



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA INGENIERÍA BIOQUÍMICA



“Desarrollo de herramientas de biología sintética para la bacteria no modelo
Burkholderia sacchari: Una nueva plataforma para una producción más limpia”

Trabajo de Titulación. Modalidad: Proyecto de Investigación presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autora: María José Barreno Sánchez

Tutor: MSc. Yunys Pérez Betancourt

Ambato - Ecuador

Noviembre - 2018


APROBACIÓN DEL TUTOR

MSc. Yunys Pérez Betancourt

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 24 de Octubre del 2018



MSc. Yunys Pérez Betancourt

C.I. 175647174-0

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, María José Barreno Sánchez manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



María José Barreno Sánchez

C.I. 180455675-9

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dr. Alcides Alberto Bustillos Ortiz, Ph.D.

C.I. 180400106-1



Dr. David Andrés Terán Mera, Ph.D.

C.I. 171656972-6

Ambato, 08 de Noviembre del 2018

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de Investigación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este proyecto dentro de las regularizaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'María José Barreno Sánchez', is written over a horizontal line.

María José Barreno Sánchez

C.I. 180455675-9

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres, dos seres maravillosas que con su ejemplo de trabajo duro y perseverancia, me impulsan en cada etapa de mi vida.

Son mi motivación constante.

AGRADECIMIENTOS

A mi Patria, por apostarle a la educación y permitir que todos tengamos acceso ella.

A mis padres, mis dos viejitos, que desde el inicio confiaron en mí y apoyaron mis decisiones. No fue fácil, pero el trabajo y dedicación que pusieron en mí todos los días ahora es palpable.

A mis hermanos, son mi espejo.

A Carlos y Linda. Dicen que encontramos en un profesor el ejemplo de como uno se ve a sí mismo en el futuro; para mí son ellos. Llegaron llenos de conocimiento y nuevas experiencias listos para compartir, dispuestos a trabajar e investigar con unas ganas que contagiaban. Son una dupla poderosa y tienen una vibra mágica. Esto fue posible gracias a ellos.

A mi amiga de la vida, Pao, tu estas siempre y yo estaré siempre.

A mis amigos, Cheve, Eli, Leo, Gato, Dar, Juanjo, Joss, Jannys, Adrián, Eno, Mau, Chenny, Mercy, que hicieron mi vida universitaria mucho más placentera, con todas sus ocurrencias y graciosadas. Cuando nos juntábamos todo era posible. Aprendí mucho de ustedes.

A mis profesores, todos y cada uno llegaron a aportar algo de sí en mi formación.

Finalmente, quisiera compartir unas letras, que en lo personal, considero pueden llegar a motivar a quien sepa leer con atención.

“El futuro pertenece a aquellos que creen en la belleza de sus sueños”

Eleanor Roosevelt.

¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PORTADA	I
APROBACIÓN DEL TUTOR	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	III
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO	IV
DERECHOS DE AUTOR	IV
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: EL PROBLEMA	3
1.1. Tema de investigación	3
1.2. Justificación	3
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes investigativos	6
2.2. Hipótesis	12
2.2.1. Hipótesis nula	12
2.2.2. Hipótesis alternativa	12
2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis	12
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Materiales	13
3.2. Métodos	13
3.2.1. Prueba de catalasa	13
3.2.2. Prueba de oxidasa	13
3.2.3. Preparación de células competentes	14

3.2.3.1.	Método CaCl ₂ en células de <i>Escherichia coli</i>	14
3.2.3.2.	Método RbCl en células de <i>Escherichia coli</i>	14
3.2.3.3.	Método RbCl en células de <i>Burkholderia sacchari</i>	15
3.2.4.	Transformación de células competentes	16
3.2.4.1.	Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	16
3.2.4.2.	Transformación de células de <i>Burkholderia sacchari</i>	16
3.2.5.	Prueba de eficiencia de células competentes	16
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		19
4.1.	Análisis y discusión de los resultados	19
4.2.	Verificación de la hipótesis	26
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		27
5.1.	Conclusiones	27
5.2.	Recomendaciones	27
BIBLIOGRAFÍA		28
ANEXOS		32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la solución TFB1	14
Tabla 2. Componentes de la solución TFB2	15
Tabla 3. Concentración de plásmidos extraídos de <i>E. coli</i>	19
Tabla 4. Transformación de células de <i>B. sacchari</i>	20
Tabla 5. Conteo de UFC de <i>B. sacchari</i> transformadas	20
Tabla 6. Eficiencia de transformación en <i>B. sacchari</i>	21
Tabla 7. Datos obtenidos de inducción de promotores	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño del plásmido y nomenclatura de plásmidos BglBrick (pBb).....	11
Figura 2. Inducción de pB1k-GFP en <i>B. sacchari</i>	23
Figura 3. Inducción de pB5k-RFP en <i>B. sacchari</i>	24
Figura 4. Inducción de pB6a-GFP en <i>B. sacchari</i>	24
Figura 5. Inducción de pB8k-RFP en <i>B. sacchari</i>	25

RESUMEN

La diversidad metabólica en microorganismos puede proporcionar la base para crear nuevos productos bioquímicos. Sin embargo, la mayoría de los proyectos de ingeniería metabólica utilizan un puñado de organismos modelo establecidos y, por lo tanto, un desafío para aprovechar el potencial de las funciones microbianas novedosas es la capacidad de expresar nuevos genes o utilizar directamente organismos no modelo. La manipulación genética de microorganismos que no son modelos aún es un desafío debido a los matices específicos del organismo que dificultan las herramientas genéticas moleculares universales. Sin embargo, en los últimos años, se han logrado avances sin precedentes en biología sintética y el desarrollo de herramientas de genética molecular. Es por ello que el objetivo de este estudio es desarrollar herramientas útiles de biología sintética para potenciar el uso de la bacteria no modelo *Burkholderia sacchari*, como alternativa de producción biológica, ya que se ha comprobado que puede sintetizar varios productos de alto valor usando diversas fuentes de carbono. En este trabajo se utilizaron los plásmidos BglBrix, un estándar que incluye todas las partes biológicas básicas necesarias para que un vector sea eficiente, estable y cumpla su función dentro de la célula. La transformación de células de *Burkholderia sacchari* con los plásmidos BglBrix se realizaron por método químico utilizando RbCl, obteniendo una alta eficiencia de transformación. Ensayos de dosis-inducción fueron realizados para evaluar la expresión de las proteínas fluorescentes a una máxima concentración de inductor.

Palabras clave: *Burkholderia sacchari*, organismo no modelo, biología sintética, transformación química, vectores BglBrix.

ABSTRACT

The metabolic diversity in microorganisms can provide the basis to create new biochemical products. However, most metabolic engineering projects use a handful of established model organisms and, therefore, a challenge to take advantage of the potential of novel microbial functions is the ability to express new genes or directly use non-model organisms. Genetic manipulation of non-model microorganisms is still a challenge due to the specific nuances of the organism that make universal molecular genetic tools difficult. However, in recent years, unprecedented advances have been made in synthetic biology and the development of molecular genetic tools. That is why the objective of this study is to develop useful tools of synthetic biology to enhance the use of the non-model bacterium *Burkholderia sacchari*, as an alternative to biological production, since it has been proven that it can synthesize several high-value products using different sources of carbon. In this work we used the BglBrix plasmids, a standard that includes all the basic biological parts necessary for a vector to be efficient, stable and fulfill its function within the cell. The transformation of *Burkholderia sacchari* cells with the BglBrix plasmids was carried out by chemical method using RbCl, obtaining high transformation efficiency. Dose-induction assays were performed to evaluate the expression of fluorescent proteins at a maximum concentration of inducer.

Key words: *Burkholderia sacchari*, non-model organism, synthetic biology, chemical transformation BglBrix vectors.

INTRODUCCIÓN

Gran parte de nuestro conocimiento sobre la herencia, el desarrollo, la fisiología, los procesos celulares y moleculares se deriva de los estudios de organismos modelo o de referencia.

Los organismos modelo generalmente se definen como especies no humanas que se estudian extensamente para comprender una variedad de fenómenos biológicos, con la esperanza de que los datos, modelos y teorías generados sean aplicables a otros organismos, particularmente aquellos que son de alguna manera más complejos que el original. En muchos casos, la selección de organismos particulares fue fortuita y no cuidadosamente planificada, ya que los organismos ya estaban en uso o eran familiares para los investigadores, y algunas de sus características ventajosas sólo surgieron en retrospectiva (Princeton University Press, n.d.; Somerville & Koornneef, 2002; University of Chicago Press, n.d.). El inventario más ampliamente reconocido de organismos modelo, compilado por el Instituto Nacional de Salud de los EE. UU., Comprende sólo trece especies, incluida la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*, la planta *Arabidopsis thaliana*, el pez cebra *Danio rerio* y El ratón *Mus musculus* (Desaintes, 2008). Sin embargo, desde la llegada de los proyectos de secuenciación genómica a gran escala, el término "organismo modelo" se ha vuelto omnipresente en el discurso biológico, y se usa cada vez más para describir cualquier organismo experimental utilizado para investigar un proceso o sistema biológico particular. Los ejemplos de esta tendencia incluyen manuales de laboratorio recientes sobre organismos modelo "emergentes" que van desde la abeja de miel hasta el wallaby (Cold Spring Harbor Press, 2009) .

Muchos grupos de investigación están experimentando presiones como resultado de la popularidad del término, por ejemplo, debido a los sistemas de otorgamiento competitivos que obligan a los investigadores a concentrarse en estos organismos o a racionalizar el trabajo de investigación propuesto sobre un organismo en particular al afirmar que, en cierto sentido, es un "organismo modelo" (Maher, 2009; Sommer, 2009). Los críticos también han cuestionado la validez científica de los organismos modelo como herramientas de investigación, señalando que su uso enfatiza la unidad

a lo largo de la vida en lugar de explorar la diversidad, y la genética sobre todas las demás características o niveles de análisis del organismo (Bolker, 1995).

Para diseñar un microorganismo no modelo es importante el desarrollo de un vector lanzadera eficiente, estable y robusto, ya que es un paso decisivo para la entrega de genes foráneos a las células y que ésta pueda asimilarlos como propios. Los elementos genéticos esenciales para un vector lanzadera incluyen un origen de replicación, elementos de expresión y un marcador seleccionable (Yan & Fong, 2017).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de investigación

Desarrollo de herramientas de biología sintética para la bacteria no modelo *Burkholderia sacchari*: Una nueva plataforma para una producción más limpia.

1.2. Justificación

En la actualidad, las distintas actividades de la vida diaria involucran productos derivados de fuentes no renovables, particularmente de productos petroquímicos. El uso de combustibles fósiles para la producción especialmente de plásticos, no solo ha disminuido sus reservas, sino que es uno de los factores que contribuye de forma importante al incremento de emisiones de gases de efecto invernadero, y con ello al calentamiento global (K. H. Lee, Park, Kim, Kim, & Lee, 2007). Por lo que en diferentes foros nacionales e internacionales, se ha enfatizado la necesidad de buscar alternativas sostenibles de producción, derivadas del aprovechamiento de recursos renovables (Koller et al., 2005; Lynd, van Zyl, McBride, & Laser, 2005; Mendonça et al., 2014; Thompson, Moore, vom Saal, & Swan, 2009).

Los microorganismos poseen la capacidad de producir una amplia variedad de moléculas (combustibles, fármacos, entre otros) (Fichtner, Voigt, & Schuster, 2017; Girvan & Munro, 2016; Hirasawa & Shimizu, 2016) que parten del consumo de específicas fuentes de energía y varía es la regulación del catabolismo de cada uno. Las especies que son buenas candidatas para un bioproceso consolidado y convertirse en microorganismos modelo generalmente tienen varias características: La primera es que expresan una gran variedad de genes que degradan los polímeros de azúcar. La segunda, tienen capacidades bioquímicas que conectan la entrada de materia prima renovable a las vías de producción bioquímica aguas abajo y, la tercera es que se derivan de diversos entornos ambientales (es decir, termófilos, acidófilos, autótrofos) y poseen atributos beneficiosos (es decir, alta tolerancia al alcohol, tolerancia a la temperatura, tolerancia al pH) (Lynd et al., 2005). Sin embargo, el desarrollo de microorganismos no modelo es relativamente lento y se ve

obstaculizado en gran medida por herramientas genéticas moleculares limitadas y por la falta de conocimiento sobre sus rutas metabólicas y su complicada regulación.

Si bien es cierto, existen microorganismos que ya son considerados modelo como *Escherichia coli* (*E. coli*) o *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), debido a la disponibilidad de una amplia gama de herramientas establecidas, con las que se ha podido entender y modificar su metabolismo para producir moléculas de interés (Park et al., 2014), sin embargo, en ciertos casos otros microorganismos pueden ser cepas hospedadoras más adecuadas ya que poseen características fisiológicas y metabólicas con mayor potencial y, con ayuda de las nuevas herramientas de manipulación genética, poder explotar la alta capacidad de producción que tienen.

Burkholderia sacchari (*B. sacchari*), es una bacteria Gram negativa que ha llamado el interés en los últimos años, ya que puede crecer usando muy diversas fuentes de carbono (Brämer, Vandamme, da Silva, Gomez, & Steinbüchel, 2001) y además posee la capacidad de producir una gran variedad de moléculas de alto valor, como ácido xilónico, hidrogeles, 1,2,4-butanetriol y xilitol, entre otros. (Mendonça et al., 2014). Esta bacteria, acumula grandes cantidades (hasta 80% de su peso), de polihidroxialcanoatos (PHA), que son poliésteres biodegradables y biocompatibles, que tienen propiedades físicas similares a las de algunos polímeros sintéticos y por lo tanto, se consideran una alternativa para sustituir al plástico de origen petroquímico (S. Y. Lee, 1996). A pesar del enorme potencial de esta bacteria, uno de los factores que limitan su uso a escala industrial, es la ausencia de herramientas útiles para optimizar la producción biológica en este microorganismo, principalmente mediante modificación genética, transformación y otras herramientas disponibles en otros microorganismos.

Se han reportado transformaciones exitosas de *B. sacchari* exclusivamente por métodos físicos (electroporación) (Guamán et al., 2018). Métodos químicos aún no han sido reportados, pero que considerando la estructura celular de la bacteria, son excelentes alternativas que se debe tomar en cuenta. Es por tal motivo que se ha escogido al RbCl para probar la transformación en *B. sacchari*, una variante con un costo mayor al del método tradicional de CaCl₂ pero que utiliza el catión Rb⁺ con el

que se ha probado que aumenta la competencia de la célula e incrementar la eficiencia de transformación en bacterias (R. Green & Rogers, 2013).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Desarrollar herramientas útiles para potenciar el uso de la bacteria no modelo *Burkholderia sacchari*, como alternativa de producción biológica.

1.3.2. Objetivos específicos

2.2.1 Establecer un método eficiente de transformación para la bacteria *Burkholderia sacchari*

2.2.2 Identificar los orígenes de replicación y promotores de los vectores BglBricks que sean funcionales en *Burkholderia sacchari*

2.2.3 Evaluar tres parámetros relevantes, de los promotores funcionales en *Burkholderia sacchari*: inducción máxima, concentración óptima de inductor y cinética de inducción.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

La biología sintética es la ingeniería de la biología, la síntesis y/o modificación de sistemas biológicos utilizando herramientas de biología molecular, ingeniería genética, ingeniería metabólica y bioinformática, que muestran funciones que no existen en la naturaleza (Serrano, 2007). Esta disciplina, se centra en el diseño y la construcción de partes, dispositivos y circuitos biológicos que se pueden comprender y ajustar para cumplir con los criterios de rendimiento específico, así como rediseñar los sistemas biológicos naturales existentes. La biología sintética se esfuerza por hacer que la ingeniería de la biología sea más fácil y más predecible.

Herramientas básicas de biología molecular como la clonación de ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación de ácidos nucleicos, entre otras, han permitido alcanzar los conocimientos que hasta ahora se tiene sobre las entidades biológicas, su funcionamiento y su evolución, además de dar paso a nuevas estrategias más complejas y eficientes, como clonación independiente de ligasa (SLIC), ensamble isotérmico Gibson, clonación por extensión circular de la polimerasa (CPEC), ensamble Golden Gate, etc. (Yan & Fong, 2017), que no dependen de enzimas de restricción y simplifican algunos procesos de ensamblaje y construcción de circuitos biológicos.

Diferentes tipos de células utilizan mecanismos básicos y actualizados de organización y comunicación, la comprensión de las distintas células proporciona una cantidad increíblemente rica de información para comprender cualquier otro tipo de célula, incluso de organismos tan distantes como las levaduras y los humanos (Seok et al., 2013).

Organismos extraordinariamente complejos como lo son los multicelulares, se pueden comprender mejor si se dividen en jerarquías y de esa manera analizar cada nivel individual. Entender cómo el ADN, las proteínas y los metabolitos funcionan en células individuales, ayuda a comprender cómo se organizan los diferentes tipos de células en los tejidos, como los tejidos producen órganos complejos y, finalmente

formar el organismo, el nivel más alto de la jerarquía (Helman, Lim, Peisajovich, Pincus, & Sommovilla, 2007)

El principio central que sustenta gran parte de la biología molecular actual radica en la relación entre el ADN, el ARN y las proteínas. El código genético (el ADN) instruye a las células a producir proteínas mediante la traducción de la secuencia de ADN en un ARN mensajero intermediario (ARNm), en el proceso conocido como transcripción. El ARNm se traduce luego en una cadena polipeptídica que comprende una secuencia definida de los 20 aminoácidos naturales (traducción) para producir proteínas que llevan a cabo la mayoría de las funciones y actividades celulares dentro de los organismos. Pero esto se ha visto respaldada por desarrollos tecnológicos paralelos (The Royal Academy of Engineering, 2009). Ejemplos de tales desarrollos son: computadoras cada vez más potentes, el auge de internet; potentes motores de búsqueda y redes de banda ancha. Esto ha resultado en una explosión masiva de datos, incluidas las secuencias del genoma de cientos de organismos diferentes, incluido el genoma humano, donde ahora se puede identificar y estudiar el complemento completo de los componentes proteicos.

Es este componente biológico más simple que usan los biólogos sintéticos, una secuencia definida de ADN que codifica cierta información y, como resultado, realiza una función definida. Esta podría ser una función reguladora de genes, tal como un promotor de expresión génica, un sitio de unión a ribosomas para dirigir la traducción de proteínas o un marco de lectura abierto que codifica una proteína particular. Muchas partes diferentes se pueden combinar en un "dispositivo" (Helman et al., 2007)

El ADN sintético está optimizado para la funcionalidad dentro del chasis, que es el anfitrión de la reacción, ya sea un simple interruptor biológico, un oscilador o un biosensor. El chasis a menudo se conoce como el "hardware" en biología sintética y el ADN sintético como el software. Con mucho, el chasis más común en uso hoy en día es *E. coli*. Sin embargo, hay una serie de otros chasis naturales en uso. Para utilizar con éxito un chasis en particular, es esencial comprender con tanto detalle como sea posible cómo se comportará con la presencia de circuitos de ADN sintético (The Royal Academy of Engineering, 2009). Un punto clave para entender es que, por definición, los chasis son organismos vivos cuya respuesta a la inyección de

ADN sintético puede ser difícil de determinar. Además, para un conjunto dado de tareas, un tipo de chasis puede funcionar mejor que otro.

A medida que se desarrolle la biología sintética, la cantidad y el tipo de chasis aumentarán inevitablemente a medida que se satisfaga una gama más amplia de aplicaciones (The Royal Academy of Engineering, 2009).

Escherichia coli: una bacteria que normalmente se encuentra en el intestino grueso de animales de sangre caliente. Debido a que *E. coli* se puede cultivar fácilmente y tiene una genética relativamente simple que puede manipularse fácilmente, se pueden construir cepas de laboratorio no infecciosas y es uno de los organismos modelo más comunes utilizados en biología molecular. En este momento, también es el chasis más utilizado en biología sintética.

Bacillus subtilis: una bacteria no patógena que se encuentra con frecuencia en el suelo. Al igual que *E. coli*, *B. subtilis* se manipula fácilmente en relación con los cambios genéticos. Por lo tanto, es ampliamente utilizado en una variedad de estudios de laboratorio. A veces se usa en lugar de *E. coli* porque algunas de sus propiedades son más favorables a algunas formas específicas de manipulación genética relacionadas con la biología sintética (los circuitos de ADN pueden integrarse fácilmente en el genoma de *B. subtilis*).

Mycoplasma: una bacteria que no tiene una pared celular. En términos de biología sintética, la forma más conocida es *M. genitalium*. Esto es porque (como se describió anteriormente) fue la bacteria que fue sintetizada por el Instituto Venter. Debido a que el *Mycoplasma* tiende a ser inestable, normalmente no se utiliza como un chasis en biología sintética.

Levadura: hay un gran número de especies de levadura. Las especies que se utilizan principalmente como un chasis en biología sintética son *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura es ampliamente utilizada en biología molecular, particularmente en relación con la investigación sobre la célula eucariótica, que se vincula directamente con la biología humana. Las levaduras se utilizan como un chasis en biología sintética y parecen ser (en circunstancias específicas) capaces de acomodar secuencias más grandes de ADN modificado que *E. coli*.

Pseudomonas putida: aunque a veces se utiliza como un chasis en biología sintética, su uso no es tan común como *E. coli*, *B. subtilis* y levadura.

El desarrollo de un vector lanzadera eficiente, estable y robusto es una herramienta importante para diseñar un microorganismo no modelo, ya que es un paso decisivo para la entrega de genes extraños a las células, la expresión heteróloga de genes foráneos y es un enfoque para la entrega de ADN de donantes. para la ingeniería del genoma. Un vector lanzadera efectivo debe poseer las siguientes características: (1) Debe poder replicarse en la cepa no modelo o *Escherichia coli* de manera estable; (2) Debe contener marcadores seleccionables eficientes y robustos; (3) Debe tener una baja homología con el cromosoma del huésped (en caso de intercambio de alelos); (4) Debe albergar elementos de expresión funcional (es decir, promotor, sitio de unión al ribosoma) (Yan & Fong, 2017).

Las piezas de ensamblaje estándar, como BioBricks (Knight et al., 2003), que incluyen todas estas "partes básicas", llamadas así por ser considerados elementos no reducibles de la composición genética. Estas partes se pueden enganchar en múltiples dispositivos creando así "sistemas" o "módulos" capaces de comportamientos complejos. Además, se puede lograr un nivel aún más alto de complejidad utilizando diferentes tipos de células (cada una con diferentes módulos sintéticos integrados).

El estándar BioBricks descrito por Knight y colaboradores (Knight et al., 2003) fue la primera implementación de una estrategia para definir reglas de composición que permiten el ensamblaje de partes biológicas estándar utilizando una química de ensamblaje único. El método de ensamblaje emplea digestión de enzimas de restricción y reacciones de ligación para ensamblar pequeñas partes básicas en piezas compuestas más grandes. Las partes básicas están flanqueadas por sitios de restricción específicos en sus extremos 5' y 3'. La digestión con estas enzimas genera extremos cohesivos compatibles que se pueden ligar juntos.

La ligadura de dos partes genera una secuencia con una cicatriz entre las partes que no contiene ninguno de los sitios originales. El producto resultante es una nueva pieza compuesta con las mismas características de ensamblaje que las dos partes originales. Todavía está flanqueado por sitios de restricción únicos en sus extremos 5' y 3' y, por lo tanto, es posible el ensamblaje iterativo de partes compuestas más

grandes. Se han descrito más de 2,000 partes básicas que cumplen con este estándar, y se han utilizado en la construcción de una amplia gama de circuitos genéticos y dispositivos biosintéticos (Brown, 2007; Dueber et al., 2009; Peccoud et al., 2008; Shetty, Endy, & Knight, 2008).

Desde el inicio del primer estándar de ensamblaje, se han propuesto y desarrollado otros muchos para describir la composición funcional y el ensamble físico. De hecho, este campo está experimentando una actividad sólida y actualmente se han propuesto y desarrollado varias mejoras al estándar original de BioBricks, junto con estrategias y estándares de ensamblaje completamente alternativos (Anderson et al., 2010).

Es así como se ha descrito un nuevo estándar, robusto pero flexible para componer partes biológicas llamado BglBricks (T. S. Lee et al., 2011). El nuevo estándar aborda varios de los problemas clave asociados con el estándar original BioBricks como: la presencia de cicatrices en la secuencia, el bloqueo de los sitios de restricción por la *dam* metilación cuando se franquea ciertas secuencias, la complicada construcción de máquinas más sofisticadas de proteínas modulares, entre otras desventajas (Phillips & Pamela, 2006) y, que además, proporciona una base para el desarrollo de plataformas de ensamblaje automatizadas. El estándar BglBrick admite el ensamblaje con las enzimas de restricción BglIII y BamHI que flanquean los extremos 5' y 3' de las partes básicas, respectivamente. Estas enzimas poseen varias ventajas sobre las utilizadas en estándares anteriores: primero, tienen una extensa historia de uso, lo que asegura su confiabilidad; segundo, cortan con alta eficiencia; en tercer lugar, no se ven afectados por la superposición o la metilación del ADN; finalmente, dan como resultado una secuencia de cicatriz de 6 nucleótidos (GGATCT) que codifica la glicina-serina, una secuencia que se demuestra inocua en la mayoría de las aplicaciones de fusión de proteínas en una variedad de sistemas hospedadores, incluidos *E. coli*, levadura y humanos (Evers, van Dongen, Faesen, Meijer, & Merkx, 2006).

Otra de las ventajas del estándar BglBricks es que utiliza promotores inducibles. La actividad de un promotor inducible, como su nombre lo indica, es inducida por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos. Los promotores inducibles son una herramienta muy poderosa en la ingeniería genética porque la expresión de genes

operativamente vinculados a ellos puede activarse o desactivarse en ciertas etapas del desarrollo de un organismo en particular.

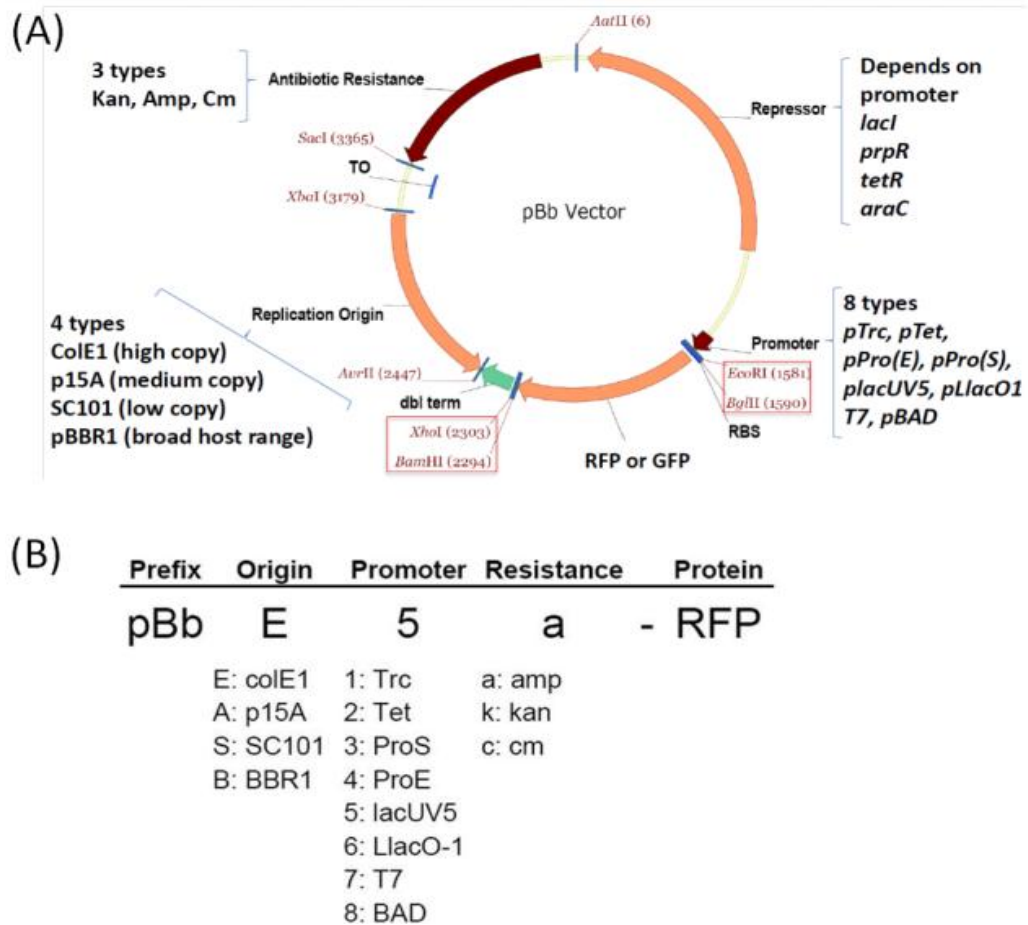


Figura 1. Diseño del plásmido y nomenclatura de plásmidos BglBrick (pBb).

(A) Diseño de plásmido de vectores pBb. El plásmido se compone de tres módulos: módulo de gen de resistencia a antibióticos, módulo de origen de replicación y módulo de expresión, que incluye el represor, el promotor, el gen de interés (RFP o GFP) y el terminador. Los sitios BglBrick están en recuadros rojos. (B) Nomenclatura del sistema de vector pBb. La identidad del vector se describe mediante tres letras que contienen la información del origen de replicación, el promotor y el marcador de resistencia a antibióticos como se indica. El prefijo pBb se usa para plásmidos BglBrick y el nombre del gen de la proteína en el plásmido se incluye al final de la descripción del vector (T. S. Lee et al., 2011).

La construcción del módulo de expresión BglBrick consiste en uno de los 8 promotores diferentes y sus represores correspondientes que se han utilizado con frecuencia para la producción de proteínas y la ingeniería de vías metabólicas. Para los promotores inducibles por IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), los promotores Trc y T7 son potentes y P_{lacUV5} como promotor de fuerza media (Anthony et al., 2009). Cada construcción llevó *lacI^d* para reprimir la expresión de

estos promotores. $P_{LlacO-1}$ también se añadió a la lista de promotores inducibles por IPTG debido a su regulación estricta con expresión de nivel medio a alto. Varios promotores inducidos por productos químicos distintos de IPTG se incluyen en la lista de promotores: sistema de expresión génica regulada por tetraciclina (P_{tet} y *tetR*) (S. K. Lee, Newman, & Keasling, 2005), el sistema de expresión génica regulado por propionato recientemente desarrollado (P_{ppB} y *prpR*) (S. K. Lee & Keasling, 2005, 2008) y el sistema promotor inducible por arabinosa (P_{BAD} y *araC*) (Guzman, Belin, Carson, & Beckwith, 1995). En la Figura 1 (B) se describe la lista de promotores.

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

Las herramientas de biología sintética no permiten la transformación de la bacteria no modelo *Burkholderia sacchari* con plásmidos BglBricks.

2.2.2. Hipótesis alternativa

Las herramientas de biología sintética permiten la transformación de la bacteria no modelo *Burkholderia sacchari* con plásmidos BglBricks.

2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis

- Establecimiento de un método eficiente de transformación para la bacteria *B. sacchari*
- Transformación con plásmidos BglBricks en *E. Coli* y la bacteria *B. sacchari*
- Extracción y purificación de plásmidos de las colonias transformantes
- Ensayos de dosis-inducción de promotores funcionales en *B. sacchari*.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

La cepa de *Burkholderia sacchari* fue cedida por el Laboratorio de Bioproductos en el Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

La cepa de *E. coli* DH10 β y los plásmidos BglBricks (ensamblados por el Dr. Carlos Barba Ostria) fueron cedidos por el Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Biología Sintética en el Departamento de Energía, Ingeniería Química y Ambiental de la Washington University in St Louis, Estados Unidos.

- pB8k-RFP: 4441 pb
- pB1k-GFP: 4727 pb
- pB5c-RFP: 4810 pb
- pB6a-GFP: 4893 pb

3.2. Métodos

Los procedimientos se siguieron en base a los protocolos establecidos en los Métodos de Biología Molecular del libro “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”(M. R. Green & Sambrook, 2012), siempre y cuando no se indique otra fuente.

3.2.1. Prueba de catalasa

Una pequeña cantidad de colonia bacteriana se transfirió a la superficie de un portaobjetos de vidrio limpio y seco con un asa estéril. Se colocó una gota de agua oxigenada (H₂O₂) al 3% en el portaobjetos y se mezcló. Un resultado positivo es la rápida evolución del oxígeno (en 5-10 segundos) como lo demuestra el burbujeo. Un resultado negativo es que no hay burbujas o solo algunas burbujas dispersas.

3.2.2. Prueba de oxidasa

Para la prueba de oxidasa se utilizaron tiras de diagnóstico de la casa Sigma-Aldrich (USA). Se tomó una tira de diagnóstico del contenedor y con un asa estéril se colocó

una pequeña cantidad de colonia bacteriana en el lugar donde se indica. Un resultado positivo es la coloración oscura-azulada en el lugar donde se colocó la colonia. Un resultado negativo no presenta coloración.

3.2.3. Preparación de células competentes

3.2.3.1. Método CaCl_2 en células de *Escherichia coli*

Se inocularon células de *E. coli* DH10 β en 5 ml de medio Luria Bertani (LB) en un tubo Falcon de 50 ml y se dejó crecer durante 24 horas a 37 °C con agitación vigorosa 220 rpm. Se usó 0.5 ml para inocular 50 ml de LB en un matraz de 250 ml y se incubó a 37°C con agitación a 220 rpm. El crecimiento de las células se reguló hasta que el OD₆₀₀ alcance 0.5-0.6. Una vez alcanzado el crecimiento adecuado se transfirió el cultivo a un tubo de centrifuga de 50 ml autoclavado y se enfrió en hielo. Después de 30 min se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 20 ml de solución CaCl_2 50mM fría y se incubó en hielo por 20 min. Nuevamente se centrifugaron las células a 3500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 2.5 ml de CaCl_2 50mM con glicerol al 10%. Se tomaron alícuotas de 100 uL en tubos de 2 mL y se guardó a -80°C para su uso posterior.

3.2.3.2. Método RbCl en células de *Escherichia coli*

Medios y Soluciones

LB + 35 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (LBMg)

Tabla 1. Componentes de la solución TFB1

Compuesto	Concentración en solución
KOAc	30 mM
RbCl	100 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mM)
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 mM
Glicerol	15% vol/vol

El pH fue ajustado a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Se agregó dH₂O a 200 ml. Se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración a 4°C.

Tabla 2. Componentes de la solución TFB2

Compuesto	Concentración en solución
MOPS	10 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75 mM
RbCl	10 mM
Glicerol	15% vol/vol

El pH fue ajustado a 6.5 con KOH. Se agregó dH₂O a 200 ml. Se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración a 4°C.

Se inocularon células de *E. coli* DH10β en 5 mL de medio LBMg y se incubó durante la noche a 37 °C con agitación constante de 220 rpm. Se diluyó 200 uL de cultivo en 200 ml de medio LBMg y se incubó a 37 °C durante 2 horas con agitación constante. El crecimiento de las células se reguló hasta que el OD₆₀₀ alcance 0.5-0.6 y una vez alcanzado el rango adecuado se transfirió el cultivo a un tubo de centrifuga de 50 ml autoclavado y se enfrió en hielo de 10 a 15 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 3500 rpm a 4 °C. Se resuspendieron las células en 10 ml de TFB1 frío y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante y posteriormente se suspendieron las células en 2 ml de TFB2. Las alícuotas de células en volúmenes de 100 µl en tubos de microcentrifuga. Las células se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

3.2.3.3. Método RbCl en células de *Burkholderia sacchari*

Células de *Burkholderia sacchari* se sometieron a un proceso de preparación similar al de *E. coli*, con cambios en temperatura, ya que el crecimiento óptimo de esta bacteria se da a 30°C y un crecimiento del precultivo de alrededor de 4 horas, que es lo que le tomó alcanzar un OD₆₀₀ entre 0.5-0.6.

3.2.4. Transformación de células competentes

3.2.4.1. Transformación de células de *Escherichia coli*

Células de *E. coli* DH10 β fueron transformadas con los plásmidos BglBricks. Se mezclaron 100 μ l de células competentes de *E. coli* DH10 β y 5 μ l de cada uno de los plásmidos en tubos de microcentrífuga de 2 ml y se incubó por 30 minutos en hielo. Para el ingreso del ADN plasmídico en las células se realizó un choque térmico a 42°C por 60 segundos, a continuación se incubaron las células en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 900 μ L de medio LB y se incubó en agitación (220 rpm) a 37°C por 1 hora. En placas Petri con agar LB y el antibiótico de selección correspondiente (ampicilina, kanamicina o cloranfenicol, a una concentración de 100 μ g/ml) se inocularon 100 μ l de cultivo (dilución 1/10) y se dispersó sobre la superficie del agar, se centrifugó el resto del medio y se tomaron 100 μ l del pellet para plaquear (sin dilución). Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

3.2.4.2. Transformación de células de *Burkholderia sacchari*

Se sometieron células de *Burkholderia sacchari* al mismo tratamiento para transformación que *E. coli*. Con la diferencia de que para expresar el gen marcador de selección la bacteria necesita de más tiempo, por lo que se incubó alrededor de 2 horas y a 30°C. El proceso de plaqueado es exactamente el mismo y, la incubación se da a 30°C por 24 horas.

3.2.5. Prueba de eficiencia de células competentes

Se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) resultantes de la transformación, la cantidad de ADN plasmídico plaqueado conocido (en ng) y tomando en cuenta la dilución, se calculó la eficiencia de transformación mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{ng \text{ de ADN plaqueado}} = \frac{1 \times 10^3 ng}{ug}$$

Las unidades finales con las que se expresa la eficiencia de transformación son en UFC/ μ g ADN.

3.2.6. Extracción y purificación de plásmidos

Se inoculó una colonia de *B. sacchari* transformada con cada uno de los plásmidos BglBricks en 40 ml de medio LB con 100 µg/ml del antibiótico de selección correspondiente en cada caso y se incubó a 30°C por una noche en agitación constante a 220 rpm. Se centrifugó el cultivo bacteriano a 3500 rpm por 10 minutos y el pellet resultante fue resuspendido en 5 ml de tampón homogeneizador, que en su composición tiene 25 mM Tris-HCl, pH=8.0, 50 mM glucosa, 1% lisozima, ARNasa 100 µg/ml, acompañado de una agitación vigorosa utilizando un vortex (Labnet, USA) para la posterior incubación en hielo durante media hora. A continuación se añadió 5 ml de tampón de lisis (0.2 M NaOH y 1% de SDS) y se incubó en hielo por 5 minutos. Luego se agregaron 5 ml de tampón de neutralización (3M NaC₂H₃O₂, pH=4.8) , se mezcló por inmersión para centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se precipitaron los plásmidos presentes en el sobrenadante etanol al 96% y se centrifugó nuevamente 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. El pellet resultante se lavó con 10 ml de etanol al 70% y se centrifugó en las mismas condiciones. El sobrenadante fue descartado y los restos eliminados por evaporación. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 200 µl de buffer TE1X (10 mM Tris-HCl, pH=8.0, 0.01 mM EDTA).

Para la obtención de ADN plasmídico de mejor calidad se realizó una purificación siguiendo las especificaciones del kit comercial de purificación de ADN plasmídico (PureLink Quick plasmid miniprep kit) de la casa comercial Invitrogen.

Para determinar la concentración y pureza del ADN plasmídico extraído se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, USA).

3.2.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizó la electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa para comprobar la calidad del ADN plasmídico extraído. Específicamente, se mezclaron 5 µl de ADN de cada uno de los plásmidos, 1 µl de buffer TAE1X y colorante de carga (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de cianol de xileno, 30% de glicerol) y se cargaron en un gel de agarosa al 1% (p/v en tampón TAE1X) con 0.01% (v/v) de SyberSafe. El marcador de peso molecular que se utilizó fue 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen,

USA). La electroforesis se corrió a 90V por 40 minutos. Para observar las bandas correspondientes al ADN plasmídico se utilizó el sistema de imágenes Enduro™ GDS Touch (Labnet International, USA).

3.2.8. Ensayos de Dosis-Inducción de promotores

Se cultivaron las células de *B. sacchari* durante la noche a 37 °C en 5 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente (ampicilina, kanamicina, cloranfenicol). A la mañana siguiente, los cultivos se diluyeron a una $OD_{600} = 0.05$ en 500 mL de LB suplementado con antibiótico. Los cultivos se hicieron crecer adicionalmente hasta una $OD_{600} = 0,5-0,7$ y posteriormente se indujeron con IPTG 1mM o arabinosa 0.4% (inducción máxima) según corresponda. Las mediciones de la OD y fluorescencia se hicieron durante 48 horas cada 15 minutos en el Lector de Placas Tecan M200 Pro, (Suiza).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados

La inserción en *E. coli* DH10 β de los plásmidos pB8k-RFP, pB1k-GFP, pB5c-RFP y pB6a-GFP se realizó por el método de CaCl₂ y RbCl a una OD₆₀₀ de 0.607, se comprobó con marcadores de selección resistentes a antibióticos (ampicilina, cloranfenicol o kanamicina). Se observó crecimiento bacteriano de células transformadas en placas con los antibióticos. Por otro lado, no se observó crecimiento de células sin transformar en los mismos antibióticos (control negativo), confirmando la eficacia de los antibióticos. A continuación se seleccionó una colonia aislada para la reproducción de los plásmidos de interés y su purificación para su posterior propósito.

Cada uno de los plásmidos fueron extraídos y purificados utilizando el kit de extracción de ADN plasmídico (Invitrogen, USA) siguiendo el protocolo de la casa comercial. La cuantificación de ADN se determinó por espectrofotometría a 260 nm (A260) en el Nanodrop 2000. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Concentración de plásmidos extraídos de *E. coli*

Plásmido	Concentración (ng/ μ l)
pB8k-RFP	140.8
pB1k-GFP	31.9
pB5c-GFP	141.0
pB6a-GFP	73.6

B. sacchari ha sido transformada exclusivamente por métodos físicos (electroporación) (Guamán et al., 2018), mientras que otros métodos no han sido probado o reportados actualmente, es por lo cual para esta experimentación se buscó evaluar la eficiencia de transformación por el método químico de RbCl para dos réplicas a una OD₆₀₀ de 0.667.

Conocida la concentración de los plásmidos, se pudo estimar la cantidad necesaria para la transformación de cada uno tubo de células competentes, 5µl.

Tabla 4. Transformación de células de *B. sacchari*

Plásmido	Transformación	Control Negativo
pB8k-RFP	+	-
pB1k-GFP	+	-
pB5c-GFP	+	-
pB6a-GFP	+	-

El crecimiento bacteriano fue abundante. Se observaron incontables Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en placas sin dilución, mientras tanto, en placas con dilución 1/10 se presenciaron colonias contables (Tabla 5). El control negativo no tuvo crecimiento y para asegurarse que las colonias fueran *B. sacchari* transformadas se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa, que resultan positivas para la bacteria ya que posee la capacidad de sintetizar las dos enzimas (Silva, Bramer, Vandamme, Gomez, & Steinbuche, 2001). Y efectivamente se confirmó la transformación de *B. sacchari*.

Tabla 5. Conteo de UFC de *B. sacchari* transformadas

Plásmido	UFC		
	Sin diluir	Dilución 1/10	
		Réplica 1	Réplica 2
pB8k-RFP	Incontable	258	295
pB1k-GFP	Incontable	321	302
pB5c-GFP	Incontable	274	262
pB6a-GFP	Incontable	308	325

Con estos resultados se puede comprobar que el método de RbCl es eficaz en la transformación de *B. sacchari* pero para estimar cuán eficiente es el método se procedió a calcular la eficiencia de transformación según la fórmula que se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Dicha eficiencia se puede definir como la eficiencia mediante la cual las células pueden captar el ADN extracelular y expresar sus genes codificados (R. Green & Rogers, 2013). Esto se basa en la competencia de las células y se calculó dividiendo el número de transformantes exitosos por la cantidad de ADN (ng) en dilución utilizado durante el proceso de transformación. Dicho de otro modo, es el número de unidades formadoras de colonias (UFC) producidas por 1 µg de ADN plásmido (CFU/µg ADN) (Hanahan, 1983).

La cantidad de ADN utilizado en total fue el resultado del producto de la concentración de ADN (Tabla 3) y el volumen añadidos (5µl), entre la dilución total del ADN antes de la siembra que fue de 1000µl (100µl de células competentes + 895µl de medio LB + 5µl de ADN plasmídico). Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 6. Eficiencia de transformación en *B. sacchari*

Plásmido	Cantidad de ADN (ng) en reacción	UFC/microgramo de ADN R1	UFC/microgramo de ADN R2
pB8k-RFP	0.7040	3.66x10 ⁵	4.05x10 ⁵
pB1k-GFP	0.1595	2.01x10 ⁶	1.89x10 ⁶
pB5c-GFP	0.7050	3.89x10 ⁵	3.72x10 ⁵
pB6a-GFP	0.3680	8.37x10 ⁵	8.83x10 ⁵

El método de electroporación en general tiene una mejor eficiencia de transformación que los métodos químicos, que puede variar de 2x10⁸ a 2x10¹⁰ y con un límite teórico de transformación para los plásmidos más comúnmente utilizados de 1x10¹⁰ UFC/µg. Además, en la práctica, el mejor resultado posible puede ser alrededor de 2–4x10¹⁰ UFC/µg para un plásmido pequeño como pUC19 (2686 pares de bases), y considerablemente menor para plásmidos grandes. (Hanahan, Jessee, & Bloom, 1991), sin embargo permite que se transformen plásmidos grandes de 200 kb de tamaño

La preparación normal de células competentes por métodos químicos puede producir una eficiencia de transformación que varía de 10⁶ a 10⁸ UFC/µg de ADN. Sin embargo, existen protocolos para fabricar células supercompetentes que pueden

producir una eficiencia de transformación de más de 1×10^9 . (Inoue, Nojima, & Okayama, 1990)

Por lo tanto, los resultados obtenidos no están alejados de un valor considerable de eficiencia de transformación, además de que se deben tomar en cuenta varios factores que pueden afectar en mayor o menor medida la transformación, empezando con que se está trabajando con una bacteria no modelo, con características fenotípicas y genotípicas diferentes a *E. coli* (Silva et al., 2001), El método de preparación de células competentes, la duración del choque térmico, la temperatura del choque térmico, el tiempo de incubación después del choque térmico, el medio de crecimiento utilizado y diversos aditivos, pueden afectar la eficiencia de transformación de las células (Ymer, 1991). La temperatura y tiempo que requiere para un crecimiento óptimo es uno de los primeros pasos para transformación, y uno de los que más se debe considerar debido a que las células son más susceptibles de hacerse competentes cuando están creciendo rápidamente, por lo tanto, las células normalmente se recolectan en la fase logarítmica temprana del crecimiento celular. En este experimento se alcanzó una OD_{600} de 0.667 después de 5 horas en incubación con agitación a 30°C, crecimiento que está dentro del rango adecuado, ya que la densidad óptica óptima para recolectar células normalmente se encuentra alrededor de 0.4-0.6. También se ha encontrado que un valor mayor de 0.94-0.95 produce un buen rendimiento de células competentes, pero esto puede ser poco práctico cuando el crecimiento celular es rápido. (Tang et al., 1994).

Otro factor que se debe tomar en cuenta es el tamaño de los plásmidos. Un estudio realizado en *E. coli* encontró que la eficiencia de transformación disminuye linealmente con el aumento del tamaño del plásmido, es decir, los plásmidos más grandes se transforman menos bien que los plásmidos más pequeños. (Hanahan, 1983). Los plásmidos que se utilizaron se encuentran entre 4000 a 5000 pares de bases, no son de un tamaño considerable pero sí pueden afectar en poca medida el proceso de transformación química.

La forma del ADN que se va a insertar en la célula también es un factor a tomar en cuenta. El plásmido superenrollado tiene una eficiencia de transformación ligeramente mejor que la de los plásmidos relajados: los plásmidos relajados se transforman a una eficiencia de alrededor del 75% de los superenrollados. (Hanahan,

1983) El tamaño del ADN afecta al superenrollamiento en plásmidos mayores a 30 Kb, por lo que este no sería un factor que afecte estas transformaciones, ya que como se mencionó anteriormente, los plásmidos que se utilizaron son pequeños.

Una vez que se ha comprobado la transformación de los plásmidos en *B. sacchari*, el siguiente paso de la experimentación son los ensayos de dosis inducción para los promotores inducibles por IPTG y arabinosa.

Para sistemas inducibles por IPTG, la producción de proteína fluorescente se controló con 1 mM de IPTG, y para el plásmido con el promotor inducible por arabinosa, la producción de proteína fluorescente se controló con 0.4%. Al cabo de 48 horas se recolectaron los datos (Ver Anexos) y se hicieron las representaciones gráficas correspondientes.

Se creó una gráfica que contiene la fluorescencia específica (fluorescencia de RFP o GFP / OD₆₀₀) en función del tiempo para cada plásmido.

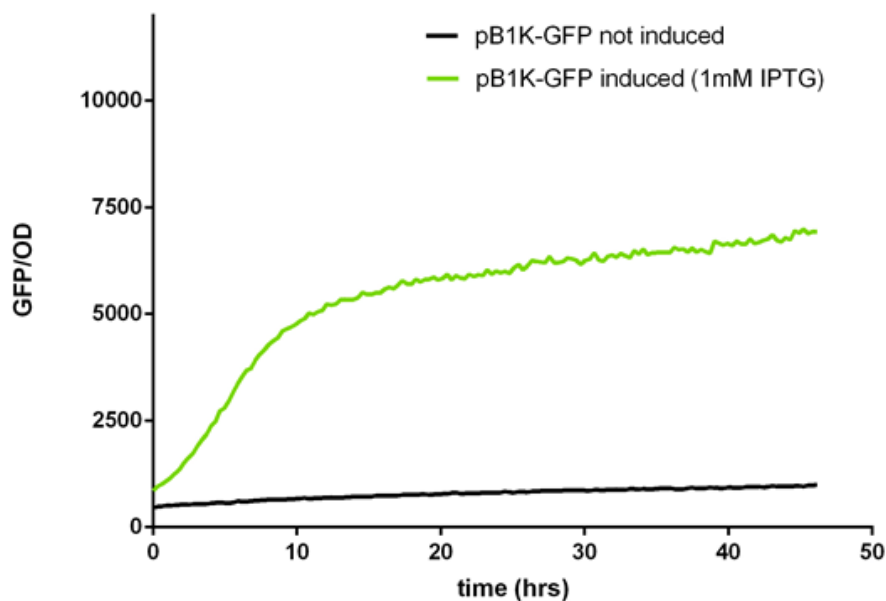


Figura 2. Inducción de pB1k-GFP en *B. sacchari*.

La figura muestra la representación de los datos obtenidos de la expresión del promotor del plásmido pB1k-GFP en *B. sacchari* cuando no se induce (línea negra) y con máxima inducción por IPTG 1mM (línea verde) durante 48 horas. El eje de las X corresponde al tiempo de inducción en horas, mientras que el eje de las Y corresponde a la fluorescencia/densidad óptica.

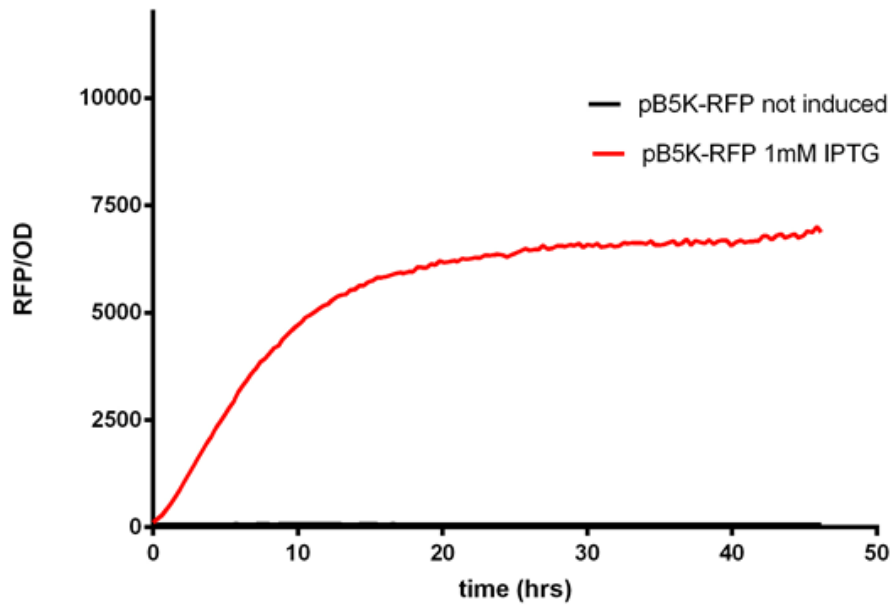


Figura 3. Inducción de pB5k-RFP en *B. sacchari*.

La figura muestra la representación de los datos obtenidos de la expresión del promotor del plásmido pB5k-RFP en *B. sacchari* cuando no se induce (línea negra) y con máxima inducción por IPTG 1mM (línea roja) durante 48 horas. El eje de las X corresponde al tiempo de inducción en horas, mientras que el eje de las Y corresponde a la fluorescencia/densidad óptica.

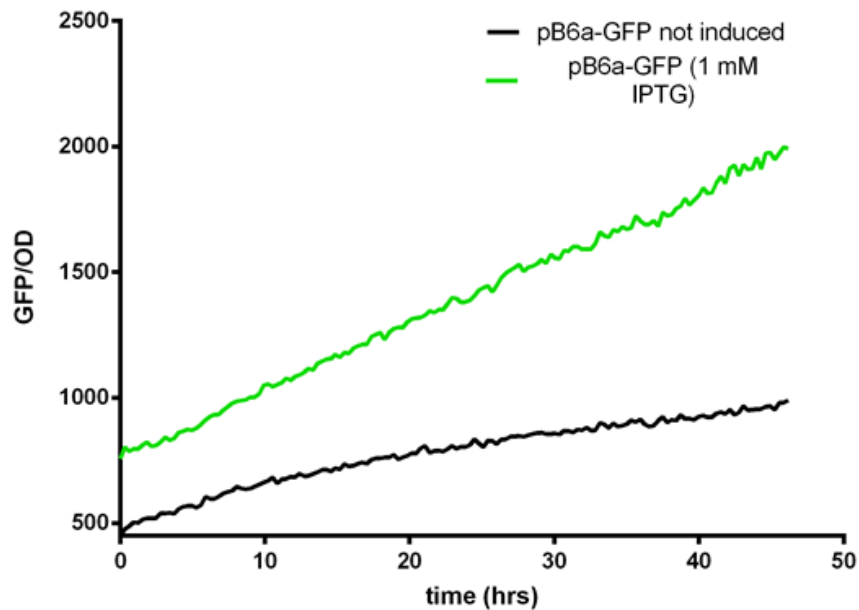


Figura 4. Inducción de pB6a-GFP en *B. sacchari*.

La figura muestra la representación de los datos obtenidos de la expresión del promotor del plásmido pB6a-GFP en *B. sacchari* cuando no se induce (línea negra) y con máxima inducción IPTG 1mM (línea verde) durante 48 horas. El eje de las X corresponde al tiempo de inducción en horas, mientras que el eje de las Y corresponde a la fluorescencia/densidad óptica.

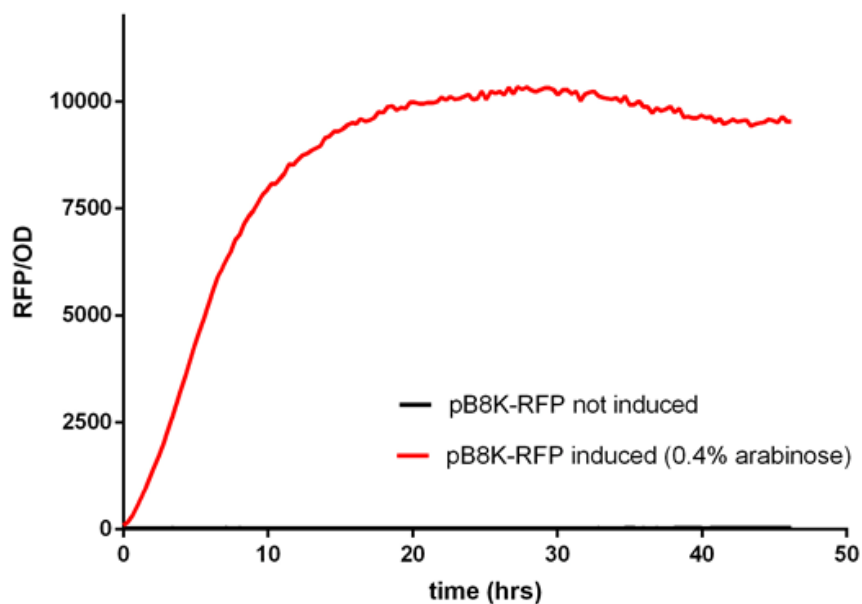


Figura 5. Inducción de pB8k-RFP en *B. sacchari*.

La figura muestra la representación de los datos obtenidos de la expresión del promotor del plásmido pB8k-RFP en *B. sacchari* cuando no se induce (línea negra) y con máxima inducción por arabinosa 0.4% (línea roja) durante 48 horas. El eje de las X corresponde al tiempo de inducción en horas, mientras que el eje de las Y corresponde a la fluorescencia/densidad óptica.

En las Figuras 2,3,4 y 5 se puede observar que existe notable diferencia de expresión cuando se somete o no a inducción, incluso en plásmidos que presentaron expresión basal o constitutiva (Figuras 2 y 4), esto se debe a que la propia maquinaria de la célula reconoce el promotor y lo activa a pesar de no tener inductor. Se tiene que considerar que este sistema fue diseñado en *E. coli* (T. S. Lee et al., 2011) y al estar usándose en otro organismo se puede esperar que tenga el potencial de generar esta expresión.

La expresión de RFP y GFP en diferentes dosis de inductor de vectores BglBricks se probó en *E. coli* (T. S. Lee et al., 2011). Los resultados de expresión para la máxima dosis que utilizaron (0.5mM) están alrededor de 700 (Fluorescencia/OD) y en incrementando, al cabo de 20 horas de experimento. En las representaciones gráficas del presente experimento se puede evidenciar que para una inducción máxima durante 48 horas, la expresión de la fluorescencia asciende considerablemente.

La alta expresión de fluorescencia es debido a que muchas de las moléculas de represor se pegan al inductor y este hace que se despegue del ADN, para que la ARN

polimerasa pueda transcribir abundante ARN y de igual forma, abundante proteína fluorescente. La expresión de la proteína tiene una relación directamente proporcional a la concentración de inductor. A menor concentración de inductor se obtendrá menor fluorescencia y a mayor concentración mayor será la expresión (T. S. Lee et al., 2011).

La densidad óptica es importante en el desarrollo del experimento de expresión de proteínas, ya que no es igual una célula que exprese abundante proteína, a un conjunto de células que expresan la misma cantidad.

Finalmente, se llegará a un punto límite de expresión de proteína fluorescente, a pesar de que la dosis de inducción sea constantemente alta la célula dejará de expresarla, esto se debe a que la maquinaria de la célula tiene que seguir produciendo otras proteínas para poder sobrevivir y la producción de la proteína fluorescente deja de ser elemental.

4.2. Verificación de la hipótesis

Hipótesis nula

Las herramientas de biología sintética no permiten la transformación de la bacteria no modelo *Burkholderia sacchari* con plásmidos BglBricks.

Hipótesis alternativa

Las herramientas de biología sintética permiten la transformación de la bacteria no modelo *Burkholderia sacchari* con plásmidos BglBricks.

Una vez concluidos los ensayos de transformación química en *B. sacchari*, se determinó que sí se pueden desarrollar herramientas útiles para potenciar su uso. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa que indica que las herramientas de biología sintética permiten la transformación de la bacteria no modelo *B. sacchari* con plásmidos BglBricks.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

El método de transformación química con RbCl resultó ser eficiente para la inserción de vectores BglBrix en la bacteria *Burkholderia sacchari*.

Los orígenes de replicación y promotores de los vectores BglBrick son funcionales en *Burkholderia sacchari*, ya que se obtuvo un alto índice de reproducción celular (UFC/ng ADN) y los estudios de dosis-inducción indicaron la expresión de proteína fluorescente en presencia del inductor correspondiente.

La expresión de la proteína fluorescente (GFP o RFP) por los promotores de los vectores BglBrick en *Burkholderia sacchari* se representaron mediante una cinética de inducción e indicaron que la inducción máxima de 1mM para IPTG y 0.4% arabinosa es un concentración óptima para la máxima expresión.

5.2. Recomendaciones

Ensamblar las biopartes en plásmidos multi módulo y de igual manera estudiar la expresión de promotores mediante ensayos de fluorescencia.

Realizar ensayos de dosis-inducción con una concentración variada de inductores, dado que el nivel de producción de proteínas generalmente depende de la concentración del inductor, y este perfil de expresión es información importante cuando se usan los vectores BglBrick para la ingeniería metabólica.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J. C., Dueber, J. E., Leguia, M., Wu, G. C., Goler, J. A., Arkin, A. P., & Keasling, J. D. (2010). BglBricks: A flexible standard for biological part assembly. *Journal of Biological Engineering*, 4(1), 1. doi:10.1186/1754-1611-4-1
- Anthony, J. R., Anthony, L. C., Nowroozi, F., Kwon, G., Newman, J. D., & Keasling, J. D. (2009). Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. *Metabolic Engineering*, 11(1), 13–19. doi:10.1016/j.ymben.2008.07.007
- Bolker, J. A. (1995). Model systems in developmental biology. *Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 17(5), 451–455. doi:10.1002/bies.950170513
- Brämer, C. O., Vandamme, P., da Silva, L. F., Gomez, J. G., & Steinbüchel, A. (2001). Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 5), 1709–1713. doi:10.1099/00207713-51-5-1709
- Brown, J. (2007). The iGEM competition: building with biology. *IET Synthetic Biology*, 1(1), 3–6. doi:10.1049/iet-stb:20079020
- Cold Spring Harbor Press. (2009). *Emerging Model Organisms: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Press, Ed.) (Vol. 1, pp. 2009–2010).
- Desaintes, C. (2008). Research on animal model organisms funded by the European Commission's framework programmes. *Disease Models & Mechanisms*, 1(4–5), 209–212. doi:10.1242/dmm.001578
- Dueber, J. E., Wu, G. C., Malmirchegini, G. R., Moon, T. S., Petzold, C. J., Ullal, A. V., ... Keasling, J. D. (2009). Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nature Biotechnology*, 27(8), 753–759. doi:10.1038/nbt.1557
- Evers, T. H., van Dongen, E. M. W. M., Faesen, A. C., Meijer, E. W., & Merkx, M. (2006). Quantitative understanding of the energy transfer between fluorescent proteins connected via flexible peptide linkers. *Biochemistry*, 45(44), 13183–13192. doi:10.1021/bi061288t
- Fichtner, M., Voigt, K., & Schuster, S. (2017). The tip and hidden part of the iceberg: Proteinogenic and non-proteinogenic aliphatic amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(1 Pt A), 3258–3269. doi:10.1016/j.bbagen.2016.08.008
- Girvan, H. M., & Munro, A. W. (2016). Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. *Current Opinion in Chemical*

Biology, 31, 136–145. doi:10.1016/j.cbpa.2016.02.018

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Cloning and Transformation with Plasmid Vectors. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition., Vols. 1-3, pp. 157–258). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Green, R., & Rogers, E. J. (2013). Transformation of chemically competent *E. coli*. *Methods in Enzymology*, 529, 329–336. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8
- Guamán, L. P., Barba-Ostria, C., Zhang, F., Oliveira-Filho, E. R., Gomez, J. G. C., & Silva, L. F. (2018). Engineering xylose metabolism for production of polyhydroxybutyrate in the non-model bacterium *Burkholderia sacchari*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 74. doi:10.1186/s12934-018-0924-9
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4121–4130.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204, 63–113.
- Helman, N., Lim, W., Peisajovich, S., Pincus, D., & Sommovilla, N. (2007). A Conceptual Instruction Manual for Synthetic Biology. *University of California San Francisco*.
- Hirasawa, T., & Shimizu, H. (2016). Recent advances in amino acid production by microbial cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 42, 133–146. doi:10.1016/j.copbio.2016.04.017
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. doi:10.1016/0378-1119(90)90336-P
- Knight, T., Knight, T. F., Rettberg, J. R., Chan, L., Endy, D., Shetty, R. P., & Che Idris, A. (2003). Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. *Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks*.
- Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., ... Varila, P. (2005). Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, 6(2), 561–565. doi:10.1021/bm049478b
- Lee, K. H., Park, J. H., Kim, T. Y., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2007). Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Molecular Systems Biology*, 3, 149. doi:10.1038/msb4100196
- Lee, S. K., & Keasling, J. D. (2005). A propionate-inducible expression system for enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6856–6862. doi:10.1128/AEM.71.11.6856-6862.2005

- Lee, S. K., & Keasling, J. D. (2008). Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate-inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. *Protein Expression and Purification*, *61*(2), 197–203. doi:10.1016/j.pep.2008.06.008
- Lee, S. K., Newman, J. D., & Keasling, J. D. (2005). Catabolite repression of the propionate catabolic genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: evidence for involvement of the cyclic AMP receptor protein. *Journal of Bacteriology*, *187*(8), 2793–2800. doi:10.1128/JB.187.8.2793-2800.2005
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, *14*(11), 431–438. doi:10.1016/0167-7799(96)10061-5
- Lee, T. S., Krupa, R. A., Zhang, F., Hajimorad, M., Holtz, W. J., Prasad, N., ... Keasling, J. D. (2011). BglBrick vectors and datasheets: A synthetic biology platform for gene expression. *Journal of Biological Engineering*, *5*, 12. doi:10.1186/1754-1611-5-12
- Lynd, L. R., van Zyl, W. H., McBride, J. E., & Laser, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, *16*(5), 577–583. doi:10.1016/j.copbio.2005.08.009
- Maher, B. (2009). Evolution: Biology's next top model? *Nature*, *458*(7239), 695–698. doi:10.1038/458695a
- Mendonça, T. T., Gomez, J. G. C., Buffoni, E., Sánchez Rodríguez, R. J., Schripsema, J., Lopes, M. S. G., & Silva, L. F. (2014). Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(4), 815–829. doi:10.1111/jam.12406
- Park, S. H., Kim, H. U., Kim, T. Y., Park, J. S., Kim, S.-S., & Lee, S. Y. (2014). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. *Nature Communications*, *5*, 4618. doi:10.1038/ncomms5618
- Peccoud, J., Blauvelt, M. F., Cai, Y., Cooper, K. L., Crasta, O., DeLalla, E. C., ... Waldon, S. A. (2008). Targeted development of registries of biological parts. *Plos One*, *3*(7), e2671. doi:10.1371/journal.pone.0002671
- Phillips, I., & Pamela, S. (2006, April 20). A New Biobrick Assembly Strategy Designed for Facile Protein Engineering. Retrieved January 11, 2018, from <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/32535>
- Princeton University Press, 2004 (Ed.). (n.d.). *Making Mice: Standardizing Animals for American Biomedical Research, 1900-1955 - Karen Rader - Google Libros*.
- Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W., ... Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(9), 3507–3512. doi:10.1073/pnas.1222878110
- Serrano, L. (2007). Synthetic biology: promises and challenges. *Molecular Systems*

Biology, 3, 158. doi:10.1038/msb4100202

- Shetty, R. P., Endy, D., & Knight, T. F. (2008). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, 2, 5. doi:10.1186/1754-1611-2-5
- Silva, L., Bramer, C., Vandamme, P., Gomez, G., & Steinbuche, A. (2001). *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1709–1713. Retrieved from <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/51/5/0511709a.pdf?expires=1540170935&id=id&accname=guest&checksum=D2740E9795B257F33B4C8F1624CCF006>
- Somerville, C., & Koornneef, M. (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews. Genetics*, 3(11), 883–889. doi:10.1038/nrg927
- Sommer, R. J. (2009). The future of evo-devo: model systems and evolutionary theory. *Nature Reviews. Genetics*, 10(6), 416–422. doi:10.1038/nrg2567
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H. O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., ... Yokoyama, K. (1994). The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 22(14), 2857–2858.
- The Royal Academy of Engineering. (2009). An Introduction: What is synthetic biology? In The Royal Academy of Engineering (Ed.), *Synthetic Biology: Scope, applications and implications* (pp. 14–22). London.
- Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., & Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 2153–2166. doi:10.1098/rstb.2009.0053
- University of Chicago Press, 1994 (Ed.). (n.d.). *Lords of the Fly: Drosophila Genetics and the Experimental Life - Robert E. Kohler - Google Libros*.
- Yan, Q., & Fong, S. S. (2017). Challenges and Advances for Genetic Engineering of Non-model Bacteria and Uses in Consolidated Bioprocessing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2060. doi:10.3389/fmicb.2017.02060
- Ymer, S. (1991). Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6960.

ANEXOS

Tabla 7. Datos obtenidos de inducción de promotores

Tiempo (s)	Relación entre Fluorescencia /OD							
	pB8K-RFP_NEG	pB8K-RFP	pB1K-GFP-NEG	pB1K-GFP	pB5c-RFP_NEG	pB5c-RFP	pB6a-GFP_NEG1	pB6a-GFP
0	13,1291	95,02515	450,6699	857,5529	44,8718	113,342	450,6699	756,9095
0,3097778	23,74545	170,4996	477,3869	957,4067	67,3174	201,2491	477,3869	803,2258
0,6195555	25,57136	316,2209	489,1304	1009,416	66,7334	284,0319	489,1304	787,0222
0,9293333	25,74003	519,0513	504,7977	1084,746	66,15945	410,9116	504,7977	796,2903
1,239139	25,87322	735,5788	501,6584	1158,33	68,64989	550,7745	501,6584	796,9398
1,548917	25,96981	959,4802	515,2515	1262,645	67,98317	706,4472	515,2515	811,3268
1,858694	26,01626	1222,306	520,0655	1362,276	67,32928	875,513	520,0655	823,3058
2,168472	27,7551	1474,324	520,3252	1508,025	66,58212	1060,348	520,3252	806,2992
2,47825	26,13098	1715,163	521,0016	1630,071	68,96552	1238,548	521,0016	810,388
2,788028	26,14379	2005,291	540,6488	1735,905	65,13647	1424,232	540,6488	822,9426
3,097806	27,66927	2337,013	539,2545	1907,578	64,41718	1609,002	539,2545	842,8881
3,407583	29,35421	2638,936	542,4528	2049,301	69,71809	1778,669	542,4528	831,5301
3,717361	27,64677	2971,551	538,4315	2173,754	69,06907	1960,784	538,4315	838,4521
4,027167	27,33119	3308,186	557,2756	2363,438	71,17438	2112,583	557,2756	860,9069
4,336945	27,39726	3616,022	565,9656	2467,438	67,31051	2307,945	565,9656	866,9109
4,646722	27,10892	3966,361	568,3971	2725,638	66,43559	2458,374	568,3971	874,0516
4,956528	27,03992	4313,051	570,5706	2785,892	68,41505	2614,634	570,5706	871,1434
5,266305	26,80543	4636,749	562,1743	2962,177	67,58659	2784,238	562,1743	878,724

5,576083	28,12061	4925,884	572,5895	3168,595	72,18212	2928,709	572,5895	893,2853
5,885861	27,81641	5254,853	606,3947	3365,752	71,23287	3148,325	606,3947	910,7197
6,195667	27,48511	5567,25	597,2324	3530,423	67,60411	3301,587	597,2324	925,3198
6,505445	27,13295	5878,415	597,6096	3674,165	69,37033	3433,165	597,6096	932,7806
6,81525	26,73003	6078,174	607,0402	3722,579	65,84145	3586,854	607,0402	934,0012
7,125278	29,20987	6298,868	618,9968	3920,587	70,14809	3697,139	618,9968	950,9833
7,435056	27,19725	6483,586	625,2208	4056,728	74,37804	3852,814	625,2208	964,0666
7,744861	25,22068	6773,274	629,5908	4159,321	75,91093	3935,583	629,5908	977,8812
8,054639	28,92562	6886,184	645,6091	4286,637	72,42757	4054,878	645,6091	985,793
8,364417	28,42832	7145,596	639,1752	4368,808	69,1358	4179,286	639,1752	989,3279
8,674194	26,21919	7312,272	636,2708	4439,193	70,69722	4231,116	636,2708	991,6642
8,984	25,93697	7441,969	638,9453	4591,391	69,87952	4393,894	638,9453	1001,717
9,293777	25,36462	7621,77	647,2166	4648,582	73,8271	4489,008	647,2166	1002,563
9,603583	26,07724	7801,826	654,485	4693,691	72,95834	4592,439	654,485	1015,891
9,913362	25,52881	7911,807	662,4918	4747,141	72,10979	4687,775	662,4918	1049,208
10,22317	23,79536	8068,232	669,0718	4834,477	71,4615	4772,728	669,0718	1054,412
10,53294	24,47267	8083,081	683,069	4888,169	70,64722	4887,218	683,069	1044,064
10,84272	23,98082	8196,091	658,9521	5013,085	72,1208	4945,402	658,9521	1052,337
11,15253	23,47418	8324,712	675,6324	4987,036	73,61142	5014,302	675,6324	1060,564
11,46231	23,02632	8531,469	677,8588	5052,631	72,79947	5089,413	677,8588	1077,778
11,77211	22,45989	8521,497	685,5346	5076,1	72,09962	5158,013	685,5346	1068,956
12,08189	22,18935	8643,791	684,375	5229,613	71,36678	5201,794	684,375	1085,036
12,39167	22,79084	8741,916	698,1074	5206,839	70,75471	5292,316	698,1074	1090,308
12,70144	21,45046	8779,61	688,6967	5226,281	70,09345	5370,78	688,6967	1100,741
13,01125	22,0088	8857,426	688,9161	5325,412	71,50368	5414,258	688,9161	1116,279

13,32103	21,96047	8908,948	696,8959	5337,079	68,85041	5430,681	696,8959	1110,505
13,63081	21,94952	8962,337	703,9275	5328,738	70,30604	5532,03	703,9275	1137,415
13,94058	21,09281	9145,637	712,9964	5340,671	67,72009	5540,541	712,9964	1144,872
14,25039	20,12477	9186,969	713,6432	5381,61	71,23957	5628,357	713,6432	1153,846
14,56017	21,10341	9292,547	706,8607	5499,485	70,60722	5635,344	706,8607	1155,508
14,86997	21,19713	9301,822	720,1889	5459,184	70,0841	5714,286	720,1889	1171,559
15,17978	22,24469	9360,672	715,3327	5454,085	71,52792	5750,132	715,3327	1161,29
15,48956	22,27172	9452,207	735,337	5492,852	70,93596	5817,8	735,337	1179,625
15,79936	21,24861	9494,578	728,1694	5497,149	68,51997	5823,975	728,1694	1177,73
16,10914	22,32143	9487,039	729,3168	5579,96	68,01399	5842,434	729,3168	1197,221
16,41892	22,31011	9593,039	737,3271	5620,098	69,44444	5873,673	737,3271	1205,977
16,72869	23,37398	9538,129	742,8572	5593,59	70,89481	5908,974	742,8572	1212,041
17,0385	23,40729	9558,1	737,8917	5673,007	68,59756	5934,938	737,8917	1212,766
17,34828	22,42381	9617,573	753,7546	5776,769	70,10231	5922,058	753,7546	1243,028
17,65808	22,4444	9754,266	758,3874	5710,558	67,6819	5949,303	758,3874	1251,326
17,96786	23,48377	9738,9	759,5292	5694,084	69,10722	5965,178	759,5292	1259,926
18,27792	22,48569	9875,022	762,144	5813,084	70,61884	6067,839	762,144	1231,501
18,58772	23,51738	9895,725	763,6566	5749,768	68,29088	6055,458	763,6566	1261,88
18,89753	22,53637	9797,665	773,2816	5804,889	69,7888	6049,229	773,2816	1275,698
19,20731	23,51738	9860,621	754,6131	5810,439	67,55523	6130,23	754,6131	1280,295
19,51708	23,60185	9835,701	763,1073	5855,876	67,21163	6117,821	763,1073	1279,284
19,82689	24,65331	9977,856	768,8098	5797,56	68,65402	6204,864	768,8098	1300,92
20,13667	23,59942	9983,883	778,9013	5829,959	66,55874	6171,512	778,9013	1314,06
20,44647	24,67866	9945,162	777,9886	5921,464	67,92992	6187,226	777,9886	1317,24
20,75625	23,57282	9948,761	798,274	5799,956	67,55556	6212,084	798,274	1319,171

21,06606	24,7117	9977,396	808,7639	5898,852	67,24474	6199,324	808,7639	1328,616
21,37583	23,70401	9963,352	780,7888	5841,367	65,11792	6261,75	780,7888	1345,902
21,68561	24,75247	9994,189	787,9274	5831,515	68,37307	6248,203	787,9274	1339,262
21,99539	24,77036	10099,25	790,1038	5926,327	64,57243	6264,052	790,1038	1349,725
22,30519	24,74737	10034,6	786,1302	5878,175	67,59099	6283,06	786,1302	1351,281
22,615	25,82111	10110,03	795,4545	5914,83	67,42738	6280,285	795,4545	1372,908
22,92478	24,69644	10048,3	808,3202	5901,43	65,34824	6336,493	808,3202	1398,693
23,23458	25,82911	10067,66	797,9002	6034,812	65,14658	6334,2	797,9002	1395,349
23,54436	24,84472	10115,45	804,5977	5928,194	64,87963	6351,001	804,5977	1380,84
23,85414	23,81446	10160,53	803,2444	6005,046	66,32653	6362,784	803,2444	1381,562
24,16394	24,86531	10051,71	812,354	5962,343	66,00101	6342,549	812,354	1388,309
24,47375	25,91748	10063,62	833,9808	5998,751	64,09175	6298,974	833,9808	1405,434
24,78353	24,8911	10239,26	818,0645	5952,824	67,2495	6351,383	818,0645	1428,945
25,09331	23,64795	10037,64	803,7094	6078,795	66,9232	6388,246	803,7094	1438,267
25,40308	24,89885	10237,89	829,4813	6156,533	66,71114	6441,462	829,4813	1446,098
25,71289	25,90137	10189,47	828,2365	6029,772	66,37903	6495,845	828,2365	1421,492
26,02269	27,00457	10229,49	815,2866	6125,356	64,53748	6455,318	815,2866	1446,475
26,33247	25,98482	10152,98	832,9088	6248,226	66,10478	6468,427	832,9088	1477,807
26,64225	25,99563	10327,45	835,6546	6234,132	65,78947	6478,809	835,6546	1496,084
26,95205	27,0439	10174,41	845,1417	6216,325	65,57377	6560,858	845,1417	1507,708
27,26186	27,0439	10339,26	846,3871	6201,162	67,02632	6485,747	846,3871	1518,557
27,57164	26,00104	10283,47	847,9678	6340,782	65,10416	6497,843	847,9678	1530,426
27,88142	26,98775	10334,51	845,4227	6202,104	64,90346	6549,535	845,4227	1503,268
28,19122	28,08112	10264,25	851,0107	6202,607	68,00518	6555,078	851,0107	1519,749
28,501	27,06923	10223,97	856,3605	6225,857	64,47453	6543,154	856,3605	1523,785

28,81078	27,03827	10271,03	859,9752	6308,87	62,75141	6580,965	859,9752	1533,63
29,12058	25,97403	10311,82	860,96	6292,091	67,24303	6566,156	860,96	1549,333
29,43061	27,04671	10318,25	856,1559	6256,58	65,49521	6606,742	856,1559	1535,443
29,74042	26,03895	10278,12	855,6676	6166,505	65,31783	6523,788	855,6676	1571,092
30,05019	27,11157	10153,87	858,3375	6252,423	63,63347	6592,841	858,3375	1556,604
30,35997	27,0186	10269,5	853,9271	6285,218	64,9145	6555,58	853,9271	1554,798
30,66978	28,09573	10274,35	869,2458	6430,775	63,29114	6607,262	869,2458	1586,677
30,97958	27,12289	10180,24	868,0809	6268,972	63,07159	6528,613	868,0809	1583,093
31,28936	27,13704	10233,11	861,3958	6234,189	66,1105	6543,594	861,3958	1600,526
31,59914	27,13704	10019,19	873,3624	6346,117	64,29356	6578,597	873,3624	1602,733
31,90895	28,18372	10169,43	870,4062	6380,625	64,08253	6540,168	870,4062	1590,849
32,21875	28,16901	10210,57	881,2168	6332,509	65,55331	6554,622	881,2168	1591,686
32,52853	27,15972	10235,71	869,5652	6414,094	63,84304	6628,319	869,5652	1591,568
32,83831	29,17883	10123,82	870,9213	6359,69	65,21739	6613,616	870,9213	1614,776
33,14811	28,15139	10089,31	899,9521	6319,925	66,61503	6629,932	899,9521	1659,631
33,45789	28,06653	10065,58	893,8815	6481,76	66,45032	6627,779	893,8815	1645,102
33,76767	28,21906	10048,8	879,8283	6402,999	63,19359	6627,805	879,8283	1638,911
34,07747	28,21317	10086,93	898,2607	6517,459	64,60545	6603,732	898,2607	1668,871
34,38736	26,09059	9984,752	885,7754	6389,096	62,9317	6667,398	885,7754	1662,255
34,69714	29,17274	10123,55	889,2578	6430,7	62,81599	6580,447	889,2578	1682,144
35,00694	29,27033	9919,151	895,7693	6434,815	64,13193	6573,243	895,7693	1670,644
35,31672	29,20317	9930,582	909,9481	6442,219	62,52859	6593,046	909,9481	1678,173
35,6265	28,24268	10008,39	902,9081	6448,391	65,33961	6629,508	902,9081	1723,863
35,93631	29,27645	9883,987	914,0038	6441,4	62,37639	6674,678	914,0038	1704,848
36,24608	28,13966	9874,084	893,9855	6559,912	63,67495	6577,855	893,9855	1690,667

36,55589	28,00249	9728,986	885,721	6507,557	62,05539	6622,271	885,721	1691,609
36,86567	31,19476	9851,077	888,2656	6523,896	60,43209	6711,672	888,2656	1705,489
37,17545	28,18372	9781,529	908,8796	6446,038	61,74699	6575,164	908,8796	1683,195
37,48522	28,25154	9814,348	924,253	6538,532	61,67268	6678,276	924,253	1737,846
37,79503	28,14846	9886,225	901,0887	6445,055	59,96103	6644,208	901,0887	1725,438
38,1048	29,27033	9740,398	912,2402	6508,952	61,36806	6613,745	912,2402	1729,161
38,41461	29,3071	9838,784	909,3002	6456,736	61,23973	6696,351	909,3002	1754,054
38,72439	30,33473	9626,969	931,2486	6416,833	62,67722	6597,131	931,2486	1763,429
39,03417	29,18491	9646,052	916,3987	6701,256	59,5061	6669,562	916,3987	1793,966
39,34397	30,33156	9611,442	917,4312	6657,574	60,92125	6689,072	917,4312	1767,112
39,65375	29,26727	9614,473	911,7916	6615,301	60,86698	6678,238	911,7916	1786,105
39,96353	29,3163	9676,408	925,2507	6647,336	60,6868	6560,468	925,2507	1804,223
40,2733	28,22201	9624,837	929,4359	6601,449	62,19458	6642,811	929,4359	1835,948
40,58336	30,38877	9634,138	922,0986	6699,819	62,10262	6682,567	922,0986	1813,414
40,89314	30,2493	9521,22	923,1821	6636,512	60,43632	6636,304	923,1821	1816,925
41,20292	30,36649	9595,465	937,9248	6636,593	60,41851	6663,778	937,9248	1856,47
41,51272	29,33473	9474,895	943,0122	6751,489	60,22327	6666,667	943,0122	1882,288
41,8225	30,37603	9518,774	935,9495	6649,243	61,62876	6665,223	935,9495	1854,12
42,13231	29,26116	9585,953	952,2737	6676,264	61,52945	6785,019	952,2737	1913,529
42,44208	30,37603	9523,846	931,5931	6724,82	60,01171	6785,019	931,5931	1926,195
42,75189	31,31851	9548,872	942,1265	6753,013	61,35866	6700,584	942,1265	1884,099
43,06167	31,35452	9566,452	967,4523	6849,955	62,69136	6796,537	967,4523	1928,151
43,37147	30,38877	9428,11	950,783	6726,458	59,74064	6837,088	950,783	1909,449
43,68125	31,24349	9473,28	953,125	6690,002	59,58437	6748,917	953,125	1912,261
43,99103	30,40151	9496,967	955,0311	6788,53	60,98446	6790,899	955,0311	1956,583

44,30083	29,35318	9512,795	955,9804	6733,524	62,34595	6832,069	955,9804	1911,889
44,61061	30,39195	9585,03	964,2302	6949,759	60,79027	6750,488	964,2302	1973,945
44,92039	31,40375	9556,324	966,7405	6894,521	60,73753	6791,676	966,7405	1976,744
45,23019	30,40151	9505,461	952,803	6982,99	59,1716	6905,587	952,803	1948,864
45,53997	30,40788	9647,557	979,4838	6887,062	60,47516	6869,848	979,4838	1973,834
45,84975	30,30936	9528,614	980,9987	6928,711	60,44905	7002,169	980,9987	1998,29
46,15953	30,4047	9532,552	990,2956	6923,627	61,84381	6874,864	990,2956	1991,429