



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CREACIÓN DE UNA MUTANTE DE *ESCHERICHIA COLI* BL21
(DE3) COMO HERRAMIENTA DE BIOLOGÍA SINTÉTICA PARA EL
DESARROLLO DE PLATAFORMAS LIBRES DE CÉLULAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SAÚL MARTÍNEZ MORENO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2025



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

VOCAL: Profesor: CARMINA MONTIEL PACHECO

SECRETARIO: Profesor: FERNANDO GUZMÁN CHÁVEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: CAROLINA RODRÍGUEZ SAAVEDRA

2° SUPLENTE: Profesor: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 324,
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO “E”,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. FERNANDO GUZMÁN CHÁVEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB MISAEL JOSAFAT FABIÁN DEL OLMO

SUSTENTANTE:

SAÚL MARTÍNEZ MORENO

RESUMEN

La biología sintética busca diseñar y mejorar sistemas biológicos para facultarlos con nuevas funciones útiles en investigación, biotecnología o diagnóstico. En este contexto, la bacteria *Escherichia coli* ha sido una plataforma clave debido a la facilidad para su manipulación genética y su uso extendido en la expresión de proteínas recombinantes. El presente trabajo se enfocó en modificar genéticamente a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para su potencial uso en el desarrollo de biosensores empleando sistemas libres de células (cell-free systems) acoplados a la actividad de la enzima β -galactosidasa.

Para la modificación genética de esta cepa, se aisló por PCR el fragmento Δ M15 del gen *lacZ* de la cepa *E. coli* TOP10 y se clonó en el vector pJET para su almacenamiento y verificación por secuenciación. Posteriormente, este fragmento se integró en el genoma de *E. coli* BL21 (DE3) mediante el sistema λ -Red basado en el mecanismo de recombinación homóloga. La secuenciación confirmó la inserción deseada, sin embargo, también reveló una mutación no planificada (Cys248Ser). A partir de la cepa mutante, se obtuvieron extractos celulares, los cuales se utilizaron para montar reacciones libres de células suplementadas con X-Gal y un plásmido codificante para el péptido alfa; en este ensayo no se observó actividad enzimática, lo cual sugirió que la mutación fue exitosa, sin embargo, tampoco se logró la complementación con el péptido alfa. En contraste, se observó que la adición del gen *lacZ* completo (en forma de plásmido), tanto *in vitro* como *in vivo*, restaura la actividad de la β -galactosidasa, lo que permitió la degradación del sustrato X-Gal.

Un análisis estructural por modelado con AlphaFold 3 y visualización en PyMOL sugiere que la mutación puntual pudo haber alterado el sitio activo de la enzima, impidiendo la complementación funcional con el péptido alfa. Estos resultados indican que la cepa BL21 (DE3) Δ M15 no es capaz de sintetizar una β -galactosidasa funcional al complementarse con el péptido alfa, sin embargo, se restaura la actividad de la enzima al agregar el gen *lacZ* completo, por lo cual se concluye que la cepa modificada en este proyecto, es potencialmente útil para la producción de extractos celulares libres de la enzima β -galactosidasa y por consiguiente, para su aplicación en el desarrollo de plataformas biosensoras libres de células capaces de producir un cambio visual al estar presente o no el analito de interés.

Como perspectiva, se propone modificar el gen *lacZ* de la cepa BL21 (DE3) con la secuencia completa proveniente de la cepa TOP10 y no solo la región Δ M15, a fin de buscar la complementación alfa de la enzima y el subsecuente uso de la cepa en el diagnóstico molecular.

ÍNDICE

RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS.....	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
1.2 JUSTIFICACIÓN	7
1.3 HIPÓTESIS	8
2. ANTECEDENTES	8
2.1 BIOLOGÍA SINTÉTICA	8
2.2 SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS (CELL-FREE TECHNOLOGY).....	9
2.3 SISTEMAS DE EDICIÓN GENÓMICA EN BACTERIAS	12
2.3.1 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA POR MAQUINARIA DE BACTERIÓFAGO λ -RED CONTENIDA EN PLÁSMIDO PKD46	12
2.4 BACTERIAS COMO PLATAFORMA BIOLÓGICA.....	15
2.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS <i>E. COLI</i> TOP10 Y BL21 (DE3)	16
2.5 SISTEMA DE EXPRESIÓN T7	18
2.6 OPERÓN <i>LAC</i>	20
2.7 GEN <i>LACZ</i> Y ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN ALFA.....	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GENERAL	24
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	24
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	25
4.1 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS	25
4.1.1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO	25
4.1.2 TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO.....	25
4.1.3 GENERACIÓN DE CÉLULAS BL21 (DE3) ELECTROCOMPETENTES PARA INSERCIÓN DEL PLÁSMIDO PKD46	25

4.1.4	GENERACIÓN DE CÉLULAS BL21 (DE3) ELECTROCOMPETENTES TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PKD46	26
4.1.5	TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN	26
4.1.6	CURACIÓN DEL PLÁSMIDO PKD46 DE LA CEPA BL21 (DE3) Δ M15	27
4.2	MANIPULACIÓN DE DNA	27
4.2.1	EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	27
4.2.2	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POR PCR	28
4.2.3	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	29
4.2.4	PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO	30
4.2.5	PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSA	31
4.2.6	CLONEJET PCR CLONING KIT	32
4.2.7	CUANTIFICACIÓN DE DNA	32
4.2.8	SECUENCIACIÓN POR OXFORD NANOPORE	33
4.3	DISEÑO <i>IN SILICO</i> (ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS CEPAS TOP10 Y BL21 (DE3) PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL OPERÓN <i>LAC</i>)	33
4.4	CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA MUTANTE BL21 (DE3) Δ M15	36
4.5	COMPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA MUTANTE Y NATIVA	38
4.6	EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LA CEPA BL21 (DE3) Δ M15 EN UN ENSAYO LIBRE DE CÉLULAS	39
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1	ANÁLISIS Y DISEÑO <i>IN SILICO</i>	43
5.2	OBTENCIÓN DE <i>LACZ</i> Δ M15 A PARTIR DE LA CEPA <i>E. COLI</i> TOP10 ..	45
5.3	OBTENCIÓN DE LA MUTANTE BL21 (DE3) Δ M15	48
5.4	EFFECTO DE LA MUTACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE LA CEPA BL21 (DE3) Δ M15	55
5.5	EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LA CEPA BL21 (DE3) Δ M15 EN SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS (CELL-FREE)	55
5.6	COMPLEMENTACIÓN ALFA <i>IN VIVO</i>	58
6.	CONCLUSIONES	63
6.1	PERSPECTIVAS	63
7.	REFERENCIAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

En esta lista se presentan las abreviaturas empleadas a lo largo del documento. Cuando corresponda se incluye la traducción al español y en cursivas su denominación original en inglés.

- **CFPS:** Síntesis de Proteínas en Sistemas Libres de células (*Cell-Free Protein Synthesis*)
- **CFS:** Sistemas Libres de Células (*Cell-Free Systems*)
- **CRISPR-Cas9:** Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)
- **Cys248Ser:** variación genética en la que el aminoácido cisteína en la posición 248 se reemplaza por serina
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
- **DSB:** Ruptura de doble cadena (*Double Strand Break*)
- **HDR:** Reparación dirigida por homología (Homology Directed Repair)
- **IMLC:** Ingeniería Metabólica Libre de Células
- **IPTG:** Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- **NHEJ:** Unión de extremos no homólogos (Non-Homologous End Joining).
- **pb:** Pares de bases
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
- **RNA:** Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)
- **X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
- **λ -Red:** Lambda Red

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de una reacción de síntesis de proteínas libre de células (CFPS).....	10
Figura 2. Mapa del plásmido pKD46..	14
Figura 3. Comparación maquinaria λ -Red y CRISPR-Cas9.....	15
Figura 4. Comparación de las cepas <i>E. coli</i> TOP10 y BL21 (DE3).....	17
Figura 5. Sistema de expresión T7.....	19
Figura 6. Enzima β -galactosidasa.	20
Figura 7. Reacción de degradación del sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) por acción de la enzima β -galactosidasa.	21
Figura 8. Selección de colonias recombinantes por el método X-gal para vectores de clonación.....	22
Figura 9. Marcador de peso molecular empleado para las electroforesis llevadas a cabo.	30

Figura 10. Región divergente en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) y DH5- α	34
Figura 11. Representación del gen <i>lacZ</i> Δ M15 contenido en el DNA genómico de células de la cepa <i>E. coli</i> TOP10.....	34
Figura 12. Representación del gen <i>lacZ</i> completo contenido en el DNA genómico de la cepa <i>E. coli</i> BL21 (DE3) WT.....	35
Figura 13. Panorama general del procedimiento para la construcción de la cepa <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Δ M15.....	36
Figura 14. Plásmido pJET-LacZalpha	37
Figura 15. Plásmido pAA90_LacZ-alfa.....	39
Figura 16. Plásmido pSM_T7_LacZFull empleado para el ensayo cell-free con el extracto celular de la cepa BL21 (DE3) Δ M15.....	40
Figura 17. Inserto y vector utilizados para la construcción del plásmido pSM_T7_LacZFull	41
Figura 18. Aminoácidos contenidos en la región divergente del gen <i>lacZ</i>	43
Figura 19. Análisis bioinformático de la alineación de secuencias de nucleótidos..	44
Figura 20. Alineación de oligonucleótidos con el gen <i>lacZ</i> en la cepa TOP10	44
Figura 21. Región del gen <i>lacZ</i> en la cepa BL21 (DE3) flanqueada por los oligonucleótidos Fw Delta M15 y Rv Delta M15.	45
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de amplificación por PCR del fragmento <i>lacZ</i> Δ M15 obtenido del DNA genómico de las células competentes TOP10.	45
Figura 23. Electroforesis de fragmento <i>lacZ</i> Δ M15 amplificado por PCR a partir del vector de clonación pJET que permitió su almacenamiento.	46
Figura 24. Electroforesis de amplificación por PCR de pJET-LacZ Δ M15 digerido con enzimas Xho1 y Xba1.....	46
Figura 25. Alineación del gen <i>lacZ</i> reportado para <i>E. coli</i> DH5-alfa con el resultado de la secuenciación del pJET-LacZa.....	47
Figura 26. Alineación de DNA correspondiente a la cepa BL21 (DE3) nativa con la secuenciación de nucleótidos del fragmento <i>lacZ</i> Δ M15 obtenido a partir del pJET-LacZa en donde se almacenó	47
Figura 27. Restricción del plásmido pKD46 utilizando las enzimas de restricción BsaI y Sall.....	48
Figura 28. Cultivo en medio sólido conteniendo X-Gal y ampicilina para la selección de colonias blancas mutadas.	49
Figura 29. Cultivo en medio LB con X-Gal y ampicilina de colonias blancas.	50
Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento <i>lacZ</i> Δ M15 amplificado por PCR y obtenido a partir de diferentes colonias de las células BL21 (DE3) mutadas.....	51
Figura 31. Alineación de la secuencia DNA del fragmento <i>lacZ</i> Δ M15 amplificado por PCR y obtenido a partir del DNA genómico de las células BL21 (DE3) mutadas..	51
Figura 32. Obtención de colonias aisladas de la cepa BL21 (DE3) mutada para posterior curación del plásmido pKD46.....	52

Figura 33. Caja “1” con medio LB sin antibiótico, conteniendo 15 colonias diferentes aisladas de la cepa BL21 (DE3) Δ M15, las cuales crecieron adecuadamente a 37°C.	53
Figura 34. Caja “1” con medio LB con ampicilina, conteniendo el inóculo de las mismas 15 colonias tomadas para la caja anterior.....	53
Figura 35. Caja “2” con medio LB sin antibiótico, conteniendo 15 colonias diferentes de la cepa BL21 (DE3) Δ M15.	54
Figura 36. Caja “2” con medio LB con ampicilina, conteniendo las mismas 15 colonias inoculadas en la caja “2” sin ampicilina.....	54
Figura 37. Curvas de crecimiento para la cepa BL21 (DE3) nativa y BL21 (DE3) Δ M15	55
Figura 38. Evaluación de la actividad in vitro de la enzima β -galactosidasa en un ensayo libre de células a partir de extractos celulares provenientes de la cepa BL21 (DE3) Δ M15.....	57
Figura 39. Mutación Cys248Ser.....	58
Figura 40. Predicción de la enzima β -galactosidasa sintetizada en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) WT	59
Figura 41. Predicción de la enzima β -galactosidasa sintetizada en la cepa BL21 (DE3) Δ M15 con la mutación Cys248Ser.	60
Figura 42. Estructura de los aminoácidos cisteína y serina.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características y mutaciones de las cepas de <i>E. coli</i> TOP10 y BL21 (DE3)	16
Tabla 2. Descripción de las mutaciones más importantes en las cepas empleadas	16
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para las reacciones de amplificación por PCR.....	29
Tabla 4. Amplificación por PCR empleando Q5 High-Fidelity 2X Máster Mix	29
Tabla 5. Parámetros de amplificación por PCR del fragmento lacZ a partir del DNA genómico de ambas cepas.....	29
Tabla 6. Reacción de clonación con pJET	32
Tabla 7. Componentes de reacción libre de células para evaluación del funcionamiento de la cepa BL21 (DE3) Δ M15.....	42
Tabla 8. Comparación de la predicción de estructura del sitio activo de la enzima β -galactosidasa en la cepa WT y Δ M15 con la mutación puntual Cys248Ser	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de la biología sintética y las plataformas libres de células han permitido construir herramientas con distintas aplicaciones biotecnológicas (Chen et al., 2012). Dentro de estas herramientas, destaca la creación y desarrollo de cepas bacterianas con características específicas para objetivos deseados (van der Oost & Patinios, 2023). Un ejemplo de ellas es *E. coli* BL21 Star (DE3) (en lo sucesivo *E. coli* BL21 (DE3)) que, entre otras modificaciones genéticas, posee un sistema de expresión basado en la RNA polimerasa del bacteriófago T7, lo cual es útil para la expresión de proteínas recombinantes (Invitrogen, 2010). Otro ejemplo de estas cepas modificadas es *E. coli* TOP10, que posee una mutación en el gen *lacZ*, denominada *lacZ* Δ M15, la cual conduce a la expresión de una versión incompleta y catalíticamente inactiva de la enzima β -galactosidasa, pero que es posible complementar por medio de un plásmido que exprese el péptido α y reestablezca la actividad catalítica (Juers et al., 2012). Esto permite emplear a dicha cepa en ensayos de selección azul/blanco basados en la degradación de sustratos como X-Gal (Guo et al., 2019).

En la actualidad, muchos métodos para la detección de analitos siguen dependiendo de equipos sofisticados, reactivos costosos o condiciones de laboratorio específicas, lo que limita su aplicación en entornos con recursos limitados (Zhang et al., 2020). Por lo tanto, existe una necesidad creciente por desarrollar biosensores capaces de detectar de manera simple, visual y específica la presencia de compuestos de interés.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El diseño de plataformas biológicas que generen una señal colorimétrica únicamente en presencia del analito de interés representa una estrategia prometedora para el desarrollo de biosensores visuales y de bajo costo. Los sistemas libres de células han emergido como una tecnología versátil en biología sintética, permitiendo la expresión controlada de proteínas sin necesidad de células vivas (Maharjan & Park, 2023). Sin embargo, la mayoría de estos sistemas utilizan extractos celulares de cepas comerciales que no están diseñadas para funciones de detección y cuya composición no siempre es óptima para activar mecanismos de respuesta a visual a analitos específicos.

Aprovechar el fenómeno de complementación alfa de la enzima β -galactosidasa ofrece, por lo tanto, una oportunidad innovadora para construir un biosensor dentro de una plataforma libre de células, mediante la modificación genética de una cepa

comercial y con ello desarrollar además otras herramientas moleculares visuales, sensibles, económicas y escalables.

1.3 HIPÓTESIS

En biotecnología, contar con una herramienta biológica con la capacidad para producir proteínas recombinantes y a su vez con la característica de ser complementada mediante un plásmido de expresión (péptido alfa), permitiría obtener una plataforma con el potencial de ser utilizada en diferentes campos biotecnológicos como el diagnóstico molecular.

La modificación al genoma de *E. coli* BL21 (DE3) con la mutación $\Delta M15$ generaría una cepa incapaz de sintetizar la enzima β -galactosidasa funcional por sí misma, lo cual facultaría a la cepa para su uso en la obtención de extractos celulares desprovistos de la actividad β -galactosidasa, lo que permitiría por lo tanto el desarrollo de sistemas libres de células para su aplicación en el diseño de biosensores y otras herramientas moleculares que utilicen a esta enzima como reportero molecular.

2. ANTECEDENTES

2.1 BIOLOGÍA SINTÉTICA

La biología sintética (BS) es un campo emergente multidisciplinario cuyo fin es explorar, comprender, diseñar y construir nuevos sistemas biológicos al combinar conocimientos y técnicas de biología, química, bioinformática e ingeniería. Su principal objetivo es incrementar la facilidad y eficiencia con la que se pueden diseñar, construir y caracterizar sistemas biológicos, siguiendo los principios de *diseñar-construir-probar-aprender* mediante el uso de herramientas moleculares estandarizadas, por lo que los esfuerzos principales de esta disciplina están centrados en el desarrollo de estas tecnologías (Chen et al., 2012).

No obstante, a pesar de que la biología sintética ha permitido la generación de herramientas moleculares para el descubrimiento de nuevos fármacos o la generación de biosensores, estas se basan principalmente en el diseño y modificación racional del genoma de bacterias (y otros organismos) de interés, con el objetivo de construir plataformas biológicas para la ejecución de tareas específicas (Han et al., 2023). En este sentido, una tecnología que depende mayoritariamente del fondo genético del organismo a utilizar son los Sistemas Libres de Células (CFS por sus siglas en inglés "Cell-free System"), ya que estos son sistemas *in vitro* para

la síntesis de proteínas cuyo potencial y eficiencia está directamente relacionado con el origen del extracto celular que se utilice en la reacción (Koo et al., 2020).

2.2 SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS (CELL-FREE TECHNOLOGY)

Muchas herramientas de biología sintética han empleado sistemas basados en células completas y, a pesar de demostrar un amplio potencial biotecnológico en diferentes áreas, las limitantes inherentes al uso de células como huéspedes ha restringido su alcance y enfoque, por ejemplo, en la producción de proteínas que son tóxicas para el hospedero o la incapacidad para realizar ensayos de alto rendimiento a bajo costo debido a lo laboriosos y exhaustivos que son los protocolos para obtención de proteínas recombinantes. Para dar una posible solución a tales problemas, los sistemas libres de células surgen como una opción atractiva que ha permitido prescindir de complejidades y ha brindado oportunidades para el diseño racional y la manipulación de sistemas biológicos, que a su vez han permitido un avance acelerado en la BS y más ampliamente en la biotecnología (Tinafar et al., 2019).

Los CFS son plataformas en las cuales se llevan a cabo reacciones bioquímicas sin necesidad de utilizar células vivas. Estos sistemas se pueden construir utilizando extractos celulares crudos o componentes purificados. Los oligonucleótidos se han utilizado ampliamente debido a que los lisados celulares se pueden preparar fácilmente y contienen toda la maquinaria celular requerida para los procesos de transcripción, traducción, regeneración de energía, así como las rutas metabólicas nativas. Estos extractos son altamente funcionales, sin embargo, son complejos e indefinidos (Ji et al., 2022). En contraste, los CFS definidos, también llamados sistemas PURE (síntesis proteica utilizando elementos recombinantes) pueden ser reconstituidos a partir de componentes purificados (Shimizu et al., 2001).

De igual manera es posible clasificar los CFS por su método de preparación: aquellos basados en extractos celulares y los basados en enzimas purificadas (Koo et al., 2020). Los sistemas basados en extractos celulares han permitido conducir investigaciones para el estudio de la **síntesis de proteínas en sistemas libres de células (CFPS)** y, por otro lado, los sistemas basados en enzimas purificadas permiten mejorar los resultados de la síntesis de proteínas en formatos libres de células (Shimizu et al., 2001). Ambos métodos cuentan con ventajas, desventajas y consideraciones únicas.

Los componentes de una reacción de CFPS se describen en la figura 1. Las plataformas pueden ser diseñadas para contener únicamente los factores benéficos para la síntesis de proteínas y prescindiendo de aquellos potencialmente perjudiciales, como lo son las enzimas degradadoras y rutas metabólicas

energéticamente costosas y que no están relacionadas con la síntesis de la proteína de interés.

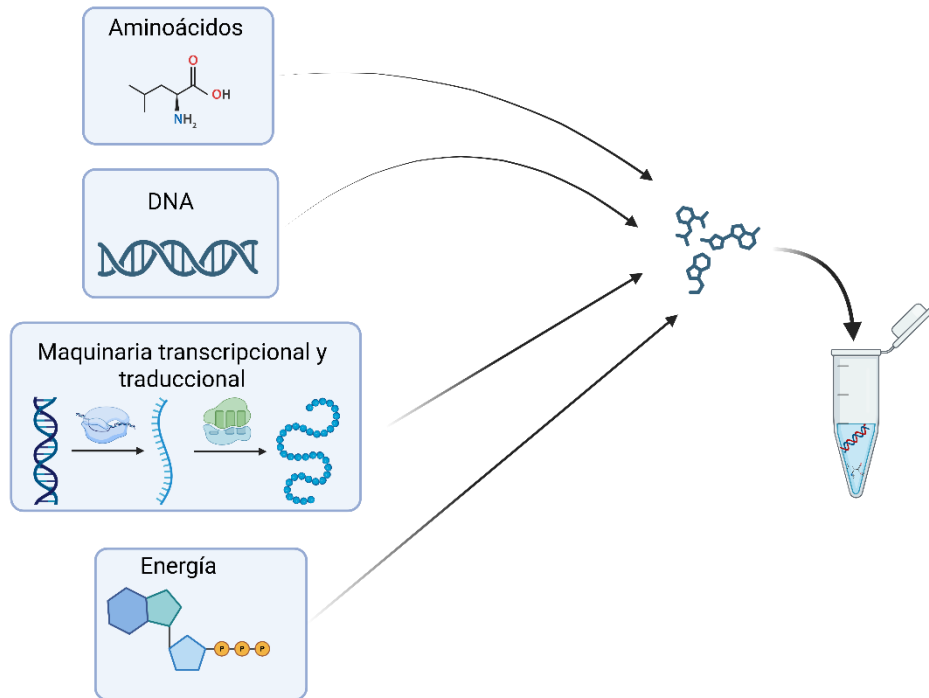


Figura 1. Componentes de una reacción de síntesis de proteínas libre de células (CFPS). Se requieren aminoácidos como monómeros para construir una proteína funcional, DNA codificante para la síntesis de proteínas, ribonucleótidos, moléculas que provean energía para las reacciones de síntesis y la maquinaria transcripcional y traduccional requerida para estas reacciones. Todos los componentes se mezclan en un tubo de reacción.

Los CFS han sido objeto de múltiples mejoras sucesivas, iniciando hace más de un siglo desde lisados celulares que demostraron que procesos moleculares básicos como la fermentación se pueden llevar a cabo fuera de las células, hasta el diseño actual de plataformas industrialmente modificadas para la producción de múltiples moléculas blanco. El mejoramiento de estos sistemas continúa en términos tecnológicos (en la preparación de extractos y el desarrollo de los componentes de las plataformas) así como en términos económicos, con el uso de reactivos de bajo costo (Brookwell et al., 2021).

La tolerancia y personalización de las condiciones de reacción de los CFS los vuelven una plataforma ideal para la creación de prototipos de nuevas rutas metabólicas y circuitos genéticos, lo cual a su vez los vuelve atractivos para la

producción industrial de biomoléculas (biofabricación). La aplicación de los CFS en la creación de prototipos, en donde nuevas ideas, herramientas y sistemas son probados previo a su producción masiva, es viable gracias a que es posible estudiar el metabolismo evitando el conflicto entre reacciones y variables no controladas (Moore et al., 2017).

Múltiples campos se han beneficiado de la biofabricación por sistemas libres de células, siendo algunos ejemplos: la industria alimentaria, de cosméticos y especialmente los biofármacos que a su vez abarcan una amplia gama de moléculas como anticuerpos monoclonales, vacunas, péptidos antimicrobianos, entre otros (Ji et al., 2022). Los CFS representan una importante oportunidad para producir biofármacos de una manera más económica y eficiente que no es posible con los métodos actuales basados en células vivas (Stech & Kubick, 2015).

Otra aplicación de los CFS es su uso como **biosensores**, permitiendo la detección rápida de analitos en concentraciones traza (Zhang et al., 2020). Los biosensores libres de células pueden ser optimizados para detectar una amplia variedad de analitos y superan las desventajas presentadas en los sistemas basados en células. Por ejemplo, permiten prescindir de la membrana celular que dificulta el monitoreo y modificación del receptor, evitan el riesgo de contaminación ambiental con organismos genéticamente modificados y logran operar en un amplio rango de ambientes que podrían ser tóxicos para sistemas basados en células (Brookwell et al., 2021).

La ingeniería metabólica libre de células (IMLC) es otra área beneficiada de los CFS, empleándolos para la manipulación de genes y procesos moleculares para el entendimiento y control de las funciones biológicas como rutas enzimáticas, transducción de señales y la expresión de genes. La habilidad para escalar la producción, controlar las variables de la reacción y producir una amplia variedad de proteínas de interés demuestran la superioridad de la ingeniería metabólica libre de células sobre los sistemas basados en células (Swartz, 2018).

Por lo tanto, los CFS en biología sintética permiten un control directo de la transcripción, traducción y metabolismo en un ambiente abierto. Adicionalmente, el ciclo del diseño-construcción-prueba-aprendizaje se reduce a días, mientras que en un sistema dependiente de células tomaría semanas (Lu, 2017). En términos de biofabricación, los rendimientos y proporciones de producción son escalables y comparables con los sistemas dependientes de células. Así, los CFS surgen como una tecnología flexible y poderosa para la ingeniería de sistemas y partes biológicas con diferentes aplicaciones prescindiendo del uso de células. (Lu, 2017).

A pesar del gran potencial de los sistemas CFPS, aún existen desventajas que deben ser abordadas. Un ejemplo de estas desventajas es la carencia de las maquinarias celulares requeridas para realizar modificaciones postraduccionales complejas en las proteínas, a diferencia de sistemas derivados de organismos eucariontes (Maharjan & Park, 2023), estas modificaciones incluyen glicosilaciones,

fosforilaciones, formación de puentes disulfuro, acetilaciones, etc. La falta de adecuadas modificaciones postraduccionales impide la actividad biológica adecuada de las proteínas eucariontes que requieren de dichas modificaciones para ser funcionales.

Por otro lado, el costo de una alta concentración de proteína se ha reducido considerablemente en los sistemas CFPS que utilizan extractos de *E. coli* en comparación con los que se utilizaban anteriormente como el sistema de reticulocitos de conejo, los extractos de trigo o las células de insecto. Estos sistemas eucariontes, a pesar de ser capaces de realizar modificaciones postraduccionales, generalmente requieren procedimientos laboriosos de extracción, los cuales son más costosos y con menores rendimientos (Carlson et al., 2012).

En este contexto, la optimización de estos sistemas a partir de extractos celulares provenientes de organismos modificados abre un abanico de posibilidades para su aplicación a bajo costo en áreas como el diagnóstico molecular, que tradicionalmente involucra el uso de biológicos de alto costo, haciendo limitado su uso por la mayor parte de la población.

Para el cumplimiento de los objetivos de la biología sintética y los sistemas libres de células se han desarrollado sistemas de edición genómica en bacterias, que se describen a continuación.

2.3 SISTEMAS DE EDICIÓN GENÓMICA EN BACTERIAS

La elucidación de las características funcionales y estructurales del DNA y RNA, en conjunto con el desarrollo de herramientas de ingeniería genética han permitido la edición genómica de bacterias, la cual implica la modificación de secuencias específicas del genoma bacteriano para alterar características genéticas, como lo es la inserción, eliminación o reemplazo de genes; lo cual ha demostrado un notable potencial en aplicaciones biotecnológicas (van der Oost & Patinios, 2023).

A la fecha el sistema por doble recombinación homóloga asistida por λ -Red para la edición genómica en bacterias ha sido ampliamente utilizado y se describe brevemente a continuación.

2.3.1 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA POR MAQUINARIA DEL BACTERIÓFAGO λ -RED CONTENIDA EN PLÁSMIDO PKD46

El cromosoma bacteriano puede ser editado *in vivo* por recombinación homóloga utilizando productos de PCR y oligonucleótidos sintéticos como sustrato. Esto es posible gracias a las propiedades de recombinación del bacteriófago λ que permiten

una recombinación homóloga eficiente entre un fragmento de DNA exógeno y el cromosoma bacteriano (Thomason et al., 2005). Esta tecnología permite insertar o suprimir secuencias de DNA sin requerir sitios de restricción (Sharan et al., 2009).

La recombinación homóloga mediada por el sistema **λ -Red** ha sido utilizada como herramienta genética para modificar el cromosoma bacteriano con una cadena lineal de DNA o de doble cadena (Costantino et al., 2003)

Este sistema consiste en tres genes: **α** , **β** y **γ** que codifican respectivamente para: una exonucleasa 5' \rightarrow 3' que degrada una de las cadenas de DNA de doble cadena generando una cadena sencilla de DNA, la proteína **β** que se une al DNA de cadena sencilla e impide su degradación y la proteína **γ** que inhibe la exonucleasa recBCD de *E. coli* para evitar la degradación de las cadenas de DNA lineal generadas (Caldwell & Bell, 2019).

El plásmido **pKD46** expresa el sistema λ -Red bajo el control de un promotor estrictamente regulado para evitar eventos de recombinación indeseados en condiciones no inducibles. Además, ha sido empleado sobre otros plásmidos (como pKD20) debido a un aumento considerable en los rendimientos del número de recombinantes obtenidas (Datsenko & Wanner, 2000).

Además, pKD46 es un plásmido recombinogénico sensible a la temperatura (Hossain et al., 2015) por lo cual se debe crecer a una temperatura $\leq 32^{\circ}\text{C}$ y es posible curarlo de la cepa mutada una vez confirmada la presencia de la mutación. El mapa del plásmido se observa en la figura 2.

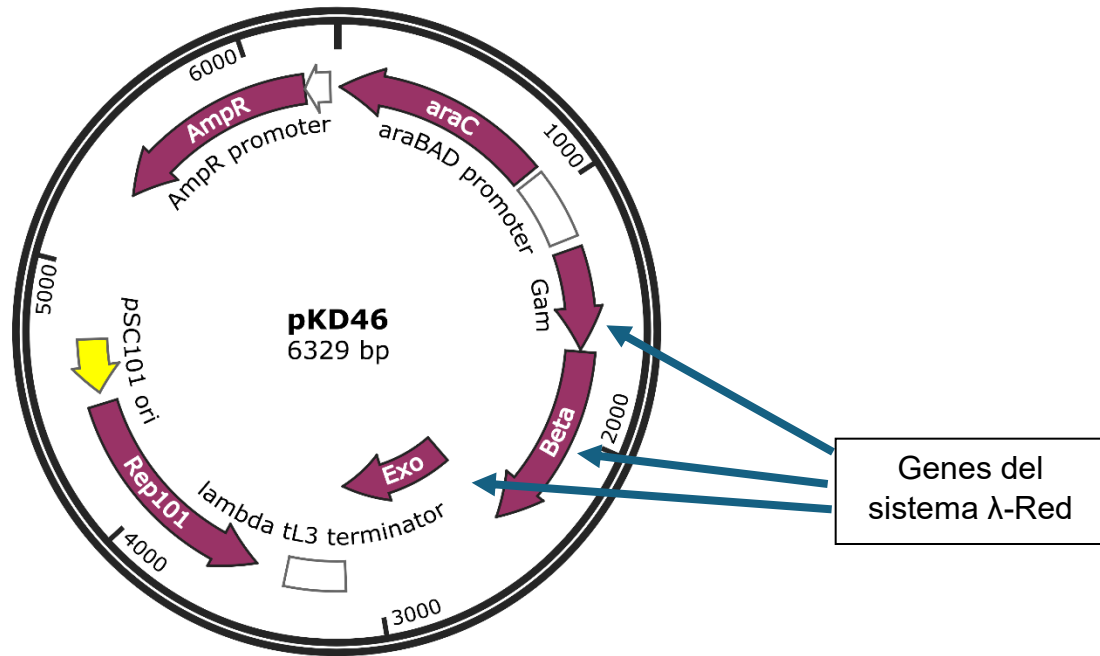


Figura 2. Mapa del plásmido pKD46. Este plásmido contiene los genes del sistema λ -Red bajo el promotor de arabinosa, con resistencia a ampicilina.

En la figura 3 se compara la tecnología CRISPR-Cas9 con la de recombinación homóloga λ -Red, evidenciando la decisión de uso de esta última para los fines del presente trabajo.

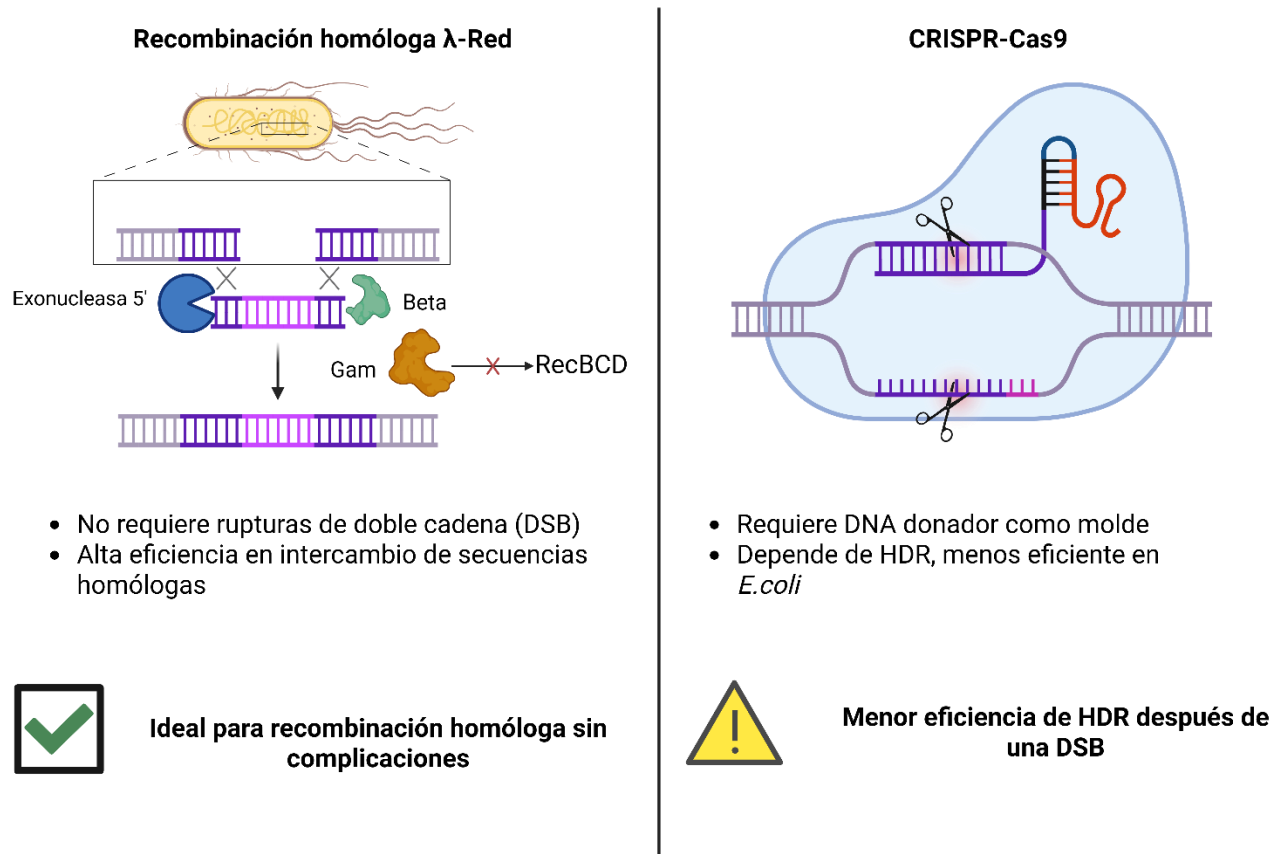


Figura 3. Comparación maquinaria λ-Red y CRISPR-Cas9. La maquinaria λ-Red es preferible sobre CRISPR-Cas9 para intercambiar una región homóloga en *E. coli* porque permite una recombinación homóloga eficiente sin necesidad de inducir rupturas de doble cadena (DSB), ya que *E. coli* no cuenta con una vía de reparación dirigida por homología (HDR) tan eficiente como las células eucariotas, lo que hace al sistema CRISPR-Cas9 menos eficiente en este contexto (Arroyo-Olarte et al., 2021).

2.4 BACTERIAS COMO PLATAFORMA BIOLÓGICA

Desde una perspectiva biotecnológica, las bacterias han sido las plataformas más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes, siendo *E. coli* el modelo por elección debido a sus múltiples características como un crecimiento rápido, disponibilidad de herramientas moleculares para su manipulación, facultado para crecer en medios mínimos y de bajo costo, así como el acceso a cepas modificadas para la realización de tareas específicas, por mencionar algunos (Yu et al., 2023).

Dentro de las cepas de *E. coli* más utilizadas en el campo de la biotecnología destacan aquellas utilizadas como medio de clonación o almacenamiento de DNA plasmídico, tal como DH5- α o TOP10, o aquellas utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes debido a sus características metabólicas como las cepas BL21 (DE3) (Mayer et al., 2022).

2.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS *E. COLI* TOP10 Y BL21 (DE3)

Una cepa bacteriana se define como un subgrupo de una especie bacteriana con variaciones genéticas específicas con respecto al tipo silvestre parental (Yan et al., 2020) y una mutación es un cambio en la secuencia de DNA de un organismo (NHGRI, 2025).

Cada cepa puede ser descrita por su genotipo, que lista las mutaciones que le confieren propiedades específicas (Invitrogen, 2010). El genotipo de una cepa de *E. coli* es fundamental, ya que define las características que pueden aprovecharse para distintos objetivos (Joshi et al., 2022).

Las mutaciones de las cepas TOP10 y BL21 (DE3) se describen en la tabla 1, mientras que la descripción y relevancia de algunas de estas mutaciones se describen en la tabla 2.

Tabla 1. Características y mutaciones de las cepas de *E. coli* TOP10 y BL21 (DE3)

Cepa	Características y mutaciones	Referencia
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ - <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	(Casali, 2003)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	(Casali, 2003)

Tabla 2. Descripción de las mutaciones más importantes en las cepas empleadas

Mutación	Descripción	Importancia
<i>lacZ</i> Δ M15	Delección parcial del gen β -galactosidasa	Permite la complementación alfa para la selección de colonias blancas/azules
<i>mcrA</i>	Mutación en los sistemas de restricción metilcitosina-específicos	Permite mayor eficiencia en la clonación de DNA que contiene metilcitosinas
<i>recA</i>	Recombinación homóloga obstruida	Previene la recombinación de DNA introducido con el DNA del

		huésped, incrementando la estabilidad de los insertos
DE3	Lisógeno conteniendo el gen para la RNA polimerasa T7	Permite la expresión de sistemas basados en el promotor T7

Por lo tanto, *E. coli* TOP10 (al igual que la cepa DH5- α) es una bacteria modificada genéticamente para maximizar la eficiencia de la transformación, por lo cual es ampliamente utilizada en experimentos de tecnología de DNA recombinante, como lo es la clonación. Esta cepa contiene la mutación *lacZ* Δ M15 que inactiva el gen *lacZ*, produciendo la enzima β -galactosidasa no funcional (Hamed et al., 2020). Sin embargo, por las mutaciones presentes en la cepa TOP10, no está optimizada para una alta producción de proteínas ni de extracto celular. Esto impiden el uso de su extracto celular en ensayos libres de células (cell-free technology), como se describe en la figura 4.


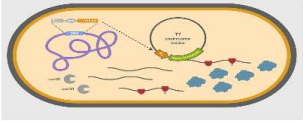
	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Cepa		
Uso principal	Clonación de DNA recombinante	Producción de proteínas recombinantes
Características genéticas relevantes	<i>lacZ</i> Δ M15	T7 RNA pol inducible
Ventaja	Ensayos de selección azul/blanco <input checked="" type="checkbox"/>	↑ producción de proteínas Apta para cell-free
Limitación	↓ producción de proteínas No apta para cell-free	No apta para ensayos de selección azul/blanco <input type="checkbox"/>

Figura 4. Comparación de las cepas *E. coli* TOP10 y BL21 (DE3), contrastando el uso principal que se les da, así las características genéticas que les confiere ventajas y limitaciones específicas. Una de las principales diferencias de las cepas es la presencia del gen *lacZ* completo para BL21 (DE3) e incompleto para la cepa TOP10.

Por otro lado, la designación **DE3** indica que la cepa contiene el lisógeno DE3 con el gen para la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. Además, estas cepas contienen el gen *rne131* mutado que codifica para una enzima RNAasa E trunca que es incapaz de degradar RNAm, resultando en una mayor estabilidad de este último (Carmignotto & Azzoni, 2019). Otra característica de esta cepa es la ausencia de proteasas (*lon* y de membrana externa), lo cual reduce la degradación de proteínas heterólogas expresadas en esta cepa. Todo esto vuelve a las cepas DE3 excelentes para la expresión de proteínas heterólogas (Mo et al., 2025) y, por lo tanto, también para su aplicación en ensayos libres de células donde se pretenda expresar alguna proteína, cuya secuencia codificante esté bajo el control del promotor T7. A continuación se describe el fundamento del sistema de expresión T7.

2.5 SISTEMA DE EXPRESIÓN T7

E. coli BL21 (DE3) posee el sistema de expresión genética basado en la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (T7 RNA pol). Esta RNA polimerasa reconoce específicamente su promotor T7 y lo transcribe 8 veces más rápido que la RNA polimerasa de la propia bacteria (Studier & Moffattf, 1986). El gen codificante para la T7 RNA pol se rige por el promotor *lacUV5* inducible por el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), lo cual hace al sistema altamente controlable y específico.

Al producirse una mayor cantidad de RNAm, de manera general se produce una mayor cantidad de proteína, lo cual resuelta crucial durante la producción de proteínas recombinantes (Du et al., 2021). El funcionamiento del sistema se resume en la figura 5.

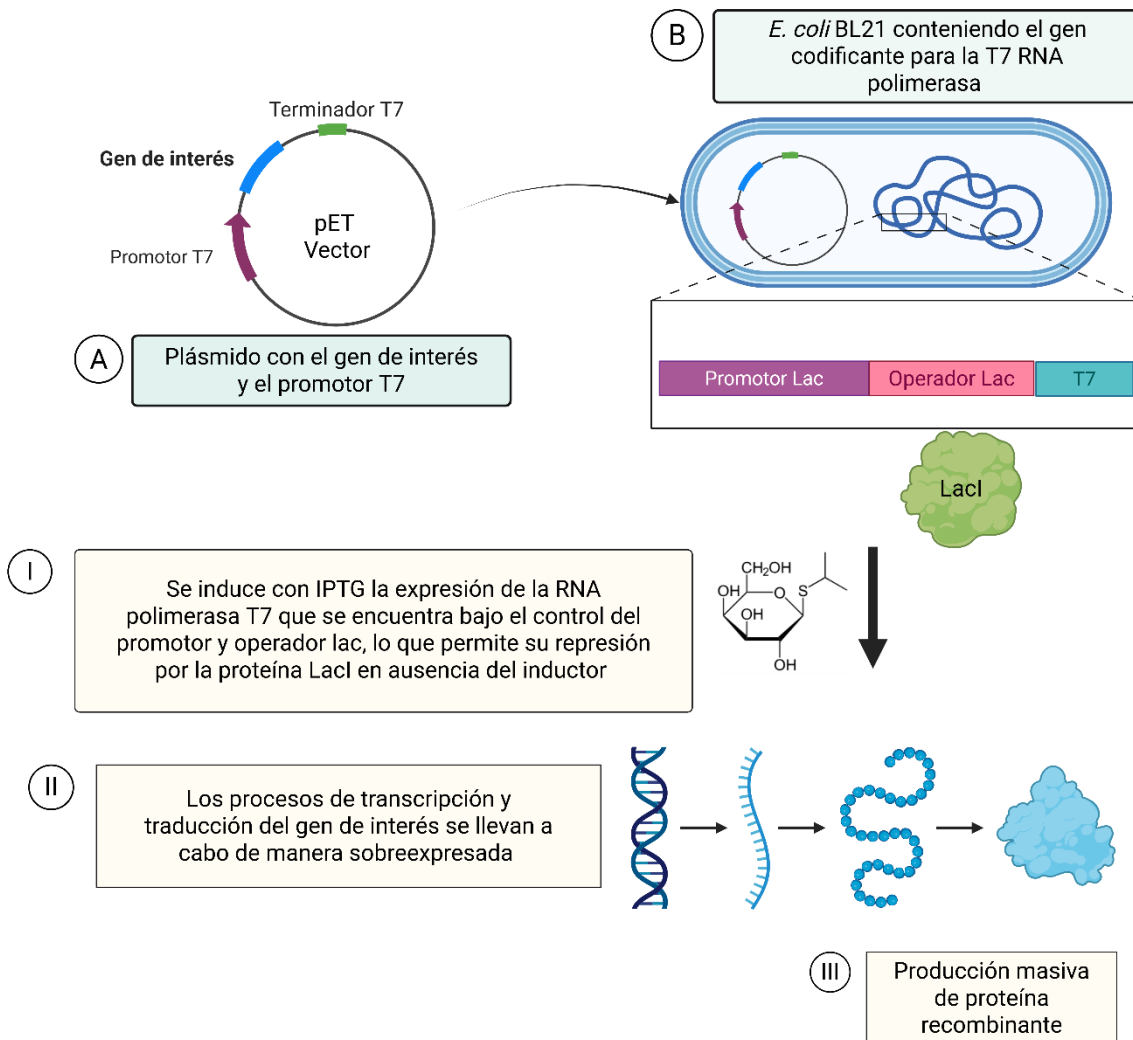


Figura 5. Sistema de expresión T7. La sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 (DE3) con el sistema T7, se compone de: (A) el plásmido con el gen codificante para la proteína de interés y el promotor T7, así como su terminador; y de (B) la cepa bacteriana que contiene el gen codificante para la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor y operador Lac. Para que el sistema funcione se induce con IPTG para desreprimir al gen y de esta manera se inicia la actividad de la RNA polimerasa T7 produciendo RNAm como parte del proceso de transcripción. Al aumentar la cantidad de RNAm a su vez aumenta la cantidad de proteína recombinante, obteniéndose así una cantidad incrementada de la proteína de interés.

2.6 OPERÓN LAC

Para organismos unicelulares como las bacterias, la expresión genética representa una respuesta fundamental a cambios en el ambiente físico y nutricional en el que se encuentren. En *E. coli* la fuente principal de energía es la glucosa; sin embargo, cuando no hay glucosa disponible en su ambiente, la bacteria utiliza la lactosa como fuente de energía (Velazco et al., 2021).

El operón *lac* en *E. coli* consiste en un sistema de tres genes codificantes para dos enzimas y un transportador, las cuales son requeridas para el metabolismo de la lactosa: β -galactosidasa (codificada por *lacZ* y representada en la figura 6) que cataliza la degradación de lactosa a glucosa y galactosa, β -galactosidasa permeasa (codificada por *lacY*) que permite el acceso del sustrato a la célula para el uso de la enzima (Kaback et al., 2011) y la galactosidasa-acetiltransferasa (codificada por *lacA*) que minimiza el estrés celular al disminuir las concentraciones intracelulares del inductor (Marbach & Bettenbrock, 2012).

La expresión de estos tres genes es controlada por un solo promotor y regulada por dos rutas principales: la proteína activadora por catabolitos (CAP) y la proteína represora LacI (Velazco et al., 2021).

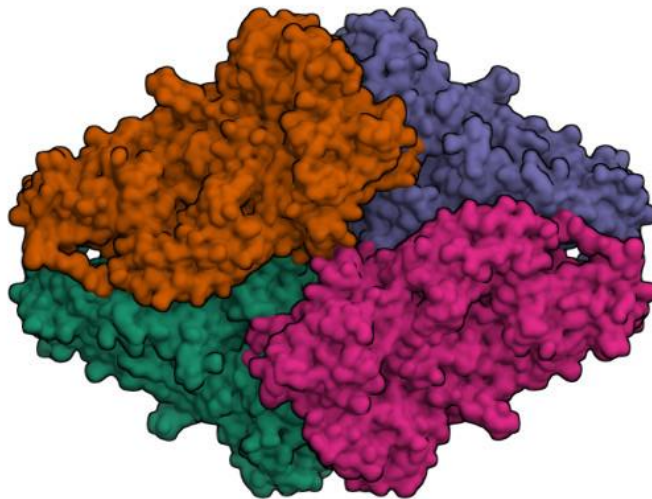


Figura 6. Enzima β -galactosidasa. Es un tetrámero de cuatro subunidades de polipéptidos idénticos, cada uno de 1023 aminoácidos. Este polipéptido es codificado por el oligonucleótido gen (*lacZ*) del operón *lac*. (Uchil et al., 2017)

El promotor del operón *lac* ha sido ampliamente utilizado para la expresión de múltiples proteínas recombinantes en grandes cantidades en *E. coli* y muchos vectores actualmente utilizados han sido diseñados para optimizar su expresión (Velazco et al., 2021).

2.7 GEN *lacZ* Y ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN ALFA

La actividad de la enzima β -galactosidasa puede ser evaluada con un sustrato cromogénico como X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) que es convertido por la β -galactosidasa en un compuesto insoluble de color azul después de su oxidación con aire (Green & Sambrook, 2019) como se describe en la figura 7.

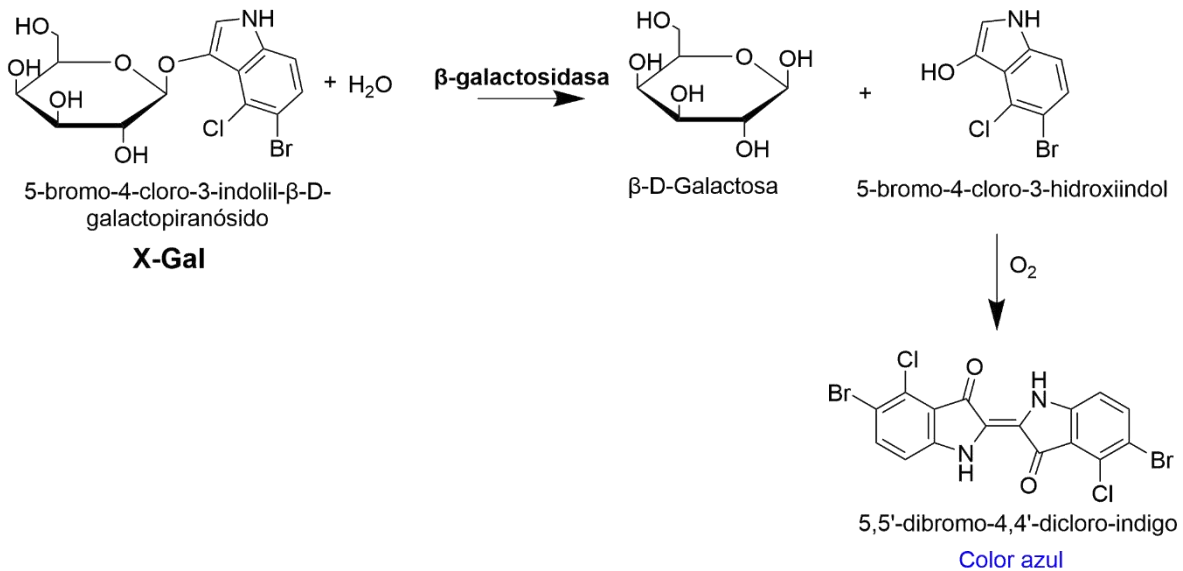


Figura 7. Reacción de degradación del sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) por acción de la enzima β -galactosidasa generando (posterior a su oxidación con aire) el producto insoluble de color azul índigo.

La complementación alfa ocurre cuando dos fragmentos (α y ω) de la enzima β -galactosidasa se asocian para formar la enzima funcional, esto ocurre *in vivo*, así como *in vitro*. Las bacterias resultantes de esta complementación alfa son fácilmente reconocidas por formar colonias azules en presencia del sustrato X-Gal (Green & Sambrook, 2019).

Las cepas empleadas en estos experimentos son mutantes con una versión incompleta del gen *lacZ* como lo es *E. coli* TOP10 con el fragmento *lacZ* Δ M15

(Prentki, 1992) que producen una versión trunca de la enzima β -galactosidasa, llamada fragmento ω que carece de actividad catalítica. Por lo tanto, por sí mismas producen colonias blancas al ser crecidas con el sustrato X-Gal. Sin embargo, es posible lograr la activación de la enzima a través del mecanismo de complementación alfa al introducir a la bacteria un plásmido que contenga la subunidad α del gen *lacZ*; lo cual, complementa el gen *lacZ* trunco y produce la enzima β -galactosidasa activa y funcional (Hamed et al., 2020). El péptido α contiene de 13 a 50 aminoácidos y permite restaurar la función la enzima (Achatz & Skerra, 2024).

Por lo tanto, en un ensayo de clonación, para la selección las colonias recombinantes se emplea X-Gal junto con un inductor de la enzima β -galactosidasa, el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en el medio de cultivo: las colonias recombinantes, que sintetizan la enzima funcional completa tendrán un pigmento azul (figura 8). Mientras que aquellas colonias no recombinantes, que no contienen el plásmido con el inserto para el péptido α , carecerán del pigmento (Achatz & Skerra, 2024).

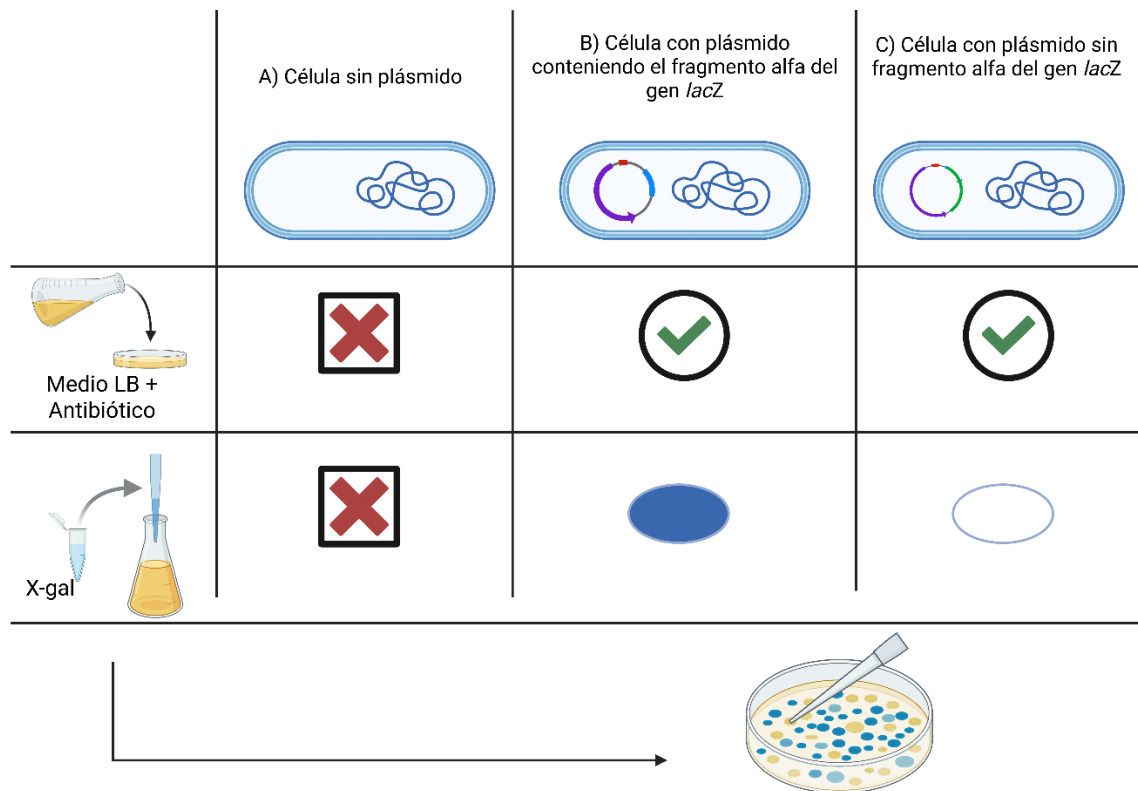


Figura 8. Selección de colonias recombinantes por el método X-gal para vectores de clonación. Las colonias azules cumplirán con la complementación alfa, en la

cual el DNA genómico de la célula se complementa con el péptido alfa de la enzima β -galactosidasa para dar lugar a la síntesis completa de la enzima funcional.

El péptido α y su complementación para la síntesis de la enzima β -galactosidasa funcional ha sido empleado como reportero para la evaluación de la actividad de promotores, así como el monitoreo de la transcripción en *E. coli* el cual ha mostrado una sensibilidad superior en comparación con otros sistemas de monitoreo como el de la proteína fluorescente mCherry (Guo et al., 2019)

E. coli BL21 (DE3) al contener el gen *lacZ* intacto no permite utilizar esta cepa para ensayos de complementación alfa. Sin embargo, para darle esta característica es posible mutar la región del gen por el fragmento Δ M15 contenido en la cepa TOP10. De esta manera se aprovecharía la maquinaria de BL21 (DE3) para la producción de proteínas recombinantes, así como su uso en ensayos de selección y otras aplicaciones biotecnológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Generar una plataforma biológica de alta expresión de proteínas recombinantes que permita utilizar como reportero a la enzima β -galactosidasa, mediante su complementación con el gen correspondiente en ensayos libres de células (cell-free).

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar y comparar por análisis *in silico* la región del gen *lacZ* que fue deletada en la cepa de *E. coli* TOP10, con respecto a la secuencia del gen presente en la cepa *E. coli* BL21 (DE3).
- Modificar el gen *lacZ* en el genoma de *E. coli* BL21 (DE3) con la mutación Δ M15 mediante la técnica de recombinación homologa por λ -Red, a fin de obtener una cepa con la enzima β -galactosidasa inactiva.
- Utilizar la cepa modificada de BL21 (DE3) para la obtención de extractos celulares que permitan establecer un sistema libre de células capaz de ser complementado con el gen *lacZ*.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

4.1.1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* TOP10 y BL21 (DE3), ambas obtenidas de la colección del laboratorio y cuyas características se describen en la tabla 2.

Todas las células fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB). Se utilizó antibiótico ampicilina a una concentración de 100 ng/μL.

4.1.2 TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO

Todas las transformaciones que se realizaron por choque térmico siguieron el protocolo que se describe brevemente a continuación: un tubo de células competentes almacenadas a -70°C se colocó directamente en hielo, y una vez descongelada la alícuota de células, se añadieron 50 ng del plásmido de interés y se mezcló por inversión. Después de 30 min de incubación en hielo, las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C por 1 min.

A continuación, se agregó 1 mL de medio líquido LB y la mezcla se incubó 1 h a 37°C con agitación constante a 250 rpm. Posteriormente se concentraron las células por centrifugación a 12,000 rpm durante 1 min, se descartó el sobrenadante y resuspendió el paquete celular en 100 μL de medio LB líquido.

Finalmente, con ayuda de una varilla en “L” se esparcieron los 100 μL de las bacterias transformadas en las cajas con el medio sólido LB y se incubaron a 37°C por 16 h.

4.1.3 GENERACIÓN DE CÉLULAS BL21 (DE3) ELECTROCOMPETENTES PARA INSERCIÓN DEL PLÁSMIDO PKD46

Para preparar células electrocompetentes de uso inmediato en la transformación, del plásmido pKD46 que contiene los genes del sistema λ-Red para la recombinación homóloga, se empleó el siguiente protocolo:

A partir de un cultivo *overnight* de células BL21 (DE3) se tomaron 500 μL, los cuales se inocularon en 10 mL de medio LB y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.4-0.5 a 600 nm. Se utilizó un densímetro celular portátil para el monitoreo de OD.

Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se tomaron 2 mL del cultivo anterior y se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Posteriormente el botón celular se resuspendió en 800 μ L de sacarosa al 20% mantenida en hielo. Después, se centrifugó y descartó el sobrenadante. Este lavado con sacarosa se repitió una vez más manteniendo las células en hielo en todo momento.

A continuación, se resuspendió el botón celular con 600 μ L de sacarosa al 20%, se centrifugó a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el botón celular se resuspendió en 300 μ L de sacarosa al 20% y, de este medio se tomaron 150 μ L, los cuales se transfirieron a tubos de 1.5 mL limpios y estériles para transformar las células electrocompetentes con 300 μ L del plásmido pKD46 utilizando una celda de electroporación de 2 mm.

4.1.4 GENERACIÓN DE CÉLULAS BL21 (DE3) ELECTROCOMPETENTES TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PKD46

A partir de un cultivo *overnight* de células BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pKD46, crecidas a 30°C con agitación constante de 200 rpm se tomó 1mL de este cultivo y se agregó a un matraz de 500 mL estéril y con tapa.

A este matraz se le agregaron 100 mL de medio LB, 100 μ L de ampicilina a una concentración de 100 mg/mL y 6 mL de L-Arabinosa 1M para inducir el sistema λ -Red. Posteriormente, el matraz se incubó a 30°C y 200 rpm hasta obtener una densidad óptica (OD) de 0.6-1.0. La OD se midió utilizando un densímetro celular portátil. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se dividió el volumen total del cultivo en dos tubos tipo Falcon de 50 mL, se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregaron 10 mL de glicerol al 10 % y se resuspendió el botón celular con ayuda de un agitador de vórtice. Después se agregó solución de glicerol al 10 % hasta llegar a un volumen final de 50 mL. Este proceso de lavado se repitió dos veces más, manteniendo las células en hielo y utilizando solución de glicerol frío. Al finalizar el tercer lavado, se resuspendió el pellet en el volumen residual de glicerol y se tomaron 50 μ L para transferir a tubos de 1.5 mL limpios y estériles. Los tubos se etiquetaron y almacenaron a -20 °C.

4.1.5 TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

En una celda para electroporación Bio-Rad® (No. de catálogo 165-2086) previamente esterilizada en luz UV por 15 min se colocaron 50 μ L de células electrocompetentes previamente preparadas (véase sección 4.1.3 y 4.1.4).

Posteriormente, en condiciones de esterilidad, a esta celda se le adicionó el DNA correspondiente (10 µL del producto de PCR de la región *lacZΔM15* amplificada a partir de DNA genómico de la cepa de *E. coli* TOP10 (el protocolo seguido se describe en la sección (4.2.1)). Una vez lista la celda con la mezcla de células electrocompetentes y el DNA a insertar, esta se colocó en un electroporador de la marca Bio-Rad® y se dio un pulso correspondiente a 2500 volts, eligiendo el programa de bacteria “*E. coli* 2”. A continuación, la celda se retiró y se colocó en hielo.

Posteriormente, se agregó 1 mL de medio LB a la celda y se resuspendió suavemente. Todo el volumen de la celda se transfirió a un tubo de 1.5 mL estéril y se incubó 2 horas a 30°C y 1000 rpm.

De esta mezcla se realizó una dilución 1:10 y se sembró masivamente en cajas Petri con medio LB, ampicilina y X-Gal (cuando fue necesario) por 16 h a 30°C.

4.1.6 CURACIÓN DEL PLÁSMIDO PKD46 DE LA CEPA BL21 (DE3) ΔM15

A partir del cultivo en glicerol (al 25 % y almacenado a -70°C) de la cepa BL21 (DE3) ΔM15 que se generó, se realizó un cultivo líquido en medio LB sin antibiótico, el cual se incubó por 16 h a 37°C con agitación constante a 200 rpm. Al día siguiente, a partir de este cultivo se estriaron placas de LB sólido y nuevamente se incubaron a 37°C por una noche.

Posteriormente se tomaron colonias aisladas de la cepa BL21 (DE3) mutada y se sembraron primero en medio LB sólido sin antibiótico y después en medio LB sólido con antibiótico ampicilina (a una concentración de 100 mg/mL), identificando cuidadosamente cada colonia sembrada en ambos medios.

Se seleccionaron las colonias que crecieron en medio LB sin antibiótico y que no lo hicieron en el medio con antibiótico, debido a la resistencia a antibiótico contenida en el plásmido pKD46 y que al no presentarse crecimiento en presencia del medio con antibiótico indica la ausencia del plásmido y por ende su adecuada expulsión de la cepa mutante.

4.2 MANIPULACIÓN DE DNA

4.2.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

La extracción de DNA genómico de las cepas *E. coli* TOP10 y BL21 (DE3) se realizó utilizando el kit “ONE-4-ALL Genomic DNA Miniprep” (No. de catálogo BS88503),

siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Basic) con algunas modificaciones como se describe a continuación.

Se transfirieron 5 mL de un cultivo *overnight* a un tubo de 1.5 mL para posteriormente centrifugar a 10,000 rpm durante un minuto y descartar el sobrenadante. Después, se agregaron 180 μ L del amortiguador de resuspensión y pretratamiento (ACL) y 20 μ L de proteasa K cuya función es la degradación de proteínas y nucleasas, mezclando con ayuda de un agitador de vórtice. Esta mezcla se incubó a 56°C por 1 h.

Posteriormente, se agregaron 200 μ L de amortiguador (CL) que permite lisar células y desnaturalizar biomoléculas, y se mezclaron con ayuda de un agitador de vórtice. A esta mezcla se añadieron 200 μ L de etanol al 98 % que favorece la unión del DNA a la membrana de sílice y nuevamente se mezcló vigorosamente en agitador de vórtice. A continuación, esta mezcla se transfirió a la columna de cromatografía y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min, descartando el filtrado.

Enseguida se agregaron 500 μ L de la solución de lavado (CW1) que desnaturaliza proteínas y degrada contaminantes solubles en agua, y se centrifugó por 1 min más a 12,000 rpm, el filtrado se descartó. Después, se agregaron 500 μ L de la solución de lavado CW2 que elimina sales residuales y contaminantes solubles en etanol, y nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm descartando el filtrado.

Finalmente, para eluir el DNA se colocó la columna en un tubo limpio de 1.5 mL, se incubó 3 min a temperatura ambiente para evaporar el etanol y se agregaron 50 μ L de agua MQ (precalentada a 50°C) al centro de la membrana, esperando 2 min para centrifugar a 12,000 rpm por 2 min.

Una vez terminada la centrifugación, la muestra se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.2.2 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POR PCR

Para la amplificación de la región Δ M15 del gen *lacZ* utilizado para la obtención de la mutante en la cepa BL21 (DE3) se diseñaron oligonucleótidos específicos (tabla 3) empleando el DNA genómico de las cepas de *E. coli* como molde. Las configuraciones de las reacciones de PCR, así como las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 4 y 5, respectivamente.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para las reacciones de amplificación por PCR.

Oligonucleótido	Fragmento	Secuencia 5' → 3'
Fw Delta M15	Fw DNA LacZ	CGTTGGCCGATTCATTAATG
Rv Delta M15	Rv DNA LacZ	GTAGGTAGTCACGCAACTC

Tabla 4. Amplificación por PCR empleando Q5 High-Fidelity 2X Máster Mix

Reactivo	Volumen para una reacción de 25 µL	Volumen para una reacción de 50 µL
Oligonucleótido sentido 10 µM	1.25	2.5 µL
Oligonucleótido reverso o antisentido 10 µM	1.25	2.5 µL
DNA	1 µL	1 µL o cbp 50 ηg
Q5 High-Fidelity 2X Máster Mix	12.5 µL	25 µL
Agua ultrapura (libre de nucleasas)	cbp 25 µL	cbp 50 µL

Tabla 5. Parámetros de amplificación por PCR del fragmento lacZ a partir del DNA genómico de ambas cepas.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98°C	30 s
Alineación (30 ciclos)	98°C	10 s
	61°C	30 s/kb
	72°C	30 s
Extensión final	72°C	2 min
Espera	4°C	∞

4.2.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los resultados de los experimentos de PCR fueron montados en un gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio a una concentración de 5 mg/mL en una cámara de electroforesis por 40 min a un voltaje constante de 90 V.

Las bandas que representan el DNA amplificado se visualizaron en un transiluminador UV (CScientific® modelo GL-3120). Posteriormente, se comparó el peso de los productos de PCR con el marcador de peso molecular empleado.

Se utilizó el marcador Gene Ruler 1 kb del fabricante Thermo Fisher Scientific, siguiendo las instrucciones del manual de uso (figura 9).

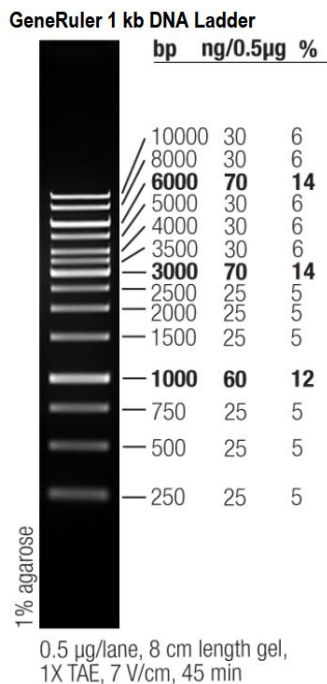


Figura 9. Marcador de peso molecular empleado para las electroforesis llevadas a cabo. Gene Ruler 1 kb del fabricante Thermo Fisher Scientific.

4.2.4 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO

Para la obtención del plásmido se utilizó el kit comercial Miniprep kit (con número de catálogo 27106), siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN) como se describe a continuación.

A partir de un cultivo líquido de 5 mL incubado 16 h a 37°C a 200 rpm, en medio LB con el antibiótico correspondiente, se centrifugaron 4 mL de este cultivo por 3 min para posteriormente decantar y descartar el sobrenadante, dejando el botón celular en el fondo del tubo. Este se resuspendió en 250 µL de amortiguador de resuspensión que permite inhibir nucleasas e hidrolizar RNA y se transfirió a un tubo de 1.5 mL.

Posteriormente se agregaron 250 µL de amortiguador de lisis alcalina cuya función es solubilizar la membrana celular y desnaturalizar DNA y proteínas, este se mezcló

vigorosamente invirtiendo el tubo 4 a 6 veces hasta que la solución se tornara clara (se evitó que la reacción de lisis procediera más de 5 min). A continuación, se agregaron 350 μL de buffer neutralizante que permite el DNA plasmídico renaturalice y precipita DNA genómico y proteínas; este se mezcló inmediata y vigorosamente invirtiendo el tubo 4 a 6 veces para posteriormente centrifugar por 10 min.

Del sobrenadante generado en el paso anterior se tomaron y transfirieron 800 μL a la columna de cromatografía (QIAprep 2.0). Se centrifugó por 1 min y descartó el filtrado.

Para el lavado de la columna se agregaron 500 μL de amortiguador de unión de DNA y eliminación de contaminantes para posteriormente centrifugar por 1 min y descartar el filtrado. Después se agregaron 750 μL de amortiguador de lavado (PE) para la eliminación de sales caotrópicas y contaminantes residuales, se centrifugó por 1 min y se descartó el filtrado.

Se centrifugó la columna por un minuto adicional para remover residuos de los amortiguadores de lavado.

Finalmente se colocó la columna en un tubo limpio de 1.5 mL para eluir el DNA con 50 μL de agua MQ previamente calentada a 50°C. Esta cantidad de agua se agrega en el centro de la columna y se deja reposar por un minuto para después centrifugar por un minuto.

4.2.5 PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSA

Para la purificación de DNA en gel de agarosa se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante del kit de extracción de gel de DNA Monarch® (número de catálogo #T1020) como a continuación se describe.

Con ayuda de una espátula se cortaron las bandas de DNA del peso deseado a partir de un gel de agarosa al 1 %, cuidando no cortar exceso de gel para facilitar la purificación. En este paso se minimizó la exposición del gel a la luz UV. Posteriormente, se transfirieron los fragmentos de gel a un tubo etiquetado de 1.5 mL. Después, se pesó el gel para agregar 4 volúmenes de amortiguador disolvente por cada parte de gel (por ejemplo: 400 μL de amortiguador para 100 mg de agarosa) y se incubó la muestra a 50°C por 10 min o hasta que el gel estuviera completamente disuelto, agitando el tubo periódicamente.

A continuación, se insertó la columna de cromatografía en un tubo colector y se transfirió la muestra disuelta a la columna para posteriormente centrifugar a 13000 rpm por 1 min y descartar el filtrado.

Se agregaron 200 μL de amortiguador de lavado a la columna, para después centrifugar, descartar el filtrado y repetir este proceso de lavado.

Finalmente se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 mL (cuidando que la punta de la columna no entrara en contacto con el filtrado) y se agregaron 20 μL de agua MQ precalentada a 50°C para eluir el DNA y se centrifugó por 1 min.

4.2.6 CLONEJET PCR CLONING KIT

Para almacenar el fragmento *lacZ Δ M15* amplificado del DNA genómico de la cepa *E. coli* TOP10, se utilizó el kit comercial “CloneJET PCR Cloning Kit” como a continuación se describe.

El fragmento de PCR deseado se ligó al vector pJET1.2 a partir de la reacción descrita en la tabla 6.

Tabla 6. Reacción de clonación con pJET

Componente	Volumen para una reacción de 20 μL
Amortiguador de reacción 2X	10 μL
Fragmento de DNA LacZ	1 μL
Vector de clonación pJET	1 μL
Agua ultrapura MQ	7 μL
DNA ligasa T4	1 μL

Una vez preparada la reacción, esta se mezcló con un agitador de vórtice brevemente y se centrifugó por un par de segundos. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente (22°C-24°C) por 5 min.

Finalmente, la mezcla de reacción se utilizó directamente para transformar por choque térmico células competentes de *E. coli* TOP10, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

4.2.7 CUANTIFICACIÓN DE DNA

La cuantificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo por espectrofotometría de luz UV en volúmenes del orden de microlitros utilizando el equipo NanoDrop®. Todas las muestras que fueron medidas cumplen con los parámetros de pureza (relación 260/230 > 1.8).

4.2.8 SECUENCIACIÓN POR OXFORD NANOPORE

Los fragmentos correspondientes al gen *lacZ* en ambas cepas fueron purificados y verificados por la tecnología de secuenciación Oxford Nanopore. Esta novedosa tecnología se basa en dispositivos que utilizan celdas de flujo que contienen arreglos de nanoporos embebidos en una membrana electro-resistente, cada nanoporo cuenta con su propio electrodo conectado a un cable y un chip sensor que mide la corriente eléctrica que pasa por cada nanoporo. Cuando los nucleótidos de la secuencia de DNA analizada fluyen por los nanoporos interrumpen la corriente eléctrica y forman un “garabato” o pico. Este garabato es posteriormente decodificado utilizando algoritmos de llamadas de bases (basecalling) para obtener en tiempo real el orden preciso de nucleótidos en los fragmentos de DNA analizados. El proceso de llamada de bases permite convertir una señal en una base nucleotídica (Herzyk, 2014).

4.3 DISEÑO *IN SILICO* (ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS CEPAS TOP10 Y BL21 (DE3) PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL OPERÓN LAC)

A partir de la base de datos del genoma tanto de la cepa BL21 (DE3) como de DH5 α (cuyas características son muy similares a las de la cepa TOP10), obtenidas de la plataforma del NCBI, se utilizaron para identificar y alinear las secuencias correspondientes del gen *lacZ* en ambas cepas de *E. coli*. Posteriormente se analizó la secuencia de aminoácidos correspondiente al gen *lacZ* del operón de lactosa y se encontró la región divergente en ambas cepas como se observa en la figura 10.

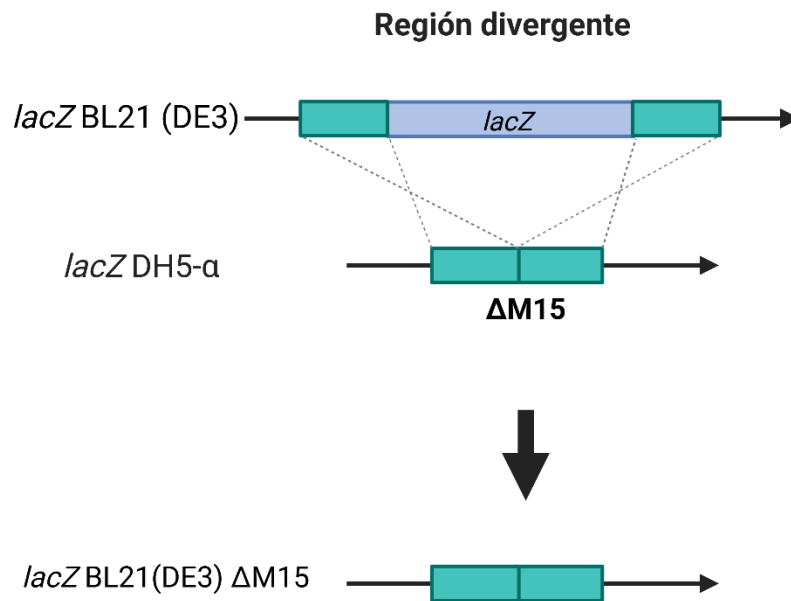


Figura 10. Región divergente en *E. coli* BL21 (DE3) y DH5- α . Esta región contiene a su vez regiones homólogas en los extremos que se pueden aprovechar para su recombinación por homología

Una vez identificada la secuencia del gen *lacZ*, se diseñaron oligonucleótidos (tabla 3) para la amplificación de la región denominada Δ M15. Estos oligonucleótidos se añadieron a la secuencia del gen *lacZ* de cada cepa como se representa en las figuras 11 y 12 con ayuda del software SnapGene.

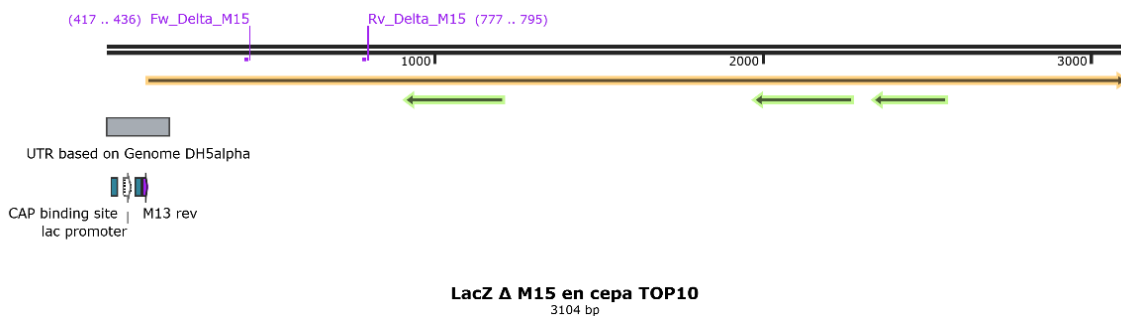


Figura 11. Representación del gen *lacZ* Δ M15 contenido en el DNA genómico de células de la cepa *E. coli* TOP10

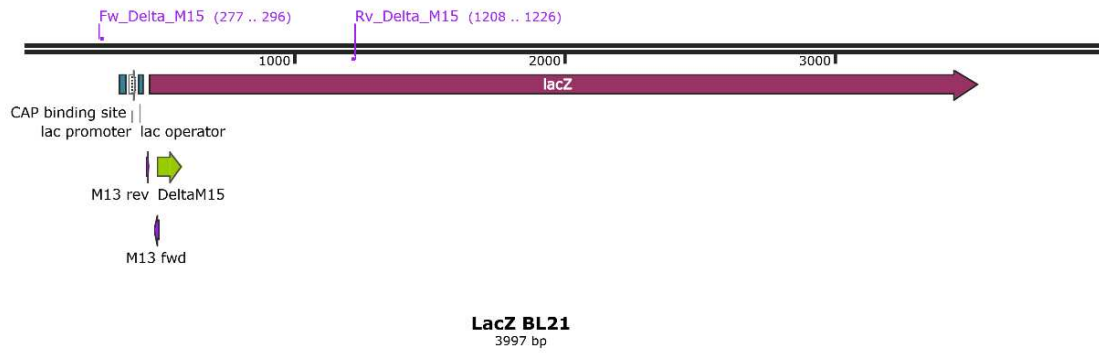


Figura 12. Representación del gen *lacZ* completo contenido en el DNA genómico de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) WT

4.4 CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA MUTANTE BL21 (DE3) Δ M15

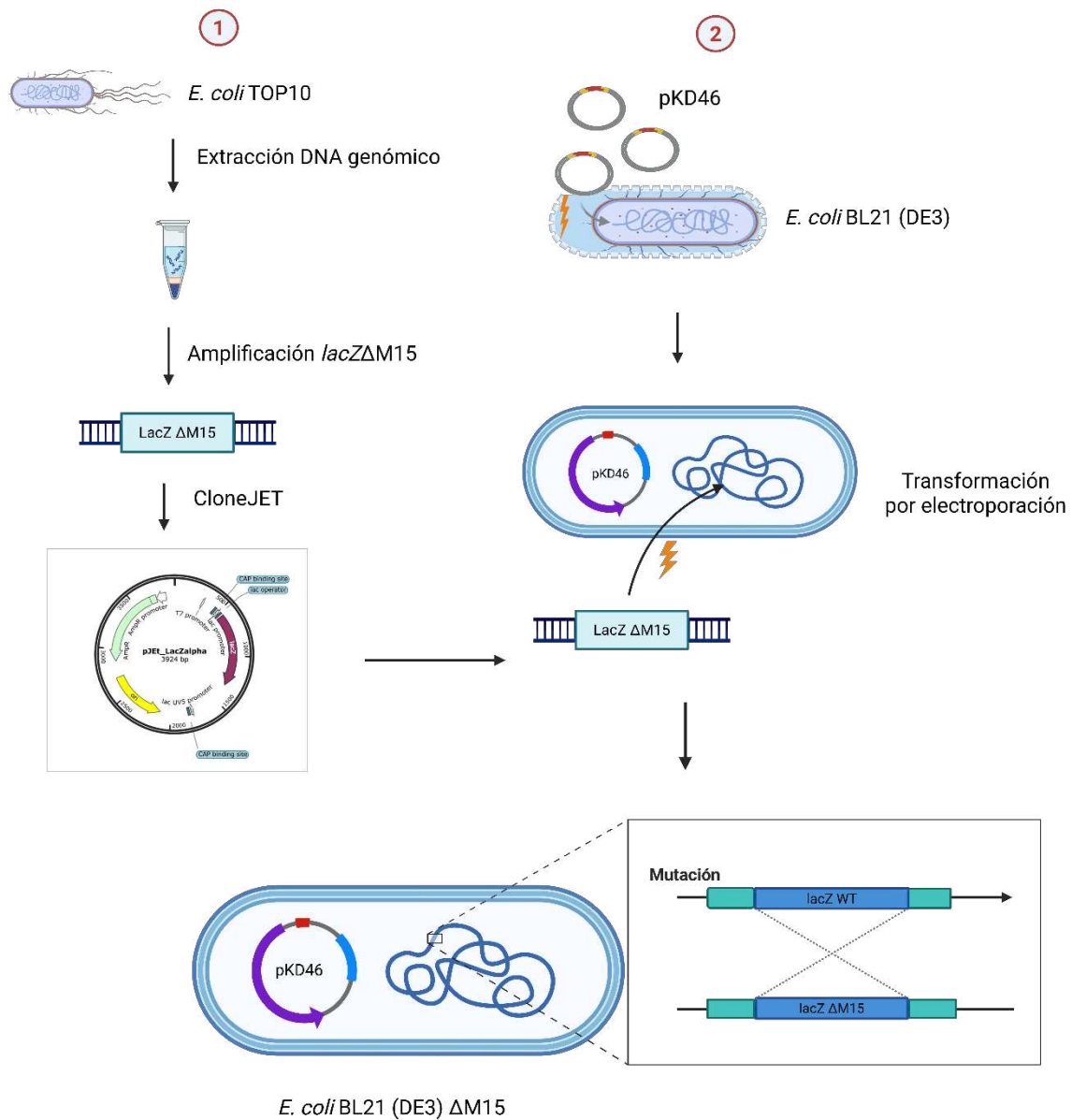


Figura 13. Panorama general del procedimiento para la construcción de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) Δ M15.

Primeramente, se realizó la extracción de DNA genómico de ambas líneas celulares de *E. coli* (TOP10 y BL21 (DE3)). De BL21 (DE3) con el objetivo de compararlo con

la BL21 (DE3) mutada al final del experimento y de TOP10 para extraer el fragmento de DNA de *lacZΔM15*.

A continuación, se amplificó por PCR el fragmento *lacZΔM15* de células competentes *E. coli* TOP10 con los oligonucleótidos Fw Delta M15 y Rv Delta M15 utilizando un gradiente de temperatura de 6 reacciones (55.7, 56.9, 58.8, 63, 65) °C). Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR y se cortaron cuidadosamente los fragmentos del gel para purificar el DNA con ayuda del kit correspondiente.

Subsecuentemente, se realizó la clonación en pJET del fragmento *lacZΔM15* (protocolo descrito en el apartado 4.2.6) para almacenar el inserto.

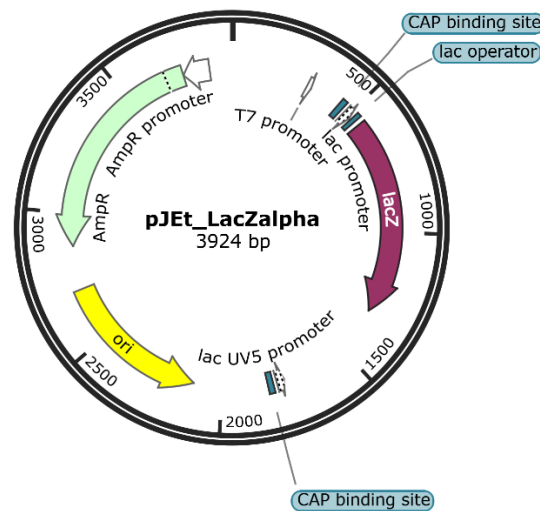


Figura 14. Plásmido pJET-LacZalpha. La clonación del fragmento *lacZΔM15* para su almacenamiento y posterior secuenciación se realizó en el vector pJET (CloneJET PCR Cloning Kit)

Después, se transformaron por choque térmico las células *E. coli* TOP10 con el pJET conteniendo el fragmento *lacZΔM15*. A continuación, se tomaron 6 colonias transformadas y se inocularon en medio líquido, después, se purificó y cuantificó el plásmido de las 6 colonias y se realizó un ensayo de restricción con las enzimas Xho1 y Xba1 para verificar la identidad del plásmido y se eligió una de las muestras que presentaron el patrón de digestión esperado para su secuenciación por Oxford Nanopore.

El plásmido pKD46 (donado por el Dr. José Utrilla del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM) que alberga la maquinaria de recombinación del

bacteriófago λ -Red (estable a 30°C), fue extraído de células DH5a utilizando Miniprep de la marca QIAGEN.

Una vez purificado y cuantificado el plásmido pKD46, este se utilizó para la transformación por electroporación de células BL21 (DE3). Posteriormente, las células transformadas con esta construcción se almacenaron en 25 % de glicerol a -70°C, para su subsecuente uso en la preparación de células electrocompetentes. Para confirmar que el plásmido pKD46 fue transformado exitosamente en las células BL21 (DE3) se llevó a cabo la purificación del plásmido a partir de un cultivo en medio líquido para su posterior restricción con las enzimas Bsal y Sall. De igual manera se secuenciaron las colonias positivas para confirmación.

Utilizando células BL21 (DE3) electrocompetentes que contenían al plásmido pKD46 se transformó el producto de PCR correspondiente al fragmento *lacZ* Δ M15 obtenido de la cepa TOP10, para su incorporación al DNA genómico de la cepa BL21 (DE3) gracias al mecanismo de recombinación homóloga λ -Red.

A continuación, se creció un cultivo en medio sólido del producto de la transformación obteniéndose colonias azules y blancas (colonias con la mutación deseada), estas últimas fueron aisladas y crecidas nuevamente en medio sólido y líquido.

A partir de un cultivo en medio líquido de las colonias mutadas (blancas en medio sólido con X-Gal) se realizó la extracción de DNA genómico y se amplificó por PCR la región de *lacZ* Δ M15. Una de estas muestras se envió a secuenciar para la confirmación de la correcta edición del gen *lacZ*.

Finalmente, se realizó la curación del plásmido pKD46 de la cepa BL21 (DE3) mutada. Primero obteniendo colonias aisladas y posteriormente seleccionando aquellas que crecieron en medio sin antibiótico y no lo hicieron en el medio con ampicilina (curación de la cepa).

4.5 COMPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA MUTANTE Y NATIVA

A partir de un cultivo overnight de la cepa BL21 (DE3) sin modificar y BL21 (DE3) Δ M15, se realizó la dilución correspondiente para obtener una absorbancia inicial de 0.05.

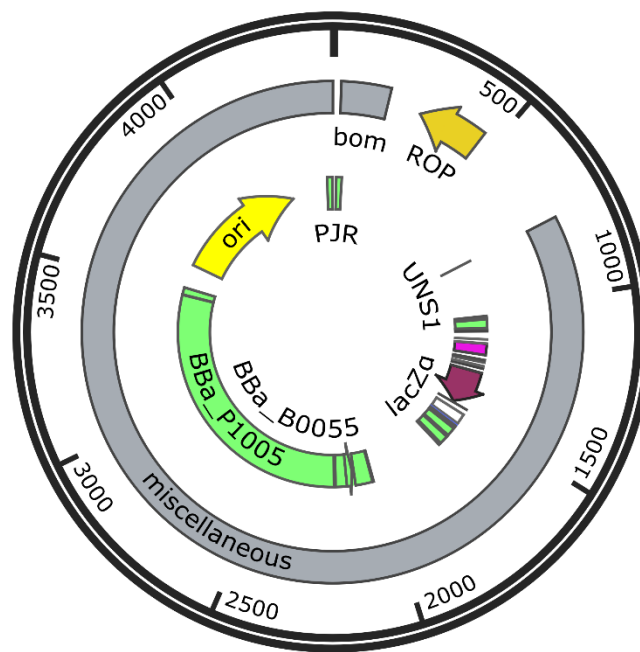
En una placa de 96 pozos se colocó el medio LB como blanco, en otro carril la muestra de la cepa BL21 (DE3) y finalmente la muestra de la cepa BL21 (DE3) Δ M15.

A continuación, la placa se colocó en un lector de microplacas CLARIOstar^{Plus}® del fabricante BMG LABTECH obteniendo y registrando valores de absorbancia a 600

nm cada 15 min por un periodo de 165 min. Estos valores se graficaron para comparar las curvas de crecimiento de ambas cepas y descartar posibles cambios en el crecimiento derivados de la mutación realizada.

4.6 EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LA CEPA BL21 (DE3) Δ M15 EN UN ENSAYO LIBRE DE CÉLULAS

Para evaluar el funcionamiento de la cepa BL21 (DE3) Δ M15 se comenzó con la purificación del plásmido **pAA90_LacZ-alfa** (donado por el Dr. Anibal Arce), el cual contiene el inserto para la producción del péptido alfa de la enzima β -galactosidasa, además de resistencia a tetraciclina como marcador de selección y el promotor T7 para acoplarlo con la RNA polimerasa contenida en la cepa a evaluar.



pAA90_LacZ-alfa
4423 bp

Figura 15. Plásmido pAA90_LacZ-alfa. Contiene el fragmento codificante para el péptido alfa de la enzima β -galactosidasa, resistencia a tetraciclina como marcador de selección, así como el promotor y terminador T7 para el uso de este sistema.

Posteriormente, se construyó el plásmido **pSM_T7_LacZFull** cuyo mapa se describe en la figura 16.

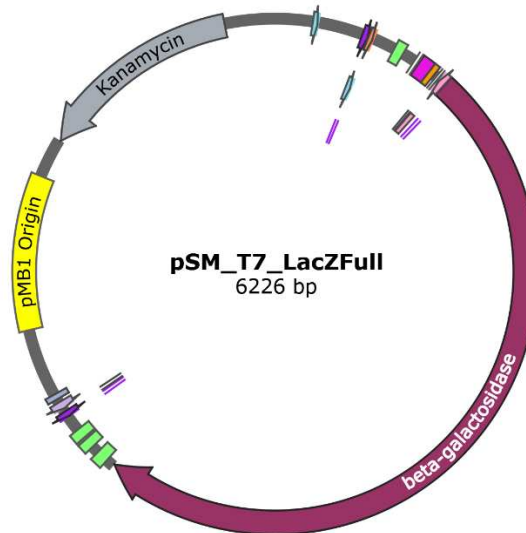


Figura 16. Plásmido pSM_T7_LacZFull empleado para el ensayo cell-free con el extracto celular de la cepa BL21 (DE3) Δ M15. Este plásmido contiene el fragmento completo para la enzima β -galactosidasa, así como el promotor T7 compatible con la cepa BL21 (DE3) para la sobreexpresión de proteínas recombinantes.

Para la construcción del plásmido se realizó la clonación Golden Gate del inserto codificante para la enzima β -galactosidasa (BBF10K_003366, proveniente de la colección Open Enzymes donada por la Dra. Jenny Molloy) con el vector (146_pFGC-T7-RJBB) que contiene el sistema de expresión con el promotor T7, como se resume en la siguiente figura:

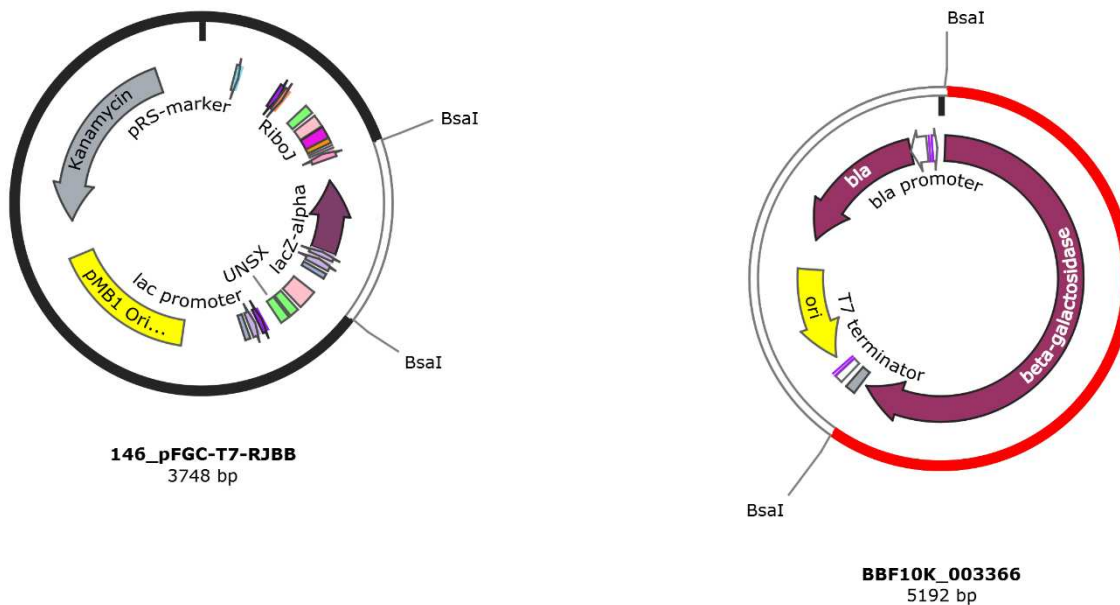


Figura 17. Inserto y vector utilizados para la construcción del plásmido *pSM_T7_LacZFull*

Para evaluar la funcionalidad de la cepa BL21 (DE3) Δ M15 se prepararon los reactivos necesarios para las reacciones libres de células (cell-free) conforme al protocolo de bajo costo publicado por el Dr. Fernando Guzmán Chávez (Constructing Cell-Free Expression Systems for Low-Cost Access) (Guzman-Chavez et al., 2022), como se describe brevemente a continuación.

A partir de la cepa BL21 (DE3) Δ M15, cuya mutación fue verificada por secuenciación y almacenada en glicerol, se inocularon 4 mL de medio LB sin antibióticos con 40 μ L del cultivo en glicerol en un tubo de 14 mL de fondo redondo. Posteriormente este tubo se incubó por 16 h a 37°C con agitación constante a 200 rpm.

Al día siguiente, se inoculó un matraz de 50 mL con 50 mL de medio LB sin antibiótico con 50 μ L del pre-inóculo. Este matraz se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm. Después de 16 h, a partir de este cultivo se inocularon 400 mL de medio 2xYT en matraces de 2.5 L, obteniendo una densidad óptica inicial de 0.05.

Una vez alcanzada una OD de 0.6, el cultivo se indujo con 1 mM de IPTG hasta obtener una OD de 2.0. En todo momento las células fueron incubadas a 37°C con agitación constante. Posteriormente se obtuvo el botón celular por centrifugación y se procedió a su lavado con amortiguador S30A (50 mM Tris, 14 mM glutamato de magnesio, 60 mM glutamato de potasio, pH 7.7) dos veces.

Subsecuentemente el botón celular se resuspendió en amortiguador S30B (50 mM Tris, 14 mM glutamato de magnesio, 60 mM glutamato de potasio, a pH=8.2), siguiendo la relación de 1 mL de amortiguador S30B por cada 900 mg de células. Finalmente, la suspensión celular se distribuyó en tubos de 1.5 mL y se sonicaron por 3 min, en pulsos de 10 s de descanso y 10 s de sonicación. Las condiciones de sonicación fueron amplitud al 50 % con una frecuencia de 20 kHz.

Al finalizar la lisis celular, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 20 min y el sobrenadante (correspondiente al extracto celular) se almacenó a -70°C hasta su uso.

Posteriormente se montaron las siguientes reacciones de un volumen total de 12 µL en tubos de 1.5 mL para la evaluación de la cepa. Se evaluó un control negativo de la cepa BL21 (DE3) ΔM15 al cual no se le agregó plásmido y en su lugar se empleó agua libre de nucleasas. A su vez se usó un control positivo con el extracto celular de la cepa BL21 (DE3) parental, al cual no fue necesario agregar plásmido y ese volumen se sustituyó por agua libre de nucleasas. Estas reacciones se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Componentes de reacción libre de células para evaluación del funcionamiento de la cepa BL21 (DE3) ΔM15

Componente	BL21 (DE3) ΔM15	Control cepa BL21 (DE3) ΔM15	Control cepa BL21 (DE3) WT
	Volumen (µL)	Volumen (µL)	Volumen (µL)
Agua libre de nucleasas	1.4	4.4	4.4
PEG 8000 (40%)	0.6	0.6	0.6
Plásmido 20 nM	3	-	-
Mezcla Wizard*	3	3	3
Extracto celular BL21 (DE3) ΔM15	4	4	-
Extracto celular BL21 (DE3) WT	-	-	4

*La mezcla Wizard contiene glutamato de potasio 175 mM, glutamato de amonio 10 mM, oxalato de potasio 2.7 mM, putrescina 1 mM, espermidina 1.5 mM, NAD 0.33 mM, ATP 1.2 mM, CTP, GTP y UTP 0.86 mM, CoA 0.27 mM, MRE600 *E. coli* tRNA 0.172 mg/mL, ácido folínico 0.07 mM, fosfoenolpiruvato (PEP) 33 mM y cada uno de los 19 aminoácidos a una concentración 2 mM, a excepción de glutamato pues ya se había agregado en forma de glutamato de potasio y glutamato de magnesio 10 mM.

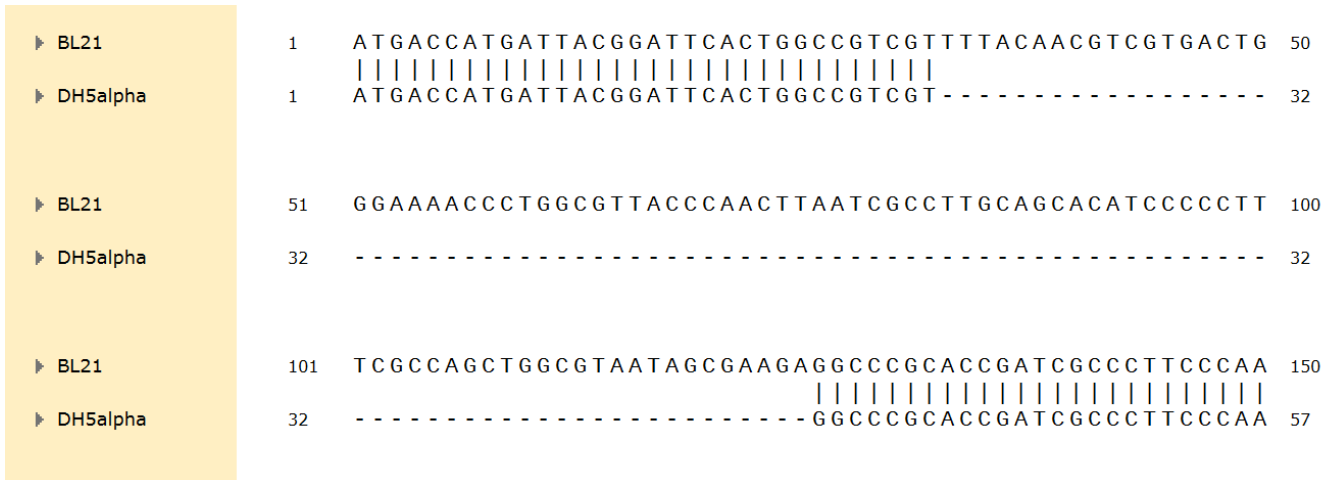


Figura 19. Análisis bioinformático de la alineación de secuencias de nucleótidos. Los nucleótidos del gen *lacZ* de la cepa DH5- α se ubican en la parte superior y los de la cepa BL21 (DE3) WT se encuentran en la parte inferior.

Al realizar un ensayo de PCR *in silico* utilizando la secuencia del gen *lacZ* del DNA genómico (verificada por secuenciación) de la cepa TOP10 (figura 20) y los oligonucleótidos diseñados se obtiene una región de 857 pb, flanqueada por dichos oligonucleótidos (Fw Delta M15 y Rv Delta M15). Esta región fue obtenida y almacenada en el vector pJET, para posteriormente mutar a la cepa BL21 (DE3).



Figura 20. Alineación de oligonucleótidos con el gen *lacZ* en la cepa TOP10. Se obtiene un fragmento de 857 pares de bases correspondiente a la región utilizada para mutar a la cepa BL21 (DE3).

Por otro lado, al añadir los mismos oligonucleótidos a la secuencia del gen *lacZ* en la cepa BL21 (DE3), se obtiene un fragmento de 950 pares de bases (figura 21), lo cual coincide con la diferencia de 93 nucleótidos correspondientes a la región Δ M15 que no se encuentra presente en esta cepa, ya que contiene el gen *lacZ* completo (Invitrogen, 2010).

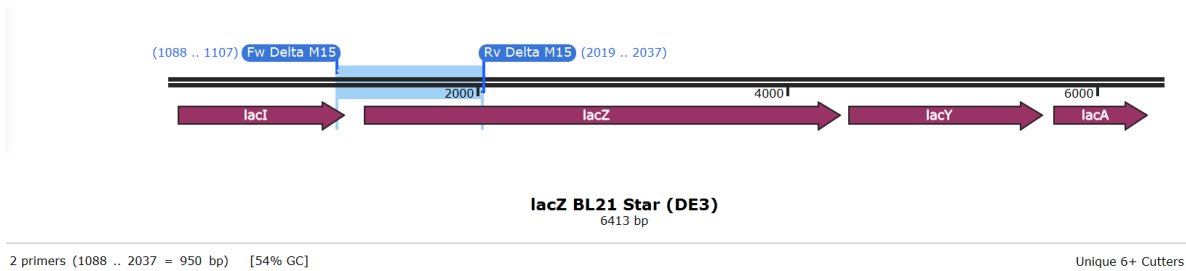


Figura 21. Región del gen *lacZ* en la cepa BL21 (DE3) flanqueada por los oligonucleótidos Fw Delta M15 y Rv Delta M15. Se obtiene una región de 950 pares de bases.

5.2 OBTENCIÓN DE *LACZ* Δ *M15* A PARTIR DE LA CEPA *E. COLI* TOP10

A partir de los productos de la amplificación por PCR del fragmento *lacZ* Δ *M15* obtenido del DNA genómico de *E. coli* TOP10, utilizando los oligonucleótidos Fw Delta M15 y Rv Delta M15 y su posterior análisis en geles de agarosa al 1 % se pueden observar bandas con el peso esperado de 857 pb al ser contrastadas con el marcador de peso molecular, por lo cual se determinó que la banda obtenida fue la correcta, además de que no se observaron productos inespecíficos.

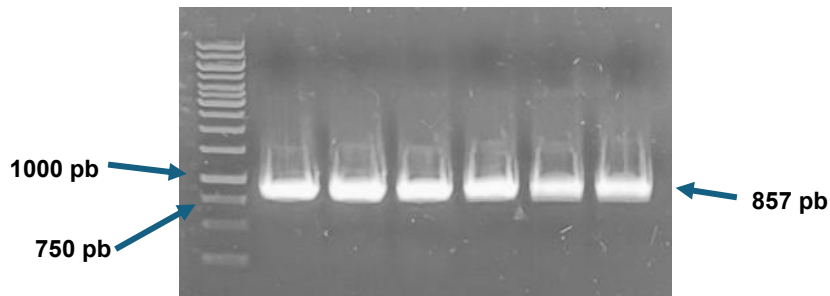


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa de amplificación por PCR del fragmento *lacZ* Δ *M15* obtenido del DNA genómico de las células competentes TOP10.

Una vez verificado el tamaño del producto de PCR, la banda correspondiente fue purificada e insertada en el vector pJET para su almacenamiento y nuevamente se comprobó la identidad de este fragmento mediante su amplificación por PCR usando como molde el vector pJET-LacZ α y su visualización en gel de agarosa (figura 23).

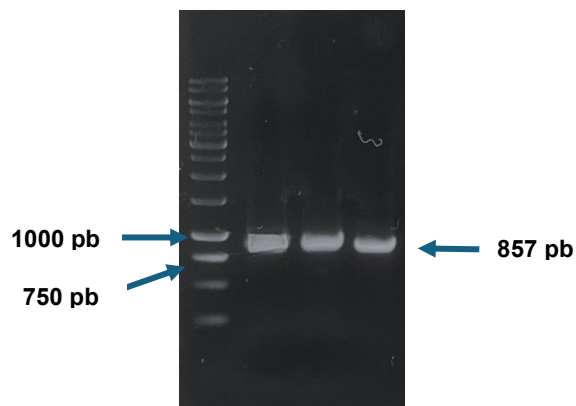


Figura 23. Electroforesis de fragmento *lacZ* Δ M15 amplificado por PCR a partir del vector de clonación pJET que permitió su almacenamiento. Se muestra el peso molecular del producto esperado.

Para confirmar la identidad del vector construido se realizó un análisis de digestión del vector de clonación pJET-LacZalpha utilizando las enzimas Xho1 y Xba1, con lo cual se descarta la existencia de algún falso positivo que se pudiera haber generado durante la identificación del fragmento por PCR.

Como se observa en la figura 24, el patrón de digestión es el esperado en los carriles 3, 4, 5 y 6, ya que se identificaron las bandas a 2949 pb y 975 pb, lo cual permitió confirmar satisfactoriamente la presencia del inserto dentro del vector. En los otros carriles se formaron productos inespecíficos.

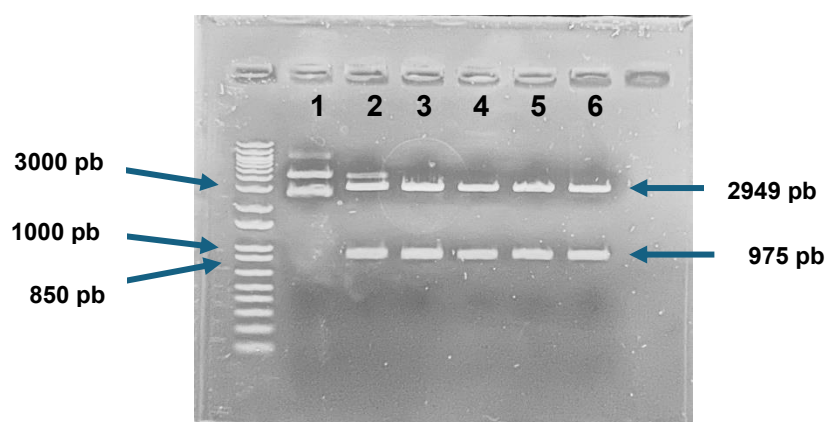


Figura 24. Electroforesis de amplificación por PCR de pJET-LacZ Δ M15 digerido con enzimas Xho1 y Xba1.

Debido a que el fragmento *lacZ*ΔM15 obtenido a partir de la cepa *E. coli* TOP10 fue el que se utilizó para la modificación genómica de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), el plásmido pJET-LacZa ΔM15 fue secuenciado en su totalidad por tecnología Oxford Nanopore por la compañía Plasmidsaurus.

Al realizar el alineación del gen *lacZ* reportado para *E. coli* DH5-alfa con el resultado de la secuenciación, se observa un alineación al 100 % (figura 25), en contraste con lo observado en el alineación para el gen *lacZ* correspondiente a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (figura 26), lo cual corresponde con el análisis *in silico* realizado previamente (sección 5.1) en donde se detectó una delección de 93 pares de bases correspondientes a la región denominada M15 (Prentki, 1992). Estos resultados confirmaron que el cassette de delección era el correcto y su secuencia idéntica a la deseada, lo cual fue de importancia ya que esta construcción se utilizó como molde de DNA para amplificar el fragmento M15 que se utilizó para la mutación del gen *lacZ* en la cepa BL21 (DE3).

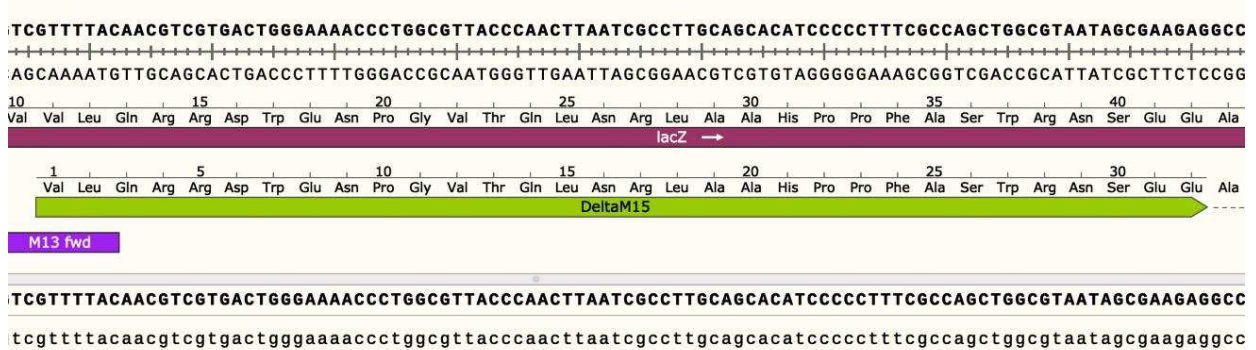


Figura 25. Alineación del gen *lacZ* reportado para *E. coli* DH5-alfa con el resultado de la secuenciación del pJET-LacZa. La alineación es del 100 %, lo cual confirma que el fragmento a utilizar es el deseado para la mutación.

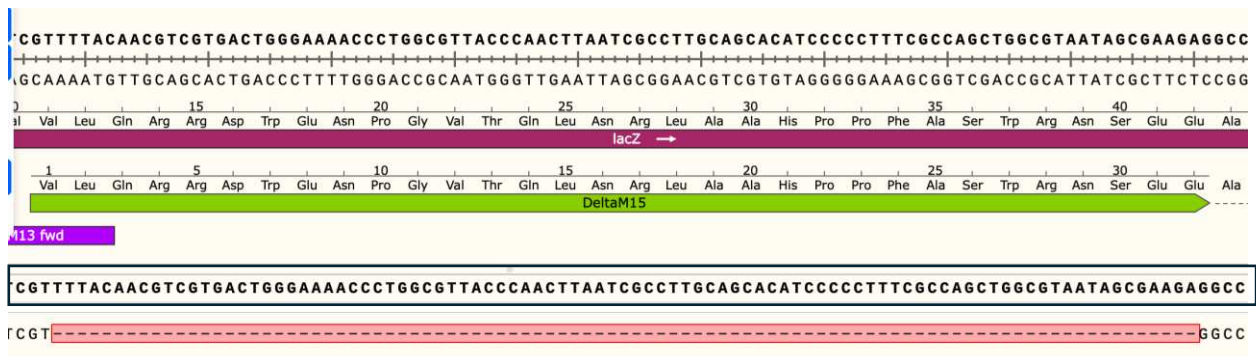


Figura 26. Alineación de DNA correspondiente a la cepa BL21 (DE3) nativa (señalado con una flecha), con la secuenciación de nucleótidos del fragmento *lacZ*ΔM15 obtenido a partir del pJET-LacZa en donde se almacenó (señalado con una estrella)

5.3 OBTENCIÓN DE LA MUTANTE BL21 (DE3) Δ M15

Para la obtención de la mutante BL21 (DE3) Δ M15, se empleó la estrategia de recombinación homóloga utilizando el plásmido pKD46, el cual codifica el sistema λ -Red para la recombinación homóloga, por lo cual se verificó su identidad mediante un análisis de restricción con las enzimas Bsal y Sall (figura 27), observándose bandas a 3746 pb y 2583 pb conforme a lo esperado por el peso del plásmido.

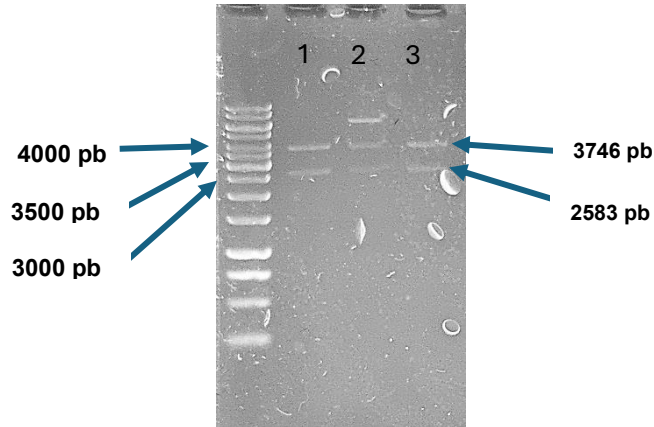


Figura 27. Restricción del plásmido pKD46 utilizando las enzimas de restricción Bsal y Sall. Los cortes específicos de las enzimas generan dos fragmentos, uno de 3746 pb y otro de 2583 pb respectivamente; los cuales se observan y por ende confirman el contenido del plásmido. En todos los carriles se cargó la misma muestra, sin embargo, únicamente en el carril “2” se observó una inespecificidad.

Previo a la mutación de la región genómica correspondiente a la región Δ M15 del gen *lacZ*, el plásmido pKD46 fue transformado por electroporación en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) como se indicó en la sección de *Procedimientos Experimentales*.

Luego de seleccionar las colonias que albergaban al plásmido pKD46, estas fueron crecidas en medio líquido LB y tratadas con una solución de glicerol al 10 % para posteriormente introducir el cassette de delección por electroporación nuevamente.

Una vez transformadas las células, las colonias con la probable mutación fueron elegidas con base al fenotipo deseado (colonias blancas) mostrado en placas de LB Agar + X-Gal + Ampicilina, ya que al tener mutada la región M15 del gen *lacZ*, expresarían una versión trunca de la enzima β -galactosidasa, la cual carecería de la capacidad para metabolizar al compuesto X-Gal y, por lo tanto, no se observarían colonias azules, resultado de la reacción descrita en la figura 7.

Como se observa en la figura 28, alrededor de 20 colonias presentaron el fenotipo deseado, colonias blancas indicativo de la no degradación del sustrato X-Gal, por lo cual, fueron crecidas en una nueva placa (figura 29) para confirmar su identidad. No obstante, a pesar de que dichas colonias presentaban el fenotipo deseado al inicio, en el segundo plaqueo (figura 29) solo dos de ellas conservaron el fenotipo de colonias blancas. Esto se debió probablemente a que las colonias que presentaban un aparente fenotipo de color blanco no habían sintetizado aún, o en cantidad suficiente, la enzima β -galactosidasa, por lo que no metabolizaron el sustrato X-Gal. Otra posible explicación es que estas colonias pudieron haber crecido sobre otras lo que evitó que tuvieran contacto directo con el sustrato. Ambas hipótesis han sido abordadas previamente en un estudio enfocado en la eliminación de falsos positivos en la selección de colonias blancas (Zhang et. al., 2016)

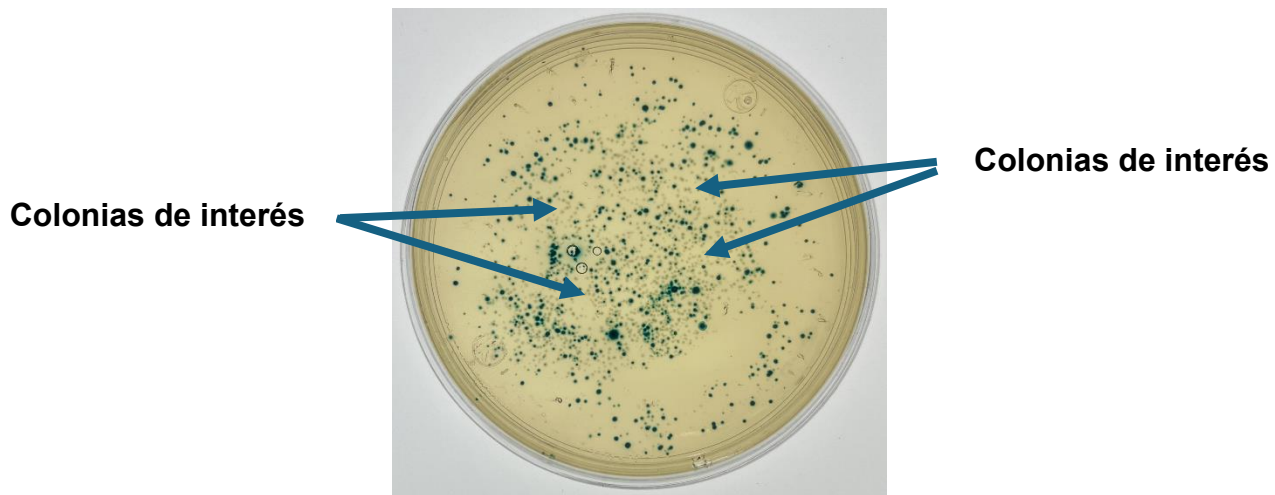


Figura 28. Cultivo en medio sólido conteniendo X-Gal y ampicilina para la selección de colonias blancas mutadas.

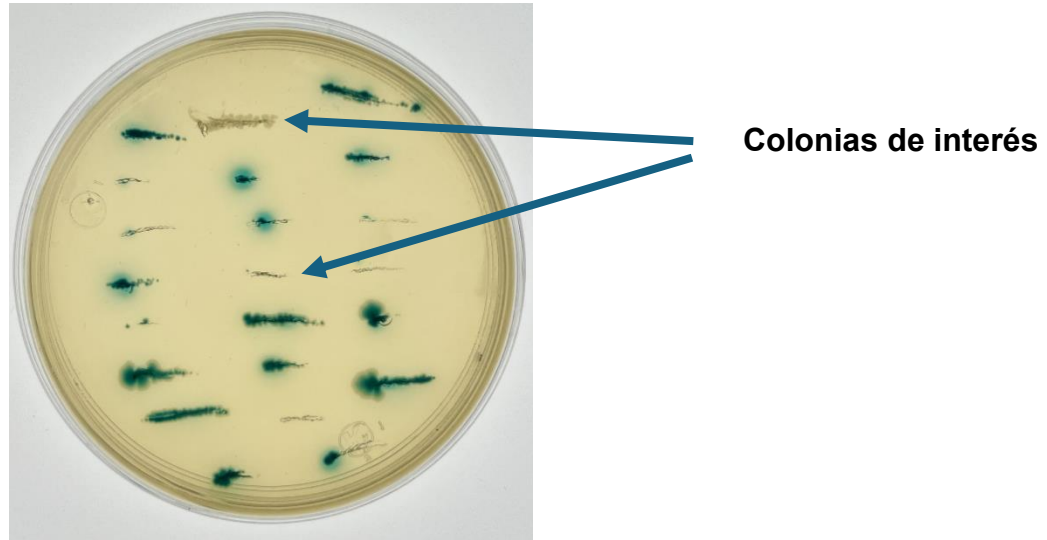


Figura 29. Cultivo en medio LB con X-Gal y ampicilina de colonias blancas. Las colonias obtenidas en el paso anterior se sembraron de nuevo para confirmar que no degradan el sustrato X-Gal y que, por lo tanto, no producen la enzima funcional β -galactosidasa. Las estrias blancas fueron tomadas para la continuación de los experimentos.

De las colonias blancas (mutadas) que fueron estriadas y cultivadas en medio líquido, se purificó el DNA genómico y se llevó a cabo la electroforesis del producto de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos Fw Delta M15 y Rv Delta M15, la cual permitió observar la banda correspondiente al fragmento *lacZ* Δ M15, confirmando la delección de este fragmento ahora en el genoma de *E. coli* BL21 (DE3) Δ M15.

Adicionalmente, las colonias seleccionadas fueron conservadas a -70°C con glicerol al 50% para su posterior utilización en los experimentos subsecuentes.

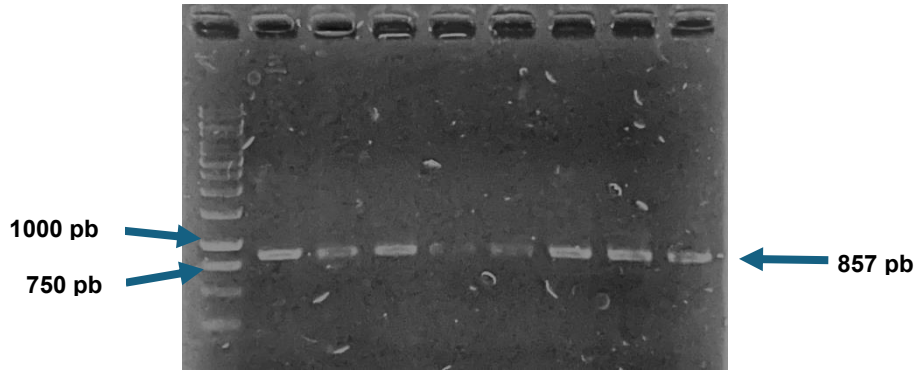


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento *lacZ* Δ M15 amplificado por PCR y obtenido a partir de diferentes colonias de las células BL21 (DE3) mutadas.

Una vez secuenciado (por tecnología Oxford Nanopore) el fragmento correspondiente a la mutación Δ M15 en *E. coli* BL21 (DE3), la secuencia fue alineada y comparada con la secuencia de la cepa BL21 (DE3) sin modificar. El resultado de esta comparación (figura 31) demostró que la delección de la región Δ M15 fue exitosa, confirmando la obtención de la nueva cepa BL21 (DE3) Δ M15.



Figura 31. Alineación de la secuencia DNA del fragmento *lacZ* Δ M15 amplificado por PCR y obtenido a partir del DNA genómico de las células BL21 (DE3) mutadas. La secuencia superior corresponde a la cepa BL21 (DE3) sin modificar, mientras que la inferior corresponde a la cepa BL21 (DE3) Δ M15. La alineación de las secuencias confirma que la secuencia Δ M15 de la cepa TOP10 se encuentra también en la cepa BL21 (DE3) que denominamos mutada.

Para la curación del plásmido termosensible pKD46 de la cepa BL21 (DE3) Δ M15, se recuperó la cepa a partir del cultivo almacenado en glicerol y se cultivaron colonias a 37°C, favoreciendo la pérdida del plásmido. Este paso es importante y relevante durante el proceso de generación de mutantes, ya que se busca obtener cultivos libres de la maquinaria λ -Red que pudieran interferir en el uso posterior de la cepa generada (Hossain et al., 2015).

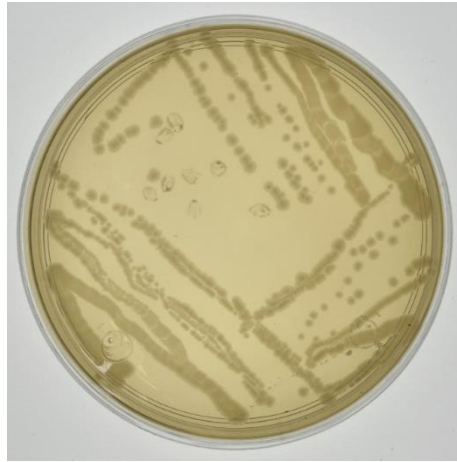


Figura 32. Obtención de colonias aisladas de la cepa BL21 (DE3) Δ M15 para posterior curación del plásmido pKD46

Posteriormente, las colonias aisladas fueron cultivadas en medio con y sin antibiótico, identificando cada colonia con un número del 1 al 15; con lo cual una vez incubadas por 24 h a 37°C se observaron los dos medios de cultivo para detectar aquellas colonias que crecieron en medio sin antibiótico y no lo hicieron en medio con antibiótico, confirmando la expulsión del plásmido con el marcador de selección para ampicilina en todas las colonias, ya que las células al no contener el plásmido con la resistencia a antibiótico no son capaces de crecer en este medio, confirmando la ausencia del plásmido.

Esto fue posible ya que el plásmido pKD46 es sensible a la temperatura y debe ser crecido a no más de 32°C (Hossain et al., 2015), por lo tanto, al realizar el cultivo a 37°C la curación del plásmido fue exitosa (Papa & Shoulders, 2019).

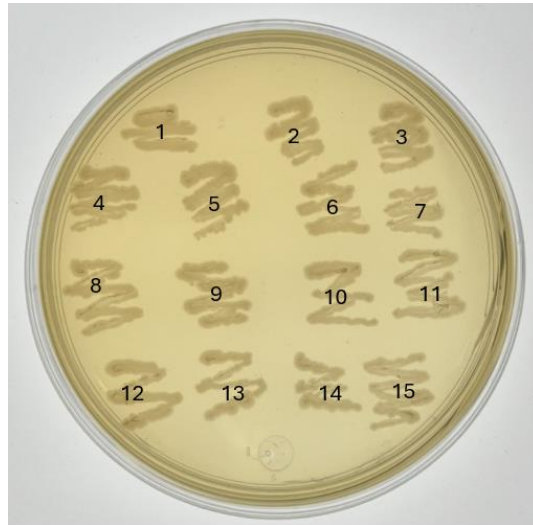


Figura 33. Caja "1" con medio LB sin antibiótico, conteniendo 15 colonias diferentes aisladas de la cepa BL21 (DE3) Δ M15, las cuales crecieron adecuadamente a 37°C.



Figura 34. Caja "1" con medio LB con ampicilina, conteniendo el inóculo de las mismas 15 colonias tomadas para la caja anterior.

Ninguna de las colonias creció, por lo que se confirma que las células ya no contienen el plásmido pKD46 con resistencia a ampicilina.

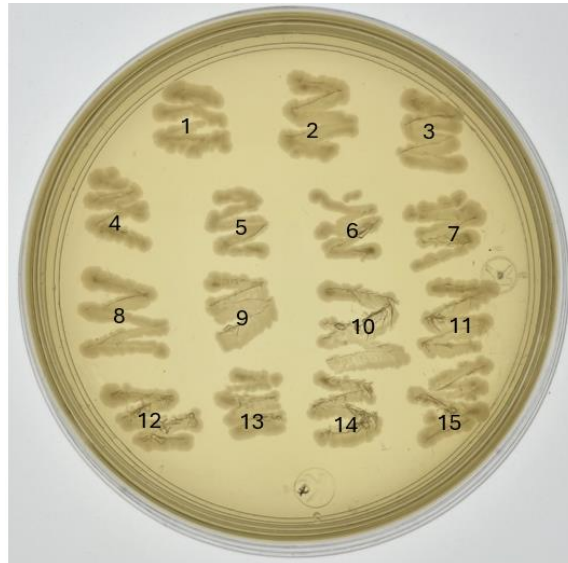


Figura 35. Caja "2" con medio LB sin antibiótico, conteniendo 15 colonias diferentes de la cepa BL21 (DE3) Δ M15.

Todas las células crecieron adecuadamente de manera aislada.



Figura 36. Caja "2" con medio LB con ampicilina, conteniendo las mismas 15 colonias inoculadas en la "caja 2" sin ampicilina.

Ninguna colonia creció, por lo cual las 15 colonias ya no contienen el plásmido pKD46 con resistencia ampicilina como marcador de selección.

5.4 EFECTO DE LA MUTACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE LA CEPA BL21 (DE3) Δ M15

Una vez generada una cepa mutante es importante descartar que la mutación afecte el crecimiento de la bacteria, ya que se ha observado que existen mutaciones que pueden interferir o afectar el crecimiento normal de los microorganismos (Baba et al., 2006).

Al obtener las curvas de crecimiento de la cepa nativa y la mutante se encontró que son similares, permitiendo descartar que la mutación en la cepa BL21 (DE3) Δ M15 afectara de alguna manera al crecimiento normal de la bacteria.

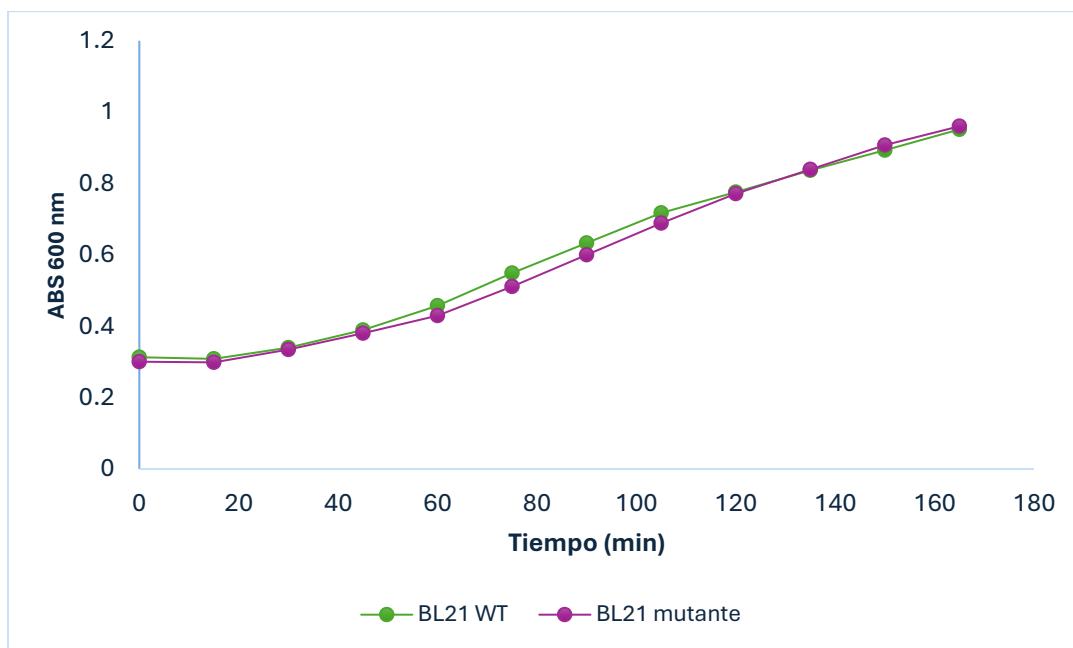


Figura 37. Curvas de crecimiento para la cepa BL21 (DE3) nativa y BL21 (DE3) Δ M15. Se registraron los valores de absorbancia a 600 nm cada 15 min por un periodo de 165 min. Ambas cepas crecieron de manera similar, descartando que la mutación realizada afectara de alguna manera el crecimiento celular.

5.5 EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LA CEPA BL21 (DE3) Δ M15 EN SISTEMAS LIBRES DE CÉLULAS (CELL-FREE)

Debido a que el objetivo principal de la creación de la cepa *E. coli* BL21(DE3) Δ M15 es que ésta sea eventualmente utilizada en la elaboración de extractos celulares, los cuales permitan desarrollar sistemas de diagnóstico basados en la tecnología libre de células con la capacidad arrojar una respuesta rápida, mediante un cambio

de coloración al adicionar un sustrato como X-Gal. Se evaluó la capacidad funcional de la cepa obtenida mediante ensayos libres de células, donde se adicionó, además de los componentes habituales de la reacción *in vitro*, el plásmido **pAA90_LacZ-alfa** con el fragmento LacZ-alfa que permitiría evaluar la complementación alfa con la cepa BL21 (DE3) Δ M15. No obstante, posterior a adicionar el sustrato cromogénico X-Gal no se llevó a cabo su degradación, ya que, en el extracto de la cepa BL21 (DE3) Δ M15 no se observó cambio de color a azul, mientras que en las reacciones con los extractos celulares provenientes de la cepa BL21 (DE3) WT (utilizada como control negativo) se presentó una coloración azul en el medio de reacción en presencia y ausencia del plásmido pAA90_LacZ, como era esperado, ya que esta cepa es capaz de sintetizar la enzima β -galactosidasa funcional sin requerir la adición del péptido alfa. La no complementación alfa en la cepa mutante pudo tener varias causas, una de ellas es que no se llevó a cabo la complementación alfa debido a una mutación puntual en la región modificada, como se discute más adelante.

Por lo tanto, se construyó por clonación tipo Golden Gate el plásmido pSM_T7_LacZFull (figura 16), el cual contiene una copia completa del gen *lacZ* para la síntesis de la enzima β -galactosidasa (Casali, 2003), además de contener el promotor T7 para su sobreexpresión. Esta nueva estrategia fue implementada, para realizar el ensayo de la síntesis de la enzima β -galactosidasa en el extracto libre de células.

Como se observa en la parte superior de la figura 38, la reacción con el plásmido conteniendo el gen *lacZ* completo utilizado en el ensayo libre de células (denominado plásmido complementario) desarrolló una coloración azul resultado de la actividad de la enzima β -galactosidasa con el sustrato X-Gal, en contraste con lo observado en ausencia del plásmido pSM_T7_LacZFull (Figura 38, parte media) donde no se observa cambio de color. La mutación de la secuencia se confirmó, por lo que el no cambio de coloración fue debido a la mutación Δ M15.

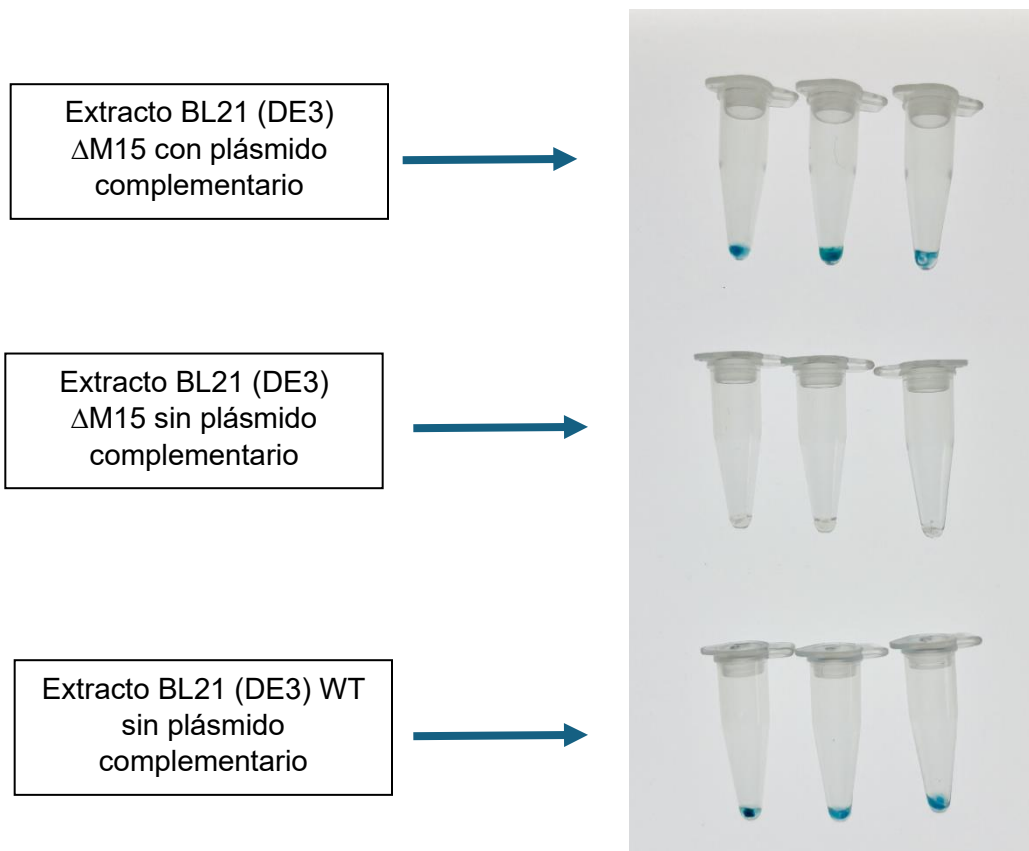


Figura 38. Evaluación de la actividad *in vitro* de la enzima β -galactosidasa en un ensayo libre de células a partir de extractos celulares provenientes de la cepa BL21 (DE3) Δ M15. Los tres tubos superiores corresponden a la reacción con el extracto celular de la cepa BL21 (DE3) Δ M15 a la cual se agregó el plásmido conteniendo la región completa para la codificación de la enzima. Los tubos de la parte central comprenden el control negativo de la cepa BL21 (DE3) Δ M15, mientras que los tres tubos inferiores corresponden a la cepa BL21 (DE3) WT

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que la cepa mutada es funcional y adecuada para desarrollar sistemas de diagnóstico basados en la actividad de la β -galactosidasa que permitan utilizar esta enzima como reportero en ensayos libres de células y que, a su vez, puedan acoplarse a sistemas de detección de patógenos, en presencia del sustrato X-Gal desarrollando una coloración azul de fácil detección a simple vista.

5.6 COMPLEMENTACIÓN ALFA *IN VIVO*

Al utilizar la cepa BL21 Δ M15 en un experimento de transformación con el plásmido pAA90_LacZ-alfa se encontró que la complementación alfa no se llevó a cabo conforme a lo esperado, ya que las colonias obtenidas presentaron el color blanco indicativo de la no degradación del sustrato X-Gal, por lo cual es posible afirmar que no se sintetizó la enzima β -galactosidasa funcional. Se descartó algún problema inherente durante la transformación de la cepa con el plásmido, ya que se observó crecimiento de colonias en el medio adicionado con el antibiótico tetraciclina, sin embargo, la complementación para la degradación del sustrato no se logró.

Por lo tanto, se analizó la secuencia de nucleótidos de la cepa BL21 (DE3) Δ M15 y se detectó una mutación puntual en la región ω del gen *lacZ*. El efecto de esta mutación puntual es el cambio de un aminoácido (cisteína por serina) en la posición 248 de la secuencia en el gen *lacZ*, que corresponde con la posición 811 de la secuenciación realizada, la cual se encuentra cercana al sitio activo que se compone de los residuos de aminoácidos 272 a 288. A continuación, se analiza y discute cómo esta mutación podría provocar cambios en la enzima que impidan su adecuada función para degradar el sustrato.



LacZM15	771 GATTTTCAGCCGCGCTGTA	CTGGAGGCTGAAGTTCAGATGT	G	811
Seq	771 GATTTTCAGCCGCGCTGTA	CTGGAGGCTGAAGTTCAGATGT	C	811

Figura 39. Mutación Cys248Ser. El cambio de nucleótido es de guanina por citosina, en la posición 811 de la secuenciación realizada para el DNA genómico de *E. coli*. BL21 (DE3) Δ M15. El resultado de esta mutación es la codificación de cisteína en vez de serina en la posición 248 de la estructura primaria de la enzima.

La edición *in vivo* del cromosoma bacteriano por recombinación homóloga utilizando productos de PCR y oligonucleótidos sintéticos como sustrato se ha reportado como una tecnología útil para insertar o deletar secuencias de DNA sin requerir sitios de restricción (Sharan et al., 2009). Sin embargo, en los resultados del presente trabajo, la edición del genoma de la plataforma biológica *E. coli* conllevó a una **mutación puntual indeseada**, por el cambio de una base nitrogenada en la secuencia del DNA genómico de la cepa generada.

En la literatura se ha reportado la adquisición de mutaciones puntuales al utilizar productos de PCR como DNA donador para la recombinación homóloga (Sharan et al., 2009) lo cual se presenta como una limitante inherente a la tecnología empleada.

Con el objetivo de analizar el efecto de la mutación sobre la síntesis de la enzima β -galactosidasa, se llevó a cabo la predicción de la estructura de la enzima sintetizada en la cepa BL21 (DE3) WT, y BL21 (DE3) Δ M15 con la mutación puntual Cys248Ser, para lo cual se utilizó el software AlphaFold 3, que permite el modelado de estructuras a partir de una secuencia FASTA, la cual a su vez se obtuvo de la base de datos del PDB (Protein Data Bank). Posteriormente, se visualizó y analizó la predicción de la estructura de la proteína en el software PyMOL, el cual permite detectar cambios estructurales pequeños al ser muy visual.

A pesar de que la estructura cristalográfica de la enzima β -galactosidasa está disponible en el PDB, se optó por predecir mediante AlphaFold 3 las estructuras correspondientes a la enzima sintetizada en la cepa WT y BL21 (DE3) Δ M15 con la mutación puntual Cys248Ser con el fin de evitar sesgos y asegurar una comparación equitativa entre las variantes producidas por cada cepa.

Una vez cargada la predicción generada para su visualización en PyMOL, se identificó el **sitio activo** de la enzima al seleccionar los residuos de aminoácidos 272 a 288 correspondientes, los cuales están reportados en la literatura (Juers et al., 2012). También se destacó visualmente la región Δ M15, así como el tetrámero que conforma la enzima para evaluar la existencia de algún cambio conformacional bajo la hipótesis de que esto ocasione la pérdida de función de complementación alfa.

De esta manera, se comparó la predicción de la estructura de la enzima β -galactosidasa en las cepas BL21 (DE3) WT y BL21 (DE3) Δ M15 Cys248Ser, obteniendo los resultados siguientes:

For Educational Use Only

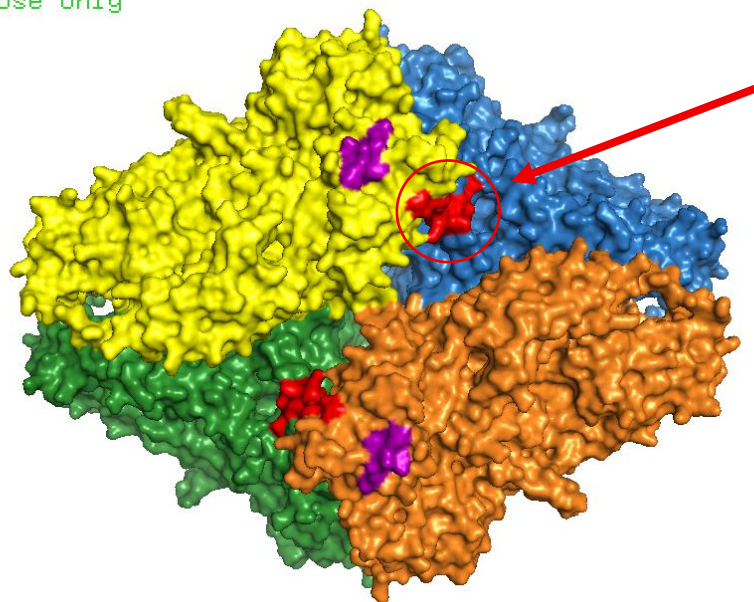


Figura 40. Predicción de la enzima β -galactosidasa sintetizada en *E. coli* BL21 (DE3) WT vista desde el frente. Los cuatro monómeros se representan cada uno

de un color diferente (amarillo, azul, verde y naranja), de color morado se destacan los aminoácidos correspondientes a la región M15 y de color rojo se identifica el sitio activo de la enzima.

For Educational Use Only

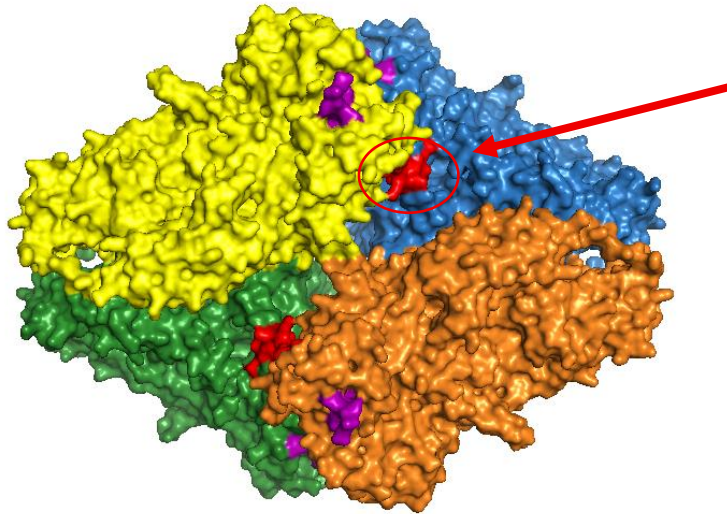
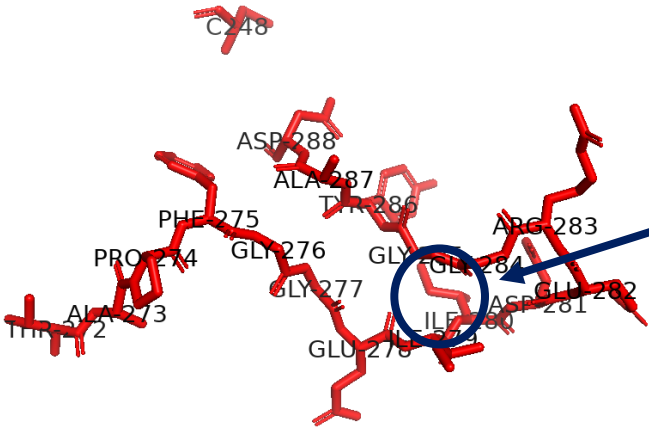
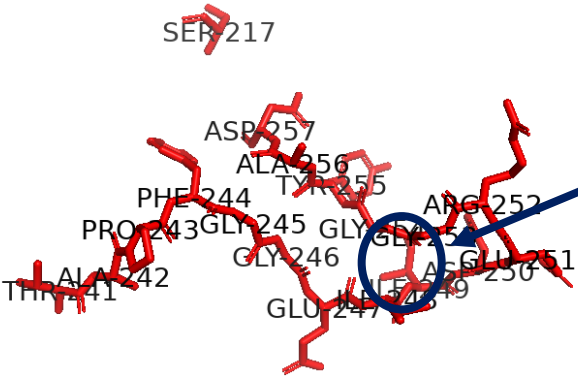


Figura 41. Predicción de la enzima β -galactosidasa sintetizada en la cepa BL21 (DE3) Δ M15 con la mutación Cys248Ser vista desde el frente. El sitio activo se encuentra ligeramente desplazado hacia el monómero representado en color azul, a diferencia de la cepa WT.

Al comparar la cepa mutante BL21 (DE3) Δ M15 Cys248Ser con la estructura de la cepa BL21 (DE3) WT se observa un cambio conformacional en el sitio activo de la enzima, como se describe en la tabla 8. Es importante destacar que la mutación puntual en la posición 248 se encuentra en una región cercana a los residuos de aminoácidos que forman el sitio activo (272-288).

Tabla 8. Comparación de la predicción de estructura del sitio activo de la enzima β -galactosidasa en la cepa WT y Δ M15 con la mutación puntual Cys248Ser

Cepa	Estructura del sitio activo de la enzima
BL21 (DE3) WT	<p>For Educational Use Only</p> 
BL21 (DE3) Δ M15 Cys248Ser	<p>For Educational Use Only</p> 

La mutación puntual Cys248Ser en la enzima β -galactosidasa podría interferir con su actividad catalítica y conformación tridimensional. A pesar de que ambos aminoácidos son polares sin carga, las reactividades son distintas, ya que la cisteína aporta un grupo tiol (-SH) capaz de formar puentes disulfuro, mientras que la serina con un grupo hidroxilo (-OH) no cumple con esta función. La sustitución elimina la capacidad de formar estos enlaces disulfuro o de participar en interacciones redox que estabilizan la estructura de la enzima, lo que ha sido descrito como causa de alteraciones significativas en la estabilidad y actividad de β -galactosidasas de otras especies (Pavlin et al., 2019) pudiendo desestabilizar regiones clave para la unión del sustrato o alterar el sitio activo (Qiu et al., 2015). Por otro lado, la serina podría estar formando puentes de hidrógeno no deseados, modificando la dinámica

conformacional o actividad catalítica (Kumagai et al., 2019) lo cual podría impedir la complementación alfa y por ende la reacción de degradación del sustrato X-Gal al utilizar la cepa mutante (Nguyen et al., 2016).

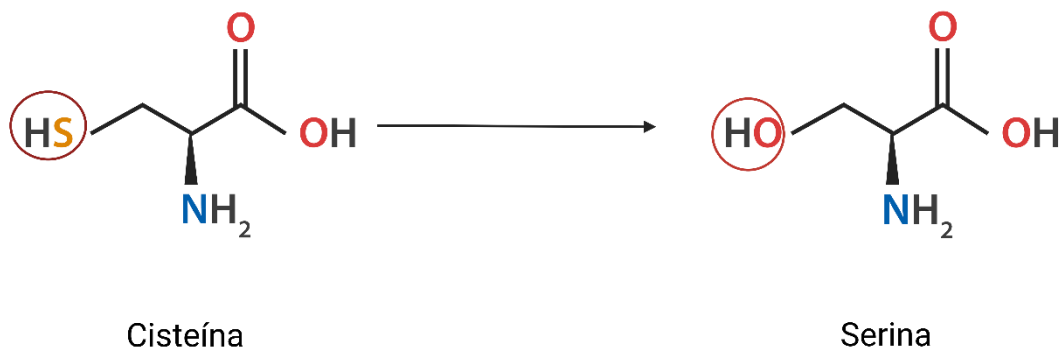


Figura 42. Estructura de los aminoácidos cisteína y serina. Ambos son aminoácidos polares sin carga, sin embargo, la reactividad es distinta por la presencia de los grupos -SH y -OH.

6. CONCLUSIONES

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) fue mutada con el fragmento *lacZ*ΔM15 obteniendo una variante de esta, tanto para su uso en ensayos libres de células, como para su aprovechamiento en la expresión de proteínas recombinantes, tomando como ventaja principal la inactivación de la enzima β-galactosidasa. Dicha inactivación permitirá utilizar esta enzima como reportero en el desarrollo de nuevas herramientas moleculares, tales como biosensores libres de células acoplados a sistemas de detección de patógenos, que en presencia del sustrato X-Gal (o análogos), producirán un cambio de coloración.

El extracto celular de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) ΔM15 es funcional y adecuado para desarrollar sistemas de diagnóstico basados en la actividad de la enzima β-galactosidasa cuando se complementa con una copia completa del gen *lacZ*.

La maquinaria λ-Red permitió la recombinación homóloga de la región *lacZ*ΔM15 en el DNA genómico de *E. coli* BL21 (DE3). Sin embargo, ocasionó una mutación puntual adicional indeseada, en la posición 248 del gen *lacZ*.

La mutación *lacZ*ΔM15 en la cepa no ocasionó cambios en su curva de crecimiento, al compararla con la cepa nativa.

La mutación puntual Cys248Ser en la cepa BL21 (DE3) ΔM15 podría estar causando cambios conformacionales en la enzima β-galactosidasa, volviéndola no funcional e impidiendo la complementación alfa.

La cepa BL21 (DE3) ΔM15 está facultada para su uso en ensayos libres de células como biosensor basado en el sistema Riboswitch, ya que previo a la mutación, esto era imposible dado que la cepa al contener el gen *lacZ* completo siempre sería capaz de producir la enzima funcional y degradar el sustrato.

6.1 PERSPECTIVAS

Modificar el gen *lacZ* de la cepa BL21 (DE3) con la secuencia completa proveniente de la cepa TOP10 y no sólo la región ΔM15, a fin de buscar la complementación alfa de la enzima y el subsecuente uso de la cepa en el diagnóstico molecular a bajo costo y en ensayos de prototipado de alto rendimiento.

7. REFERENCIAS

- Achatz, S., & Skerra, A. (2024). Comparative genome analysis of three classical *E. coli* cloning strains designed for blue/white selection: JM83, JM109 and XL1-Blue. *FEBS Open Bio*, 14(6), 888–905. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13812>
- Arroyo-Olarte, R. D., Bravo Rodríguez, R., & Morales-Ríos, E. (2021). Genome editing in bacteria: Crispr-cas and beyond. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040844>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Brookwell, A., Oza, J. P., & Caschera, F. (2021). Biotechnology Applications of Cell-Free Expression Systems. In *Life* (Vol. 11, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life11121367>
- Caldwell, B. J., & Bell, C. E. (2019). Structure and mechanism of the Red recombination system of bacteriophage λ . In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Vol. 147, pp. 33–46). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.03.005>
- Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E., & Jewett, M. C. (2012). Cell-free protein synthesis: Applications come of age. In *Biotechnology Advances* (Vol. 30, Issue 5, pp. 1185–1194). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.016>
- Carmignotto, G. P., & Azzoni, A. R. (2019). On the expression of recombinant Cas9 protein in *E. coli* BL21(DE3) and BL21(DE3) Rosetta strains. *Journal of Biotechnology*, 306, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.012>
- Casali, N. (2003). *Escherichia coli* Host Strains. In *E. coli Plasmid Vectors* (Vol. 235, pp. 27–48). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:27>
- Chen, Y. Y., Galloway, K. E., & Smolke, C. D. (2012). Conceptual frameworks for biological design Synthetic biology: advancing biological frontiers by building synthetic systems. In *Genome Biology* (Vol. 13). <http://genomebiology.com/2012/13/2/240>
- Costantino, N., Court, D. L., & Campbell, A. (2003). Enhanced levels of Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2434959100
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products (Issue 12). www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.120163297

- Du, F., Liu, Y. Q., Xu, Y. S., Li, Z. J., Wang, Y. Z., Zhang, Z. X., & Sun, X. M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Screening bacterial colonies using X-Gal and IPTG: α -complementation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(12), 790–794. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101329>
- Guo, Y., Hui, C. Y., Liu, L., Zheng, H. Q., & Wu, H. M. (2019). Improved monitoring of low-level transcription in *Escherichia coli* by a β -galactosidase α -complementation system. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01454>
- Guzman-Chavez, F., Arce, A., Adhikari, A., Vadhin, S., Pedroza-Garcia, J. A., Gandini, C., Ajioka, J. W., Molloy, J., Sanchez-Nieto, S., Varner, J. D., Federici, F., & Haseloff, J. (2022). Constructing Cell-Free Expression Systems for Low-Cost Access. *ACS Synthetic Biology*, 11(3), 1114–1128. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00342>
- Hamed, A. A., Khedr, M., & Abdelraof, M. (2020). Activation of LacZ gene in *Escherichia coli* DH5 α via α -complementation mechanism for β -galactosidase production and its biochemical characterizations. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00096-w>
- Han, Y. H., Kim, G., & Seo, S. W. (2023). Programmable synthetic biology tools for developing microbial cell factories. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 79). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102874>
- Herzyk, P. (2014). Next-Generation Sequencing. In *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* (pp. 125–145). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386882-4.00008-6>
- Hossain, M. J., Thurlow, C. M., Sun, D., Nasrin, S., & Liles, M. R. (2015). Genome modifications and cloning using a conjugally transferable recombineering system. *Biotechnology Reports*, 8, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.005>
- Invitrogen. (2010). *BL21 StarTM(DE3) One Shot[®] BL21 StarTM(DE3)pLysS One Shot[®] Chemically Competent Cells*. www.invitrogen.com
- Invitrogen. (2022). *Molecular cloning workflow solutions*. thermofisher.com/compcells
- Ji, X., Liu, W. Q., & Li, J. (2022). Recent advances in applying cell-free systems for high-value and complex natural product biosynthesis. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 67). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102142>

- Joshi, S. H. N., Yong, C., & Gyorgy, A. (2022). Inducible plasmid copy number control for synthetic biology in commonly used *E. coli* strains. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34390-7>
- Juers, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. In *Protein Science* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1792–1807). <https://doi.org/10.1002/pro.2165>
- Kaback, H. R., Smirnova, I., Kasho, V., Nie, Y., & Zhou, Y. (2011). The alternating access transport mechanism in LacY. *Journal of Membrane Biology*, 239(1–2), 85–93. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9327-5>
- Koo, J., Yang, J., & Park, H. (2020). Cell-free Systems: Recent Advances and Future Outlook. In *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (Vol. 25, Issue 6, pp. 955–961). Korean Society for Biotechnology and Bioengineering. <https://doi.org/10.1007/s12257-020-0013-x>
- Kumagai, Y., Kikuchi, T., Nonaka, A., Hiraide, M., Sato, S., Sakuraoka, M., Sasaki, A., & Kobayashi, M. (2019). Site-directed mutagenesis of cysteine to serine residues affects heparin binding and mitogenicity in fibroblast growth factor 4 produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33(1), 498–503. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1590161>
- Lu, Y. (2017). Cell-free synthetic biology: Engineering in an open world. In *Synthetic and Systems Biotechnology* (Vol. 2, Issue 1, pp. 23–27). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.02.003>
- Maharjan, A., & Park, J. H. (2023). Cell-free protein synthesis system: A new frontier for sustainable biotechnology-based products. In *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 70, Issue 6, pp. 2136–2149). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bab.2514>
- Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). Lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.009>
- Mayer, F., Cserjan-Puschmann, M., Haslinger, B., Shpylovyi, A., Dalik, T., Sam, C., Hahn, R., & Striedner, G. (2022). Strain specific properties of *Escherichia coli* can prevent non-canonical amino acid misincorporation caused by scale-related process heterogeneities. *Microbial Cell Factories*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01895-1>
- Mo, H., Liu, K., An, X., Chen, Y., Yu, J., Yu, H., Yao, M., Song, W., Li, Y., & Wang, L. (2025). Molecular cloning, expression analysis, and functional characterization of Intelectin-1 from Chinese giant salamanders (*Andrias*

- Davidianus). *Genes and Genomics*. <https://doi.org/10.1007/s13258-025-01630-1>
- Moore, S. J., MacDonald, J. T., & Freemont, P. S. (2017). Cell-free synthetic biology for in vitro prototype engineering. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 45, Issue 3, pp. 785–791). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20170011>
- Nguyen, T. T., Vu, H. Van, Nguyen, N. T. H., Do, T. T., & Nguyen, T. S. Le. (2016). Effect of mutations to amino acid A301 and F361 in thermostability and catalytic activity of the β -galactosidase from *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01. *BMC Biochemistry*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12858-016-0070-0>
- Papa, L. J., & Shoulders, M. D. (2019). Genetic Engineering by DNA Recombineering. *Current Protocols in Chemical Biology*, 11(3), e70. <https://doi.org/10.1002/cpch.70>
- Pavlin, M., Qasem, Z., Sameach, H., Gevorgyan-Airapetov, L., Ritacco, I., Ruthstein, S., & Magistrato, A. (2019). Unraveling the impact of cysteine-to-serine mutations on the structural and functional properties of Cu(I)-binding proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143462>
- Prentki, P. (1992). *Nucleotide sequence of the classical lacZ deletion $\Delta M15$* .
- Qiu, H., Honey, D. M., Kingsbury, J. S., Park, A., Boudanova, E., Wei, R. R., Pan, C. Q., & Edmunds, T. (2015). Impact of cysteine variants on the structure, activity, and stability of recombinant human α -galactosidase A. *Protein Science*, 24(9), 1401–1411. <https://doi.org/10.1002/pro.2719>
- Sharan, S. K., Thomason, L. C., Kuznetsov, S. G., & Court, D. L. (2009). Recombineering: A homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nature Protocols*, 4(2), 206–223. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.227>
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001a). *Cell-free translation reconstituted with purified components*. <http://biotech.nature.com>
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001b). *Cell-free translation reconstituted with purified components*. <http://biotech.nature.com>
- Stech, M., & Kubick, S. (2015). Cell-free synthesis meets antibody production: A review. In *Antibodies* (Vol. 4, Issue 1, pp. 12–33). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antib4010012>

- Studier, F. W., & Moffattf, B. A. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. In *J. MoZ. Biol* (Vol. 189).
- Swartz, J. R. (2018). Expanding biological applications using cell-free metabolic engineering: An overview. In *Metabolic Engineering* (Vol. 50, pp. 156–172). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.09.011>
- Thomason, L., Court, D. L., Bubunenko, M., Costantino, N., Wilson, H., Datta, S., & Oppenheim, A. (2005). Recombineering: Genetic Engineering in Bacteria Using Homologous Recombination. *Current Protocols in Molecular Biology*, 70(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0116s70>
- Tinafar, A., Jaenes, K., & Pardee, K. (2019). Synthetic Biology Goes Cell-Free. In *BMC Biology* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0685-x>
- Uchil, P. D., Nagarajan, A., & Kumar, P. (2017). β -galactosidase. In *Cold Spring Harbor Protocols* (Vol. 2017, Issue 10, pp. 774–779). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/pdb.top096198>
- van der Oost, J., & Patinios, C. (2023). The genome editing revolution. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 41, Issue 3, pp. 396–409). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.12.022>
- Velazco, S., Kambo, D., Yu, K., Saha, A., Beckman, E., Mysore, N., & Cauwenberghs, G. (2021). Modeling Gene Expression: Lac operon. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*, 1086–1091. <https://doi.org/10.1109/EMBC46164.2021.9630940>
- Yan, Y., Nguyen, L. H., Franzosa, E. A., & Huttenhower, C. (2020). Strain-level epidemiology of microbial communities and the human microbiome. In *Genome Medicine* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00765-y>
- Yu, M., Hu, S., Tang, B., Yang, H., & Sun, D. (2023). Engineering Escherichia coli Nissle 1917 as a microbial chassis for therapeutic and industrial applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 67). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108202>
- Zhang, L., Guo, W., & Lu, Y. (2020). Advances in Cell-Free Biosensors: Principle, Mechanism, and Applications. In *Biotechnology Journal* (Vol. 15, Issue 9). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.202000187>