversas y cada tipo es estrechamente distribuida entre grupos de peces. La inusual combinación de una diversidad estructural y una limitada distribución lleva a la hipótesis sugerente de que cada tipo de *AFP* ha evolucionado independientemente después de que los grupos taxonómicos de peces alcanzaran su estado actual [31].

Se ha propuesto que a lo largo de diversos enfriamientos y glaciaciones geológicamente recientes, las especies de peces tuvieron una fuerte presión selectiva para evitar el congelamiento. Por lo que la selección favoreció algún mecanismo que bajara el punto de congelamiento, el cual no debió de interrumpir la homeostasis y esto podría haber llevado a la variedad de AFPs que existe en

los peces teleósteos [31].

Los diversos tipos de AFPs tienen dos orígenes contrastantes. Algunas surgieron como una variante en familias de proteínas conocidas con funciones no relacionadas. Otras son genuinamente nuevas, formadas por eventos genéticamente recientes [31].

El tipo II ha evolucionado a partir de miembros de una superfamilia de proteínas, las lectinas tipo C, estas tienen un 30% de identidad a nivel de aminoácidos, tanto las proteínas tipo II como las Lectinas tipo C son dependientes de Ca^{+} [40].

La duplicación de genes es bien conocida como una fuente importante de genes con nuevas funciones, sin embargo el mecanismo no es del todo claro, estudios recientes han sugerido que las AFPs de tipo III han surgido a partir de un gen ancestral que originó a la sintetasa de ácido siálico y a las AFP III en donde fuertes presiones selectivas llevaron a diferentes trayectorias [33].

El tipo IV de las AFPs muestra un 20% de identidad con miembros de la superfamilia de apolipoproteínas, la cual se ha propuesto que ha emergido debido a la duplicación de un gen donde posteriormente obtuvo una nueva función [40].

No todas las AFPs tienen una similitud en alguna secuencia de genes actualmente conocidos en la base de datos, tales como AFP I y las AFGPs, sin embargo las AFGPs tienen la característica particular de estar compuestas de pequeñas repeticiones de Thr-Ala-Ala con cada Thr unida a un disacárido, la secuencia repetitiva de la proteína sugiere que el gen que codifica surgió de las duplicaciones *de novo* de un elemento corto que codifica para el monómero tripéptido [40].

II. Hipótesis

Si se transforma a una cepa silvestre de *Escherichia coli* con un vector que le permita expresar una proteína anticongelante y es llevada a su punto de congelación, entonces mostrará un comportamiento de crecimiento diferente al de una cepa silvestre sometida a las mismas condiciones, donde posiblemente la cepa con la proteína anticongelante presente una ventaja.

III. Objetivos

3.1. Objetivo general

Expresar una proteína anticongelante proveniente de peces de la familia Zoarcidae en una bacteria, *Escherichia coli*, y analizar su efecto anticongelante a través de su sobrevivencia mediante un modelo de crecimiento bacteriano.

3.2. Objetivos particulares

- ❖ Insertar el gen de la AFP del tipo III en un vector
- ❖ Transformar una cepa comercial de *E. coli* con el vector
- ❖ Elaborar un modelo que permita comparar el crecimiento de las cepas.
 - Fase I: Realizar un modelo de crecimiento en condiciones ideales para *E. coli*, es decir a 37°C
 - Fase II: Determinar la duración de la fase de aclimatación a 15°C
 - Fase III: Realizar un modelo que permita comparar las dos cepas después de llevarlas a un punto de congelación
- ❖ Analizar el sistema para poder observar si se genera una ventaja ante un evento de congelación.

IV. Materiales y métodos

4.1. Construcción del plásmido.

4.1.1 Secuencias

Vector

Como vector de expresión se usó el vector comercial pCold I desarrollado por Quian et al [41]. Este pertenece a una serie de vectores de expresión por choque frío (*cold-shock vectors*), los cuales se nombraron como pColdI, pColdII, pColdIII y pColdIV. Estos cuatro vectores son idénticos y todos ellos se derivan del vector pUC118 como esqueleto, sin embargo contienen un promotor *cspA*, con su región UTR y una DB modificada (TEE, *translation enhancing element*), además del sitio de terminación de la transcripción. Todos los vectores contienen el operador *lacI*, que previene la actividad constitutiva del promotor *cspA*, así la inducción de la expresión de proteínas por un choque frío se lleva a cabo por la adición de 1mM isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) y un choque frío¹.

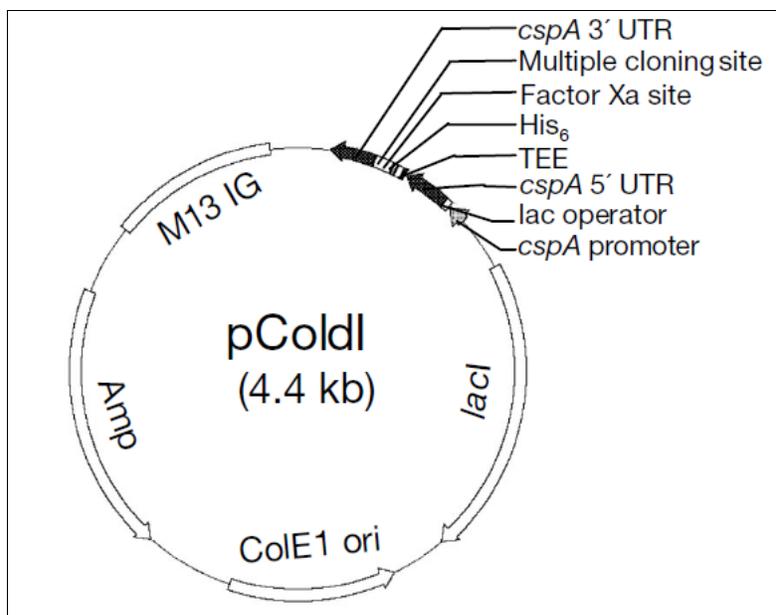


Fig. 5. Representación esquemática del vector pCold I [41].

¹ La secuencia completa del vector pColdI se encuentra en NCBI [42].

Inserto

El gen a expresar es una secuencia consenso tomada de la base de datos de NCBI realizada por Hew *et al.* 1988 [43], el gen se mandó sintetizar a Mr. Gene (© 2011 Life Technologies Corporation All Reserved) con un previo ajuste a los codones preferenciales para *E. coli*, la secuencia fue insertada en el plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana, el cual tiene un peso de 2570bp en el cual fue clonado "*in silico*" el 20 de septiembre de 2010.

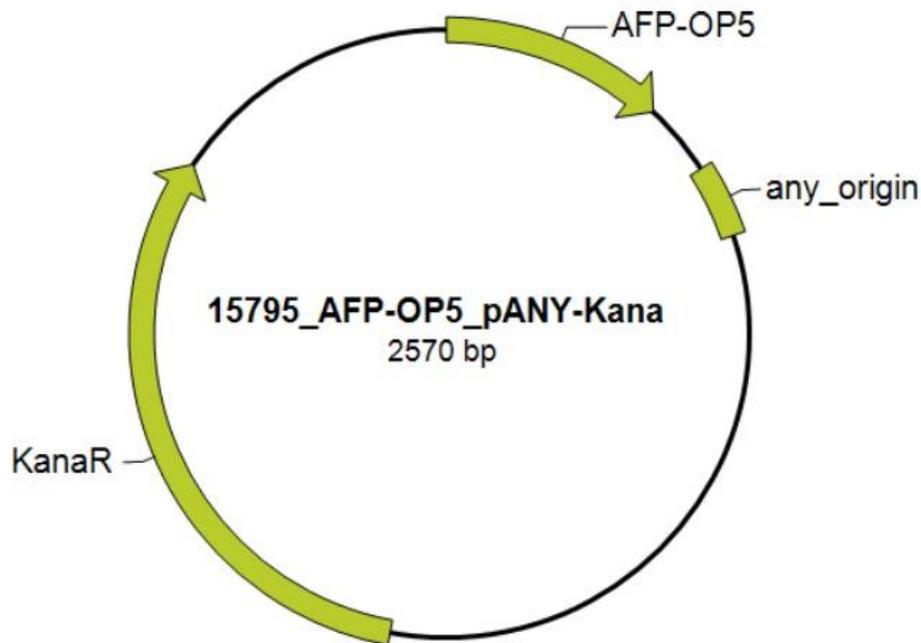


Fig.6. Representación esquemática del plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana.

Secuencia del gen de la proteína anticongelante tipo III:

```
5'-ATGAAAAGCGTGATTCTGACCGGCCTGCTGTTTGTGCTGCTGTGCGTGGATCATATGACCGC  
GAGCCAGAGCGTGGTGGCGACCCAGCTGATTCCGATTAACACCGCGCTGACCCCGGTGATGAT  
GGAAGGCAAAGTGACCAACCCGATTGGCATTCCGTTTGCAGAAATGAGCCAGATTGTGGGCAA  
ACAGGTGAACACCCCGGTGGCGAAAGGCCAGACCCTGATGCCGAACATGGTGAAAACCTATGC  
GGCGGGCAAATAATAA-3'.
```

Oligos

El siguiente par de oligos fueron diseñados para amplificar el gen de la proteína anticongelante²

>*Forward*

5'-GAATTCGCGGCCATGAAAAGCGTGA-3'



>*Reverse*

5'-ACTAGTATTATTATTGCCCCGCCGC-3'



4.1.2. Obtención del vector.

A partir de una cepa de *Escherichia coli* Top 10 transformada con el vector pCold I, se inoculó y se incubó toda la noche en medio líquido LB + ampicilina a una concentración de 100µg/ml (ver Anexo I), a una temperatura de 37°C y una agitación de 175rpm.

Posteriormente a partir de este cultivo se purificó el vector pCold I por medio de la técnica de lisis alcalina mediante un midiprep (ver Anexo I).

El plásmido purificado fue almacenado, al igual que todas las muestras de DNA, en un ultracongelador a -20°C.

² Los oligos fueron probados a través de PCR virtual [44]

Digestión del vector con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI.

Se cortó el vector obtenido a partir de un midiprep, de la siguiente manera:

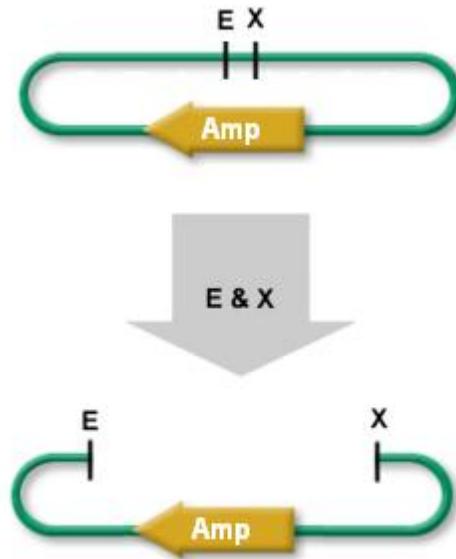


Fig.7. Representación esquemática de la digestión del vector pColdI con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI. Modificado de Registry of Standard Biological Parts [45].

Primero se digirió durante 12hr con la enzima de restricción XbaI, junto con las recomendaciones del proveedor (Fermentas). Posteriormente se inactivó congelando a -20°C durante 30 minutos.

La segunda digestión durante 3hr con EcoRI, junto con las recomendaciones del proveedor (Fermentas).

Finalmente se limpió el DNA para reacciones posteriores mediante la precipitación con sales, alcohol absoluto y alcohol al 70% (ver Anexo I).

Para comprobar la obtención del vector, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% durante 1 hora en TBE 1X a 80V y se cargaron 2µl del DNA previamente precipitado y diluido en 15µl de agua Milli-Q™ y amortiguador de carga. El resto de la muestra fue almacenado en tubos

Eppendorf en un ultracongelador a -20°C.

4.1.3. Obtención del inserto.

Se prepararon células competentes (ver Anexo I) de la cepa Top 10 de *E. coli* y se transformó transformaron con 4µl del plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana a una concentración de 20ng/ml y posteriormente se estriaron en cajas con medio LB + kanamicina con una concentración de trabajo de 35 µg/ml.

Se seleccionó una colonia transformada y se inoculó en medio líquido LB + kanamicina (35µg/ml), el cual se dejó toda la noche. A37°C y una agitación de 175 rpm.

A partir de este cultivo se purificó el plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana por medio de la técnica de lisis alcalina mediante un Midiprep (ver Anexo I).

El plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana fue almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -20°C.

PCR

Se obtuvo mediante amplificación el gen de la AFP III a partir de una reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, se utilizó la mezcla del Ready Red Taq de Sigma, con los oligos previamente diseñados, diluidos a una concentración de 2µM.

PCR 60°C	µl por cada reacción
Ready Red Taq	2
Oligo forward	2
Oligo reverse	2
Templado	2
Total	12

El programa con el que se corrió el PCR fue programado de la siguiente manera:

Desnaturalización inicial

3 minutos a 94°C

Amplificación

Desnaturalización 30 segundos a 94°C

Hibridación 30 segundos a 55°C

Extensión 30 segundos a 72°C

35 Ciclos.

Extensión final

- 5 minutos a 72°C

Se realizó la comprobación de la amplificación del gen de la AFP, mediante una electroforesis, en donde se cargaron 4µl de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 0.7% en Tris, borato, EDTA ó TBE durante 1hr a 80V y posteriormente fue teñido con bromuro de etidio para su observación por fluorescencia.

Digestión del vector con las enzimas de restricción SpeI y EcoRI

Se digirió el fragmento de DNA obtenido a partir de PCR de la siguiente manera:



Fig.8. Representación esquemática de la digestión en los extremos del producto de PCR. Modificado de Registry of Standard Biological Parts [45].

Primero se digirió durante 12hr con la enzima de restricción SpeI, junto con las recomendaciones del proveedor Takara. Posteriormente se inactivó por congelación a -20°C durante 30 minutos.

La segunda digestión durante 3hr se llevó a cabo con EcoRI, junto con las recomendaciones del proveedor Takara.

Finalmente se inactivó la reacción agregando 1/10 del Buffer *loading* de TAKARA y se limpió el DNA para reacciones posteriores mediante la precipitación con sales, alcohol absoluto y alcohol al 70%.

Para comprobar la obtención de DNA, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% durante 1 hora en TBE 1X a 80V y se cargaron 2µl del DNA previamente precipitado y diluido en 15µl de agua Milli-Q™ y amortiguador de carga.

El resto de la muestra fue almacenado en tubos Eppendorf en un ultracongelador a -20°C.

4.1.4. Ligación VECTOR + INSERTO.

La ligación del vector pColdI con el gen de la AFP III fue realizada mediante la preparación de la siguiente mezcla, la cual se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora (ver cálculos en el Anexo I)

Ligación del vector y el inserto	µl por cada reacción
Inserto	1
Vector	1
10XT4 Ligasa Buffer	1
T4 DNA Ligasa	1
Agua	5
Total	10

Posteriormente se realizó una transformación por medio de choque térmico en células competentes de top10 de *E. coli* y se estriaron en cajas con medio LB + Agar + ampicilina a una concentración de trabajo de 100 µg/ml.

Comprobación de la ligación

Para comprobar la ligación se realizó una digestión con EcoRI Takara (de la misma manera que se

describió previamente) del plásmido purificado por medio del kit “Gene JET” de Fermentas a partir de un cultivo de 12hrs a 37°C.

Además se realizó un PCR al plásmido purificado utilizando el programado como anteriormente se mencionó:

PCR 60°C	µl por cada reacción
Ready Red Taq	6
Oligo forward	2
Oligo reverse	2
Templado	2
	12

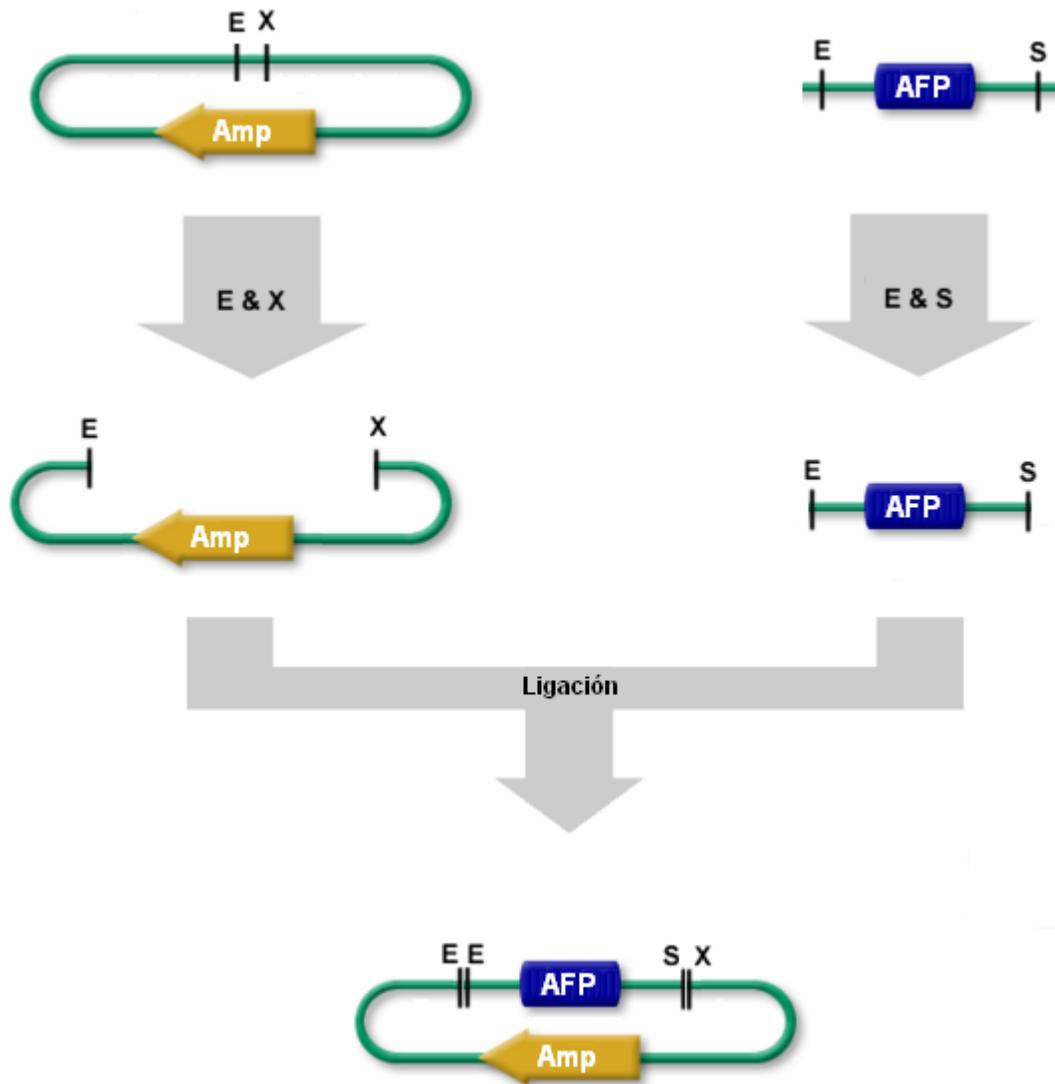


Fig. 9. Representación de la ligación del vector pCold I más la proteína anticongelante tipo III. Modificado de Registry of Standard Biological Parts [45].

4.1.5. Medios de cultivo y conservación de las cepas.

La cepa de *E. coli* empleada en este trabajo fue Top 10. En general la cepa Top 10 fue cultivada en medio LB con el antibiótico correspondiente a 37°C durante 12 hrs con una agitación de 175rpm. Todas las cepas transformadas se conservaron en glicerol al 20% a - 80°C.

4.2. Experimentos para el modelo de crecimiento bacteriano bajo un choque frío y un evento de congelación.

4.2.1. Fase I: Determinación del crecimiento de *E. coli* en condiciones ideales.

Se dejó un inóculo de una cepa silvestre, es decir de una cepa top 10 de *E. coli* sin haber sido transformada, durante 12 hrs (*overnight*) en un matraz con 50ml de medio SOC a una agitación de 300rpm.

De igual manera se dejó un inóculo de la cepa top 10 transformada con el gen de la AFP durante 12hr (*overnight*) en un matraz con 50ml de medio SOC a una agitación de 300rpm.

Se llenaron tubos Falcon de 15ml con 4 ml de medio SOC y se inocularon con 80microlitros del preinóculo previamente mencionado.

Todos los tubos fueron puestos en una incubadora a 37°C con una agitación de 300rpm.

Se monitoreó su crecimiento en intervalos de aprox. 30 minutos en un espectrofotómetro programado a una longitud de onda de 600nm.

Cada tubo sirvió para una lectura y cada lectura se realizó por triplicado.

El monitoreo del crecimiento se realizó con el siguiente protocolo:

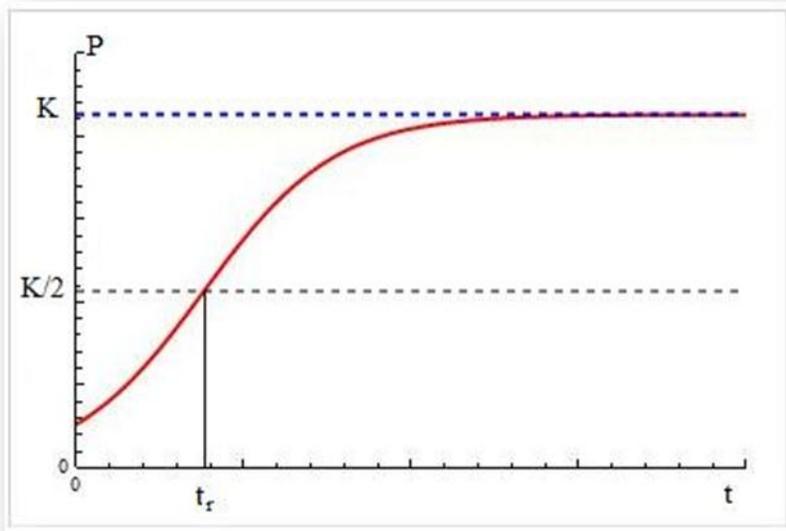
1. Después de identificar el cero en la población, medir la primera población distinta de cero P_0 y comenzar a medir el tiempo desde ahí, $t_0 = 0$.
2. Medir el tiempo total: desde que se tenía P_0 hasta que comience a estabilizarse la población. A dicho tiempo llamarle t_f .
3. Medir el punto donde se estabilizó la población, a tal parámetro llamarle K .
4. Medir la población en intervalos de tiempo hasta que no haya un crecimiento en la población.
5. En la siguiente medición de población después de t_0 identificar a tal medición con el parámetro P_1 y al tiempo con t_1 .
6. Con los parámetros anteriores se obtiene el nuevo parámetro que ayuda a medir la rapidez de crecimiento de la población r , es decir, el factor de proporcionalidad entre la población inicial y la velocidad de crecimiento de población, el cual se obtiene con la fórmula:

$$r = \frac{1}{t_1} \ln \left(\frac{P_1}{P_0} \right)$$

7. Se espera que los datos obtenidos se aproximen a la función:

$$P(t) = \frac{rP_0}{\frac{rP_0}{K} + \left(r - \frac{rP_0}{K} \right) \exp(-rt)}$$

Cuya gráfica es:



8. Se sabe que el momento en donde la población deja de crecer exponencialmente, es decir cuando ya generan efecto sobre la población las restricciones (en este caso de nutrientes), es cuando se tiene una población igual a $K/2$. Entonces es posible determinar el tiempo en el que esto ocurre, a tal tiempo le llamaremos t_r .

$$t_r = \frac{1}{r} \ln \left(\frac{K - P_0}{P_0} \right)$$

9. El tiempo t_r será el que se use para dejar la colonia de bacterias a una temperatura de 37°C , comenzando de t_0 . Después de eso la temperatura se reducirá a 15°C .

4.2.2. Fase II: Determinación de la duración de la fase de aclimatación.

Durante esta fase se determinará el tiempo de aclimatación de la bacteria, después de haberla sometido a un cambio de temperatura de 37°C a 15°C..

Para este experimento se dejó un inóculo de una cepa silvestre, durante 12 hrs (*overnight*) en un matraz con 50ml de medio SOC a una agitación de 300rpm y 37°C.

De igual manera se dejó un inóculo de la cepa top 10 transformada con el gen de la AFP durante 12hr (*overnight*) en un matraz con 50ml de medio SOC a una agitación de 300rpm y 37°C.

Se llenaron tubos Falcon de 15ml con 4 ml de medio SOC y se inocularon con 80microlitros del preinóculo previamente mencionado.

Todos los tubos fueron puestos en una incubadora a 37°C con una agitación de 300rpm hasta llegar al tiempo de $k/2$.

Se llevó a 15°C en el tiempo de $K/2$ previamente establecido en la fase I en donde además se agregó a cada tubo en condiciones de esterilidad IPTG al 1mM.

Se monitoreó su crecimiento en un espectrofotómetro programado con una longitud de onda de 600nm.

Cada tubo sirvió para una lectura y cada lectura se realizó por triplicado.

El monitoreo del crecimiento se realizó con el siguiente protocolo:

1. Obtener un cultivo de bacterias en donde la población inicial sea P_0 , considerar desde ahí $t_0 = 0$; dejar la colonia un tiempo t_r a una temperatura de 37°C.
2. Después de t_r cambiar la temperatura de 37°C a 15°C y comenzar a hacer mediciones de la población.
3. Continuar las mediciones hasta observar que comienza a haber nuevamente un incremento en la población.
4. Con los datos determinar el tiempo t_d en el que se deberá dejar la colonia de bacterias a 15°C para que la proteína pueda expresarse.

4.2.3. Fase III: Determinación del efecto de la AFP después de un evento de congelación

Se dejó un inóculo de una cepa silvestre, durante 12 hrs (*overnight*) en un matraz con 50ml de medio SOC a una agitación de 300rpm a 37°C.

De igual manera se dejó un inóculo de la cepa top 10 transformada con el gen de la AFP durante 12hr (*overnight*) en un matraz con 50ml de medio SOC a una agitación de 300rpm a 37°C.

Se llenaron tubos Falcon de 15ml con 4 ml de medio SOC y se inocularon con 80 micro-litros del preinóculo previamente mencionado.

Todos los tubos fueron puestos en una incubadora a 37°C con una agitación de 300rpm.

Se llevó a 15°C en el tiempo de *K/2* en donde además se agregó a cada tubo en condiciones de esterilidad IPTG al 1mM.

Se dejó a 15°C durante el periodo de aclimatación determinado en la fase II, posteriormente se dejó durante 12hr a -5°C (temperatura de congelamiento del LB³).

Además posteriormente se dejó durante 1hr a -20°C y se pasó a su monitoreo.

Se monitoreó su crecimiento en un espectrofotómetro programado con una longitud de onda de 600nm.

Cada tubo sirvió para una lectura y cada lectura se realizó por triplicado.

³ Se realizó un monitoreo durante una semana en un congelador en donde se colocaron tubos Falcon de 15ml con 4ml de medio LB enriquecido y se determinó el punto de congelamiento en dichas condiciones

V. Resultados

5.1. Comprobación previa al modelo

5.1.1. Comprobación de obtención del vector

La siguiente foto es de un gel de agarosa al 0.7% resultado de una electroforesis de duración de 1 hora en TBE 1 X a 80V en donde se cargaron 2µl de marcador AXYGEN 1Kb en el primer carril, y 2µl de DNA (pColdI) previamente precipitado y diluido en 15µl de agua Milli-Q™ con 2 µl de buffer de carga en el segundo carril.

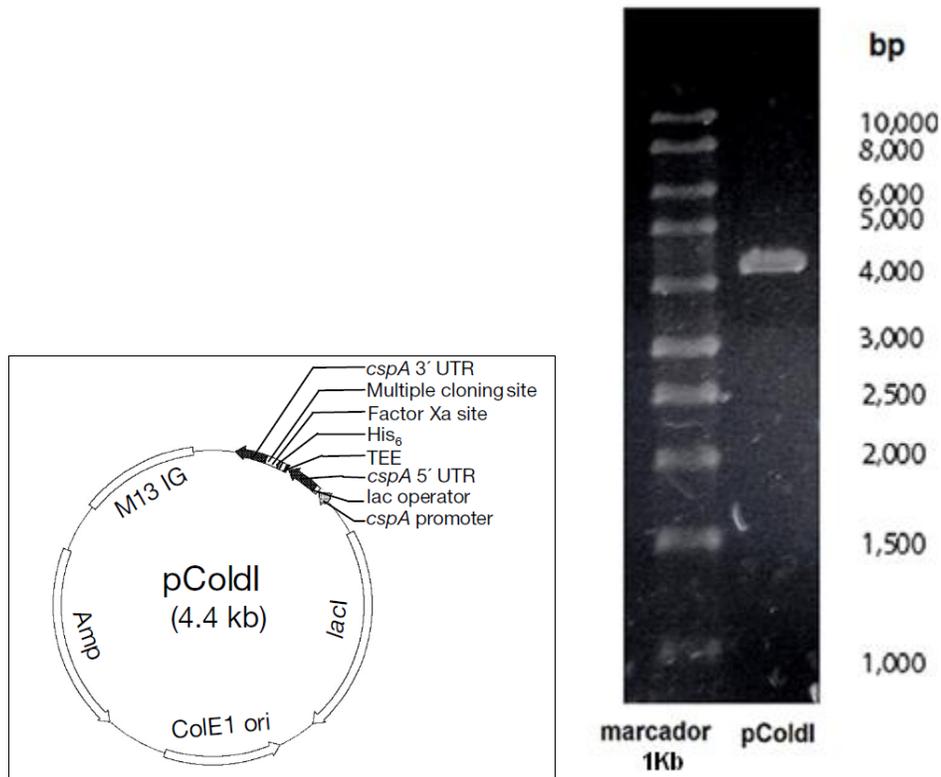


Fig.10. Esquema del vector pColdI junto con la fotografía de un gel de agarosa correspondiente al tamaño del vector pColdI. El DNA de pColdI fue el obtenido de un midiprep y fue limpiado con alcohol después de haber sido digerido con las enzimas de restricción XbaI y EcoRI como se explica en material y métodos.

El fragmento esperado era de 4407bp el cual pertenece al vector pColdI y como se puede observar en la figura 10 el tamaño corresponde al tamaño esperado.

5.1.2. Comprobación de obtención del inserto

Para comprobar la obtención del gen de la AFP, primero se verificó haber obtenido el plásmido en donde se encontraba, es decir el 15795_AFP-OP5_Pany-Kana. La foto pertenece a un gel de agarosa al 0.7% resultado de una electroforesis de duración de 1 hora en TBE 1X a 80V en donde se cargaron 2µl de DNA (15795_AFP-OP5_Pany-Kana) previamente precipitado y diluido en 15µl de agua Milli-Q™ con 2 µl de buffer de carga en el primer carril y 2µl de marcador AXYGEN 100bp (100-3,000bp) en el segundo carril.

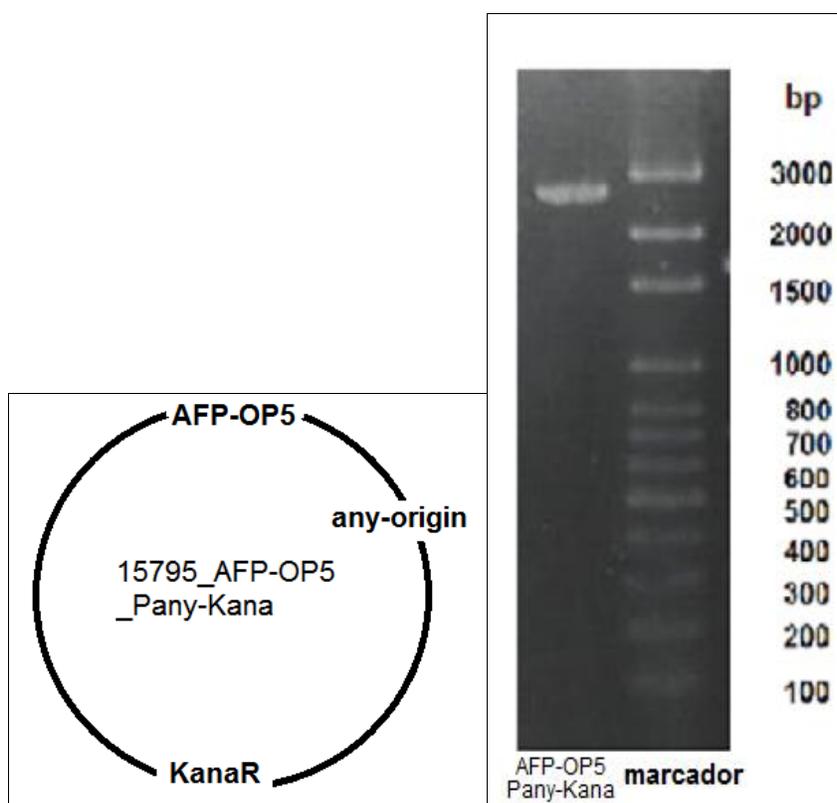


Fig.11. Esquema del plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana junto con la fotografía de un gel de agarosa correspondiente al tamaño de 15795_AFP-OP5_Pany-Kana. El DNA de 15795_AFP-OP5_Pany-Kana que se corrió fue obtenido de un midiprep y fue limpiado con alcohol después de haber sido digerido con la enzima de restricción EcoRI como se explica en material y métodos.

El fragmento esperado era de 2570bp el cual pertenece al plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana, como se puede observar en la figura 11 el tamaño correspondió al tamaño esperado.

Una vez verificada la obtención del plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana, se confirmó la obtención del gen de la AFP. La foto presentada a continuación pertenece a un gel de agarosa al 0.7% después de una electroforesis de duración de 1 hora en TBE 1X a 80V en donde se cargaron 2µl de marcador AXYGEM 100bp (100-3,000bp) en el primer carril, y 2µl de DNA del inserto AFP previamente precipitado y diluido en 15µl de agua Milli-Q™ con 2µl de buffer de carga en el segundo carril.

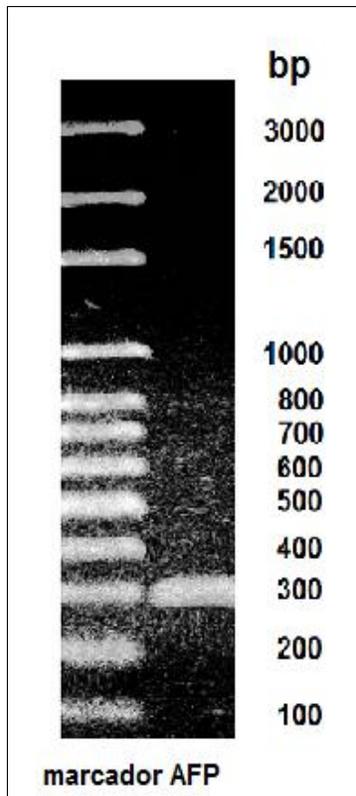


Fig.12. Fotografía de un gel de agarosa correspondiente al tamaño del inserto AFP. El DNA que se corrió en la electroforesis fue obtenido de un PCR. Se limpió con alcohol después de haber sido cortado con las enzimas de restricción SpeI y EcoRI como se explica en material y métodos.

El fragmento esperado era de 284bp el cual pertenece al gen de la AFP, como se puede observar en la figura 12 el tamaño correspondió al tamaño esperado.

5.1.3. Comprobación de obtención de la ligación VECTOR + INSERTO.

La siguiente foto es de un gel de agarosa al 0.7% resultado de una electroforesis de duración de 1 hora en TBE 1X a 80V. En el primer carril se cargaron 2µl corresponde a marcador molecular 1kb AXYGEN, el segundo carril contiene 2µl de un PCR a partir del plásmido 15795_AFP-OP5_Pany-Kana, el tercer carril contiene 2µl de un PCR de la ligación (pColdI+AFP) y finalmente el cuarto carril contiene 2µl de un PCR a partir de vector pColdI.

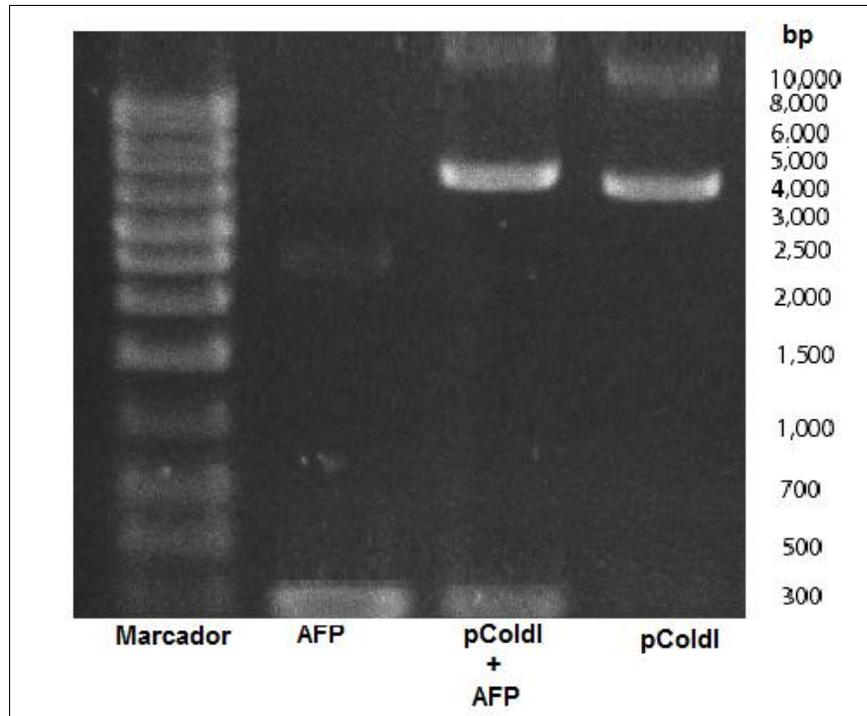
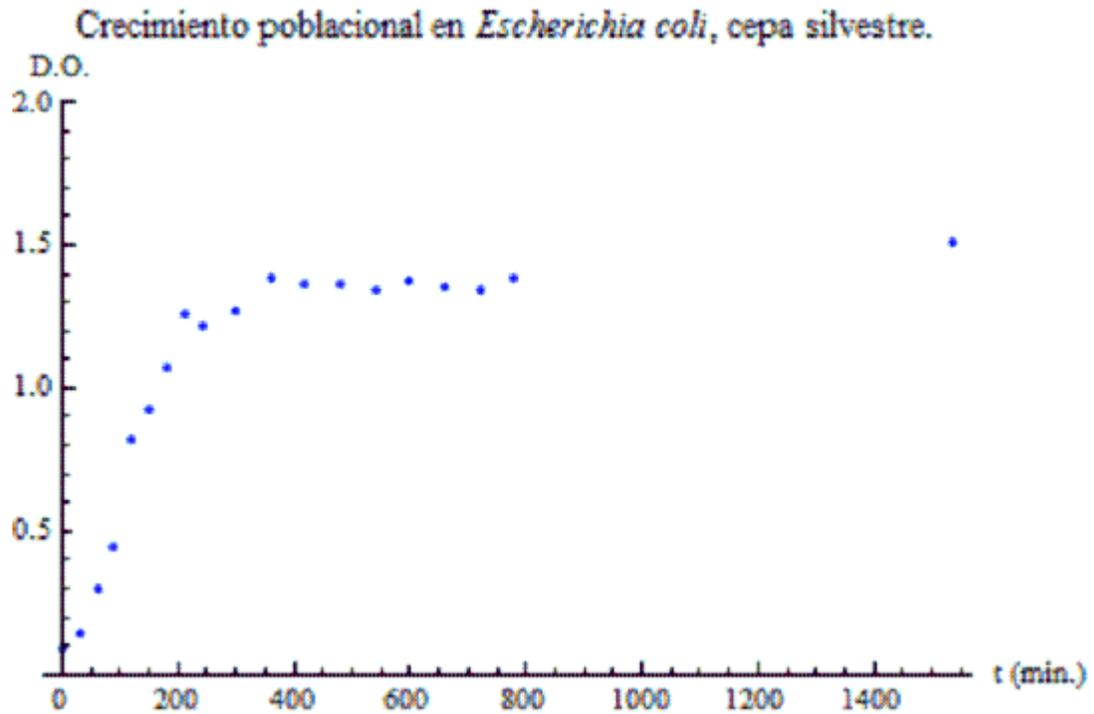


Fig.13. El DNA que se corrió en la electroforesis fue de obtenido de un PCR con los oligos diseñados para obtener la AFP como se explica en material y métodos.

El fragmento esperado era de 284pb el cual pertenece al gen de la AFP, como se puede observar en la figura 13 el tamaño observado en el tercer carril correspondió al tamaño esperado en la ligación.

5.2. Experimentos modelo.

5.2.1. Fase I: Determinación del crecimiento de *E. coli* en condiciones ideales.



Gráfica 1. Crecimiento poblacional en una cepa silvestre de *Escherichia coli*,

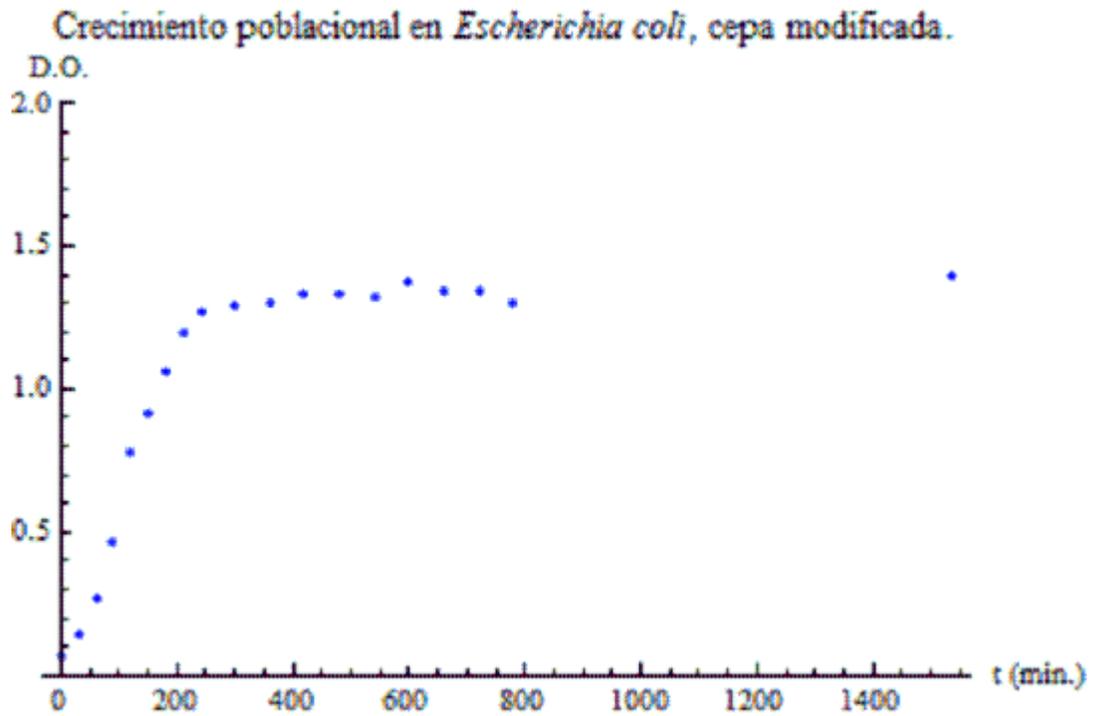
El eje X representa los minutos, el eje Y representa la densidad óptica. Los puntos azules representa el crecimiento poblacional de la cepa silvestre tomada directamente de los promedios de las mediciones que se realizaron experimentalmente.



Foto 1. Cultivos de *Escherichia coli*.



Foto 2. Incubadora programada a 37°C



Gráfica 2. Crecimiento poblacional en la cepa modificada de *Escherichia coli*,

El eje X representa los minutos, el eje Y representa la densidad óptica. La gráfica 2 representa el crecimiento poblacional de la cepa modificada tomada directamente de los promedios de las mediciones que se realizaron experimentalmente.

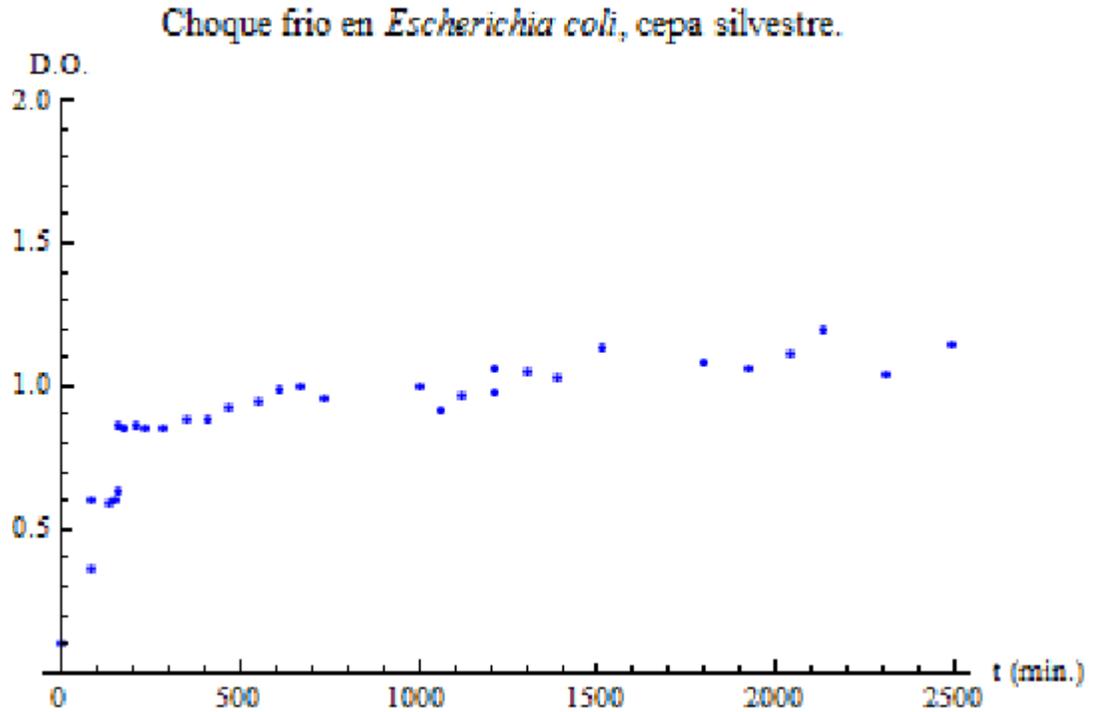


Foto 3. Incubadora cubierta con aluminio, reproduciendo las condiciones nativas de *Escherichia coli*.



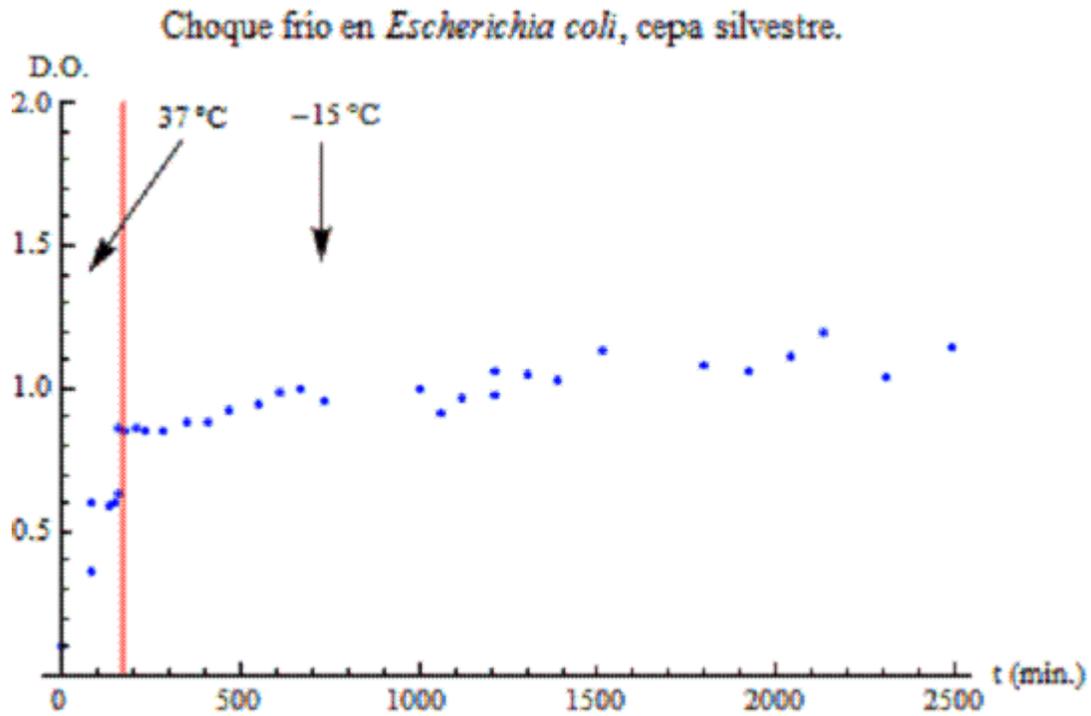
Foto 4. Incubadora programada a 300rpm

5.2.1. Fase II: Determinación de la duración de la fase de aclimatación.



Gráfica 3. Crecimiento poblacional antes y después de un choque frío en la cepa silvestre de *Escherichia coli*,

El eje X corresponde a los minutos, el eje Y corresponde a la densidad óptica. La gráfica 3 representa el crecimiento poblacional de la cepa silvestre tomada directamente de los promedios de las mediciones que se realizaron experimentalmente, el momento en que se dio el choque fue cuando $t_r = 172$ minutos, es decir el tiempo en el que llegó a $K/2$.



Gráfica 4. Crecimiento poblacional indicando el momento del choque frío en la cepa silvestre de *Escherichia coli*,

El procedimiento para la cepa modificada fue exactamente el mismo, sin embargo al parecer el tiempo de recuperación fue mayor al de la cepa silvestre y dado que sólo se requiere el tiempo de aclimatación en el que ambas cepas se comportaron igual, la cepa silvestre es la que determinó la duración de la fase a partir de estos datos.



Foto 5. Termostato programado a 15°C Foto 6. Cuarto Frío controlado con oscilaciones de 1°C

5.2.3. Fase III: Determinación del efecto de la AFP después de un evento de congelación.

Una vez que se sacaron los tubos de -20°C se observó que mientras todos los tubos de la cepa silvestre se congelaron, los tubos con la cepa modificada se congelaron de manera distinta y 5 tubos de 15 no se congelaron.

Escherichia coli: cepa modificada y cepa silvestre después de un evento de congelación.

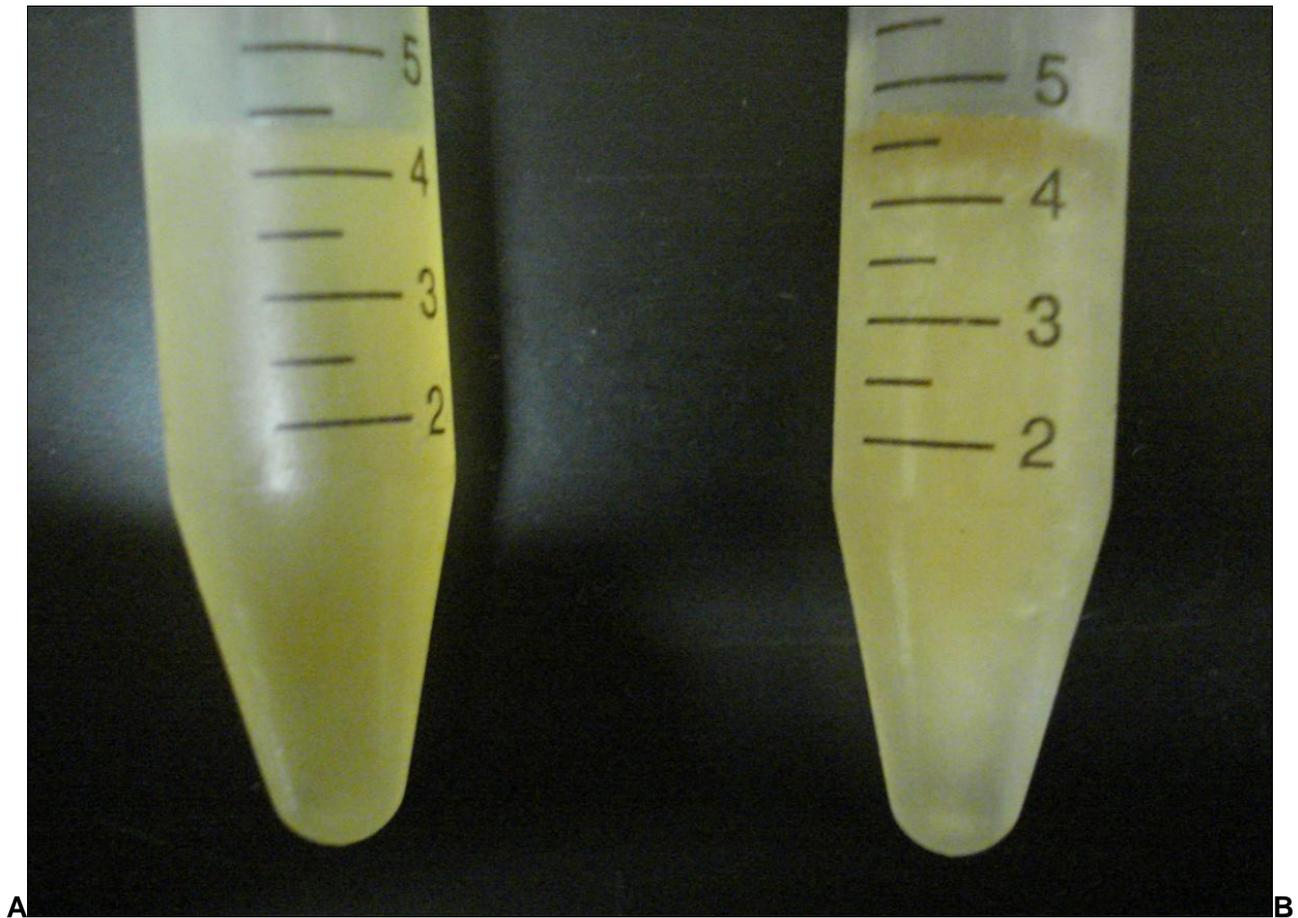
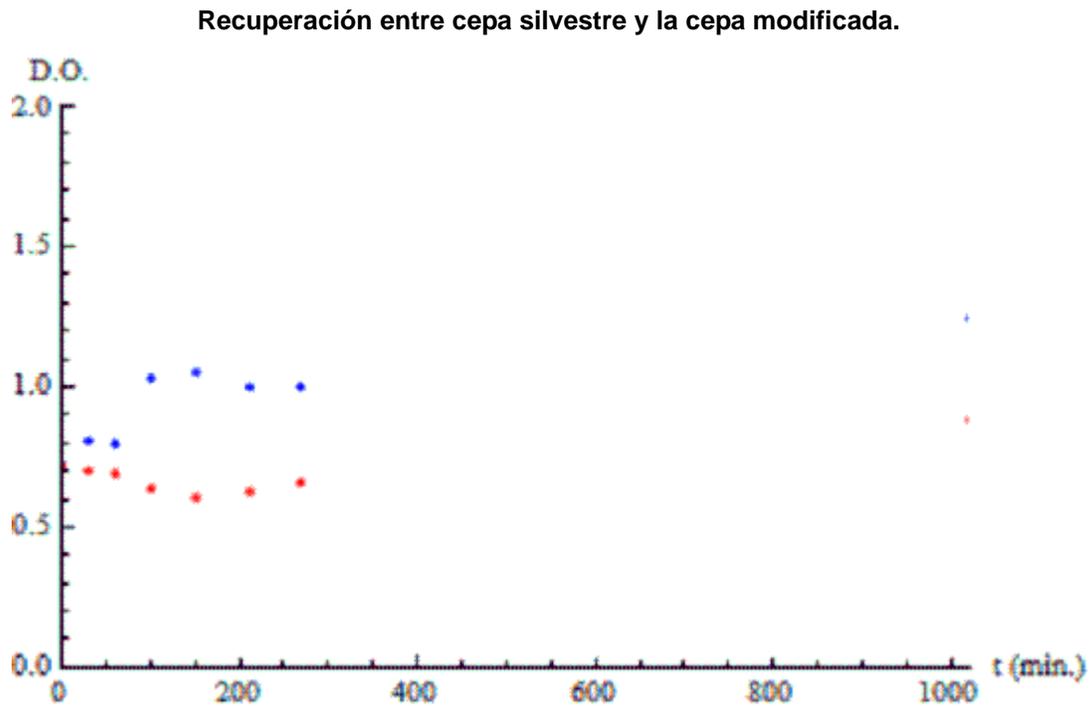


Foto 7. Tubos con cultivo de *Escherichia coli* los cuales muestran una diferencia en su congelamiento. El tubo A contiene la cepa modificada y muestra un estado “gelatinoso”, el tubo B se contiene la cepa silvestre muestra un estado sólido.

La foto 7 tomada después de congelar a -20°C , el tubo del lado A contiene a la cepa modificada, el tubo del lado B contiene a la cepa silvestre. Como se puede observar en la foto existe un congelamiento distinto, la cepa modificada se congeló de manera uniforme y “gelatinosa” mientras que la cepa silvestre se congeló de una manera heterogénea.

Después de sacar los tubos del congelador descongelaron a una temperatura de 4°C, se regresaron a las condiciones ideales, es decir 37°C con una agitación de 300rpm.

Y los datos obtenidos están representados en la siguiente gráfica:



Gráfica 5. Recuperación entre cepa silvestre y la cepa modificada.

El eje X corresponde a los minutos, el eje Y corresponde a la densidad óptica. La gráfica 5 representa el crecimiento poblacional de la cepa silvestre tomada directamente de los promedios de las mediciones que se realizaron experimentalmente, a partir del momento en que se retomaron las condiciones ideales.

VI. Análisis de resultados

6.1. Fase I: Determinación del crecimiento de *E. coli* en condiciones ideales.

Crecimiento poblacional de *Escherichia coli*, cepa silvestre.

Los siguientes datos son los promedios de cada medición, es decir, si se hicieron tres mediciones, entonces $(m_1+m_2+m_3)/3$ es el dato en DO a 600nm.

En la tabla 2 la distancia representa la cercanía o lejanía del valor experimental contra el valor teórico de la densidad óptica, el límite inferior y el límite superior, es decir, los límites de los cuales se espera que crezca la población a un tiempo dado, estos fueron obtenidos a partir de la distancia y posteriormente se calculó el promedio de todas las distancias y se dividió entre dos ese valor para usarlo finalmente en la definición de los límites superior e inferior.

Silvestre DO							
Medición	t (min.)	DO	DO Teórica	Distancia	Lim. Inf.	Lim. Sup.	
1	0	0.0870	0.0870	0.0000	0.0171	0.1569	K
2	30	0.1417	0.1367	0.0050	0.0668	0.2066	1.5094
3	60	0.3036	0.2106	0.0929	0.1407	0.2805	
4	90	0.4471	0.3153	0.1318	0.2454	0.3852	
5	120	0.8207	0.4539	0.3668	0.3840	0.5238	R
6	150	0.9208	0.6216	0.2991	0.5518	0.6915	0.016
7	180	1.0726	0.8042	0.2684	0.7343	0.8740	
8	210	1.2604	0.9810	0.2794	0.9112	1.0509	
9	240	1.2228	1.1343	0.0885	1.0644	1.2042	Po
10	300	1.2740	1.3420	0.0680	1.2721	1.4119	0.0870
11	360	1.3797	1.4416	0.0620	1.3717	1.5115	
12	420	1.3655	1.4831	0.1177	1.4132	1.5530	
13	480	1.3658	1.4994	0.1336	1.4295	1.5693	P1
14	540	1.3446	1.5056	0.1611	1.4358	1.5755	0.1417
15	600	1.3790	1.5080	0.1290	1.4381	1.5779	
16	660	1.3490	1.5089	0.1599	1.4390	1.5788	
17	720	1.3404	1.5092	0.1688	1.4394	1.5791	t1

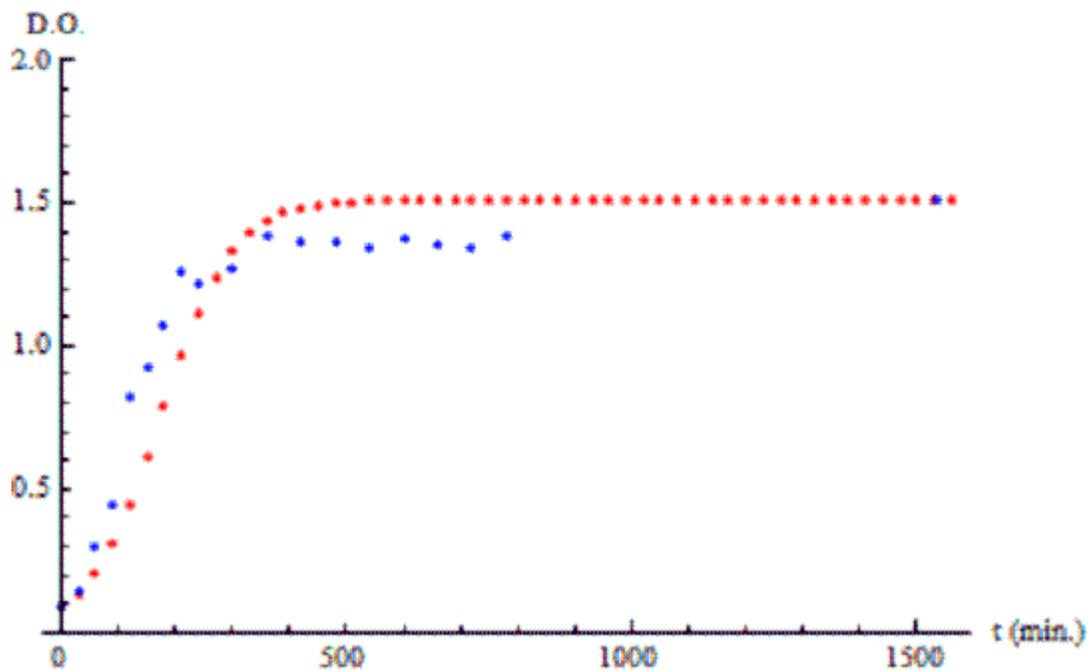
18	780	1.3856	1.5094	0.1238	1.4395	1.5793	30
19	1535	1.5094	1.5094	0.0000	1.4396	1.5793	
		1.5094		0.1398			

Tabla 2. Datos de la cepa silvestre a 37°C

Los valores de la Tabla 2 mostrados en el código de colores fueron obtenidos de la siguiente fórmula para identificar a la curva teórica.⁴

$$P(t) = \frac{rP_0}{\frac{rP_0}{K} + \left(r - \frac{rP_0}{K}\right) \exp(-rt)}$$

Y poder así realizar la siguiente comparación:



Gráfica 6. Crecimiento poblacional de *Escherichia coli*, cepa silvestre, datos experimentales (azul) y datos teóricos (rojo).

Así, podemos observar que los datos que se obtiene a partir de la fórmula (datos teóricos,

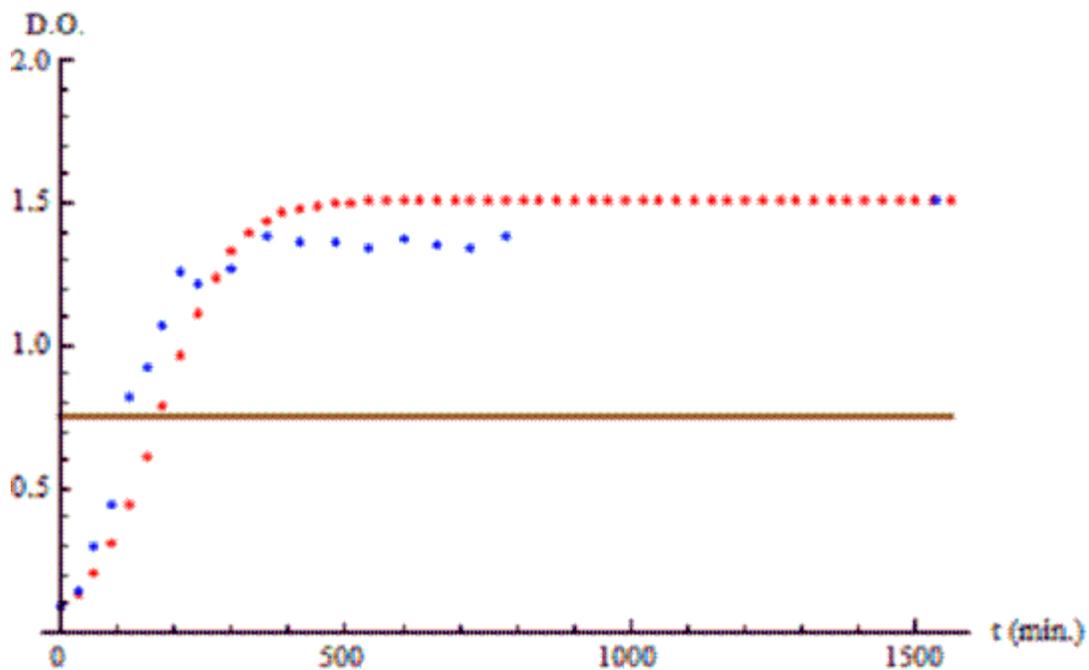
⁴ Las fórmulas empleadas en esta sección se explican en la parte de métodos y en el anexo II.

rojo) representan a los datos experimentales (azul).

A partir de los datos teóricos fue posible establecer el momento en que se llega a la mitad de la capacidad de carga ($k/2$) y se realizó con la siguiente fórmula:

$$t_r = \frac{1}{r} \ln \left(\frac{K - P_0}{P_0} \right) = \frac{1}{0.016} \ln \left(\frac{1.5094 - 0.0870}{0.0870} \right) = 174.637 \text{ min}$$

En donde $K/2$ fue igual a $1.5094/2 = 0.754$



Gráfica 7. Crecimiento poblacional de *Escherichia coli* de la cepa silvestre. Determinación de k .

El tiempo calculado, sirvió para conocer un aproximado de lo que se debe esperar en minutos, para que se tenga la certeza de que la población lleve la mitad de su crecimiento, con respecto a su capacidad de carga; claramente se debe cuidar que la población inicial y las condiciones sean lo más similares posibles para experimentos posteriores.

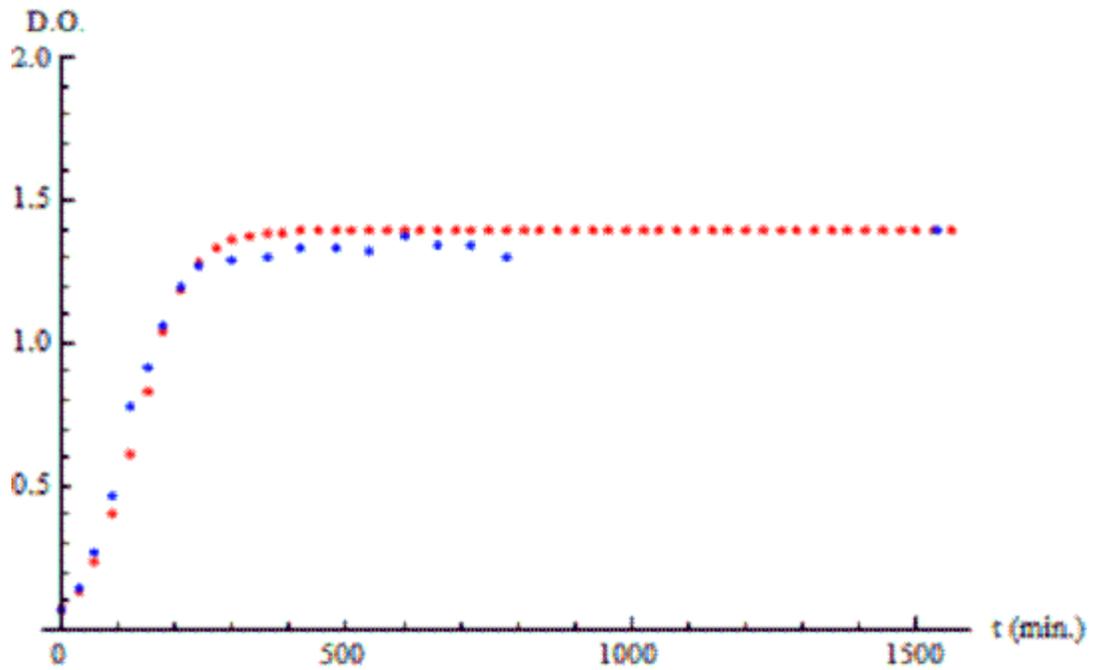
Crecimiento poblacional en *Escherichia coli*, cepa modificada.

El procedimiento recién mostrado se realizó para la colonia modificada.

Modificada DO							
Medición	t (min.)	DO	DO Teórica	Distancia	Lim. Inf.	Lim. Sup.	
1	0	0.0731	0.0731	0.0000	0.0486	0.0976	K
2	30	0.1418	0.1351	0.0067	0.1106	0.1596	1.3941
3	60	0.2719	0.2402	0.0317	0.2157	0.2646	
4	90	0.4673	0.4009	0.0665	0.3764	0.4254	
5	120	0.7796	0.6121	0.1675	0.5876	0.6366	R
6	150	0.9112	0.8404	0.0708	0.8159	0.8649	0.022
7	180	1.0613	1.0406	0.0208	1.0161	1.0650	
8	210	1.1966	1.1863	0.0103	1.1618	1.2108	
9	240	1.2718	1.2786	0.0068	1.2541	1.3031	Po
10	300	1.2878	1.3614	0.0736	1.3369	1.3859	0.0731
11	360	1.3058	1.3853	0.0795	1.3608	1.4097	
12	420	1.3337	1.3917	0.0581	1.3673	1.4162	
13	480	1.3337	1.3935	0.0598	1.3690	1.4180	P1
14	540	1.3234	1.3939	0.0705	1.3695	1.4184	0.1418
15	600	1.3723	1.3941	0.0217	1.3696	1.4185	
16	660	1.3443	1.3941	0.0498	1.3696	1.4186	
17	720	1.3476	1.3941	0.0465	1.3696	1.4186	t1
18	780	1.3043	1.3941	0.0898	1.3696	1.4186	30
19	1535	1.3941	1.3941	0.0000	1.3696	1.4186	
		1.3941		0.0490			

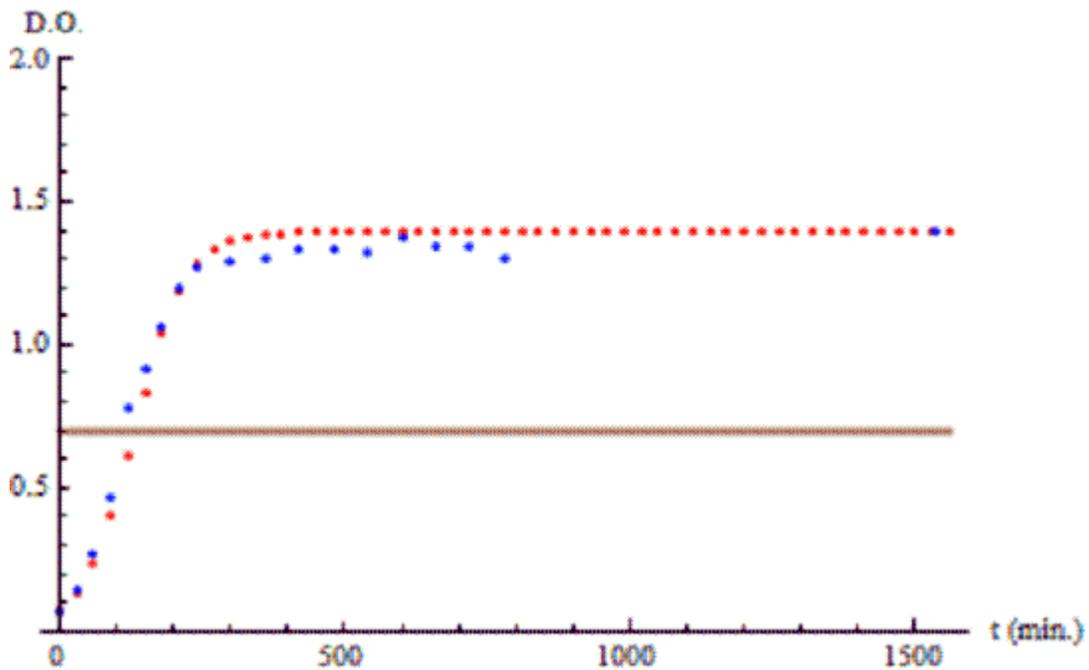
Tabla 3. Datos de la cepa modificada a 37°C

Ésta es la correspondiente gráfica de dispersión:



Gráfica 8. Crecimiento poblacional de *Escherichia coli*, cepa modificada, datos experimentales (azul) y datos teóricos (rojo).

En donde $K/2 = 1.3941/2 = 0.697$



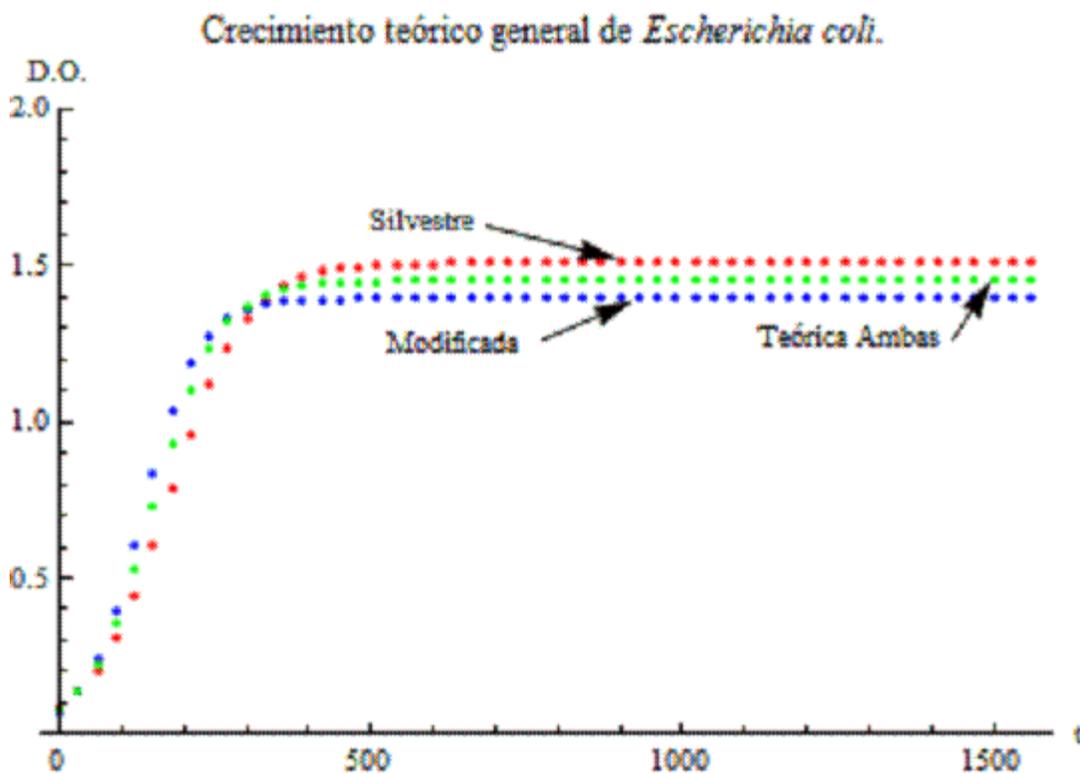
Gráfica 9. Crecimiento poblacional de *Escherichia coli* de la cepa modificada. Determinación de k .

Crecimiento teórico en *Escherichia coli*.

Considerando los valores de las mediciones de ambas cepas se aplicó la misma fórmula que se aplicó individualmente a cada cepa, es decir:

$$P(t) = \frac{rP_0}{\frac{rP_0}{K} + \left(r - \frac{rP_0}{K}\right) \exp(-rt)}$$

Y se estimó un crecimiento teórico general, tomando así el valor de $K/2$ de en dicha curva el cual fue de $1.440/2 = 0.72$



Gráfica 10. Crecimiento poblacional teórico de *Escherichia coli*, teórica silvestre (rojo), teórica modificada (azul) y teórica que representa a ambas cepas (verde).

6.2. Fase II: Determinación de la duración de la fase de aclimatación.

Choque frío en *Escherichia coli*, cepa silvestre.

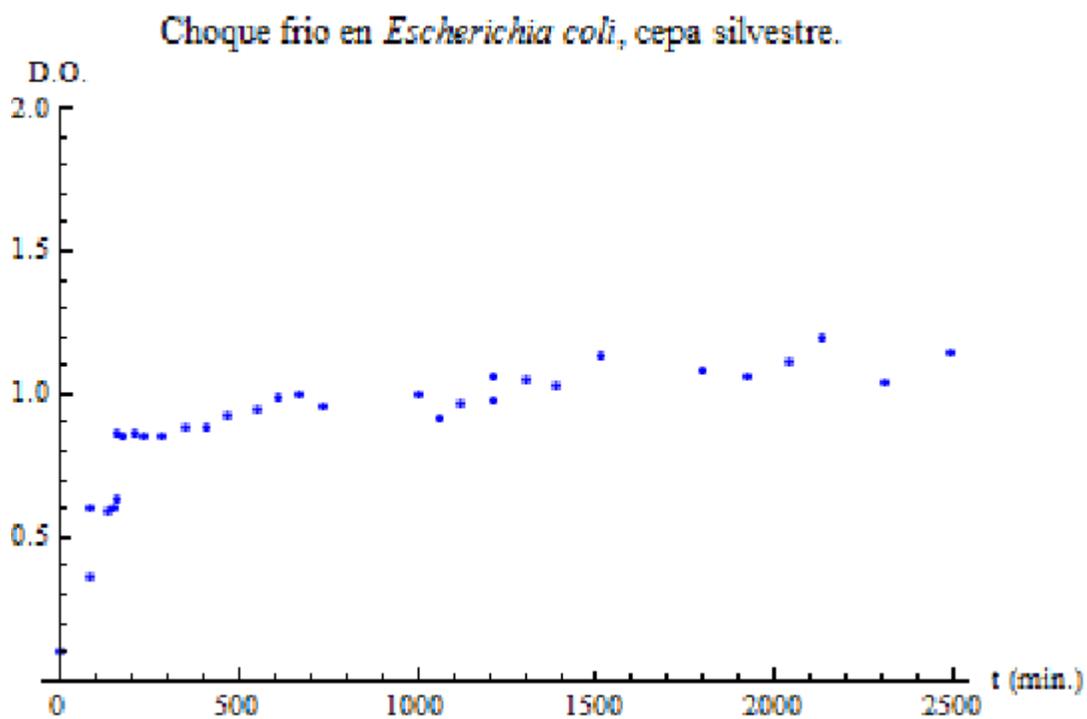
Una vez que se analizó el tipo de crecimiento bacteriano en condiciones “ideales” y se establecieron los tiempos, se analizaron los datos generados cuando se realizó el choque de temperatura de 37°C a 15°C. Los datos obtenidos fueron los que se muestran en la tabla 4.

Crecimiento con choque		
	t (min)	DO
	0	0.0969
	85	0.6036
	87	0.3670
	136	0.5887
	147	0.6039
	160	0.8639
Choque t	162	0.6317
0	172	0.8490
	205	0.8639
58	230	0.8490
115	287	0.8536
175	347	0.8863
235	407	0.8877
295	467	0.9242
355	550	0.9446
415	610	0.9920
475	672	0.9979
535	734	0.9531
	1000	0.9960
	1060	0.9106
	1120	0.9677
	1210	0.9762
	1210	1.0606
	1300	1.0521
	1390	1.0318

	1510	1.1372
1627	1799	1.0870
1747	1919	1.0614
1867	2039	1.1099
1957	2129	1.2002
2137	2309	1.0418
2317	2489	1.1448

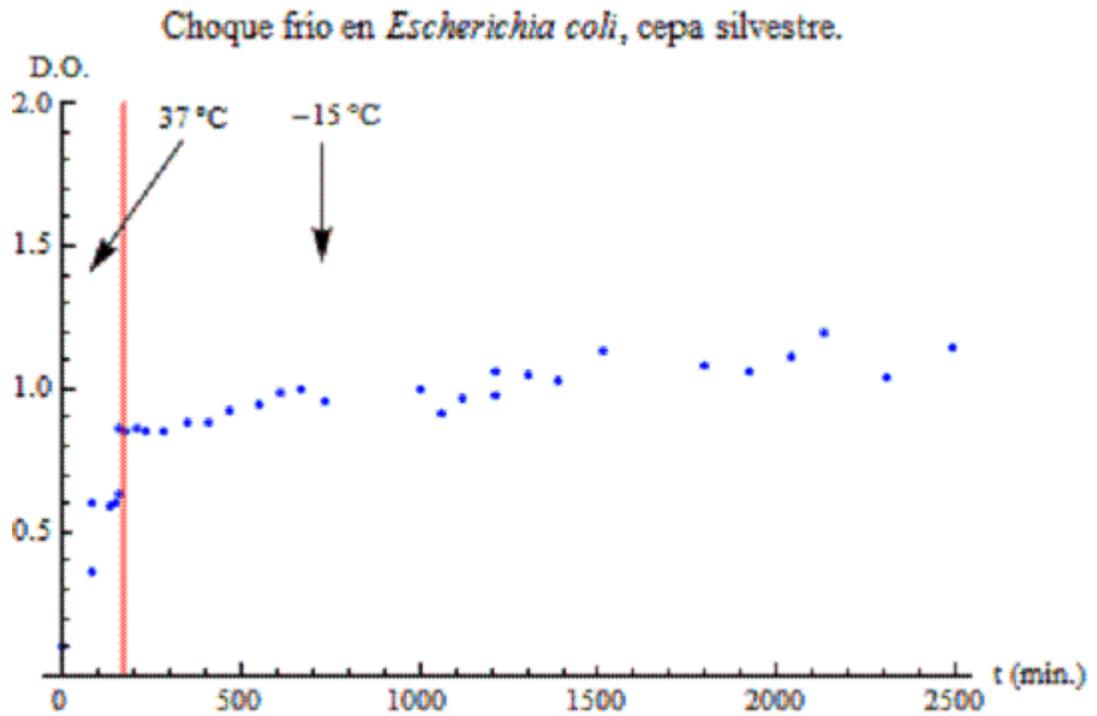
Tabla 4. Datos de la cepa silvestre a 15°C

Los datos graficados, tiempo vs DO, se muestran a continuación:



Gráfica 11. Crecimiento poblacional de *Escherichia coli* de la cepa silvestre, antes y después de un choque frío.

Si observamos, el momento en que se dio el choque fue cuando se llevaban 172 minutos, que corresponde claramente con el valor para el tiempo de $t_r = 174$ min, calculado previamente.



Gráfica 12. Choque frío en *Escherichia coli* en la cepa silvestre

Se observa que la población se estabilizó al momento del choque frío (línea roja). Entonces una vez que observamos los efectos esperados, es decir que ocurra la fase de aclimatación, se calculó el tiempo total que se debe esperar para que las bacterias se adapten nuevamente para comenzar a crecer normalmente.

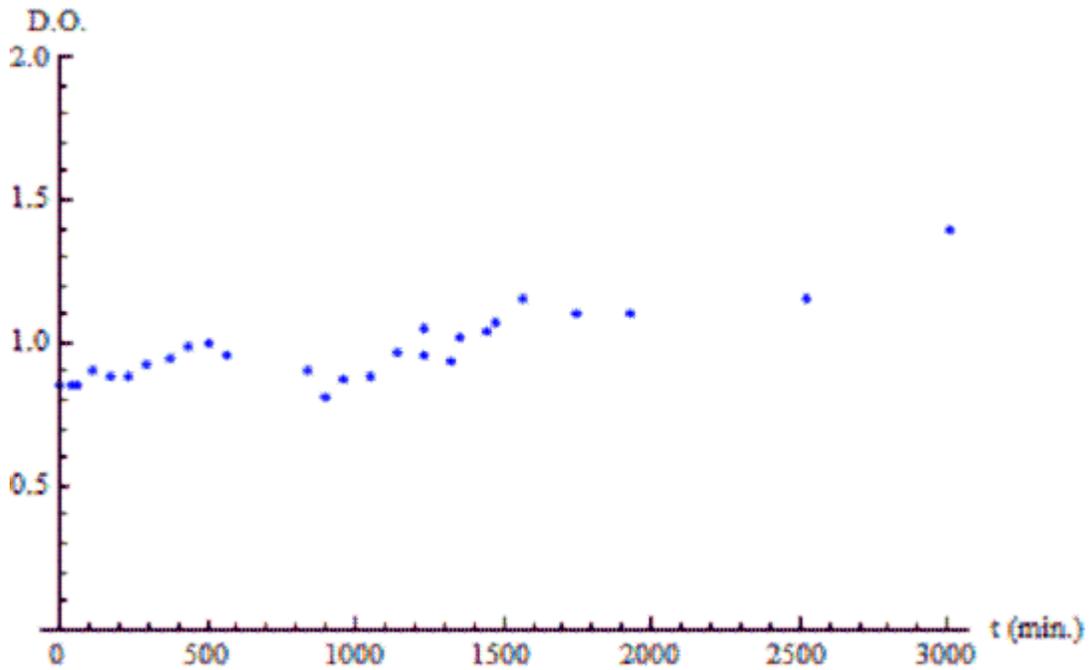
Análisis de recuperación.

Lo primero que se realizó fue establecer la distribución, es decir, tomar los datos a partir del choque frío.

Dist. Silv. Choque					
t (min.)	DO	Rect. Ajus.	Lim. Inf.	Lim. Sup.	
0	0.8490	0.9500	0.8592	1.0408	Recuperación t_d
45	0.8490	0.9500	0.8592	1.0408	1475
58	0.8490	0.9500	0.8592	1.0408	
115	0.9084	0.9500	0.8592	1.0408	Recuperación hr.
175	0.8863	0.9500	0.8592	1.0408	24.58
235	0.8877	0.9500	0.8592	1.0408	
295	0.9242	0.9500	0.8592	1.0408	
378	0.9446	0.9500	0.8592	1.0408	
438	0.9920	0.9500	0.8592	1.0408	
500	0.9979	0.9500	0.8592	1.0408	
562	0.9531	0.9500	0.8592	1.0408	
840	0.9001	0.9500	0.8592	1.0408	
900	0.8147	0.9500	0.8592	1.0408	
960	0.8718	0.9500	0.8592	1.0408	
1050	0.8803	0.9500	0.8592	1.0408	
1140	0.9647	0.9500	0.8592	1.0408	
1230	0.9562	0.9500	0.8592	1.0408	
1235	1.0460	0.9500	0.8592	1.0408	
1320	0.9359	0.9500	0.8592	1.0408	
1355	1.0204	0.9500	0.8592	1.0408	
1440	1.0413	0.9500	0.8592	1.0408	
1475	1.0689	0.9500	0.8592	1.0408	
1565	1.1592	0.9500	0.8592	1.0408	
1745	1.1080	0.9500	0.8592	1.0408	
1925	1.1038	0.9500	0.8592	1.0408	
2520	1.1553	0.9500	0.8592	1.0408	
3005	1.3972	0.9500	0.8592	1.0408	

Tabla 5. Datos de la cepa silvestre después del choque frío

A continuación se muestra la gráfica correspondiente a los datos de la tabla 5.



Gráfica 13. Crecimiento poblacional de *Escherichia coli* de la cepa silvestre después del choque frío

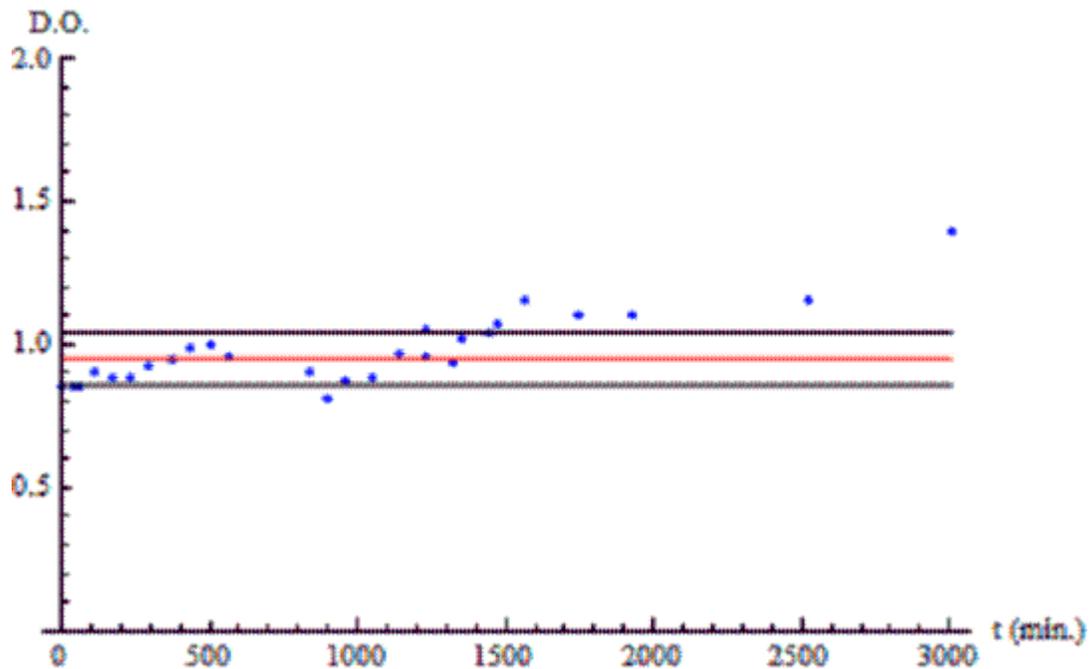
Con ésta información se propusieron todas las rectas posibles para establecer cuál es la recta teórica, comenzando desde el valor menor hasta el mayor de la distribución, con una variación de una décima; se calcularon las distancias de cada recta con su correspondiente punto en la distribución, para que con esto, se decidiera cuál es la recta que genera el promedio mínimo posible de distancias entre recta propuesta y distribución, y así establecerla como la recta teórica, para que se propusieran a las rectas límite que servirían de referencia y poder conocer el momento en que la población se recupera.

Los resultados fueron:

Resumen	
Valor promedio mínimo	0.0931
Recta Ajustada	0.9500
Desviación Estándar	0.0908
Límite Superior	1.0408
Límite Inferior	0.8592

Tabla 6. Recta óptima

La recta teórica y sus límites quedaron de la siguiente forma:



Gráfica 14. Recta teórica y sus respectivos límites en el crecimiento poblacional de *Escherichia coli* de la cepa silvestre.

Observando así, que la recuperación (t_d) comenzó al minuto 1475, es decir en 24.58 horas, como lo indican la gráfica 14 y la tabla 5.

El procedimiento para la cepa modificada fue exactamente el mismo, sin embargo su recuperación no fue clara, ya que aparentemente para cuando la cepa comenzó a recuperar la población, consumió todos los nutrientes y dada la variación obtenida es requerido realizar este experimento en más ocasiones; sin embargo, como lo que se requiere es el tiempo en el que las dos cepas se comporten lo mas similares posible se tomó como referencia el tiempo de aclimatación de la cepa silvestre, el cual quedó en 24:00 hr

6.3. Fase III: Determinación del efecto de la AFP después de un evento de congelación.

Previamente se definió el valor al que a las dos cepas se les llevarían a la temperatura de 15°C y con esto se determinó en tiempo en el que se alcanzaría dicho valor.

Posteriormente se determinó que el tiempo en el que las cepas permanecerían a 15°C con la intención de que la cepa modificada produjera la AFP fue de 24hr.

Con la última fase (la cual se explica en la parte de métodos del apartado 4.2.3. Fase III: Determinación del efecto de la AFP después de un evento de congelación), los datos obtenidos a partir del crecimiento en condiciones ideales después del evento de congelación, el análisis es el siguiente:

Recuperación después de la congelación.

Recuperación Silv		
t (min)	DO	
0	0.7200	K
30	0.8087	1.2401
60	0.7997	R
100	1.0333	0.004
150	1.0523	Po
210	1.0016	0.7200
270	1.0027	P1
1020	1.2401	0.8087
		t1
		30

Tabla 7. Datos de la cepa silvestre después del choque frío

Como se observa, se procedió de la misma manera en que se hizo para el crecimiento poblacional a temperatura ambiente, y se hace esto justamente porque se piensa que las condiciones serán las mismas hasta el momento de regresar a temperatura ambiente. La tabla correspondiente para el crecimiento de la cepa modificada es:

Recuperación Mod		
t (min)	DO	
0	0.7200	K
30	0.6966	0.8874
60	0.6947	R
100	0.6328	-0.001
150	0.6048	Po
210	0.6278	0.7200
270	0.6599	P1
1020	0.8874	0.6966
		t1
		30

Tabla 8. Datos de la cepa modificada después del choque frío

Además de observar una diferencia clara visual (Foto 7) entre la cepa silvestre y la cepa modificada, el análisis mostró una gran diferencia en los tipos de crecimiento, debido a que los factores de crecimiento r , para cada población **no son los mismos**. En la gráfica 5 (Recuperación entre cepa silvestre y la cepa modificada) se observa la diferencia del crecimiento entre la cepa silvestre efecto de la proteína sobre la bacteria modificada con el gen de la AFP.

Finalmente, para tener mayor evidencia de la diferencia que existe entre ambas cepas, se calcularon las distancias entre cada punto de distribución, observando que se encuentran separadas una de la otra.

Comparación			
T	DO-S	DO-M	Distancia
0	0.7200	0.7200	0.000
30	0.8087	0.6966	0.112
60	0.7997	0.6947	0.105
100	1.0333	0.6328	0.401
150	1.0523	0.6048	0.448
210	1.0016	0.6278	0.374
270	1.0027	0.6599	0.343
1020	1.2401	0.8874	0.353

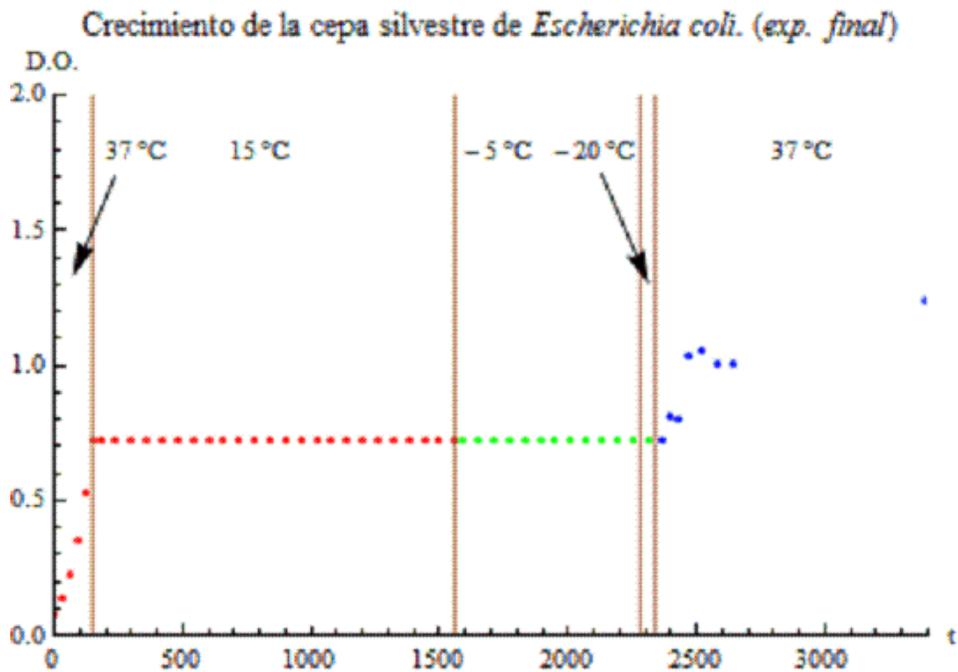
Tabla 9. Datos de la cepa silvestre después del choque frío

VII. Discusión y conclusiones.

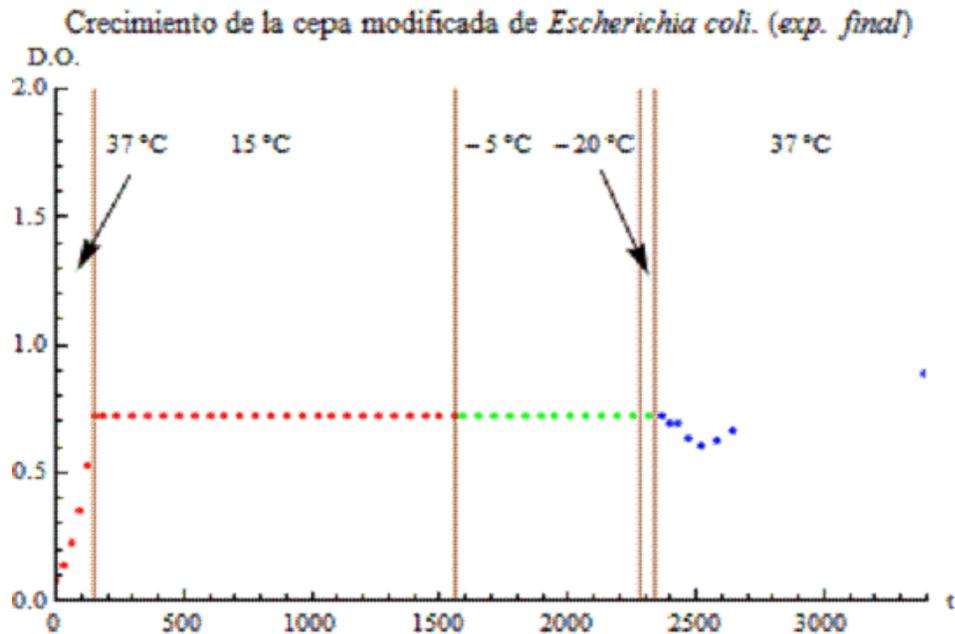
7.1. Discusión

Se puede concluir que efectivamente el crecimiento entre la cepa silvestre y la cepa modificada son diferentes, sin embargo se esperaba que la cepa modificada tuviese una ventaja en su crecimiento con respecto a la silvestre, suponiendo que la proteína anticongelante le permitiría una mayor sobrevivencia ante un evento de congelación.

Las siguientes dos gráficas representan el crecimiento de *Escherichia coli* en diferentes condiciones ambientales, de la cepa silvestre, es decir sin ser modificada. Y de la cepa modificada, es decir siendo transformada con el gen de la proteína anticongelante AFP.



Gráfica 14. Experimento final, cepa silvestre de *E. coli*.



Gráfica 15. Experimento final, cepa modificada de *E. coli*.

Pese a que se observó un efecto físico en el medio de la cepa modificada, ya que posteriormente de haber sido congelada algunos tubos no se congelaron y otros formaron un estado “gelatinoso”, como se observa en la foto 7, esto no se vio reflejado en su crecimiento o por lo menos no de la manera que se suponía. Esto puede deberse al costo-beneficio, al parecer el gasto energético que le cuesta a la bacteria producir la proteína es demasiado. Sin embargo, un solo experimento final no es suficiente, quizá con un futuro experimento en donde se le dé a la bacteria nuevos nutrientes disponibles para su consumo, de manera que pueda ser comparada con la bacteria silvestre, entonces quizá se pueda observar una ventaja.

Cada objetivo particular fue logrado en ésta tesis, sin embargo, son sólo las bases para realizar mucho más trabajo, si se cuenta con un lector más preciso y las condiciones para realizar “n” veces el experimento, dado que ya se tiene un modelo que permite predecir el momento que se necesita alcanzar la D.O. de elección, entonces se podrían hacer estudios que nos permitan saber la adecuación de la bacteria, jugando con los tiempos de congelación, llevándolas a un punto crítico en donde la cepa silvestre se vea afectada para entonces comparar el daño entre ambas cepas y ver más claramente el efecto en su supervivencia.

Además es importante mencionar que se intentó comprobar la expresión de la proteína (ver anexo III), sin embargo no se logró. Considerando que en *Escherichia coli* no se ha reportado que contenga moléculas que impidan la congelación o que al introducir un plásmido en una cepa genere

el cambio en el estado de congelación, es decir que interfiera en la formación de cristales y dado que es clara la evidencia de este cambio en las cepas modificadas en el último experimento, en mi opinión es necesario, en trabajos futuros, repetir por lo menos la comprobación por medio del gel de poliacrilamida. Es importante considerar que la proteína es pequeña y que muestra una estabilidad a 0°C en donde su desnaturalización es a un poco más de la temperatura ambiente [5], así que, un mal manejo de ésta proteína podría causar su degradación, además sería de gran ayuda considerar cómo Quian y colaboradores [41] comprobaron la expresión de diversas proteínas por medio de la clonación en el vector pCold y repetir al igual que los experimentos que realice un choque frío cuando DO es igual a $k/2$ y evitar o más bien disminuir el efecto del consumo de nutrientes.

Perspectivas.

Es importante comprobar la expresión de la proteína anticongelante y afirmar con toda certeza que es la responsable del cambio entre los cultivos después de congelarse. En trabajos posteriores podría realizarse con mayor planeación la realización de la comprobación de la sobreexpresión por medio de un gel de poliacrilamida, realizar un gel de poliacrilamida nativo, etc, además de realizar un RT-PCR junto con el análisis de un Northern Blot.

Como ya lo he mencionado antes, dado que se cuenta con un modelo que predice el crecimiento de *Escherichia coli* a 37°C y a 15°C, con la ayuda de aparatos más preciso y la maquinaria necesaria para realizar “n” mediciones, se podría aun mas precisar el modelo y poder jugar con las condiciones de congelación para poder hacer una comparación efectiva entre la cepa silvestre y la modificada y encontrar si existe una ventaja a la bacteria que tenga esta información.

Conclusiones específicas

*Al transformar la cepa de *E. coli* y buscar la expresión de la AFP se observa un efecto físico, es decir, existe una diferencia entre cepas (silvestre y modificada) del estado de la materia (del cultivo) ante un evento de congelación,

*Al transformar la cepa de *E. coli* y buscar la expresión de la AFP se observa un efecto cuantitativo, entre ambas cepas, el cual se ve reflejado en el crecimiento poblacional, por lo que las r de cada curva son diferentes, reflejando una velocidad de crecimiento diferente.

*Es necesario realizar experimentos posteriores para poder proponer que la AFP le genera una ventaja a la bacteria en condiciones de congelación y corroborar que es la responsable dichos cambios mencionados.

VIII. Anexos

8.1. Anexo I: Soluciones y Protocolos⁵

Preparación de medio LB (Luria Bertani) y SOC

Es importante estar familiarizado con la preparación de medio líquido Luria Bertani (LB) y SOC, ya que los experimentos requieren su utilización constante. A continuación se detalla el método para preparar 1L de LB ó SOC.

Utilizar un matraz o vaso de precipitado de 1lt y disolver las cantidades de los solutos indicadas en la parte de abajo para cada medio correspondiente en 500ml de agua desionizada.

- *Para una disolución eficiente utilizar una mosca de agitación y colocar sobre una parrilla magnética 5 min aproximadamente hasta observar una mezcla totalmente homogénea.*
1. Aforar en una probeta a un volumen de 1L.
 2. Colocar la mezcla en frascos limpios con alícuotas que pueden ser de 250 o menos dependiendo del la cantidad que requiera nuestro experimento.
 - a. *Cuidar que el volumen que vertimos en el frasco sea menor o igual a la capacidad total del recipiente ya que al momento de esterilizar el líquido alcanza su punto de ebullición con el riesgo de derramarse y perder medio.*
 3. Poner cinta testigo y cerrar con cuidado de no apretar en exceso ya que al hacer ebullición el líquido genera una alta presión con un riesgo de reventar el frasco.
 4. Esterilizar 20 minutos a 20 libras de presión.
 5. Secar, apretar la rosca y guardar. Los frascos pueden conservarse a temperatura ambiente o a 4 °C por tiempo indefinido siempre y cuando se encuentren perfectamente sellados.

⁵ Los protocolos utilizados fueron obtenidos a partir de los protocolos optimizados para el Taller de Biología Sintética. [46, 47]

Medio Luria Bertani (LB)

Extracto de Levadura 5 g/L
Tryptona de Caseína 10 g/L
Cloruro de Sodio 10 g/L
pH 7.0

Medio SOC

Extracto de Levadura 5 g/L
Tryptona de Caseína 20 g/L
Cloruro de Sodio 0.5844 g/L
Cloruro de potasio 0.1864 g/L
Cloruro de Magnesio 2.033 g/L
Glucosa 3.60032 g/L
pH 7.0

Preparación de cajas petri con y sin antibiótico

Nota: en el siguiente protocolo se enlistan los pasos para preparar cajas petri con y sin antibiótico, la preparación de cajas con antibiótico varía en concentraciones dependiendo de las necesidades del usuario y requerimientos del experimento.

Cálculos para 500ml (tomar en cuenta que cada caja petri tiene una capacidad de 20ml al momento de hacer los cálculos respecto al número de cajas que se desean preparar).

1. Utilizar un vaso de precipitados o matraz de 1lt y disolver 12.5gr de LB Broth Miller en 200ml de agua desionizada.
2. Pesar y adicionar 7.5 gr de agar bacteriológico a la mezcla anterior.

Para una adecuada disolución utilizar una mosca de agitación con agar y un vaso de precipitado, colocar sobre una parrilla magnética 5 min aproximadamente hasta observar que la mezcla sea totalmente homogénea.

3. Antes de esterilizar la mezcla anterior medir en una probeta y hacer alícuotas de 250 ml, esto es importante para hacer los cálculos del antibiótico necesario.
4. Esterilizar en autoclave 20 minutos a 20 libras de presión.

Por experiencia, a partir de los 20 minutos de que retiramos del autoclave es posible adicionar el antibiótico y comenzar a llenar las cajas petri, este paso es importante hacerlo rápido ya que la solución comienza a perder temperatura y el agar a solidificarse, generando grumos.

5. En campana (de preferencia) o en condiciones de esterilidad adicionar el antibiótico y mezclar perfectamente.

6. Verter la mezcla anterior en cajas petri estériles (usar campana o condiciones de esterilidad absoluta con mecheros).

Para eliminar las burbujas que se forman al momento de llenar las cajas petri utilizar un encendedor limpio (se recomienda pasarlo por una toalla o una sanita con alcohol) y tener mucho cuidado de no tocar el líquido.

7. Dejar secar las cajas abiertas bajo la campana de 30 a 40 minutos hasta observar una consistencia firme y color opaco; cortar tiras de parafilm de \pm 10 cm de largo y sellar.

Concentraciones de trabajo para antibióticos:

Las siguientes columnas presentan ejemplos para concentraciones de antibióticos, es necesario entender bien cómo y cuánto antibiótico utilizar tanto para la preparación de cultivos como para la preparación de cajas petri.

Ampicilina

Concentración Stock: 50mg/ml
Concentración de trabajo: 100 μ g/ml
Ejemplo para preparar **30ml**
 $C_1V_1=C_2V_2$
(500mg/ml) $V_1 = (100\mu\text{g/ml}) (30\text{ml})$
(500mg/ml) $V_1 = (0.100\text{mg/ml}) (30\text{ml})$
 $V_1 = ((0.100\text{mg/ml}) (30\text{ml})) / 500\text{mg/ml}$
 $= 0.06\text{ml}$
= 60 μ l

Kanamicina

Concentración Stock: 25mg/ml
Concentración de trabajo: 35 μ g/ml
Ejemplo Para preparar **30ml**
 $C_1V_1=C_2V_2$
(25mg/ml) $V_1 = (35\mu\text{g/ml}) (30\text{ml})$
(25mg/ml) $V_1 = (0.035\text{mg/ml}) (30\text{ml})$
 $V_1 = ((0.035\text{mg/ml})(30\text{ml})) / 25\text{mg/ml}$
 $= 0.042\text{ml}$
= 42 μ l

Preparación de células químicamente competentes.

La preparación de células competentes es un paso crucial ya que son el organismo modelo en el cual trabajamos, aunque la utilización de este protocolo no es muy frecuente, es necesario tenerlo bien montado.

1. Incubar una alícuota de células, en 2 ml de medio LB líquido por 8 horas a 37°C.

- *La alícuota puede ser un tubo de células DH5α o TOP10, las cuales son cepas de uso corriente en los experimentos de laboratorio.*
2. Con el preinóculo incubar 100 ml y crecer en agitación vigorosa a 37°C en promedio tres horas hasta alcanzar una $D.O_{600nm} = 0.4$
 3. Reposar el matraz en agua hielo 10 minutos.
 4. Centrifugar 10 minutos a 4°C a 5,000 rpm.
 5. Resuspender en 2ml de $CaCl_2$ 100Mm / Glicerol 17%.
 6. Incubar 4 horas a 37°C en agitación.
 7. Alicuotar de 50μl - 100μl en tubos eppendorf, congelar en nitrógeno líquido y guardar a -80°C.
 - *En caso de no contar con nitrógeno líquido, colocar un frasco con 50ml de etanol absoluto a -80°C, el etanol puede congelar las células en un intervalo de tiempo muy corto; aunque puede ser poco práctico, es un recurso eficaz.*
 8. Para probar la correcta preparación de las células se debe utilizar el protocolo de transformación (se muestra a continuación), insertando un gen reportero, en nuestro caso se utilizó una Proteína roja Fluorescente, con resultados positivos.

Transformación de células competentes por choque térmico.

El protocolo de transformación es de los más utilizados en experimentos de biología sintética, los pasos deben realizarse en condiciones de esterilidad (usando campana), de no ser posible se deben colocar mecheros sobre el área y trabajar lo más cerca posible a éstos.

- 1.- En tubos limpios y estériles colocar una alícuota de 3-4 μl del plásmido a transformar
- 2.- Dar un *spin* para bajar cualquier gota que se haya adherido a la pared del tubo.
- 3.- Descongelar las células competentes.

- *El descongelamiento no debe tomar más de 10 minutos; para cada ensayo se utiliza una alícuota, bajo ninguna circunstancia se deben reciclar tubos una vez descongelados ya que pierden su capacidad de ser transformadas.*
- 4.- Tomar con una pipeta el contenido total del tubo de células competentes y transferirlo al tubo que contiene el plásmido, mezclar muy suavemente.
- *Tomar en cuenta que las células se encuentran muy maltratadas ya el CaCl₂ le hace hoyos a la membrana por lo que este paso debe ser con mucho cuidado.*
- 5.- Incubar en hielo 20 min.
- *Prender el baño María y estabilizar en 42°C.*
- 6.- Someter a choque térmico en el baño María por 50 segundos.
- *Cuidar que al momento de que los tubos se sumergen en el baño María el agua sólo toque la punta sin que llegue a la tapa, evitando el riesgo de que el agua se pueda filtrar, contaminando el contenido.*
- 7.- Inmediatamente regresar los tubos al hielo y esperar 2 min (choque térmico).
- 9.- Agregar 300 µl de medio LB estéril y pipetear muy suavemente.
- *Este paso también se conoce como recuperación de células.*
- 10.- Incubar a 37°C con agitación vigorosa a 150 rpm por 90 minutos.
- *Sacar las cajas de refrigeración para que tomen temperatura ambiente.*
- 11.- Tomar 200 µl con pipeta y sembrar en cajas petri.
- *Las cajas de siembra deben haber sido preparadas con las dosis correctas de antibiótico, el agar debe mostrar una consistencia firme, es común que si las cajas tienen mucho tiempo en refrigeración pierdan consistencia, por lo que se deben revisar antes de comenzar el experimento.*
- 12.- Utilizando un asa de siembra, distribuir de forma homogénea.

Extracción de plásmido utilizando el método Birnboim.

Antes de comenzar el protocolo es necesario tener tres frascos con stock de las soluciones que se describen a continuación, esto permitirá que el experimento sea ágil y minimizar los errores.

Soluciones Birnboim.

Solución I: Tris 25mM pH8.0, EDTA 10mM pH 8.0, glucosa 50mM.

STOCK	Para 10ml	20ml	30ml	40ml	50ml
1.0M Tris 8.0	250µl	500 µl	750 µl	1,000 µl	1,250 µl
0.5M EDTA 8.0	200 µl	400 µl	600 µl	800 µl	1,000 µl
Glucosa.	90mg	180mg	270mg	360mg	450mg

Solución II: NaOH 0.2 M, SDS 1.0%

STOCK	Para 100ml	200ml	300ml	400ml	500ml
1.0 M NaOH	20ml	40ml	60ml	80ml	100ml
20% SDS	5ml	10ml	15ml	20ml	25ml

Solución III; KOAc 3M, pH 5.5.

Disolver 29.5 gr de acetato de potasio en 40 ml de dH₂O, ajustar con ácido acético glacial a pH 5.5, aforar a 100 ml

Midiprep

Midiprep permite conseguir grandes concentraciones de DNA, es necesario tener disponible una centrifuga con capacidad para tubos Falcon de 50 y 15ml de preferencia con regulación de temperatura que permita enfriar a 4°C.

1. Dejar un inóculo de 12 horas en tubos Falcon de 50 ml. Se recomienda un inóculo de 30 a 35 ml de medio, esto permitirá una correcta oxigenación y un crecimiento óptimo.
2. Centrifugar 20 minutos a 4,000 rpm, tirar el sobrenadante y dejar aproximadamente 1ml de medio en tubo para disolver en vórtex.
 - *Previo a centrifugar es necesario nivelar el peso, utilizando una balanza, se pesan dos tubos, el que tenga mayor peso es el de referencia, el de menor peso se nivela utilizando agua ddH₂O.*

3. Agregar 3 ml de solución Birnboim I para disolver en el vórtex , pasar la mezcla a tubos de 15 ml y dejar 10 min a temperatura ambiente.
 - *A la solución Birnboim I se le agrega lisozima a una concentración de 5mg/ml (sólo a la solución que en ese momento se vaya a ocupar).*
4. Agregar 3ml de solución Birnboim II, mezclar por inversión 6 veces, incubar en hielo por 10 min.
5. Agregar 3ml de solución Birnboim III, mezclar por inversión 6 veces, incubar en hielo por 10 min.
6. Centrifugar a 4,000 rpm por 20 minutos.
 - *Es muy importante en este paso cuidar que los desechos celulares se encuentren bien precipitados y firmes en el fondo del tubo, ya que en él se encuentran proteinasas y DNAsas que pueden dañar el plásmido.*
7. Transferir el sobrenadante a un tubo falcon nuevo y estéril de 15 ml.
 - *De ser necesario repetir el paso número 5 y precipitar nuevamente los desechos celulares ya que con frecuencia estos no quedan bien asentados en el fondo con un riesgo potencial de perder DNA.*
 - *Si el volumen del sobrenadante es mayor a 7 ml, dispensar en otro tubo, nunca pasar de un volumen de 7ml.*
8. Agregar 1:1 de isopropanol e incubar 1 hora a -20°C.
9. Centrifugar 30 minutos a 4,000 rpm y decantar dejando aproximadamente 500 µl para despegar la pastilla y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml
10. Lavar la pastilla con 500µl de etanol al 70% y centrifugar a 15,000 rpm durante 10 minutos.
11. Decantar y secar la pastilla en vacío por 15 minutos a 45 °C
12. Agregar 200 µl de agua inyectable y dejar reposar 30 minutos a 40°C

- *En este paso se recomienda observar la densidad de la pastilla, los 200 μ l pueden incrementarse a 400, incluso 700, si la pastilla es muy visible.*
- *Para obtener un buen resultado al momento de despegar la pastilla se recomienda precalentar una alícuota de ddH₂O en termoblock a 65 °C por 10 minutos.*

13. Resuspender la pastilla utilizando una micropipeta de 1ml.

14. Dependiendo del volumen en que se haya resuspendido y de la marca y las indicaciones del proveedor variar la cantidad de RNAsa a agregar e incubar a 37°C por 30 minutos.

- *En caso de no terminar, los tubos se pueden guardar a -20°C. Al día siguiente descongelar y agregar la RNAsa.*

Precipitación de DNA por alcoholes.

Este protocolo se conoce también como limpieza de DNA, se recomienda llevarlo a cabo después de obtener el plásmido y de manera particular cuando la pastilla se observa muy densa con un color blanco, esto significa que se encuentra muy cargado de sales.

1. Agregar 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.2

- *Ejemplo: si el tubo contiene 30 μ l de plásmido añadir 3 μ l de acetato de sodio.*

2. Resuspender en vórtex.

3. Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.

- *Ejemplo: si el tubo contiene 30 μ l en el volumen inicial añadir 75 μ l de etanol absoluto frío.*

4. Incubar a -80°C 30 minutos ó -20°C durante 1 hora.

- *Se recomienda incubar durante toda la noche a -20°C.*

5. Centrifugar 20 min a 13,000 rpm.

6. Decantar y observar la pastilla, dependiendo de la densidad y tamaño adicionar de 100 a 400 μ l de etanol al 70 % (lavado)

7. Centrifugar 5 minutos a 13,000 rpm
8. Decantar y secar en *termoblock* a una temperatura de 65°C
 - Se recomienda en este paso secar al vacío utilizando un *speedback* a 45°C.
9. Eluir la pastilla dependiendo del tamaño en un volumen de ddH₂O que puede ser de 30 a 100µl

Extracción de DNA a partir de gel de agarosa (extracción de banda)

Nota: El protocolo que se detalla a continuación debe ser realizado extremando las medidas de seguridad, ya que conlleva pasos que pueden ser potencialmente riesgosos si no se adoptan las medidas de precaución que se recomiendan.

Existe una amplia oferta de kit's para extraer DNA a partir de gel de agarosa, más o menos todos llevan la misma secuencia de pasos, el protocolo que se transcribe a continuación es el "Gene JET" de Fermentas, el cual ha arrojado buenos resultados. Al mismo se le han hecho modificaciones y es un protocolo consensado que permite hacer más eficiente el proceso y minimizar el riesgo de perder DNA.

1. Una vez que hemos terminado la electroforesis y ubicamos la banda de interés en el transiluminador, procedemos a cortar con una navaja de bisturí, si no tenemos una a la mano puede funcionar una navaja de rasurar, en cualquier caso debe ser un instrumento limpio y pasado por alcohol; en este paso se recomienda utilizar doble guante de nitrilo, ya que estamos manipulando el gel con residuos de bromuro de etidio. Con mucho cuidado separamos el fragmento de agarosa que contiene el DNA y lo pasamos a un tubo eppendorf de 1.5ml, este paso debe ser realizado con rapidez ya que en el proceso estamos exponiendo el DNA a rayos UV lo que puede dañar el material genético.
2. *Tarar* el tubo eppendorf para tener únicamente el peso del fragmento de agarosa, agregamos un volumen 1:1 de *Binding Buffer*, por ejemplo si el fragmento de agarosa tiene un peso de 100mg, se adicionan 100 µl de Buffer.
3. Incubar el tubo en el *termoblock* a una temperatura entre 50 y 60°C por 10 minutos, en este lapso de tiempo el gel debe disolverse perfectamente y adoptar un color amarillo pálido, esto indica que el pH es el óptimo. Si el color es anaranjado o violeta quiere decir que el pH es muy

básico; para corregir esta situación se debe adicionar 10µl de de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y homogenizar cuidadosamente hasta obtener la mezcla en tono amarillo.

4. El paso que se menciona a continuación es opcional y sólo debe aplicarse cuando tenemos fragmentos ≤ 500 bp o ≥ 10 kilobases
 - Si el fragmento es ≤ 500 bp adicionar 1:2 volúmenes de isopropanol. Por ejemplo si tenemos 100mg de gel disueltos en 100µl de *Binding Buffer* adicionar 100 µl de isopropanol al tubo y mezclar vigorosamente.
 - Si el fragmento es ≥ 10 kilobases adicionar 1:2 volúmenes de agua. Por ejemplo 100mg de gel disueltos en 100 µl de *Binding Buffer* adicionar 100 µl de agua y mezclar vigorosamente.
5. Transferir el contenido de la solución del paso 3 a una columna de purificación y centrifugar por un minuto, descartar los residuos del tubo colector.
6. Adicionar 700 µl del *Buffer* de lavado, y centrifugar por un minuto, desechar los residuos nuevamente del tubo colector y repetir el mismo paso.
7. En este paso se debe transferir la columna con la membrana a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril, y eluir con 50 µl del Buffer de elusión o en su defecto ddH₂O, cualquiera que sea el líquido que se seleccione para eluir es necesario **precalentar a 65°C por 10 minutos, dejar caer en el centro de la membrana los 50 µl y reposar 6 minutos**. Finalmente centrifugar 2 minutos a velocidad máxima.

Ligación.

La ligación es un paso crucial, este protocolo puede cambiar dependiendo del proveedor, se recomienda leer cuidadosamente la ficha técnica que acompaña el kit antes de hacer el experimento, el protocolo que se presenta a continuación se ha probado en múltiples ocasiones utilizando el kit T4 DNA Ligasa de Fermentas.

Un punto muy importante antes de realizar la ligación es contar con un nanodrop que nos permita tener una referencia exacta sobre las concentraciones que tenemos tanto de vector como de inserto, de otra forma hay muy pocas posibilidades de que la ligación tenga un resultado positivo.

1. Se tomó una lectura en el nanodrop, el blanco que se utilizó fue agua MiliQ:

Inserto	
Gen AFP	19.2ng/μl
Vector	
pCold I	23.5ng/μl

2. Se realizaron los siguientes cálculos para obtener el volumen en ng/μl que recomienda la hoja técnica del proveedor, como se detalla a continuación:

- Concentración del Inserto = 19.2ng/μl
- Tamaño del inserto en pares de bases = 284 pb
- Tamaño del vector en pares de bases = 4,407 pb
- Proporción que deseo = 1:5 (uno de vector 5 de inserto)

$$\text{Inserto } \frac{(19.2 \text{ ng}/\mu\text{l}) (284\text{pb})}{(4,407 \text{ pb}) (5)} = \frac{5452.8}{4,407} = 1.2373 \text{ ng}/\mu\text{l de vector}$$

- Hacemos el cálculo para diluir el vector a 1.2373 ng/μl

Lo tengo

Lo quiero



$$[23.5\text{ng}/\mu\text{l}] [?] = [1.2373\text{ng}/\mu\text{l}] [10\mu]$$

$$= 0.5265 \mu\text{l de vector diluido en } 10\mu\text{l}$$

- Aforamos 0.5265 μl de vector en 10 μl de ddH₂O para dejarlo en una concentración final de 1.2373ng/μl, para el mix de ligación tomo 1 μl de vector
- 0.5265 ng/ μl * 5 = 2.6325ng/ μl ≈ 2.6 ng/μl

- Hacemos el cálculo para diluir el inserto a 2.6 ng/μl

Lo tengo		Lo quiero
$[19.2\text{ng}/\mu\text{l}] [?] = [2.6\text{ng}/\mu\text{l}] [10\mu]$		
$=1.3711\mu\text{l del inserto diluido en } 10\mu\text{l}$		

- Aforamos 1.3711μl de inserto en 10 μl de ddH₂O para dejarlo en una concentración final de 2.6ng/μl, para el mix de ligación tomo 1 μl de inserto.

Mix de ligación:

Vector de DNA_____	1 μl
Inserto_____	1 μl
10XT4 Ligasa Buffer_____	1 μl
T4 DNA Ligasa_____	1 μl
DdH ₂ O_____	5 μl
Total	10 μl

TBE (Tris/Borate/EDTA) Buffer para electroforesis.

Se recomienda tener siempre un stock de TBE de un litro, el TBE es básico para electroforesis, el protocolo que se describe a continuación sirve para preparar un litro a 10X.

- 108 gr TRIS
- 55gr de ácido bórico.
- 40 ml de EDTA 0.5M pH 8.0.
 - El EDTA se prepara de la siguiente forma: 9.3 gr de EDTA disódico, aforar 1L dH₂O, ajustar a pH 8.0

8.2. Anexo II: Modelo

DINÁMICA POBLACIONAL

Mario Sánchez Domínguez [48].

Si $P(t)$ es el tamaño de una población al tiempo t , el modelo de crecimiento exponencial comienza suponiendo que $dP(t) / dt = kP(t)$, para cierta $k > 0$. En este modelo, la tasa relativa de crecimiento definida por

$$\frac{dP(t) / dt}{P(t)}$$

es una constante k . Es difícil encontrar casos reales de un crecimiento exponencial durante largos períodos, porque en cierto momento los recursos limitados del ambiente ejercerán restricciones sobre el crecimiento de la población. Por lo que para otros modelos, se puede esperar que la razón decrezca conforme la población $P(t)$ aumenta de tamaño.

La hipótesis de que la tasa con que crece (o decrece) una población, sólo depende del número presente $P(t)$ y no de mecanismos dependientes del tiempo, se puede enuncia como:

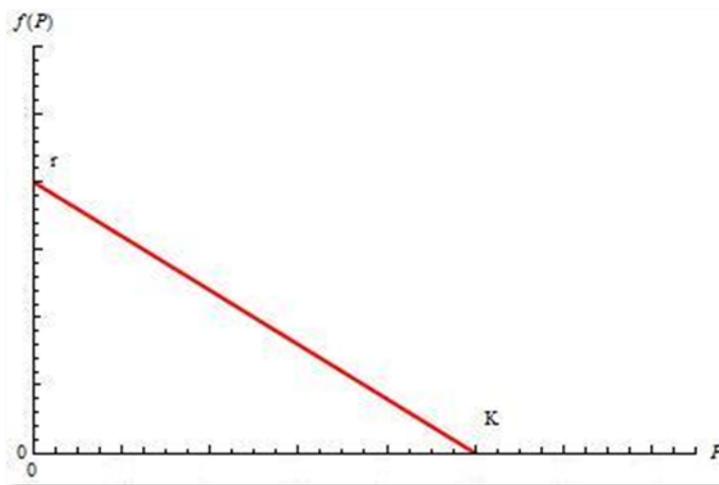
$$\frac{dP / dt}{P} = f(P)$$

o también como:

$$\frac{dP}{dt} = Pf(P)$$

Esta ecuación diferencial, que se adopta en muchos modelos de población de animales, se llama **hipótesis de dependencia de densidad**.

Suponga que un medio ambiente es capaz de sostener como máximo, una cantidad K determinada de individuos en una población. La cantidad K se llama **capacidad de sustento** del ambiente. Así, para la función f en la ecuación diferencial, se tiene que $f(K) = 0$ y $f(0) = r$



La hipótesis más sencilla es que la función f es lineal, es decir

$$f(P) = c_1 P + c_2$$

y si ahora aplicamos las condiciones $f(K) = 0$ y $f(0) = r$, tenemos que:

$$0 = f(K) = c_1 K + c_2 \quad r = f(0) = c_1 \cdot 0 + c_2$$

esto implica que

$$r = c_2 = c_1 K + r$$

por lo tanto

$$f(P) = -\frac{r}{K}P + r$$

entonces

$$f(P) = r - \frac{r}{K}P$$

y con esto, la ecuación diferencial queda:

$$\frac{dP}{dt} = P \left(r - \frac{r}{K} P \right)$$

Uno de los métodos para resolver la ecuación diferencial es por separación de variables. Si consideramos $a = r$ y $b = r/K$ y descomponemos el lado izquierdo de

$$\frac{dP}{P \left(r - \frac{r}{K} P \right)} = dt$$

se obtiene

$$\left(\frac{1}{P} + \frac{b}{a - bP} \right) dP = dt \frac{1}{a} \ln|P| - \frac{1}{a} \ln|a - bP| = t + c \ln \left| \frac{P}{a - bP} \right| = at + ac \frac{P}{a - bP} = c_1 e^{at}$$

y despejando:

$$P(t) = \frac{ac_1 e^{at}}{1 + bc_1 e^{at}} = \frac{ac_1}{bc_1 + e^{-at}}$$

Si $P(0) = P_0$ y $P_0 \neq a/b$, encontramos que $c_1 = P_0 b(a - bP_0)$ y así, sustituyendo y simplificando, la solución se convierte en

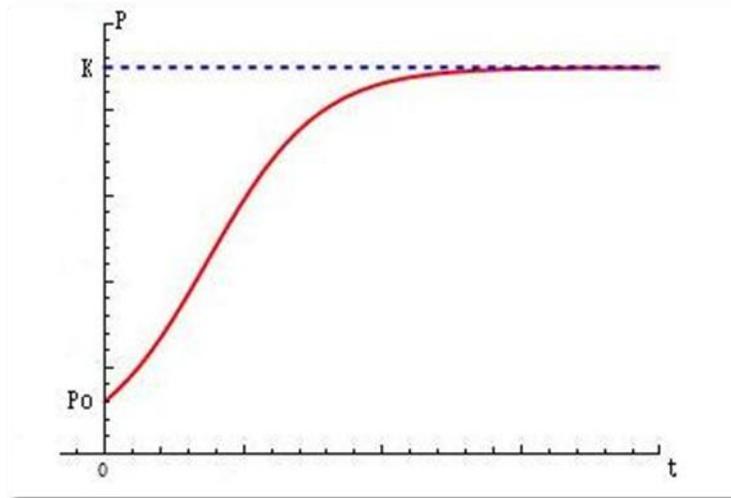
$$P(t) = \frac{aP_0}{bP_0 + (a - bP_0)e^{-at}}$$

o en otras palabras

$$P(t) = \frac{rP_0}{\frac{rP_0}{K} + \left(r - \frac{rP_0}{K}\right) \exp(-rt)}$$

Teniendo de esta manera, la solución de la ecuación diferencial.

A ésta función, se le conoce como **función logística**, en donde su gráfica muestra claramente el comportamiento que tendría el crecimiento de una población sujeta a restricciones.



Comportamiento de $P(t)$. El punto de inflexión se obtiene calculando la segunda derivada de la función e igualando con cero.

$$\frac{d^2P}{dt^2} = P \left(-b \frac{dP}{dt} \right) + (a - bP) \frac{dP}{dt} = \frac{dP}{dt} (a - 2bP) = P(a - bP)(a - 2bP) = 2b^2P \left(P - \frac{a}{b} \right) \left(P - \frac{a}{2b} \right)$$

Entonces, igualando esto con cero, obtenemos:

$$P = \frac{a}{2b} = \frac{r}{2\frac{r}{K}} = \frac{K}{2}$$

Esto significa, que cuando la población lleva la mitad de la capacidad de sustento, es cuando las restricciones del medio ambiente comienzan a causar efecto sobre el crecimiento, antes que eso el crecimiento es exponencial.

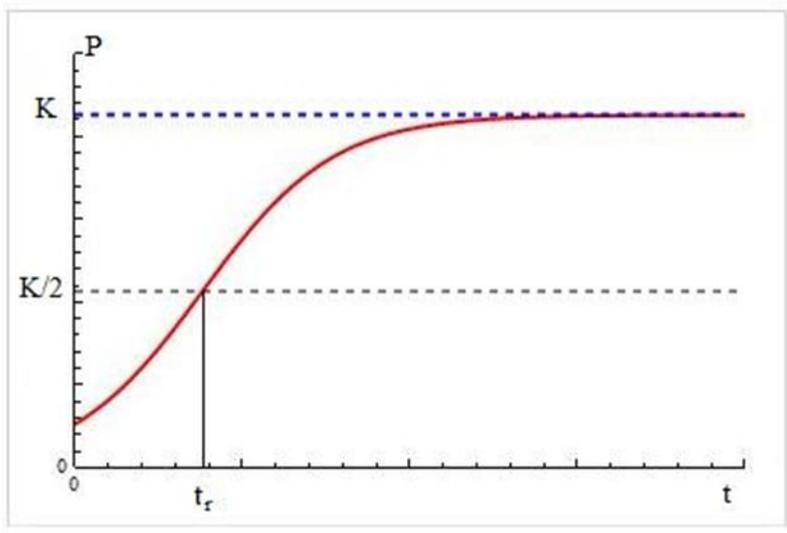
Ahora bien, para calcular el tiempo en el que se llega a $K/2$, se iguala $P(t) = K/2$ y se despeja t , obteniendo así la siguiente fórmula

$$t_r = \frac{1}{r} \ln\left(\frac{K - P_0}{P_0}\right)$$

Y por último, el factor de proporcionalidad entre la población inicial y la velocidad de crecimiento de población, se obtiene con la fórmula:

$$r = \frac{1}{t_1} \ln\left(\frac{P_1}{P_0}\right)$$

donde P_1 es la población al tiempo t_1 .



8.3 Anexo III: Primer intento por comprobar la expresión

Se realizó un intento por demostrar la expresión de la proteína AFP, para esto se dejó un cultivo en 4ml de SOC, tanto para la cepa silvestre como para la modificada durante 17hr, posteriormente se agregó 1ml de SOC para agregar nutrientes e IPTG 1mM. Se llevó a un choque frío dejándolo 24 hr. Posteriormente se centrifugó en alícuotas de 2ml y se disolvió la pastilla en buffer carga para lisar las células sonicando, hirviendo y congelando.

El tamaño de la AFP es menor a los 10kDa.

El gel teñido con azul de Coomassie es el siguiente:

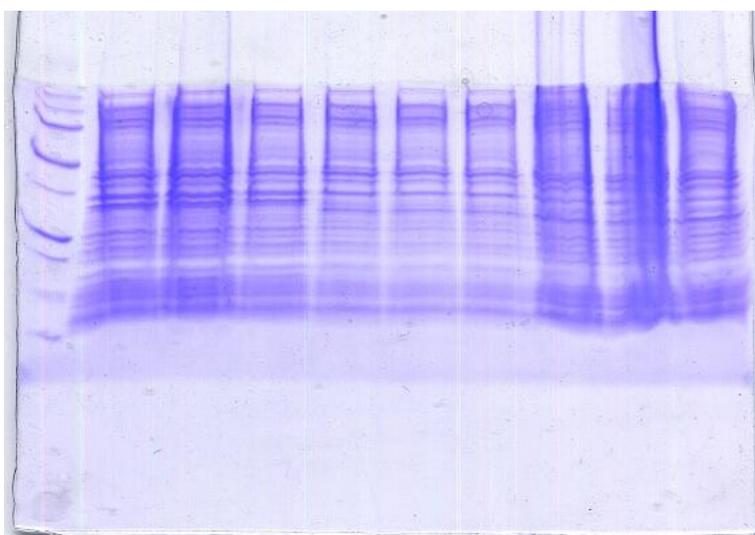


Foto 8. Gel de poliacrilamida como resultado de la electroforesis.

El primer carril es el marcador, los siguientes son las muestras, divididas en 3 grupos de 3, el primer grupo de células fue lisado hirviendo en buffer de lisis, las siguientes 3 muestras fueron sonicadas y el último grupo fue congelado 1 hr y posteriormente descongelado. El 1er carril de cada grupo consta las células sin transformar, los 2dos y 3ros carriles son cepas transformadas con la ligación, El protocolo empleado se encuentra descrito en el libro de Protocolos en Biología Molecular de Maniatis [46].

IX. Referencias

- [1] Kaznessis, Y. (2007). *Models for synthetic biology*. BMC Systems Biology, 1(47).
- [2] Barner, A., Martin, P. (2008). Synthetic Biology: social and ethical challenges. BBSRC.
- [3] Luisi, P. L. (2007). *Chemical aspects of synthetic biology*. Chemistry & biodiversity, 1:603-621.
- [4] http://partsregistry.org/Help:Synthetic_Biology
- [5] García-Arribas, O., Mateo, R., Tomczak, M., Davies, P.L., Mateu, M.G. (2007). *Thermodynamic stability of a cold-adapted protein, type III antifreeze protein, and energetic contribution of salt bridges*. Protein science, 16(2): 227-238.
- [6] Horn, G., Hofweber, R., Kremer, W., Kalbitzer, H. R. (2007). *Structure and function of bacterial cold shock proteins*. Cell. Mol. Life Sci., 64: 1457 – 1470.
- [7] Phadtare, S., Alsina, J., Inouye, M. (1999). *Cold-shock response and cold-shock proteins*. Microbiology, 2:175-180.
- [8] Yamanaka, K. (1999). *Cold Shock Response in Escherichia coli*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 1(2): 193-202.
- [9] Weber, M. H., Marahiel, M. A. (2003). *Bacterial cold shock responses*. Sci. Prog., 86: 9-75.
- [10] Chattopadhyay M. K. (2007). *Antifreeze Proteins of Bacteria*. Resonance, 25-30.
- [11] Giaquinto, L., Curmi, P. M., Siddiqui, K., Poljak, A., DeLong, E., DasSarma, S., Cavicchioli, R. (2007). *Structure and Function of Cold Shock Proteins in Archaea*. J Bacteriol., 189(15): 5738–5748.
- [12] Gualerzi, C., Giuliadori, A.M., Pon, C.L. (2003). *Transcriptional and Post-transcriptional Control of Cold-shock Genes*. J. Mol. Biol., 331: 527–539.
- [13] Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., Mendoza, D. (2004). *Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors*. J. Bacteriol., 186 (20): 6681-6688.
- [14] Jones, P.G., Van-Bogelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1987). *Induction of proteins in response to low temperature in Escherichia coli*. J Bacteriol., 169: 2092–2095.
- [15] Jones, P.G., Inouye, M. (1994). *The cold-shock response—a hot topic*. Mol Microbiol., 11: 811-818.
- [16] Graumann, P., Wendrich, T.M., Weber, M., Schroeder, K., Marahiel, M.A. (1997) *A family of cold shock proteins in Bacillus subtilis is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures*. Mol Microbiol., 25: 741-756.
- [17] Graumann, P., Marahiel, M.A. (1998). *A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain*. Trends Biochem Sci., 23: 286-290.
- [18] Mohamed, B., Al- Fageeh, Smales, C.M. (2006). *Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems*. Biochem. J., 397: 247-259.

- [19] Yamanaka, K., Fang, L., Inouye, M. (1998). *The CspA family in Escherichia coli: multiple gene duplication for stress adaptation*. Mol. Microbiol., 27: 247-255.
- [20] Tanabe, H., Goldstein, J., Yang, M., Inouye, M. (1992). *Identification of the promoter region of the Escherichia coli major cold shock gene, cspA*. J. Bacteriol., 174: 3867-3873.
- [21] Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C.O., Pon, C.L. (1999). *Massive presence of the Escherichia coli 'major cold-shock protein' CspA under non-stress conditions*. EMBO J., 18: 1653-1659.
- [22] Kumar, A., Malloch, R.A., Fujita, N., Smillie, D.A., Ishihama, A., Hayward, R.S. (1993). *The minus 35 region of Escherichia coli sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an 'extended minus 10' promoter*. J. Mol. Biol., 232: 406-418.
- [23] Jiang, W., Jones, P., Inouye, M. (1993). *Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of Escherichia coli, cspA*. J. Bacteriol., 175: 5824-5828.
- [24] Dersch, P., Kneip, S., Bremer, E. (1994). *The nucleoid-associated DNA binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of Escherichia coli K-12 to a cold environment*. Mol. Gen. Genet., 245: 255-259.
- [25] Jiang, W., Fang, L., Inouye, M. (1996). *The role of 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of Escherichia coli, in cold-shock adaptation*. J. Bacteriol., 178: 4919-4925.
- [26] Mitta, M., Fang, L., and Inouye, M. (1997). *Deletion analysis of cspA of Escherichia coli: requirement of the AT-rich UP element for cspA transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction*. Mol. Microbiol., 26: 321-335.
- [27] Inada, T., Koyama, T., Goto, F., Seto, T. (2011). *Ice Nucleation in Emulsified Aqueous Solutions of Antifreeze Protein Type III and Poly(vinyl alcohol)*. The Journal of Physical Chemistry B, 115: 7914–7922.
- [28] Ramírez, N., Sandoval, A.H., Serrano, J.A. (2004) *Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas*. Rev. Soc. Ven. Microbiol., 24 (1-2):12-23.
- [29] Goddard, S.V., Fletcher, G.L. (2002) *Physiological Ecology of Antifreeze Proteins- A Northern Perspective*. En Ewart, K.V., Hew, C.L. Fish Antifreeze proteins. World Scientific Publishing, 17-60.
- [30] Barret, J. (2001). *Thermal hysteresis proteins*. The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology. 33 (2): 105-117.
- [31] Ewart, K.V. (2002) *Fish Antifreeze Proteins: Functions, Molecular Interaction and Biological Roles*. En Ewart, K.V., Hew, C.L. Fish Antifreeze proteins. World Scientific Publishing, 61-82.
- [32] Brown, D.J., Sönnichsen, F.D. (2002) *The Structure of Antifreeze Proteins*. En Ewart, K.V., Hew, C.L. Fish Antifreeze proteins. World Scientific Publishing, 109-138.
- [33] Deng, C., Cheng, C., Yea, H., Heb, X., Chena, L. (2010). *Evolution of an antifreeze protein by neofunctionalization under escape from adaptive conflict*. PNAS, 107(50): 21593–21598.

- [34] DeVries, A.L., Wohlschlag, D.E. (1969). *Freezing resistance in some Antarctic fishes*. Science, 163 (3871): 1073–1075.
- [35] Salvay, A.G. (2000). *Structure and Interactions of Fish Type III Antifreeze Protein in Solution*. Biophysical Journal, 99: 609–618.
- [36] Hirano, Y. (2008). *Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout*. Cryobiology, 57: –51.
- [37] Scotter, A. J., C. B. Marshall, L. A. Graham, J. A. Gilbert, C. P. Garnham, P. L. Davies. (2006). *The basis for hyperactivity of antifreeze proteins*. Cryobiology, 53:229–239.
- [38] Howard, E.I., (2011). *Neutron structure of type-III antifreeze protein allows the reconstruction of AFP–ice interface*. J. Mol. Recognit., 24: 724–732.
- [39] Takamachi, M., Nishimiya, Y., Miura, A., Tsuda, S., (2009). *Fully active QAE isoform confers thermal hysteresis activity on a defective SP isoform of type III*. FEBS Journal, 276: 1471–1479.
- [40] Cheng, C.C-M., DeVries, A.L. (2002). *Origins and Evolution of Antifreeze Proteins*. En Ewart, K.V., Hew, C.L. Fish Antifreeze proteins. World Scientific Publishing, (83-108).
- [41] Quian, G., Ma, L., Khorchid, A., Swapna, G.V.T., Mal, T.K., Takayamas, M.M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H., Acton, T., Montelione, T.G., Ikura, M., Inouye, M. (2005). *Cold-shock induced high-yield protein production in Escherichia coli*. Nature Biotechnology, 22 (7):877-882.
- [42] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [43] Hew, C.L., Wang, N.C., Joshi, S. (1988). Multiple Genes Provide the Basis for Antifreeze Protein Diversity and Dosage in the Ocean Pout, *Macrozoarces americanus*. The Journal of Biological Chemistry, 263(24):12049-12055.
- [44] http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html
- [45] <http://partsregistry.org/Image:StdAss.png>
- [46] Maniatis, T. (1995). *Short protocols in molecular biology*. John Wiley and sons, New York. ISBN 0471137812.
- [47] <http://openwetware.org>
- [48] Zill, D.G. (2009). *Ecuaciones Diferenciales*, CENGAGE Learning, México, (94-98). ISBN – 13: 978– 970830038 – 4.

Software: Wolfram Mathematica 7.0 for Students.

Software: Mega 4- Molecular Evolutionary Genetics Analysis