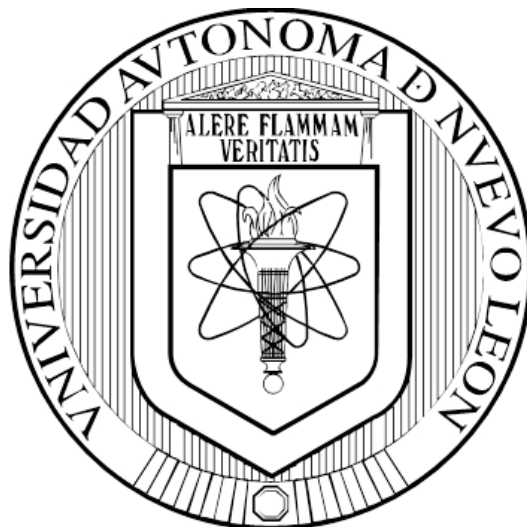


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**DISEÑO DE 3 GENES SINTÉTICOS Y CONSTRUCCIÓN DE UNA
CEPA DE *Escherichia coli* C COMO PLATAFORMA PARA LA
PROPAGACIÓN DEL BACTERIOFAGO ϕ X174 RECOMBINANTE**

POR

L.B.G. FRANCISCO DE JESÚS BALDERAS CISNEROS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA APLICADA

FEBRERO, 2018

**DISEÑO DE 3 GENES SINTÉTICOS Y CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE
Escherichia coli C COMO PLATAFORMA PARA LA PROPAGACIÓN DEL
BACTERIÓFAGO ϕ X174 RECOMBINANTE**

Revisión de Tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Asesor de Tesis

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Comité tutorial

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

Comité tutorial

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado

Comité tutorial

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén Morones por ser mi guía y apoyarme tanto en la realización del proyecto, como en la escritura de esta tesis.

A los miembros de mi comité: La Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio, Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado y el Dr. José Alberto Gómez Treviño por compartir su experiencia conmigo al darme invaluable consejos para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencias Químicas por permitirme trabajar en su laboratorio y por el apoyo con reactivos para la realización de este proyecto y a CONACyT por el apoyo económico fundamental para el desarrollo de este proyecto.

A mis Padres, Elisa Cisneros y Josué Balderas que son los pilares en mi formación. Sin ellos nada sería posible. A María Alicia Hernández Padilla por su apoyo emocional que fue fundamental en todo el tiempo de la realización de este proyecto.

A mis compañeros de generación: Lorelay, Norberto, Silvia, David, Elida, Ricardo, Arlette y Annette por todo este tiempo compartido.

A mis compañeros de laboratorio: Albert, Jordy, Javier, Ximena, Dagoberto, Alan Pepi, Luis, Hossein, Alex, Enrique y Alma, por sus ideas, por los buenos momentos y por las discusiones para mejorar el proyecto. A Lilia Esparza por su amistad, por su tiempo, por su paciencia y por todo el apoyo técnico durante este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO	4
LISTAS DE TABLA	6
LISTAS DE FIGURAS	7
NOMENCLATURA	9
RESUMEN	11
Capítulo 1	12
INTRODUCCIÓN	12
Capítulo 2	15
Antecedentes	15
2.1. Historia de los Antibióticos.....	15
2.2. Mecanismos de resistencia	18
2.3. Producción de nuevos antibióticos	20
2.4. Alternativas para los antibióticos	21
2.5. Bacteriófagos y terapia de fagos	22
2.6. Bacteriófago ϕ X174	28
2.7. Bacteriófagos genéticamente modificados y sus aplicaciones.....	30
2.8. Péptidos antimicrobianos.....	34
2.9. Bactenicina 7	37
Capítulo 3	40
Enfoque, hipótesis y objetivos	40
2.1. Enfoque	40
2.2. Hipótesis.....	42
2.3. Objetivo general	42
2.4. Objetivos específicos	42
Capítulo 4	43
Metodología	43
4.1. Materiales y equipo.....	43
4.2. Material biológico	46
4.3. Estrategia general.....	47
4.4. Diseño de genes sintéticos	49
4.5. Diseño de primers	49
4.6. Construcción de la cepa <i>E. coli</i> C pKM208.....	50
4.6.1. Extracción de pKM208.....	50
4.6.2. Caracterización del plásmido pKM208 por PCR.....	51
4.6.3. Remoción de fragmentos pequeños de ácidos nucleicos mediante precipitación con Cloruro de Litio (LiCl).....	53
4.6.4. Preparación y transformación de <i>E. coli</i> C electrocompetentes con pKM208	54

4.6.5.	Extracción de DNA plasmídico y caracterización de <i>E. coli</i> C pKM208 mediante PCR..	55
4.7.	Construcción de la cepa <i>E. coli</i> DH5 α pUC57genF	57
4.7.1.	Resuspensión del plásmido pUC57genF	57
4.7.2.	Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5 α y transformación con el vector pUC57genF.....	57
4.7.3.	Extracción, purificación y caracterización del vector pUC57genF mediante PCR	58
4.8.	Síntesis del fragmento genF mediante PCR de alta fidelidad.....	60
4.9.	Construcción de la cepa <i>E. coli</i> DH5 α pUC57cl.....	62
4.9.1.	Resuspensión del vector pUC57cl	62
4.9.2.	Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> DH5 α y transformación con el vector pUC57cl.....	62
4.9.3.	Extracción, purificación y caracterización del vector pUC57cl mediante PCR.....	63
4.10.	Síntesis de la pieza sintética cl mediante PCR de alta fidelidad	64
4.11.	Construcción del fragmento genF-cl	66
4.11.1.	Purificación del fragmento genF-cl.....	67
4.11.2.	PCR de alta fidelidad del fragmento genF-cl	67
4.11.3.	Purificación del fragmento genF-cl.....	69
4.12.	Integración del fragmento genF-cl en el cromosoma de <i>E. coli</i> C	70
4.12.1.	Prueba de infección de la cepa <i>E. coli</i> C genF-cl con el bacteriófago ϕ X174	72
Capítulo 5.....	73	
Resultados	73	
5.1.	Diseño de genes sintéticos	73
5.1.1.	Diseño de genF	73
5.1.2.	Diseño de la pieza cl	74
5.1.3.	Diseño de la pieza Bac7.	75
5.2.	Construcción de <i>E. coli</i> C pKM208.....	76
5.2.1.	Extracción y caracterización del vector pKM208.....	76
5.2.2.	Transformación y caracterización de <i>E. coli</i> C pKM208.....	78
5.3.	Construcción de <i>E. coli</i> DH5 α pUC57genF.....	81
5.3.1.	Transformación y caracterización de <i>E. coli</i> DH5 α pUC57genF.....	81
5.4.	Construcción de <i>E. coli</i> DH5 α pUC57cl.....	84
5.4.1.	Transformación y caracterización de <i>E. coli</i> DH5 α pUC57genF.....	84
5.5.	Construcción del fragmento genF-cl	87
5.5.1.	Síntesis de los fragmentos genF y cl	87
5.5.2.	PCR overlap.....	88
5.6.	Construcción de la cepa <i>E. coli</i> C genF-cl.....	92
5.6.1.	Infección de la cepa <i>E. coli</i> C genF-cl con ϕ X174	94
Capítulo 6.....	95	
DISCUSIÓN	95	
Capítulo 7.....	102	
CONCLUSIONES	102	
Capítulo 8.....	103	
REFERENCIAS.....	103	

LISTAS DE TABLA

Tabla 1. Coctel de la reacción de PCR para la caracterización del vector pKM208 utilizando los primers 5'pKM208 y 3'pKM208.....	52
Tabla 2. Coctel de la reacción de PCR para la caracterización del vector pKM208 utilizando los primers 5'pKM208 y 3'pKM208.....	56
Tabla 3. Coctel de la reacción de PCR para la caracterización del vector pUC57GenF utilizando los primers IdGenFf e IdGenFr.....	60
Tabla 4. Coctel de la reacción de PCR para la síntesis del gen sintético "genF" utilizando los primers ExtGenFf y OvergenFclr.....	61
Tabla 5. Coctel de la reacción de PCR para la caracterización del vector pUC57cl utilizando los primers IdReplf e IdRepLr.....	64
Tabla 6. Coctel de la reacción de PCR para la síntesis del gen sintético "cl" utilizando los primers OvergenFclf y ExtRepLr.....	65
Tabla 7. Coctel de la reacción de PCR para la síntesis del fragmento "genF-cl" utilizando los primers ExtgenFf y ExtRepLr.....	66
Tabla 8. Coctel de la reacción de PCR para la síntesis del fragmento "genF-cl" utilizando los primers ExtgenFf y ExtRepLr.....	68

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrategia general para la construcción de *E. coli C* *genF-cl*. En primer lugar, se diseñaron las 3 secuencias (*genF*, *cl* y *Bac7*), posteriormente se unieron los fragmentos *genF* y *cl* mediante la técnica de PCR overlap y finalmente, utilizando la técnica lambda red, se creó *E. coli C genF-cl*. 48
- Figura 2.** Estructura de la pieza “Gen F”. Las flechas moradas ejemplifican primers de extensión que hacen posible la producción de más piezas mediante PCR. Las flechas naranjas ejemplifican los primers de identificación que facilitan la selección de la cepa transformada con esta pieza. Brazo homólogo de 50 pb. RBS: Sitio de unión a ribosoma. Gen F: Marco de lectura abierto que codifica para la proteína F mayor de la cápside del bacteriófago ϕ X174. Ter: Terminador de la transcripción. Secuencias de 50 pb que son exactamente iguales a donde se integrará en el genoma de *E. coli C* mediante recombinación homóloga. 74
- Figura 3.** Estructura de la pieza “cl”. Las flechas moradas ejemplifican primers de extensión que hacen posible la producción de más piezas mediante PCR. Las flechas naranjas ejemplifican los primers de identificación que facilitan la selección de la cepa transformada con esta pieza. Brazo homólogo de 50 pb. RBS: Sitio de unión a ribosoma. cl: Marco de lectura abierto que codifica para la proteína represora λ . Ter: Terminador de la transcripción. Brazos homólogos: Secuencias de 50 pb que son exactamente iguales a donde se integrará en el genoma de *E. coli C* mediante recombinación homóloga..... 75
- Figura 4.** Estructura de la pieza “Bac7”. Las flechas moradas ejemplifican primers de extensión que hacen posible la producción de más piezas mediante PCR. Las flechas naranjas ejemplifican los primers de identificación que facilitan la selección de la cepa transformada con esta pieza. RBS: Sitio de unión a ribosoma. cl: Marco de lectura abierto que codifica para la proteína represora λ . Bac7(1-35): Marco de lectura abierta que codifica para el péptido antimicrobiano. Ter: Terminador de la transcripción. Brazos homólogos: Secuencias de 50 pb que son exactamente iguales a donde se integrará en el genoma de *E. coli C* mediante recombinación homóloga. 76
- Figura 5.** Análisis del DNA plasmídico aislado de *E. coli DH5 α* transformadas con el vector pKM208. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Ready-to-Use TM Plus 100 bp DNA Ladder. Carril 1-6: DNA plasmídico de pKM208..... 77
- Figura 6.** Análisis del ensayo de PCR del DNA plasmídico aislado de las clonas de *E. coli DH5 α* transformadas con el vector pKM208 utilizando los primers: 5’pKM208 y 3’pKM208, específicos para amplificar una secuencia interna del gen *exo*. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Ready-to-Use TM Plus 100 bp DNA Ladder. Carril 1: Producto de PCR. Carril 2: Control negativo. 78
- Figura 7.** Análisis del vector pKM208 purificado, después del tratamiento para la remoción de fragmentos pequeños. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular PCR DNA Ladder. Carril 1: Vector pKM208 (M1). Carril 2: Vector pKM208 (C1). Carril 3: Vector pKM208 (M3)..... 79
- Figura 8.** Análisis del ensayo de PCR del DNA plasmídico aislado de las colonias de *E. coli C* transformadas con el vector pKM208 utilizando los primers: 5’pKM208 y 3’pKM208, específicos para amplificar una secuencia interna del gen *exo*. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Ready-to-Use TM Plus 100 bp DNA Ladder. Carril 1: DNA plasmídico aislado de la colonia 1. Carril 2: DNA plasmídico de la colonia 2. Carril 3: DNA plasmídico de la colonia 3. Carril 4: Control negativo. Carril 5: DNA plasmídico aislado de *E. coli DH5 α* 80
- Figura 9.** Crecimiento de colonias transformadas con el vector pUC7*genF*. Las placas correspondientes a control negativo, F1 y F2 contienen ampicilina mientras en la caja Petri correspondiente a la viabilidad no contiene ampicilina. Al no presentarse crecimiento en la caja Petri de control negativo y crecimiento en las cajas Petri correspondientes a F1 y F2, indica que muy probablemente estas colonias incorporaron el vector pUC57*genF* 81

Figura 10. Análisis del DNA plasmídico aislado de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con el vector pUC57genF. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1-3: Vector pUC57genF.	82
Figura 11. Análisis del ensayo de PCR del DNA plasmídico aislado de las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con el vector pUC57genF utilizando los primers: IdGenFf y IdGenFr específicos para amplificar una secuencia interna del gen F. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1-5: DNA plasmídico aislado de diferentes colonias. Carril 6: Control negativo. Carril 7: Control positivo, pUC57genF enviado por la compañía.	83
Figura 12. Crecimiento de colonias transformadas con el vector pUC7cl. Las placas correspondientes a control negativo, R1 y R2 contienen ampicilina mientras en la caja Petri correspondiente a la viabilidad no contiene ampicilina. Al no presentarse crecimiento en la caja Petri de control negativo y crecimiento en las cajas Petri correspondientes a R1 y R2, indica que muy probablemente estas colonias incorporaron el vector pUC57cl.	84
Figura 13. Análisis del DNA plasmídico aislado de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con el vector pUC57cl. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1-7: Vector pUC57cl.	85
Figura 14. Análisis del ensayo de PCR del DNA plasmídico aislado de las colonias de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con el vector pUC57cl utilizando los primers: IdRepLf y IdRepLr específicos para amplificar una secuencia interna del gen cl. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1-3: DNA plasmídico aislado de diferentes colonias. Carril 4: Control negativo. Carril 5: Control positivo: pUC57cl enviado por la compañía.	86
Figura 15. Análisis del ensayo de PCR de alta fidelidad del DNA plasmídico del vector pUC57genF utilizando los primers: ExtGenFf y OvergenFclr y del vector pUC57cl utilizando los primers: OvergenFclf y pUC57cl. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: Fragmento genF. Carril 2: Control negativo genF. Carril 3: Fragmento cl. Carril 4: Control negativo cl.	87
Figura 16. Análisis del ensayo de PCR overlap utilizando los primers ExtGenFf y ExtRepLr. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: PCR overlap. Carril 2: Control negativo.	88
Figura 17. Análisis de la integridad del fragmento genF-cl purificado. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: fragmento genF-cl.	89
Figura 18. Análisis del ensayo de PCR de alta fidelidad del fragmento genF-cl utilizando los primers ExtGenFf y ExtRepLr. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: Fragmento genF-cl. Carril 2: Control negativo.	90
Figura 19. Análisis del producto amplificado genF-cl purificado con el kit SureClean plus. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: Fragmento genF-cl.	91
Figura 20. Cajas Petri para la selección de <i>E. coli</i> C transformada. A la izquierda <i>E. coli</i> C sin transformar. A la derecha <i>E. coli</i> C transformada. La flecha roja señala una colonia blanca que fue transformada. Ambas cajas Petri contienen Agar LB 2% con IPTG 1mM, X-Gal (100 ng/ μ L).	92
Figura 21. Cajas Petri con agar LB 2% IPTG 1mM X-Gal 100 ng/mL. En la imagen de la izquierda (control negativo) se observan colonias de <i>E. coli</i> C de color azul, debido a que pueden hidrolizar el X-Gal. En la imagen de la derecha se observan colonias de <i>E. coli</i> C genF-cl (transformada) de color blanco debido a su incapacidad de hidrolizar el X-Gal.	93
Figura 22. Pruebas de infección de diferentes cepas de <i>E. coli</i> con el bacteriófago ϕ X174. <i>E. coli</i> C presentó lisis (control negativo). La cepa <i>E. coli</i> C pKM208 fue de donde se partió para realizar la transformación. La cepa <i>E. coli</i> C genF-cl presenta lisis en menor medida que la cepa <i>E. coli</i> C y <i>E. coli</i> C pKM208. <i>E. coli</i> DH5 α no presentó lisis (control negativo).	94

NOMENCLATURA

pb:	Pares de bases
kb:	Kilobase
RBS:	Sitio de unión a ribosoma
lac:	Promotor del operón lac
lacUV5	Promotor del operon lac con una mutación en -10 que permite la unión de la RNA polimerasa sin la necesidad de la unión de la lactosa.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>cI</i>	Gen que codifica para la proteína represora de lambda
pR	Promotor del fago lambda
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
°C	Grados centígrados
mL	Mililitros
mm	Milímetros
μL	microlitros
<i>E. coli</i>	Microorganismo <i>Escherichia coli</i>
g	Gravedad
%	Porcentaje
LB	Luria-Bertani
rpm	Revoluciones por minuto
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanometros
Ω	ohms
ng	Nanogramos
C(-)	Control negativo
C(+)	Control positivo
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
MOPS	3-(n-morfolino)ácido propanesulfónico
ms	Milisegundos
RNAsa	Ribonucleasa

ng/μL	Nanogramos por microlitro
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
<i>et., al.</i>	Y otros
g	Gramos
HCl	Ácido Clorhídrico
L	Litros
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	National Center of Biotechnology Information
pH	Potencial de hidrógeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TE	Buffer amortiguador de pH Tris-EDTA
Tris	Trizma o tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades
X	Número de veces la concentración
μ	Micro
PFU	Unidades formadoras de placas
PFU/mL	Unidades formadoras de placas por mililitro
DNAsa	Desoxirribunucleasa

RESUMEN

Francisco de Jesús Balderas Cisneros

Fecha de graduación: Febrero, 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: DISEÑO DE 3 GENES SINTÉTICOS Y CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA DE *Escherichia coli* C COMO PLATAFORMA PARA LA PROPAGACIÓN DEL BACTERIÓFAGO ϕ X174 RECOMBINANTE

Número de páginas: 109

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Biología sintética

Propósito y Método del Estudio: La resistencia a antibióticos es un problema grave que va en aumento con el pasar de los años. Debido a la resistencia a antibióticos, es necesario encontrar métodos alternos para tratar las infecciones causadas por esas bacterias. Los bacteriófagos, son virus que infectan bacterias, son altamente específicos y no causan daños a los humanos y pueden ser usados para contrarrestar infecciones causadas por bacterias que son resistentes a antibióticos. En el presente trabajo se diseñaron 3 genes sintéticos: cI, genF y Bac7. Se construyó una cepa de *Escherichia coli* integrando los genes sintéticos repL, que codifica la proteína del represor lambda, que evita la producción del péptido antimicrobiano y genF que codifica para la proteína F para que el bacteriófago sea capaz de completar su empaquetamiento. Esta cepa funcionará como plataforma para la construcción y propagación del bacteriófago ϕ X174 recombinante

Contribuciones y Conclusiones: Se diseñaron 3 piezas sintéticas utilizando diferentes programas bioinformáticos que funcionan como un circuito para la modificación y propagación del bacteriófago ϕ X174. Se realizó la técnica PCR overlap para unir a las piezas gen F y cI, formando un fragmento de 2,388 pb. Se logró integrar el fragmento genF-cI en el genoma de *Escherichia coli* C utilizando la técnica λ -red sustituyendo las primeras 2,388 pb del marco de lectura abierto de lacZ. Se seleccionaron las cepas correctamente transformadas utilizando la técnica de selección de colonias azules/blancas. Se confirmó la presencia en el genoma de la pieza genF-cI mediante PCR.

FIRMA DEL ASESOR: _____

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

La resistencia de las bacterias patógenas es un problema a nivel global que sigue en aumento ya que éstas generan resistencia a los antibióticos disponibles más rápido de lo que se consigue desarrollar nuevos antibióticos en su contra (Morel & Mossialos, 2010). La crisis de la resistencia a antibióticos se ha atribuido al mal uso de estos medicamentos (Ventola, 2015).

Las bacterias tienen la habilidad natural de adquirir resistencia mediante diferentes mecanismos tales como: Intercambio de material genético con otras bacterias resistentes a antibióticos, a diversos factores ambientales a los que se exponen y a través del fenómeno de selección natural. La adquisición de resistencia de estos microorganismos es inevitable ya que es un aspecto clave de la evolución, por lo que es incontrolable (de León-Rosales, Arredondo-Hernández, & López-Vidal, 2015). Debido al rápido aumento de microorganismos patógenos a antibióticos y las dificultades que conlleva el desarrollo de nuevos antibióticos, se han buscado formas alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos, entre las cuales se encuentran: Anticuerpos, probióticos, lisinas, bacteriófagos silvestres, bacteriófagos genéticamente modificados, estimulación del sistema inmune, vacunas, péptidos antimicrobianos, péptidos de defensa del huésped y de defensa innata y péptidos antibiofilm (Czaplewski et al., 2016).

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y tienen numerosas aplicaciones en diferentes campos como: Medicina, agricultura e investigación. En la era post antibióticos, en donde los microorganismos presentan resistencia a estos fármacos, los bacteriófagos toman una gran importancia, debido a que son capaces de lisar o eliminar células bacterianas con pocos efectos negativos, con mayor especificidad y con menor probabilidad de generar resistencia que los antibióticos (Casto et al., 2016).

Otra alternativa, los péptidos antimicrobianos son producidos por una gran variedad de microorganismos como parte de su primera línea de defensa. Son de cadena corta (12 a 100 aminoácidos), tienen cargas positivas (carga total de +2 a +9), son anfifílicos y han sido aislados de microorganismos unicelulares, insectos y otros invertebrados, plantas, anfibios, pájaros, peces y mamíferos, incluyendo humanos (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006).

Con la amplia gama de posibilidades que ofrecen las técnicas de ingeniería genética que se han desarrollado hasta ahora, se han realizado modificaciones genéticas en bacteriófagos para controlarlos con precisión, detectar bacterias y como nueva alternativa a los antibióticos. En aplicaciones que van más allá de su uso como agentes antimicrobianos, también se utilizan como vehículos para la entrega de medicamentos y vacunas y el ensamblaje de nuevos materiales (Pires, Cleto, Sillankorva, Azeredo, & Lu, 2016).

En este trabajo, se realizará una modificación genética al bacteriófago ϕ X174 para controlar su replicación e introducir una secuencia que codifica para el péptido antimicrobiano Bac7(1-35) en su genoma, con la finalidad de causar la muerte de las bacterias sin la producción de nuevas partículas virales. Se combinarán las alternativas del uso de bacteriófagos y péptidos antimicrobianos empleando técnicas de ingeniería genética, para eliminar bacterias resistentes a antibióticos.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1. Historia de los Antibióticos

Los antibióticos son agentes químicos que han funcionado como una poderosa herramienta en el tratamiento clínico y la principal línea de defensa contra las infecciones bacterianas desde hace más de 50 años (Sengupta, Chattopadhyay, & Grossart, 2013). El término antibiótico, viene de la palabra “antibiosis”, usada como antónimo de “simbiosis”. Posteriormente, la palabra antibiótico tomó un contexto diferente, el cual describía la producción natural de metabolitos secundarios por hongos y bacterias que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento (bacteriostático) o de matar (bactericida) contra hongos o bacterias (Nicolaou & Rigol, 2017). Aunque los antibióticos han sido utilizados en casos clínicos a la mitad del siglo pasado, el uso de microorganismo para tratar infecciones microbianas en antiguo Egipto, Grecia, China y otros lugares del mundo está bien documentada (Sengupta et al., 2013). Contrario al pensamiento común de que la exposición a antibióticos es exclusiva de la “era de antibióticos”, diferentes investigaciones han revelado que esto no es verdad; se han encontrado rastros de tetraciclina, por ejemplo, en un esqueleto humano encontrado en la región antigua de Nubia (Sur de Egipto) perteneciente a fechas entre el 350-550 D.C (Aminov, 2010).

Antes de la era de los antibióticos, la tasa de mortalidad causada por la infección de *Pneumococcal pneumonia* y *Acute pyelonephritis* eran del 30-35% y aproximadamente 20% respectivamente y la única “terapia” para estas enfermedades infecciosas era el aislamiento del paciente (Ashkenazi, 2013). En 1904, justo antes de la era moderna de los antibióticos, las enfermedades infecciosas, como la sífilis, causada por el microorganismo *Treponema pallidum*, era usualmente tratada con sales inorgánicas de mercurio, pero el tratamiento tenía efectos secundarios severos y poca eficacia (Aminov, 2010). La era moderna de los antibióticos comienza con el descubrimiento fortuito de la penicilina a partir de un cultivo filtrado del hongo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming en 1928 (Sengupta et al., 2013) que logró, con éxito, controlar infecciones bacterianas en los soldados en la segunda guerra mundial. Los Antibióticos fueron tan exitosos que fueron considerados como la “cura definitiva”, los “medicamentos milagrosos” que el mundo necesitaba. Como resultado del éxito de los antibióticos en su inicio, ingenuamente, se consideró a las enfermedades bacterianas como permanentemente controladas (Penesyan, Gillings, & Paulsen, 2015). El mismo Alexandre Fleming advirtió que el uso indiscriminado de este antibiótico, llevarían a un rápido desarrollo de resistencia (de León-Rosales et al., 2015). Tiempo después, alrededor de 1950, la aparición de microorganismos patógenos resistentes a este antibiótico se convirtió en un problema clínico grave (Ventola, 2015). Sin embargo, durante los siguientes años, se descubrieron nuevos agentes antimicrobianos de diferentes clases que fueron introducidos en la práctica clínica cotidiana (Ashkenazi, 2013).

Entre 1960 y 1980, la industria farmacéutica introdujo una gran cantidad de nuevos antibióticos para resolver los problemas de resistencia, sin embargo, después de 1980, el descubrimiento de nuevos antibióticos disminuyó. Como resultado de lo anterior, en 2015, mucho tiempo después del primer paciente tratado con antibióticos, las infecciones bacterianas resistentes a antibióticos se han convertido en una amenaza otra vez (Ventola, 2015) y no se han visto cambios positivos en los últimos 2 años. Cada día se reporta que tanto bacterias comunes como no comunes que antes eran susceptibles a los antibióticos convencionales, adquieren resistencia a diferentes antibióticos. Inicialmente muchas de esas bacterias eran responsables de las infecciones nosocomiales y eran la causa de enfermedades y muerte de pacientes hospitalizados; recientemente se han esparcido a la población en general, causando enfermedades severas en personas sanas o que previamente no eran vulnerables (Alanis, 2005). Lo anterior, resulta en mayor morbilidad, mayor mortalidad, mayor costo en tratar enfermedades, una alta probabilidad en el esparcimiento de estas bacterias resistentes y en conjunto una disminución en el número de agentes antimicrobianos útiles para combatir las infecciones (Alanis, 2005).

2.2. Mecanismos de resistencia

La resistencia antimicrobiana puede ser clasificada de 2 formas: Endógena, por mutación y selección, o exógena, transmitida a patógenos humanos por organismos en el ambiente (productores de antibióticos, comensales, patógenos no humanos) por transferencia horizontal (Silver, 2011). Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos que conducen a la resistencia antibióticos. Los principales incluyen: La producción de enzimas que degrada o modifican a los antibióticos, cambios en la pared celular que disminuye la penetración de antibióticos, la producción de bombas de flujo que transportan el antibiótico del citosol hacia afuera de la célula, modificación del blanco que atacan los antibióticos y la creación de rutas metabólicas alternativas a aquellas que fueron atacadas por los antibióticos (Ashkenazi, 2013). Actualmente se ha enfatizado el rol que tienen la mutación en genes endógeno y la transferencia horizontal de genes en la propagación de la resistencia antibióticos en cepas que son de importancia clínica. La mayoría de los mecanismos que han jugado un papel importante en la resistencia a agentes mono terapéuticos estándar, han aparecido de esta forma (Silver, 2011). Probablemente, durante la era prebiótica, los genes de resistencia formaban parte del cromosoma y codificaban proteínas que cumplían funciones fisiológicas importantes. En la era post-antibióticos, los genes del resistoma fueron transferidos horizontalmente a nuevos huéspedes que no tenían los procesos bioquímicos y genéticos necesario, por lo que su función solo se limitó a la resistencia a antibióticos (Penesyan et al., 2015).

El nivel de resistencia que desarrollan las bacterias varía dependiendo del mecanismo de resistencia y las condiciones bajo las cuales la resistencia es medida. Algunos mecanismos de resistencia confieren niveles de resistencia que exceden la solubilidad límite del antibiótico, mientras que otros mecanismos de resistencia solo aumenta un poco la resistencia que solo pueden ser detectadas con “experimentos de tiempo de muerte” que mide la tasa a la cual las bacterias mueren durante la exposición a un antibiótico (Sommer, Munck, Toft-kehler, & Andersson, 2017). Como resultado del uso extendido de antibióticos en la medicina humana (Así como en tratamiento de animales, horticultura, apicultura y laboratorios donde practican ingeniería genética) la presión evolutiva para la emergencia de microorganismos resistentes a antibióticos ha aumentado. La adquisición de resistencia a antibióticos es un fenómeno natural y las bacterias han evolucionado para resistir la acción de antibacteriales naturales durante millones de años (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2011). Es importante tener un buen entendimiento de las bases moleculares del desarrollo de la resistencia porque nos permite desarrollar nuevos enfoques para tratar estas infecciones causadas por bacterias resistentes y por lo tanto creas nuevas estrategias para el desarrollo de nuevos tratamientos en contra de estas bacterias (Alanis, 2005).

2.3. Producción de nuevos antibióticos

La mayoría de los descubrimientos de antibióticos han sido fortuitos ya que se encontraron al buscar productos de fermentación o químicos de inhibición del crecimiento bacteriano (búsqueda empírica). Desde estos últimos descubrimientos en los 1980's, se carece de tecnología de vanguardia y esfuerzo para el diseño de nuevo antibacteriales (Silver, 2011). En 2004, solo el 1.6% de los medicamentos desarrollados por 15 de las compañías farmacéuticas más grandes, eran antibióticos. La falta de inversión para el desarrollo de nuevos antibióticos se debe a diferentes factores. En primer lugar, existen muchos antibióticos en el mercado que siguen siendo efectivos (a diferentes grados) para la mayoría de las infecciones y las autoridades de salud los prefieren como primer tratamiento (Morel & Mossialos, 2010). Las fuerzas económicas actúan en contra de la inversión para el desarrollo de nuevos antibacteriales. Desde su comienzo en los 1940's, la inversión en el descubrimiento y especialmente en la producción de nuevos antibióticos, más que otros medicamentos, se ha hecho por compañías farmacéuticas privadas (Alanis, 2005). Dimasi y colaboradores estimaron que producir y desarrollar un nuevo medicamento por la industria farmacéutica de estados unidos en el año 2000, costaba 802 millones de dólares desde el descubrimiento hasta la pre-aprobación (Dimasi, Hansen, & Grabowski, 2003).

2.4. Alternativas para los antibióticos

Debido al aumento en la resistencia y a los retos que conlleva el descubrimiento y desarrollo de agentes antimicrobianos, sería prudente considerar el potencial que tienen los enfoques no convencionales (Payne, Gwynn, Holmes, & Pompliano, 2007). Existen diferentes alternativas que se podrían utilizar para tratar infecciones de bacterias resistentes a antibióticos. Entre las más importantes están: Bacteriófagos silvestres, bacteriófagos modificados genéticamente, lisinas, probióticos, péptidos antimicrobianos, entre otros (Czaplewski et al., 2016). Son alternativas a largo plazo (10 o 15 años) a menos que se le imponga un gran esfuerzo y apoyo a estos proyectos desde este momento (O' Neill, 2016).

2.5. Bacteriófagos y terapia de fagos

Los bacteriófagos (fagos) son las entidades biológicas más abundantes en la tierra (Seed, Lazinski, Calderwood, & Camilli, 2013). Son parásitos intracelulares obligados de las bacterias y tienen diferentes ciclos de vida (Salmond & Fineran, 2015). Una sola partícula de fagos puede infectar a una especie específica de bacteria o a un grupo de la misma especie. Una vez que la célula es infectada, los fagos se multiplican exponencialmente utilizando la maquinaria celular de la bacteria incluyendo los sistemas de producción de proteínas y generación de energía. El método de propagación puede ser lítico o lisogénico. Los fagos líticos causan lisis de la bacteria huésped para liberar su progenie, mientras que los fagos lisogénicos (o temperados) integran su genoma dentro del genoma del huésped bacteriano y se replican junto al de la bacteria, lo que le confiere nuevas propiedades a la bacteria huésped (Sharma et al., 2017). Se estima que existen $>10^{30}$ fagos con cola en la biósfera y, como las partículas de fagos superan a las células procariontas por 10 veces en muestras ambientales, los bacteriófagos constituyen la mayoría de "organismos" en nuestro planeta (Brüssow & Hendrix, 2002). Todo el género bacteria, incluyendo cianobacterias, arqueobacterias y micoplasmas, son vulnerables a plétora de bacteriófagos (Sharma et al., 2017).

En el año de 1986, fue la primera vez que se reportó actividad antimicrobiana en agua del río Ganges y el río Yamuna en India por Ernest Hanbury Hankin. El agente antibacterial era filtrable, lábil al calor y tenía la capacidad de limitar la epidemia del cólera. Los fagos fueron descubiertos en 1915 de manera independiente, por Frederick Twort, un patólogo británico y en 1917 por Félix d'Herelle, un microbiólogo franco-canadiense. Twort, observó el fenómeno cuando crecía virus en el laboratorio, encontró zonas claras en cultivos de micrococcus, mientras que d'Herelle observó este fenómeno en una infección que causaba disentería hemorrágica en las tropas francesas y encontró el mismo fenómeno en 1910 cuando estudiaba cultivos de *Shigella* aislados de pacientes infectados en México. d'Herelle también propuso que el fenómeno era causado por virus que parasitaban bacterias y los nombró "bacteriófagos" (Sharma et al., 2017).

La habilidad de los fagos para infectar bacterias, llevo a d'Hérelle a examinar su potencial terapéutico contra las infecciones bacterianas (Salmond & Fineran, 2015). Después de estas observaciones, d'Herelle llevó su investigación a humanos. Primero, probó la seguridad de las suspensiones de bacteriófagos en el mismo, colegas y familia y después en pacientes que sufrían de "disentería bacilar" y cólera (Cisek, Dąbrowska, Gregorczyk, & Wyżewski, 2017). La terapia de fagos fue usada para prevenir y tratar enfermedades infecciosas en la Unión Soviética y Europa del Este, pero fue abandonada en occidente en 1940's en cuanto inició la era de los antibióticos (Matsuzaki et al., 2005). Los antibióticos se produjeron en gran cantidad, dejando la terapia de fagos obsoleta (Casto et al., 2016) pero la reciente emergencia de la resistencia bacteriana a los antibióticos obligó que los investigadores busquen métodos alternativos de tratamiento (Yosef, Kiro, Molshanski-mor, Edgar, & Qimron, 2014).

Durante la segunda guerra mundial, los aliados y el eje diferían en los métodos de tratamiento de infecciones bacterianas en sus soldados. Mientras que los científicos alemanes estudiaban fagos, los aliados eran altamente dependientes de los antibióticos, como la penicilina y amoxicilina (Summers, 2012). En los siguientes 40 años no se publicó ninguna investigación sobre la terapia de bacteriófagos; de cualquier manera, en las últimas décadas la terapia de bacteriófagos ha resurgido en el mundo occidental para combatir el problema urgente de la resistencia a antibióticos (Casto et al., 2016). El concepto tradicional de terapia de fagos en humanos es la administración de fagos virulentos (aislado de la naturaleza) directamente al paciente con la finalidad de lisar un patógeno bacteriano determinado que es responsable de una infección. Principalmente, se usa fagos líticos estrictos para la terapia, debido a la posibilidad de la transferencia de genes de virulencia en el genoma de la bacteria huésped cuando se realiza la terapia con fagos temperados (lisogénicos), aunque este fenómeno es muy raro (Viertel, Ritter, & Horz, 2014). La aparición de mutaciones que otorgan resistencia a antibióticos, favorecen la idea de que las bacterias también puedan desarrollar resistencia contra los bacteriófagos, pero a diferencia de los antibióticos, los bacteriófagos también pueden evolucionar (con tasa de mutación mucho más alta que las bacterias) y volver a tener la capacidad de infectar a las bacterias. Esto quiere decir que la resistencia bacteriana no es un problema tan grave cuando se habla de terapia de fagos (Domingo-Calap, Georgel, & Bahram, 2016).

La terapia de fagos se ha estudiado extensamente en el mundo occidental en las últimas décadas y mucho antes en Europa oriental. No existe ningún tipo de aplicación para humanos que hayan sido aprobadas o que estén en ensayos clínicos fase III en la Unión Europea o en EUA (Viertel et al., 2014), sin embargo, se han realizado pruebas clínicas controladas en humanos donde se demuestra que la terapia de fagos es segura. Por ejemplo, en un estudio en donde 15 adultos recibieron tratamiento con el bacteriófago T4, solo 5 reacciones adversas leves fueron observado y no se generaron anticuerpos contra T4. (Bruttin, Brüssow, & Bru, 2005). El tratamiento de infecciones nosocomiales (infecciones que comúnmente se adquieren en los hospitales) causadas por *Pseudomonas aeruginosa* es actualmente un gran reto. Altas tasas de morbilidad y mortalidad están relacionadas con esta infección, a la par de una gran probabilidad de que la bacteria adquiriera resistencia a los medicamentos durante el curso del tratamiento (Chatterjee et al., 2016). Con un alcance tan limitado para el desarrollo de nuevos antibióticos, los investigadores han encontrado éxito considerable en tratamientos alternativos, incluyendo los basados en bacteriófagos (Viertel et al., 2014).

Uno de los puntos interesantes en la terapia de fagos es su bajo costo. Los fagos son fáciles de aislar y su producción es rápida y barata (A diferencia de los antibióticos). Además, los fagos pueden ser estables en diferentes condiciones ambientales (los bacteriófagos pueden soportar condiciones físico-químicas extremas) (Domingo-Calap et al., 2016). La terapia de fagos es efectiva contra bacterias patógenas que son resistentes a diferentes antibióticos porque los mecanismos por los cuales el fago induce la bacteriólisis son completamente diferentes a los mecanismos de los antibióticos, no elimina bacterias benéficas o neutras porque tiene una gran especificidad contra las bacterias blanco. Los fagos o sus productos (Lisinas, por ejemplo) no afecta a las células eucariotas y los efectos adversos de los fagos no son comunes (Matsuzaki et al., 2005) por lo que los bacteriófagos son una alternativa interesante en el tratamiento de infecciones bacterianas. Con los recientes avances en la tecnología se pueden hacer mejoras en la terapia de fagos, tales como utilizar técnicas para promover la evolución de bacteriófagos y así, adaptarlos rápidamente y que tenga una gran afinidad a una cepa bacteriana específica (Domingo-Calap et al., 2016). Aunque aún no se ha estandarizado ninguna terapia que utiliza bacteriófagos, Międzybrodzki y colaboradores investigaron que se pueden tener ahorros monetarios considerables en el campo de la salud (Miedzybrodzki, Fortuna, Weber-Dabrowska, & Górski, 2007). Controlar la replicación de bacteriófagos, podría disminuir su variabilidad, lo que lo haría candidato a ser patentado (Sagona, Grigonyte, MacDonald, & Jaramillo, 2016).

A pesar de muchas barreras, tanto los bacteriófagos naturales, como los bacteriófagos que han sido modificados genéticamente, tienen muchas propiedades benéficas que justifican la investigación y el desarrollo de estos. El aislamiento y la caracterización de nuevo bacteriófagos usualmente es más barato y rápido que encontrar moléculas de antibióticos. Al tener alta especificidad, pueden eliminar los patógenos con mínimo efectos negativos sobre la microbiota benéfica (Lu & Koeris, 2011).

2.6. Bacteriófago ϕ X174

El bacteriófago ϕ X174 pertenece a la familia *Microviridae*. Es un virus pequeño (25 nm) con forma de icosaedro. El virión maduro consiste en 60 moléculas de proteína F (proteína mayor de la cápside), proteína G (proteína de aguja), 10-12 moléculas de proteína H y tiene un genoma circular de DNA de cadena sencilla (+) con un tamaño de 5,386 pb que está asociado a la proteína J (proteína de empaquetamiento) (Ruboyanes, Chen, Dubrava, Cherwa, & Fane, 2009). ϕ X174 se ha utilizado en diferentes estudios debido a que el tamaño de su genoma es excepcionalmente pequeño, la estructura de su genoma es simple y su biología molecular y estructural están bien caracterizadas (Brown, Millstein, Williams, & Wichman, 2013). El genoma de ϕ X174 fue el primer microorganismo que su genoma fue secuenciado (Sanger et al., 1978) y tiene 11 genes, de los cuales 4 genes (A*, B, K y E) están sobrelapados. Esto se refiere a que el DNA genómico es insuficiente para codificar todas las proteínas virales, a menos que parte del genoma son leídas más de una vez en diferentes marcos de lectura. (Madigan, Clark, Stahl, & Martinko, 2015). ϕ X174 es un colifago, esto quiere decir, que forma parte de los bacteriófagos que infectan a *E. coli*. los colifagos también habitan dentro del intestino humano y de otros animales de sangre caliente, donde se multiplica y son secretados con la materia fecal. Existe diferente información sobre los colifagos en agua residuales. Un número de estudios reportó que la densidad de bacteriófagos somáticos es de 10^6 - 10^8 por mililitro (Sharma et al., 2017).

El huésped natural del bacteriófago, es *Escherichia coli* C (Feige & Stirm, 1976). ϕ X174 ha sido utilizado para realizar diferentes estudios, tanto para evolución , técnica de presentación de péptidos (Christakos, Chapman, Fane, & Campos, 2016), así como reacomodar todo el genoma de ϕ X174 para no tener genes sobrelapados (Jaschke, Lieberman, Rodriguez, Sierra, & Endy, 2012). Es un organismo modelo debido a sus características.

2.7. Bacteriófagos genéticamente modificados y sus aplicaciones

Debido al incremento de bacterias multirresistentes en los últimos años, se ha renovado el interés en el uso de los bacteriófagos como agentes antimicrobianos. Las técnicas de ingeniería genética ofrecen una amplia gama de posibilidades y se están aplicando a estos virus bacterianos con el fin de detectar y tener un control preciso de las bacterias resistentes y darle una nueva función como agentes antimicrobianos (Pires et al., 2016). Aunque el uso de los bacteriófagos presenta diferentes limitantes como la poca eficiencia que tienen contra bacterias formadoras de biofilm o la adquisición de resistencia, estas barreras se pueden superar empleando bacteriófagos modificados genéticamente (Lu & Koeris, 2011). A lo largo de la historia, se han realizado modificaciones genéticas en bacteriófagos con diferentes fines de aplicación, como: Terapéuticas, industriales, biodetección, veterinarias, biocontrol de patógenos, entre otros (Sagona et al., 2016). Existen 2 métodos generales para realizar modificaciones genéticas de bacteriófagos: Los métodos *in vitro*, en los cuales se utilizan a las endonucleasas de restricción como herramientas. Bajo este concepto, se ha modificado el bacteriófago T7 para "descomprimir" su genoma y así evitar genes sobrelapados (Chan, Kosuri, & Endy, 2005). Otro método de modificación genética *in vitro* es BRED, llamado así por sus iniciales en inglés (genome recombineering with electroporated DNA), basada en el uso de recombinasas y fragmentos de PCR (Marinelli et al., 2008). Los métodos *in vivo* se han usados para modificar a los bacteriófagos en donde se involucran marcadores de selección.

La técnica que es utilizada comúnmente en estos ensayos es la recombinación homóloga, en donde la secuencia que será insertada se clona en un vector con regiones complementarias, tanto para la región río arriba, como río abajo de la secuencia del genoma del fago (Sagona et al., 2016). La recombinación homóloga se puede combinar con CRISPR, la primera para llevar a cabo la modificación genética y la segunda para la selección de los bacteriófagos modificados, al dirigir el sistema CRISPR/cas contra los bacteriófagos silvestres (Kiro, Shitrit, & Qimron, 2014). Tomás Fehér y colaboradores emplearon la técnica BRED en el colifago P1 (bacteriófago lítico) para remover el elemento genético IS1. El fago recombinante mostró características normales, como las presentó el fago P1 silvestre. Los autores demostraron que BRED puede ser aplicable para un gran rango de genomas de diferentes bacteriófagos (Fehér, Karcagi, Blattner, & Pósfai, 2012). Otra alternativa es emplear levaduras como huésped para desarrollar la manipulación genética. El genoma del fago es integrado en el genoma de la levadura. El sistema de recombinación de las levaduras es altamente eficiente y el genoma del fago no causa toxicidad a la levadura y puede mantenerse (Pires et al., 2016). Jaschke y colaboradores utilizaron esta técnica para descomprimir el genoma del bacteriófago ϕ X174 y evitar el solapamiento de genes. Al final, obtuvieron bacteriófagos viables (Jaschke et al., 2012). Dentro del campo de la terapia de fago se han hecho diferentes modificaciones genéticas para pasar las barreras que implica esta terapia. Se ha realizado diferentes investigaciones en el fago T4 o T2 para aumentar su rango de reconocimiento de huésped y así poder atacar a más cepas diferentes con un mismo bacteriófago en lugar de utilizar un coctel de fagos (Pires et al., 2016).

Yoichi y colaboradores, intercambiaron los genes que codifican para las proteínas gp37 y gp38, responsables de la unión con su huésped natural, por los genes naturales del fago PP01. El nuevo bacteriófago fue capaz de infectar cepas de *E. coli* O157:H7 pero incapaz de infectar su huésped original (Yoichi, Abe, Miyanaga, Unno, & Tanji, 2005). Estudios similares se hicieron con otros bacteriófagos como T3 (Lin et al., 2012) y JG004 cuyo huésped es *Pseudomonas aeruginosa* (Le et al., 2013). También se han realizado modificaciones para potenciar su actividad antimicrobiana. Yacoby y colaboradores usaron bacteriófagos específicos de *S. aureus* con moléculas antimicrobianas unidas a su cápside. Posteriormente conjugaron al bacteriófago con un anticuerpo IgG. Después de que las bacterias fueran expuestas al conjugado de fármaco-fago, los bacteriófagos se unieron a *S. aureus* y el cloranfenicol fue liberado (Yacoby, Bar, & Benhar, 2007). En otra de las aplicaciones en donde se han modificado bacteriófagos es para usarlos como vacunas. Sathaliyawala y colaboradores utilizaron el fago T4, con 3 antígenos del VIH unidos a su cápside para generar una vacuna contra VIH. Estos bacteriófagos modificados fueron probados en ratones, en donde se observó una fuerte respuesta inmune celular y humoral (Sathaliyawala et al., 2006). El uso de bacteriófagos deficientes de lisinas, pueden matar a las células sin lisar a las bacterias, debido a que las enzimas producidas por el fago se unen al DNA y secuestran la maquinaria metabólica de la bacteria para conseguir su replicación. Este mecanismo no lítico puede minimizar las endotoxinas liberadas y por lo tanto disminuir la producción de citocinas pro-inflamatorias en infecciones bacterianas. Matsuda y colaboradores usaron un bacteriófago T4 deficiente en lisis para tratar una infección en ratones causada por *E. coli*, utilizando como control, el fago silvestre o antibiótico.

Los resultados mostraron que utilizar al utilizar el fago T4 deficiente en lisis, aumentó la supervivencia de ratones, disminuyó la cantidad de endotoxinas a las 6 y 12 horas después de la infección y los niveles de TNF- α y IL-6 fueron menores, comparados con los controles (Matsuda et al., 2005). Se han modificados otros bacteriófagos con otros fines además del terapéutico. Lu y colaboradores, por ejemplo, modificaron el bacteriófago T7 para expresar una enzima que degrada el biofilm durante la infección y así atacar simultáneamente las células bacterianas y el matriz de biofilm (Lu & Collins, 2007). La ingeniería genética de bacteriófagos, es una área de investigación muy atractiva ya que tiene una gran utilidad potencial y aún no es completamente explotada (Pires et al., 2016).

2.8. Péptidos antimicrobianos

Muchos microorganismos producen péptidos antimicrobianos, como parte de su primera línea de defensa. De manera típica, los péptidos antimicrobianos son relativamente cortos (12 a 100 aminoácidos), están cargados positivamente (carga neta de +2 a +9), son anfifílicos y se han aislado de organismos unicelulares, así como también de otros invertebrados, plantas, anfibios, pájaros, pescados y mamíferos, incluyendo humanos (Jenssen et al., 2006). Los péptidos antimicrobianos representan a las moléculas efectoras encargadas de la defensa del huésped más antiguas presentes en los organismos en la evolución (Yeaman, 2003). La capacidad anfipática de estos péptidos es muy importante para la unión de membrana y puede ser alcanzada por una multitud de conformaciones, así como la hidrofobicidad, que es definida como el porcentaje de residuos hidrofóbicos en el péptido, que también es una característica esencial para la interacción membrana-Péptido antimicrobiano (Travkova, Moehwald, & Brezesinski, 2017). Los péptidos antimicrobianos pueden ser divididos en 2 grupos basado en su efecto final: efecto disruptivo de membrana, que causa permeabilización de membrana y efecto no disruptivo de membrana, que actúa en contra de blancos intracelulares (Toke, 2005) como la replicación del DNA y la síntesis de proteínas (Brogden, 2005). En ambos grupos, se dan interacciones electrostáticas entre los péptidos antimicrobianos catiónicos y los lipopolisacáridos aniónicos (LPS, en caso de las bacterias Gram negativas) o ácidos lipoteicoicos (En caso de las bacterias Gram-positivas) y posteriormente invade la célula (Kang, Kim, Seo, & Park, 2017).

El descubrimiento de los péptidos antimicrobianos naturales data en 1939, cuando Dubos extrajo gramicidina, un agente antimicrobiano producido por *Bacillus brevis*, del suelo. La gramicidina tenía actividad *in vitro* en contra de un amplio espectro de bacterias Gram-positiva (Dubos, 1939). Tiempo después, la gramicidina se mostró efectiva cuando se aplicaba en heridas causadas a cuyos, lo que indicaba su uso potencial como agente terapéuticos (Phoenix, Dennison, & Harris, 2013). Después de la era dorada de los antibióticos y con la aparición de microorganismos resistentes a diferentes antibióticos alrededor de 1960, impulsó la investigación de los péptidos antimicrobianos. Entre 1950 y 1960, se descubrieron diferentes proteínas catiónicas con actividad antimicrobiana, como la lactoferrina aislada de la leche (Groves, Peterson, & Kiddy, 1965) y entre 1970 y 1980, se descubrieron otros péptidos antimicrobianos como α -defensinas de conejos (Selsted, Brown, DeLange, Harwig, & Lehrer, 1985) y humanos (Ganz et al., 1985). A principios del año 2000, Brodgen descubrió el primer péptido antimicrobiano aniónico y descubrió otros péptidos en animales domésticos, entre ellos P1, Bac5, Bac7, PR-39 y profenina (Brogden, Ackermann, McCray, & Tack, 2003). En la naturaleza existen muchos péptidos antimicrobianos, sin embargo, también se pueden diseñar péptidos antimicrobianos que cumplan los requisitos para ser usados como agentes terapéuticos (Alta actividad antimicrobiana, baja toxicidad a la membrana de mamíferos, alta estabilidad proteolítica, baja afinidad al suero y bajo costo). Existen diferentes métodos que se han empleado para diseñar nuevos péptidos antimicrobianos. Entre ellos se encuentra el método empírico basado en mutaciones que consumen mucho tiempo, métodos estadísticos basados en bioinformática y métodos más sofisticados como simulaciones y experimento biofísicos.

Recientemente, las predicciones por computadora, caracterizaciones biofísicas y validaciones biológicas tienden a ser el método más eficiente para probar péptidos antimicrobianos (Li et al., 2017). Desde el año 2000, se han descubierto 20 nuevos péptidos antimicrobianos que han sido caracterizado y aproximadamente, 40 componentes están en desarrollo clínico. Muchos péptidos sintéticos han entrado a pruebas clínicas y al menos 15 están en pruebas clínicas como agentes antimicrobianos o agentes inmunomodulatorios (Fjell, Hiss, Hancock, & Schneider, 2011). De entre los péptidos que actúan sobre la membrana se encuentran LL-37, Magainin 2, BAR, MP196 entre otros, mientras que entre los péptidos que actúan a nivel intracelular se encuentra MAP, Tat, Bactenicina 7, entre otros (Bechinger & Gorr, 2017). Debido al aumento de las bacterias resistentes a antibióticos, es muy deseable desarrollar agentes antimicrobianos nuevos y efectivos, cuyos mecanismos de acción sean diferentes a los de los antibióticos convencionales y los péptidos antimicrobiano catiónicos son una buena alternativa gracias a su capacidad de inactivar bacterias, hongos y patógenos virales (Benincasa et al., 2004).

2.9. Bactenicina 7

Bac7, es un péptido derivado de la catelicidina y fue aislado de neutrófilos bovinos (Benincasa et al., 2004). Tiene una estructura primaria peculiar compuesta de una región N-terminal altamente catiónica, que incluye 8 argininas en los primeros 16 residuos, seguido de tres secuencias hidrofóbicas repetidas en tándem de 14 residuos (Frank, Gennaro, Schneider, Przybylski, & Romeo, 1990). En 1989, se purificaron 2 péptidos de extractos de gránulos de neutrófilos bovinos que exhibían actividad antimicrobiana y fueron llamados “Bac-7” y “Bac-5”. Se les llamó bactenicinas a estos polipéptidos por las palabras en latín *bacterium* (bacteria) y *necare* (matar), que eran capaces de reprimir el crecimiento de las bacterias gram-negativas y eran caracterizadas por una alta concentración de prolina y arginina (Renato Gennaro, Skerlavaj, & Romeo, 1989). Bac7 es un péptido antimicrobiano rico en prolina (entre 33% a 49%). Los miembros de este grupo (ricos en prolina) son activos contra las bacterias gram negativas y tiene un mecanismo de acción no lítico a diferencia de otros péptidos antimicrobianos conocidos. Los péptido ricos en prolina entran a la célula sin lisar la membrana y una vez en el citoplasma se une e inhibe blancos moleculares específicos esenciales para el crecimiento bacteriano, por lo que le causa su muerte (Gennaro R., Zanetti M., Benincasa M, Podda E, 2002). El cDNA del precursor de Bac7 fue clonado por primera vez utilizando RT-PCR, donde demostraron su conservación con otros péptidos antimicrobianos (Scocchi, Romeo, & Zanetti, 1994). La síntesis química de fragmentos de diferente tamaño de Bac7 indicaron que la región catiónica N-terminal es esencial para su actividad antimicrobiana.

El tamaño mínimo del fragmento N-terminal que se requiere para presentar actividad antimicrobiana son 16 residuos (R. Gennaro & Zanetti, 2000). En el 2004, Benincasa y colaboradores sintetizaron péptidos del extremo N-terminal de Bac7 de diferentes tamaños y los probaron *in vitro* para identificar el dominio responsable de la actividad antimicrobiana. Probaron diferentes longitudes del péptido para evaluar su concentración mínima inhibitoria y compararlo con el péptido completo y encontraron que Bac7(1-35) es la fracción del péptido que presenta una concentración mínima inhibitoria contra diferentes especies de bacterias, seguido por Bac7(1-16) (Benincasa et al., 2004). Posteriormente se investigó el mecanismo de acción de Bac7(1-35), en donde se descubrió que a concentraciones sub-micromolares, el enantiómero L de Bac7(1-35) mataba a las bacterias con un mecanismo dependiente de energía y de manera no lítica mientras que el enantiómero D está inactivo. A concentraciones mayores ($\geq 64 \mu\text{M}$) ambos enantiómeros, L y D de Bac7(1-35) fueron capaces de matar a las bacterias por la vía lítica. (Podda et al., 2006). El mecanismo de acción de Bac7(1-35) se basa en su afinidad con los ribosomas, uniéndose a ellos y por lo tanto bloqueando de la síntesis de proteínas (Mardirossian et al., 2014) afectando otros eventos contraduccionales, como la interacción de las chaperonas con los ribosomas y también se une a la chaperona DnaK (Zahn et al., 2014). Se ha probado la estabilidad de Bac7(1-35) en suero y plasma murino, en donde los resultados indicaron que el péptido es estable y solo se degrada después de muchas horas. También se probó su actividad en un ensayo *in vivo* en ratones infectados por *Salmonella typhi* en donde el grupo control sobrevivió durante 10 días, mientras que el grupo tratado con Bac7(1-35) sobrevivió durante 24.5 días sin efectos tóxicos con dosis de hasta 75 mg/Kg (Benincasa et al., 2010).

Estudios citotóxicos han demostrado que el péptido no induce daño necrótico ni apoptótico con concentraciones de 50-100 veces más altas que la concentración mínimas inhibitoria (Pelillo et al., 2014).

CAPITULO 3

ENFOQUE, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Enfoque

Los organismos resistentes a antibióticos aumentan cada día y si se sigue por este camino de uso indiscriminado y no racional de antibióticos, en los próximos 50 años las muertes causadas por infecciones de bacterias resistentes a antibióticos aumentará, sin embargo, la inversión tanto económica, de esfuerzo y tiempo que se hace para encontrar nuevos antibióticos es muy alta en comparación al tiempo que le toma a los microorganismos adquirir resistencia al nuevo antibiótico, por lo que las farmacéuticas no están interesadas en seguir esta línea de investigación. Por lo anterior, es necesario encontrar alternativas para tratar las infecciones causadas por microorganismos resistentes. El uso de bacteriófagos es una alternativa adecuada para combatir este problema ya que se tienen registros de terapias basadas en estos. Aunado a lo anterior, la tecnología del DNA recombinante puede potenciar su actividad antimicrobiana y evitar mayores consecuencias a contra el hospedero. Utilizar bacteriófagos como terapia, disminuye considerablemente el precio de producción ya que propagarlos es barato y son muy específicos por lo que los daños a la flora intestinal son casi nulos. Se estima que existen 10^{31} bacteriófagos en la biósfera, lo que indica que la diversidad genética es muy grande por lo que la posibilidad de encontrar nuevos genes con nuevas funciones también es grande.

Hasta ahora, la tecnología para secuenciar genomas completos permite identificar el genoma de diversos organismos, bacteriófagos en este caso y eventualmente será mejor. Lo anterior es una ventaja para el fin de la modificación genética de bacteriófagos porque permite una manipulación más precisa. En este trabajo se utilizó la tecnología del DNA recombinante para construir una variante del bacteriófago ϕ X174 y así potenciar su actividad bactericida.

2.2. Hipótesis

Utilizando el sistema λ -red será posible la construcción de *Escherichia coli* C que contenga los genes sintéticos *gen F* y *cI* integrados en el locus de *lacZ* que fungirá como plataforma para la construcción y propagación del bacteriófago ϕ X174-Bac7

2.3. Objetivo general

Construir una cepa de *Escherichia coli* C mediante la técnica λ -red que contenga la secuencia codificante para la proteína F del bacteriófago ϕ X174 y de la proteína cI del bacteriófago

2.4. Objetivos específicos

1. Diseñar una pieza genética sintética que contenga la secuencia que codifica para la proteína F del bacteriófago ϕ X174, bajo la regulación del promotor LacUV5.
2. Diseñar una pieza genética sintética que contenga la secuencia que codifica para la proteína cI del bacteriófago λ bajo la regulación de un promotor constitutivo.
3. Diseñar una pieza genética sintética que contenga la secuencia que codifica para el péptido Bac7 (1-35) bajo la regulación del promotor pR.
4. Construir una cepa de *Escherichia coli* C que contenga las piezas sintética gen F y cI mediante el sistema λ -red y caracterizarla.

CAPITULO 4

METODOLOGÍA

4.1. Materiales y equipo.

Para realizar este proyecto se utilizaron los siguientes equipos: micropipeta de volumen variable (0.2 – 2.5 μ L, *Eppendorf*), micropipeta de volumen variable (2 – 20 mL, *Eppendorf*), micropipeta de volumen variable (20 – 200 μ L, *Eppendorf*), micropipeta de volumen variable (100 – 1000 μ L, *Eppendorf*), incubadora con agitación (*Lab companion*, IS-971) incubadora estática (*Lab companion*, IB-11E), incubadora de baja temperatura (*Lab companion*, IL-11), Centrifuga de piso (*Thermo Scientific*, Sorvall Legend XFR) equipada con un rotor para tubos de 50 mL (Fiberlite F15-8X50cy) y para tubos de 1.6 mL (Fiberlite F21-48X1.5/2.0), microcentrifuga (*Ohaus*, FC5515), plancha de calentamiento con agitación (*Lab companion*, HP3000L), microondas (*Everstar*, E90D23AL-XF), horno de secado (*Shield Lab*, SGO6E), ph-metro (*Ohaus*, starter 5000), espectrofotómetro (*Opizen PLUS*, 2120UVPLUS), electroporador (*Eppendorf*, Eporator), termociclador (*Techn*, 3Prime), thermomixer (*Eppendorf*, Thermomixer R), equipo de filtración (*Millipore*), equipo purificador de agua (*Elga*, CLXXXUVM2), autoclave (*All american*, 150), campana de flujo laminar (*Labconco*, Delta series). Refrigerador 4°C/Congelador -20°C (*Norlake scientific*, LRF201WWW/), balanza analítica (AND, GR-200), balanza (*Ohaus*, YS series), nano fotómetro (*Thermo scientific*, nanodrop 2000), transiluminador (*Labnet*), cámara de electroforesis (*Labnet*), fotodocumentador (*Maestrogen*, minigel), fuente de poder (*Thermo scientific*, EC105).

El material consumible que se utilizó en este proyecto fueron: Tubos de 0.2, 0.6 y 1.6 mL (*Neptune*), tubos para centrifuga de 50 mL (*Corning*), unidades de centrifugación, amicon ultra -15 (*Millipore*, Ultracel 100.K), puntillas para micropipetas de volumen variables 0.1-20 μL , 1-200 μL , 100-1000 μL (*Neptune*) (*Corning*), celdas de electroporación de 2 mm (*VWR*, 89047-208), Jeringas, filtros de jeringa 0.2 μm (*Whatman*, Puradisc 25 AS), parafilm (*Bemis*).

El material de vidrio utilizado: cajas petri de vidrio (*Kimax*) (*Pyrex*), tubos de vidrio de 10 mL con rosca (*HACH*), matraz Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 mL (*Kimax*), vaso de precipitado de 250, 500, 1000 y 2000 mL (*Pyrex*).

Enzimas y kits para biología molecular: DNAsa I (*Roche*), RNAsa A (*Roche*), Proteinasa K (*Roche*), kit de PCR MyTaq (*BioLine*), kit de PCR alta fidelidad Accuzyme™ (*BioLine*), GelRed (*Biotium*), 100 bp PCR Ladder (*Genscript*), Ready-to-use™ Plus 100 bp DNA Ladder (*Genscript*), HyperLadder™1kb (*BioLine*). Kit de limpieza “SureClean” (*BioLine*).

Los reactivos para las diferentes soluciones provienen de Sigma y Productos Químicos Monterrey (Monterrey, N.L. Méx.) y Jalmek. Los medios de cultivo provienen de Difco (Detroit, MI, EUA) y BD Bioxon, guantes (*Confort*),

Las bases de datos y programas computacionales de biología molecular fueron: GenBank NCBI (National Center of Biotechnology Information, Bethesda MD, USA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), NUPACK (<http://www.nupack.org/>), *In Silico* PCR amplification (<http://insilico.ehu.es/PCR/>), NetPrimer Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>), Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), Codon Optimization Tool (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>), OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), BioCyc Database Collection (<https://biocyc.org/>), Snapgene viewer (<http://www.snapgene.com/>), Gene Designer 2.0 (<https://www.atum.bio/resources/genedesigner>),

4.2. Material biológico

Para realización de esta tesis se utilizó *E. coli* C (ATCC 13706)

El vector pKM208 de 8,000 pb tiene los genes que codifican para las proteínas beta, exo y gam reguladas por el promotor Lac. Este vector es utilizado para lleva a cabo los ensayos de recombinación homóloga (lambda-red). El plásmido fue adquirido de Addgene.

Las piezas genéticas diseñadas en este trabajo fueron clonadas en los plásmidos pUC57 (número alto de copias) y pB322 (Bajo número de copias) por la empresa *Biobasic*.

4.3. Estrategia general

Para cumplir el objetivo del proyecto se realizaron 3 etapas. La primera consistió en el diseño de 3 genes sintéticos, 2 para construir una cepa de *E. coli* C capaz de propagar al bacteriófago y uno más para construir el bacteriófago no replicativo y con actividad antibacterial. La segunda etapa consistió en la unión de los fragmentos genF-cI mediante overlap PCR. La tercera etapa consistió en la construcción de la cepa *E. coli* C genF cI, que contiene los genes necesarios para propagar a ϕ X174-Bac7. En la primera etapa se realizó trabajo bioinformático utilizando diferentes programas para diseñar la secuencia nucleotídica de cada gen sintético. En la segunda etapa se utilizaron primers de 40 pb de homología para unir los fragmentos genF y cI, con un solo programa en el termociclador. En la tercera etapa se integraron los genes gen F y cI en el genoma de *E. coli* C, utilizando la técnica lambda red propuesta por Murphy (Murphy & Campellone, 2003).

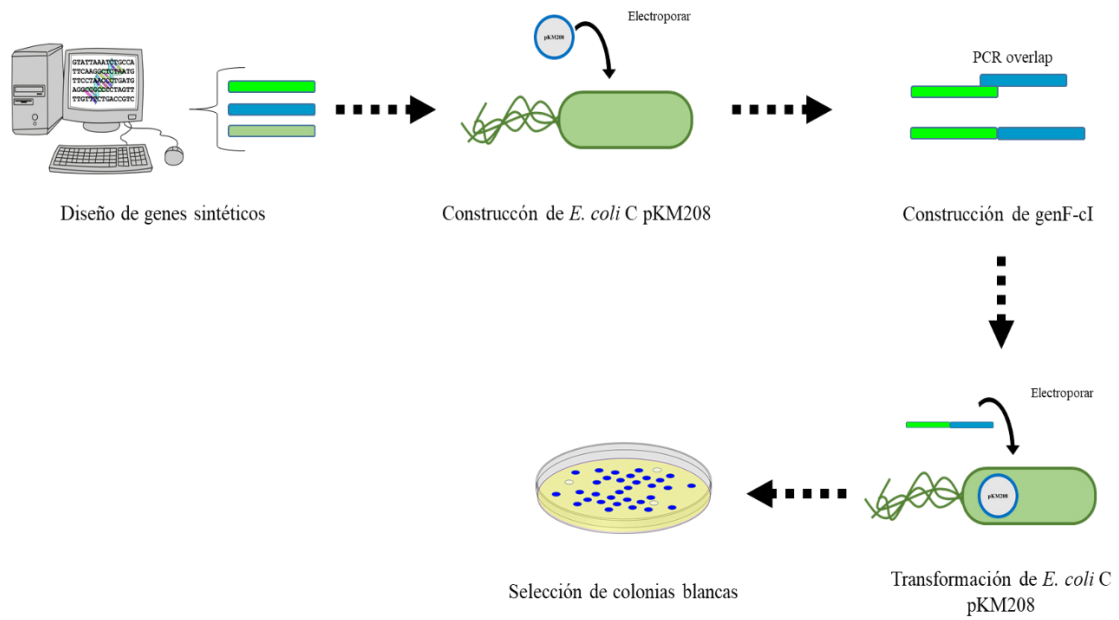


Figura 1. Estrategia general para la construcción de *E. coli* C genF-cl. En primer lugar, se diseñaron las 3 secuencias (genF, cI y Bac7), posteriormente se unieron los fragmentos genF y cI mediante la técnica de PCR overlap y finalmente, utilizando la técnica lambda red, se creó *E. coli* C genF-cl.

4.4. Diseño de genes sintéticos

Los 3 genes sintético (genF, cI y Bac7) se diseñaron utilizando el programa Gene Designer 2.0 (<https://www.atum.bio/resources/genedesigner>) y Snapgene viewer para hacer más fácil la visualización de los genes. Las secuencias para que conforman cada pieza genética se consultaron en GenBank NCBI (National Center of Biotechnology Information, Bethesda MD, USA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ioCyc Database Collection (<https://biocyc.org/>) y en bases de datos de Snapgene viewer

4.5. Diseño de primers

Todos los primers utilizados para la extensión de piezas sintéticas y para su identificación fueron diseñados con el programa informático Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

4.6. Construcción de la cepa *E. coli* C pKM208

4.6.1. Extracción de pKM208

Se aisló el vector pKM208 de 3 cultivos diferentes de *E. coli* DH5 α pKM208 previamente construida en el laboratorio. La extracción del DNA plasmídico se llevó a cabo mediante la técnica de lisis alcalina (Ausubel et al., 2003). Se realizó un cultivo de *E. coli* DH5 α pKM208 en medio LB con ampicilina (100 ng/ μ L) y se incubó durante 16 horas, 150 rpm a 30°C. Al término de la incubación, se tomaron 1.4 mL de cultivo y se depositaron en un tubo de 1.6 mL estéril (*Neptune*) el cual se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se conservaron las células. Nuevamente se tomaron 1.4 mL de cultivo y se depositaron en el mismo tubo que contenía las células y se llevó a cabo el procedimiento anterior. Al final se obtuvo el paquete celular correspondiente a 2.8 mL de cultivo, el cual fue utilizado para la extracción de DNA plasmídico. El paquete celular se resuspendió en 200 μ L de solución I (glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH=8, EDTA 10 mM pH=8) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se le agregaron 400 μ L de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezcló por inversión 5 veces y se incubó 5 minutos en hielo. Después se agregaron 300 μ L de solución III (Acetato de amonio 7.5 M pH=7.8), se mezcló suavemente por inversión y se incubó por 10 minutos a 0°C. Al terminar el tiempo de incubación se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos.

Posteriormente se recuperó la fase acuosa (evitando tomar restos celulares), se transfirieron a un tubo nuevo y estéril de 1.5 mL y se agregaron 650 μ L de isopropanol absoluto, dejándolo en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugo a 14,000 rpm durante 10 minutos para la precipitación de los ácidos nucleicos (RNA y DNA). Al final, se decantó el isopropanol y se dejaron secando boca abajo sobre una toalla de papel durante 10 minutos. Finalmente se agregaron 20 μ L de agua ultra pura con RNAsa (100 ng/ μ L). Se colocó el tubo en el thermomixer (*Eppendorf*) y se corrió un programa de 37°C durante 5 minutos (para la disolución del DNA y acción de la RNAsa), 65°C durante 15 minutos (para la inactivación de la RNAsa y posibles DNAsas presentes). Al final se midió la concentración en el espectrofotómetro nanodrop 2000 (*Thermo scientific*). Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar la integridad del plásmido.

4.6.2. Caracterización del plásmido pKM208 por PCR

Para realizar la identificación del vector pKM208 aislado previamente, se realizó la técnica de PCR, utilizando el kit MyTaqTM DNA Polymerase (*BioLine*). Los primers que se utilizaron para la identificación fueron: 5'pKM208 (5' – GAAAACAGTACGAGAACGAC -3') y 3'pKM208 (5'- GTCATAGTTGGCAAAGTACC -3') los cuales amplifican una parte interior de la secuencia que codifica para la proteína Exo y da como resultado un amplicon de 287 pb.

Se realizó una dilución 1:100 del DNA plasmídico aislado en 100 μL de agua ultra pura estéril en un tubo de 1.5 mL nuevo estéril (*Neptune*). En la Tabla 1 se muestra el coctel y los componentes que se utilizaron para la reacción (1 muestra y control negativo) el cual fue preparado en un tubo de 0.2 mL nuevo y estéril (*Neptune*). Después de preparar el coctel, se depositaron 23 μL del mismo en cada uno de los 2 tubos de 0.2 mL nuevos y estériles; posteriormente se agregaron 2 μL de la dilución 1:100 de cada muestra en los tubos correspondientes. Se creó un nuevo programa en el termociclador (*Techne*, 3 Prime) el cual fue llamado “pKM208”, con los siguientes parámetros: 95°C 1 min, 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C por 15 segundos, 72°C por 15 segundos. Finalmente 72°C durante 1 minuto y 4°C infinito. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar el resultado.

Tabla 1. Coctel de la reacción de PCR para la caracterización del vector pKM208 utilizando los primers 5’pKM208 y 3’pKM208.

Reactivo	Volumen 1X (μL)	Volumen 2x (μL)
<i>MyTaq</i> Mix (5X)	5.0	10.0
5’pKM208 (5mM)	2.5	5.0
3’pKM208 (5mM)	2.5	5.0
<i>MyTaq</i> DNA polimerasa (5U/ μL)	0.5	1
Agua ultra pura	12.5	25
DNA molde (5 ng/ μL)	2.0	-
Total	25.0	46.0

4.6.3. Remoción de fragmentos pequeños de ácidos nucleicos mediante precipitación con Cloruro de Litio (LiCl)

Para remover moléculas pequeñas de RNA y purificar el DNA plasmídico, se siguió el protocolo de la precipitación de Cloruro de Litio (Sambrook & Russel, D, 2001). Al volumen total de la extracción de DNA plasmídico (20 μ L) se le agregó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó incubar durante 30 minutos a 4°C. Después, se recuperó el precipitado de ácidos nucleicos por centrifugación a 10,000 g durante 15 minutos con temperatura de 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo abierto para que se evapore el etanol durante 5 minutos. Posteriormente se disolvió el pellet en 100 μ L de agua con RNasa (100 ng/ μ L) para generar fragmentos pequeños de RNA y también se agregaron 300 μ L de LiCl 4M y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C de temperatura, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.6 mL, se agregaron 600 μ L de isopropanol absoluto al tubo que contenía el sobrenadante y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C de temperatura, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de etanol al 70%, después se centrifugó una vez más a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. Al pasar el tiempo, se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo abierto durante 5 minutos a temperatura ambiente para que se evaporara el exceso de etanol. Finalmente se disolvió el pellet en 20 μ L de agua ultra pura, se midió la concentración en el nanodrop, se calentó a 65°C durante 15 minutos para eliminar nucleasas y se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

4.6.4. Preparación y transformación de *E. coli* C electrocompetentes con pKM208

Se prepararon células de *E. coli* C electrocompetentes y se transformaron mediante electroporación (Tu *et al.*, 2016). Para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* C, se realizó un cultivo en caldo LB y se incubó durante 16 horas a 37°C, 150 rpm. Posteriormente se tomaron 100 µL del cultivo fresco y se agregaron a un tubo de 1.6 mL nuevo y estéril (*Neptune*) que contenía 1.4 mL de caldo LB, para llevarlo a un volumen total de 1.5 mL (Se prepararon 5 tubos de la misma manera). Los tubos se incubaron en el thermomixer (*Eppendorf*) durante 2 horas a 37°C, 900 rpm. Después de las 2 horas de incubación (Cuando la OD₆₀₀ se encontraba en 0.6), las bacterias fueron centrifugadas a 9,000 rpm (Rotor Fiberlite F21-48X1.5/2, *Sorval Legend XFR, ThermoScientific*) a temperatura ambiente (25°C) durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 1 mL de agua ultra pura estéril a temperatura ambiente y se centrifugó a 9,000 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se repitió el paso anterior 2 veces más. Después de los lavados el paquete celular se resuspendió en 30 µL de agua ultra pura estéril (18 Ω) a temperatura ambiente (25°C). Los 5 tubos se etiquetaron como: M1, C1, M3, control negativo (C-) y Viabilidad (V). En los tubos correspondientes a M1, C1 y M3 se agregaron aproximadamente 300 ng de pKM208 (tomado del apartado 53) a cada uno. A los tubos C(-) y V no se les agregó DNA. Posteriormente, el volumen total de cada tubo se transfirió a una celda de electroporación con gap de 2 mm (*VWR*, tapa azul) y fue llevado al electroporador (*Eppendorf*) y se le dio un choque eléctrico de 2500 volts a temperatura ambiente (25°C).

Posteriormente se le agregó 1 mL de caldo LB a cada celda y se mezcló por inversión. El volumen total de cada celda fue transferido a tubos de 1.6 mL estériles y se dejaron incubando a 30°C durante una hora en el thermomixer. Se prepararon 5 cajas Petri con agar LB 2%. A las cajas correspondientes a M1, C1, M3 y C(-) se les agregó ampicilina (100 ng/ μ L). Al terminar el tiempo de incubación de los tubos (M1, C1, M3, C- y V) se agregó todo el volumen (1 mL) a su respectiva caja Petri y sembró por extensión. Se dejaron secar durante 10 minutos dentro de la campana de flujo laminar. Una vez secas, se les colocó parafilm (*Bemis*) para cubrir las orillas y se dejaron incubando a 30°C durante 16 horas. Al siguiente día cuando se presentó crecimiento, se levantó la colonia utilizando una puntilla amarilla estéril y se colocaron en tubos que contenían 5 mL de caldo LB + ampicilina (100 ng/ μ L) y se dejaron incubando a 30°C durante 16 horas.

4.6.5. Extracción de DNA plasmídico y caracterización de *E. coli* C pKM208 mediante PCR

Se realizó extracción de DNA plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina (Ausubel et al., 2003) siguiendo el mismo protocolo utilizado en el apartado 4.6.1 de la única colonia transformante que fue cultivadas en caldo LB + ampicilina (100 ng/ μ L). Se realizó una dilución 1:100 de cada tubo con DNA plasmídico para tener una concentración final de aproximadamente 5 ng/ μ L.

Posteriormente se realizó PCR utilizando los primers 5'pKM208 (5' – GAAAACAGTACGAGAACGAC -3') y 3'pKM208 (5'- GTCATAGTTGGCAAAGTACC -3') con las mismas condiciones utilizadas en el apartado 4.6.2. En la Tabla 2 se muestra el coctel de PCR, los reactivos y las cantidades utilizadas. Al finalizar el programa de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar los productos.

Tabla 2. Coctel de la reacción de PCR para la caracterización del vector pKM208 utilizando los primers 5'pKM208 y 3'pKM208.

Reactivo	Volumen 1X (μL)	Volumen 4x (μL)
<i>MyTaq</i> Mix (5X)	5.0	20.0
5'pKM208 (5mM)	2.5	10.0
3'pKM208 (5mM)	2.5	10.0
<i>MyTaq</i> DNA polimerasa (5U/μL)	0.5	2
Agua ultra pura	12.5	50
DNA molde (5 ng/μL)	2.0	-
Total	25.0	92.0

4.7. Construcción de la cepa *E. coli* DH5 α pUC57genF

4.7.1. Resuspensión del plásmido pUC57genF

La compañía *Biobasic* sintetizó el gen sintético *genF* y lo envió clonado en el vector pUC57 adsorbido en papel filtro señalado con un círculo. Se cortó el pedazo de papel filtro con tijeras previamente desinfectadas con alcohol etílico al 70% y luz UV (Exposición durante 15 minutos en campana). Posteriormente el pedazo de papel filtro se colocó en un tubo de 1.6 mL nuevo y estéril (*Neptune*) y se le agregaron 50 μ L de agua ultra pura estéril para llegar a una concentración final de aproximadamente 100 ng/ μ L. Se homogenizó con la pipeta para recuperar todo el DNA, se retiró el papel filtro y midió en el nanodrop para conocer su concentración. Finalmente se calentó a 65°C durante 15 minutos en el thermomixer (*Eppendorf*) para eliminar posibles nucleasas y se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

4.7.2. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y transformación con el vector pUC57genF

El protocolo que se siguió para la producción de electrocompetentes de *E. coli* DH5 α es el mismo que se menciona en el apartado 4.6.4 (Tu et al., 2016). Los 5 tubos que se utilizaron se etiquetaron como: F1, F2, F3, control negativo (C-) y viabilidad (V). En los tubos correspondientes a F1, F2 y F3 se agregaron aproximadamente 100 ng de pUC57genF a cada uno. A los tubos C(-) y V no se les agregó DNA.

Posteriormente, el volumen total de cada tubo se transfirió a una celda de electroporación con gap de 2 mm (VWR, tapa azul) y fue llevado al electroporador (*Eppendorf*) y se le dio un choque eléctrico de 2500 volts a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente se le agregó 1 mL de caldo LB a cada celda y se mezcló por inversión. El volumen total de cada celda fue transferido a tubos de 1.6 mL estériles y se dejaron incubando a 30°C durante una hora en el thermomixer (*Eppendorf*). Se prepararon 5 cajas Petri con agar LB 2%. A las cajas correspondientes a F1, F2 y F3 se les agregó ampicilina (100 ng/μL). Al terminar el tiempo de incubación de los tubos (F1, F2, F3, C- y V) se agregaron 500 μL a su respectiva caja Petri y sembró por extensión. Se dejaron secar durante 10 minutos dentro de la campana. Una vez secas, se les colocó parafilm (*Bemis*) para cubrir las orillas y se dejaron incubando a 37°C durante 16 horas. Al siguiente día cuando se presentó crecimiento, se levantaron 10 colonias utilizando una puntilla amarilla estéril y se colocaron en tubos que contenían 5 mL de caldo LB + ampicilina (100 ng/μL) y se dejaron incubando a 37°C durante 16 horas.

4.7.3. Extracción, purificación y caracterización del vector pUC57genF mediante PCR

Se realizó la extracción del vector pUC57genF mediante la técnica de lisis alcalina (Ausubel et al., 2003) siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 4.6.1. Posteriormente se realizó la purificación con cloruro de litio (Sambrook & Russel, D, 2001) de la misma manera mencionado en el apartado 4.6.3.

Una vez que se obtuvo el DNA plasmídico puro, se preparó un ensayo de PCR para identificar el plásmido utilizando el kit MyTaqDNA™ Polymerase (*BioLine*). Se realizó una dilución de cada tubo con DNA plasmídico para tener una concentración final de aproximadamente 5 ng/μL de concentración final en cada uno. Posteriormente se realizó PCR utilizando los primers IdGenFf (5'- CTTGCTATTGACTCTACTGT -3') y IdGenFr (5'- ATGGTCCTACTATTCGTATC -3') el cual amplifica una parte interna de la secuencia y da como resultado un amplicon de 1177 pb. En la Tabla 3 se muestra el coctel y los componentes que se utilizaron para la reacción (6 muestras, control negativo y control positivo) el cual fue preparado en un tubo de 0.2 mL nuevo y estéril (*Neptune*). Después de preparar el coctel, se depositaron 23 μL del mismo en cada uno de los tubos de 0.2 mL nuevos y estériles; posteriormente se agregaron 2 μL de la dilución de cada muestra en los tubos correspondientes, en control negativo se agregaron 2 μL de agua ultra pura estéril y en el tubo de control positivo se agregaron 2 μL de un vector pKM208 previamente purificado. Se creó un nuevo programa en el termociclador (*Techne*, 3 Prime) el cual fue llamado “genF”, con los siguientes parámetros: 95°C 1 min, 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 56°C por 15 segundos, 72°C por 10 segundos. Finalmente 72°C durante 1 minutos y 4°C infinito. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar el resultado.

Tabla 3. Coctel de la reacción de PCR para la caracterización del vector pUC57GenF utilizando los primers IdGenFf e IdGenFr.

Reactivo	Volumen 1X (μL)	Volumen 8X (μL)
<i>MyTaq</i> Mix (5X)	5.0	40.0
IdGenFf (5 mM)	2.5	20.0
IdGenFr (5 mM)	2.5	20.0
<i>MyTaq</i> DNA polimerasa (5 U/μL)	0.5	4.0
Agua ultra pura	12.5	100.0
DNA molde (5 ng/μL)	2.0	-
Total	25.0	184.0

4.8. Síntesis del fragmento genF mediante PCR de alta fidelidad

Para producir copias del gen sintético genF con las pares de bases homologas al fragmento cI, se utilizaron los primers ExtGenFf (5'- ACTGTACGCACTATTTACTC - 3') y OvergenFcIr (5'- AGAACGGGATAGTAGTTATCATGGTCCTACTATTCGTATC -3'). Este par de primers genera un amplicon de 1,478 pb. Para realizar este PCR se utilizó el kit Accuzyme™ (*BioLine*) que contiene una enzima de alta fidelidad. Se realizó una dilución del DNA plasmídico aislado en el apartado 4.7.3 para tener una concentración final de 10 ng/μL. En la Tabla 4 se muestran el los componentes que se utilizaron para la reacción que fueron preparados en un tubo de 0.2 mL nuevo y estéril (*Neptune*).

Después de preparar el coctel, se depositaron 49 μL del mismo en cada uno de los tubos de 0.2 mL nuevos y estériles; posteriormente se agregó 1 μL de la dilución hecha anteriormente y 1 μL de agua ultra pura estéril en el tubo correspondiente en el C(-). Se creó un nuevo programa en el termociclador (*Techné*, 3 Prime) el cual fue llamado “overlap paco”, con los siguientes parámetros: 95°C durante 3 min, 25 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C por 15 segundos, 72°C por 3:15 minutos. Finalmente 72°C durante 5 minutos y 4°C infinito. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar el resultado.

Tabla 4. Coctel de la reacción de PCR para la síntesis del gen sintético “genF” utilizando los primers ExtGenFf y OvergenFcIr

Reactivo	Volumen 1X (μL)	Volumen 2X (μL)
Agua ultra pura estéril	32.5	65.0
AccuBuffer (10X)	5	10.0
dNTP Mix (100 mM)	0.5	1.0
ExtGenFf (5 μM)	5.0	10.0
OvergenFcIr (5 μM)	5.0	10.0
Accuzyme DNA Pol (2.5 U/ μL)	1.0	2.0
DNA molde (10 ng/ μL)	1.0	-
Total	50.0	98.0

4.9. Construcción de la cepa *E. coli* DH5 α pUC57cI

4.9.1. Resuspensión del vector pUC57cI

El vector pUC57cI contiene el gen sintético *cI* que codifica para la proteína represora λ de manera constitutiva. La compañía *Biobasic*, que sintetizó la pieza *cI*, lo envió en el vector pUC57 adsorbido en papel filtro señalado con un círculo. Para resuspender el vector se siguió la misma metodología seguida en el apartado 4.7.1.

4.9.2. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y transformación con el vector pUC57cI

Se transformó a *E. coli* DH5 α con pUC57cI para resguardar y propagar el vector. El protocolo para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α es el mismo mencionado en el apartado 4.7.2. Se prepararon 5 tubos los cuales se etiquetaron como: R1, R2, R3, control negativo (C-) y viabilidad (V). El proceso y los materiales usados para la electroporación y selección de las transformadas es igual al mencionado en el apartado 4.6.4.

4.9.3. Extracción, purificación y caracterización del vector pUC57cI mediante PCR

La extracción del vector pUC57cI se realizó mediante la técnica de lisis alcalina (Ausubel et al., 2003) siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 4.6.1. Posteriormente se realizó la purificación con cloruro de litio (Sambrook & Russel, D, 2001) de la misma manera mencionado en el apartado 4.6.3. Cuando se tuvo el DNA plasmídico purificado, se realizó una dilución de cada tubo con DNA plasmídico para tener una concentración final de aproximadamente 10 ng/ μ L en cada uno. Posteriormente se preparó un ensayo de PCR para identificar el plásmido utilizando el kit MyTaqDNATM Polymerase (*BioLine*). Se emplearon los primers IdRepLf (5'-GATAACTACTATCCCGTTCT -3') e IdRepLr (5'-GTGTGTCATTGAAGTAAGAG -3') que amplifican una parte de la secuencia sintética cI dando como resultado un amplicon de 860 pb. En la Tabla 5 se muestran los componentes y cantidades que se utilizaron para realizar la PCR (7 muestras, control negativo). El coctel fue preparado en un tubo de 0.2 mL nuevo y estéril (*Neptune*). Después de preparar el coctel, se depositaron 23 μ L del mismo en cada uno de los tubos de 0.2 mL nuevos y estériles; posteriormente se agregaron 2 μ L de la dilución de cada muestra en los tubos correspondientes y 2 μ L de agua ultra pura en el control negativo. Se creó un nuevo programa en el termociclador (*Techne*, 3 Prime) el cual fue llamado “RepL”, con los siguientes parámetros: 95°C 1 min, 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 57°C por 15 segundos, 72°C por 15 segundos. Finalmente 72°C durante 1 minutos y 4°C infinito. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar el resultado.

Tabla 5. Coctel de la reacción de PCR para la caracterización del vector pUC57cI utilizando los primers IdRepLf e IdRepLr.

Reactivo	Volumen 1X (μL)	Volumen 8X (μL)
<i>MyTaq</i> Buffer (5X)	5.0	40.0
IdRepLf (5mM)	2.5	20.0
IdRepLr (5mM)	2.5	20.0
<i>MyTaq</i> DNA polimerasa (5U/μL)	0.5	4.0
Agua ultra pura	12.5	100.0
DNA molde (10 ng/μL)	2.0	-
Total	25.0	184.0

4.10. Síntesis de la pieza sintética cI mediante PCR de alta fidelidad

Para producir suficientes copias del gen sintético cI que contengan homología con el fragmento genF, se utilizaron los primers OvergenFcIf (5'-GATACGAATAGTAGGACCATGATAACTACTATCCCGTTCT -3') y ExtRepLr (5'-TTAGTTCCTCACCTACTTTC -3'). Este par de primers genera un amplicon de 950 pb, que es el tamaño total del gen sintético. Para realizar este PCR se utilizó el kit Accuzyme™ (*BioLine*) que contiene una enzima de alta fidelidad. Se realizó una dilución del DNA plasmídico aislado en el apartado 4.9.3 para tener una concentración final de 10 ng/μL. En la Tabla 6 se muestra el coctel y los componentes que se utilizaron para la reacción (1 muestra y control negativo) el cual fue preparado en un tubo de 0.2 mL nuevo y estéril (*Neptune*).

Después de preparar el coctel, se depositaron 49 μL del mismo en cada uno de los tubos de 0.2 mL nuevos y estériles; posteriormente se agregó 1 μL de la dilución hecha anteriormente y 1 μL de agua ultra pura estéril en el tubo correspondiente en el C(-). Se creó un nuevo programa en el termociclador (*Technne*, 3 Prime) el cual fue llamado “Overlap paco”, con los siguientes parámetros: 95°C 3 min, 35 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C por 15 segundos, 72°C por 3:15 minutos. Finalmente 72°C durante 5 minutos y 4°C infinito. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar el resultado.

Tabla 6. Coctel de la reacción de PCR para la síntesis del gen sintético “cI” utilizando los primers OvergenFcIf y ExtRepLr.

Reactivo	Volumen 1X (μL)	Volumen 2X (μL)
AccuBuffer (10X)	5.0	10.0
dNTP Mix (10 μM)	0.5	1.0
OvergenFcIf (5 μM)	5.0	10.0
ExtRepLr (5 μM)	5.0	10.0
ACCUZYME DNA Pol (2.5 U/mL)	1	2.0
Agua ultra pura	32.5	65.0
DNA molde (10 ng/ μL)	1.0	-
Total	50.0	98.0

4.11. Construcción del fragmento genF-cl

Para unir a los fragmentos genF y cl, se realizó el protocolo de PCR overlap, siguiendo el protocolo mencionado por Luo y colaboradores (Luo, Liu, Lin, Kabir, & Su, 2013). En la Tabla 7 se muestran los componentes que se utilizaron para realizar la PCR (1 muestra y control negativo) el cual fue preparado en un tubo de 0.2 mL nuevo y estéril (*Neptune*). Posterior al coctel se repartieron 47 μ L en 2 tubos nuevos y estériles de 0.2 mL (*Neptune*)

Tabla 7. Coctel de la reacción de PCR para la síntesis del fragmento “genF-cl” utilizando los primers ExtgenFf y ExtRepLr.

Reactivo	Volumen 1X (μ L)	Volumen 2X (μ L)
AccuBuffer (10X)	5.0	10.0
dNTP Mix (10 μ M)	0.5	1.0
ExtgenFf (5 μ M)	5.0	10.0
ExtRepLr (5 μ M)	5.0	10.0
ACCUZYME DNA Pol (2.5 U/mL)	1	2.0
Agua ultra pura	30.5	61.0
Total	47.0	94.0

Para realizar el overlap, se utilizaron los primers ExtgenFf y ExtRepLr que dan como resultado un amplicon de 2,388 pb. Como DNA molde se tomaron 2 μ L del producto de PCR obtenido en el apartado 4.8. y 1 μ L del producto de PCR obtenido del apartado 4.10. Al control negativo, se le agregaron 3 μ L de agua ultra pura. Los fragmentos de DNA molde se tomaron directamente de la reacción de PCR, según lo recomendado por el autor.

Se creó un nuevo programa en el termociclador llamado “Overlap extensión paco” con las siguientes condiciones: 95°C 5 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos, 66°C durante 30 segundos y 72°C 3.5 minutos, 20 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos, 72°C por 5 minutos. Finalmente, 72°C por 5 minutos y 4°C infinito. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar el resultado.

4.11.1. Purificación del fragmento genF-cl

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con el producto de PCR obtenido en el apartado 4.11. Posteriormente se cortó la banda correspondiente al fragmento genF-cl utilizando una hoja de bisturí nueva y estéril. La porción de agarosa cortada se agregó en un tubo de 1.5 mL nuevo y se siguió el protocolo mencionado el kit QuickClean II (*GenScript*). Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 1% para observar la integridad del fragmento.

4.11.2. PCR de alta fidelidad del fragmento genF-cl

Para producir suficientes copias del fragmento genF-cl, se utilizaron los primers ExtgenFf (5'- TTAGTTCCTCACCTACTTTC -3') y ExtRepLr (5'- TTAGTTCCTCACCTACTTTC -3'). Este par de primers genera un amplicon de 2,388 pb, que es el tamaño total del fragmento unido. Para realizar este PCR se utilizó el kit Accuzyme™ (*BioLine*) que contiene una enzima de alta fidelidad y se tomó de molde el DNA obtenido en el apartado 4.11.1.

En la Tabla 8 se muestra el coctel y los componentes que se utilizaron para la reacción (1 muestra y control negativo) el cual fue preparado en un tubo de 0.2 mL nuevo y estéril (*Neptune*). Después de preparar el coctel, se depositaron 49 μL del mismo en cada uno de los tubos de 0.2 mL nuevos y estériles; posteriormente se agregó 1 μL DNA molde y 1 μL de agua ultra pura estéril en el tubo correspondiente en el C(-). Se creó un nuevo programa en el termociclador llamado “genF-cl”, con los siguientes parámetros: 95°C 3 min, 25 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 55°C por 15 segundos, 72°C por 5 minutos. Finalmente 72°C durante 7 minutos y 4°C infinito. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para observar el resultado.

Tabla 8. Coctel de la reacción de PCR para la síntesis del fragmento “genF-cl” utilizando los primers ExtgenFf y ExtRepLr.

Reactivo	Volumen 1X (μL)	Volumen 2X (μL)
AccuBuffer (10X)	5.0	10.0
dNTP Mix (10 μM)	0.5	1.0
ExtgenFf (5 μM)	5.0	10.0
ExtRepLr (5 μM)	5.0	10.0
ACCUZYME DNA Pol (2.5 U/mL)	1	2.0
Agua ultra pura	32.5	65.0
Total	49.0	98.0

4.11.3. Purificación del fragmento genF-cl

Para purificar el fragmento genF-cl se utilizó el kit SureClean Plus (*BioLine*). El total de reacción de PCR (48 μ L) se pasó a un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril. Posteriormente se agregaron 50 μ L de la solución SureClean Plus, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 15,000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se retiró el sobrenadante con una puntilla amarilla y se agregaron 100 μ L de etanol al 70%, se mezcló con vortex durante 10 segundos y se centrifugó a 15,000 rpm durante 15 minutos. Después se retiró el sobrenadante y se repitió este último paso de nuevo. Finalmente se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se resuspendió con 30 μ L de agua ultrapura. Posteriormente se midió la concentración en el nanodrop y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% para observar su integridad.

4.12. Integración del fragmento genF-cl en el cromosoma de *E. coli* C

Para conseguir la integración del fragmento genF-cl, se siguió el protocolo de recombinación cromosomal dirigido utilizando fragmentos de PCR (Murphy & Campellone, 2003). Primero se cultivó *E. coli* C pKM208 construida anteriormente en el apartado 4.6. en un tubo con 5 mL de medio LB y ampicilina (100 ng/ μ L) a 16 horas, 150 rpm a 30°C. Al siguiente día se tomó una asada de cada tubo y se inocularon en una caja Petri con Agar LB 2% con ampicilina (100 ng/ μ L) por estría cruzada y se dejaron incubando a 30°C durante 16 horas. Al pasar el tiempo, se observó el crecimiento en la placa y se tomó una sola colonia con una puntilla amarilla estéril y se inoculó en un tubo de 1.6 mL que contenía 1 mL de medio LB con ampicilina (100 ng/ μ L) y se incubó a aproximadamente durante 3 hora y 10 minutos (hasta que la OD₆₀₀ llegó a 0.2) a una temperatura de 30°C y 900 rpm en el thermomixer (*Eppendorf*). Cuando el cultivo llegó a 0.2 de OD₆₀₀ se le agregó 1 μ L de IPTG 1M (Concentración final 1 mM). Posteriormente se dejó incubar durante 2 horas (Hasta que la OD₆₀₀ llegó a 0.5) a 30°C y 900 rpm en el thermomixer. Cuando se alcanzó la OD₆₀₀ de 0.6, se cambió la temperatura a 42°C y se incubo durante 15 minutos a 900 rpm en el thermomixer. Al pasar los 15 minutos se colocó el tubo en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 9,000 rpm durante 2 minutos, al finalizar se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol 20% - MOPS 1 mM, se centrifugó a 9,000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante.

Se repitió de nuevo el paso anterior y después, se resuspendió en 35 μL de glicerol 20%-MOPS 1 mM y se agregaron 500 ng del producto de PCR purificado (mencionado en el apartado 4.11.1) que se usará para llevar a cabo la recombinación. El volumen total fue depositado en una celda de electroporación con gap de 2 mm (VWR). La celda de electroporación se colocó en el electroporador (*Eppendorf*) y se dio un choque eléctrico de 2500 volts con un tiempo de 5 ms. Después del choque, se le agregó 1 mL de medio LB a la celda de electroporación, se mezcló por inversión y posteriormente se tomó todo el volumen y se depositó en un tubo nuevo y estéril de 1.6 mL. Posteriormente se hizo una dilución 1:100 del cultivo y se inocularon 40 cajas Petri con agar LB 2% (IPTG 1 mM, X-gal 100 ng/ μL) con 100 μL de la dilución 1:100 y se dejaron incubando durante 16 horas a 37°C. Al pasar el tiempo, se seleccionó la colonia de color blanco con una puntilla amarilla, se depositó en 1 mL de caldo LB en un tubo de 1.5 mL, se dejó incubando durante 30 minutos a 37°C, 900 rpm en el thermomixer y se sembraron 200 μL en cajas Petri con agar LB 2% (IPTG 1 mM, X-Gal 100 ng/ μL) y se dejaron incubando durante 16 horas. Finalmente se levantaron las colonias blancas y se cultivaron en 5 mL de caldo LB durante 16 horas, 150 rpm a 37°C.

4.12.1. Prueba de infección de la cepa *E. coli* C genF-cl con el bacteriófago ϕ X174

Para comprobar que la cepa transformada conservada la característica de ser susceptible a la infección por el bacteriófago ϕ X174, se realizaron pruebas de infección. Se realizaron cultivos de las cepas: *E. coli* C, *E. coli* C pKM208, *E. coli* Dh5 α y *E. coli* C genF-cl. Se prepararon 4 cajas Petri con agar LB 2% para utilizarlas como base. Posteriormente se mezclaron 10 mL de agar LB 0.5%, 100 μ L de cada cultivo y 100 μ L de ϕ X174. Se hizo el procedimiento anterior una cepa diferente por tubo. Posteriormente la mezcla se agregó sobre el agar LB 2% y se dejó secar durante 15 minutos. Al finalizar el tiempo de secado, se incubaron a 37°C durante 16 horas. Al día siguiente se observó el resultado de lisis.

CAPITULO 5

RESULTADOS

5.1. Diseño de genes sintéticos

5.1.1. Diseño de genF

Se diseñaron 3 genes sintéticos. El primer gen sintético que se diseñó fue “genF”. Este gen sintético tiene un tamaño de 1,528 pb y contiene los siguientes elementos: Promotor lacUV5, la secuencia del sitio de unión a ribosoma (RBS) del genF perteneciente al bacteriófago ϕ X174, el marco de lectura abierto del genF del bacteriófago ϕ X174, un terminador fuerte de 39 pb, un par de secuencias de unión de primers de extensión para la producción del fragmento mediante PCR, un par de secuencias de unión de primers de identificación para seleccionar a las bacterias que fueron transformadas correctamente (Secuencias no presentes en el genoma de *E. coli* C), brazos homólogos de 50 pb flanqueando todos los elementos. Al tener este gen integrado en su genoma, *E. coli* C capaz de producir la proteína de la cápside mayor del bacteriófago ϕ X174. En la figura 2 se observa un diagrama de la pieza sintética “Gen F”.

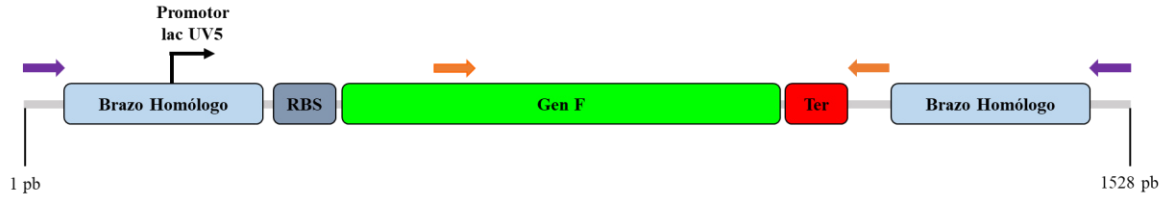


Figura 2. Estructura de la pieza “Gen F”. Las flechas moradas ejemplifican primers de extensión que hacen posible la producción de más piezas mediante PCR. Las flechas naranjas ejemplifican los primers de identificación que facilitan la selección de la cepa transformada con esta pieza. Brazo homólogo de 50 pb. RBS: Sitio de unión a ribosoma. Gen F: Marco de lectura abierto que codifica para la proteína F mayor de la cápside del bacteriófago ϕ X174. Ter: Terminador de la transcripción. Secuencias de 50 pb que son exactamente iguales a donde se integrará en el genoma de *E. coli C* mediante recombinación homóloga.

5.1.2. Diseño de la pieza cI

El siguiente gen en diseñarse fue “cI”. Este gen sintético tiene un tamaño de 1,000 pb y contiene los siguientes elementos: Promotor constitutivo, RBS, marco de lectura abierto de la proteína represora del fago lambda, un terminador fuerte de 39 pb, un par de secuencias de unión de primers de extensión para la producción del fragmento mediante PCR, un par de secuencias de unión de primers de identificación que funcionan para seleccionar a las bacterias que fueron transformadas correctamente (Secuencias no presentes en el genoma de *E. coli C*) brazos homólogos de 50 pb flanqueando todos los elementos. Al tener este gen integrado en su genoma, *E. coli C* es capaz de producir la proteína represora cI y evitar que se produzca el péptido antimicrobiano cuando se requiera la replicación del bacteriófago modificado. En la figura 3 se puede observar un diagrama de la estructura de la pieza sintética cI.

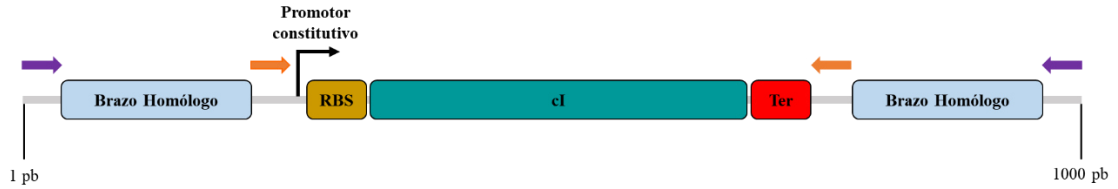


Figura 3. Estructura de la pieza “cI”. Las flechas moradas ejemplifican primers de extensión que hacen posible la producción de más piezas mediante PCR. Las flechas naranjas ejemplifican los primers de identificación que facilitan la selección de la cepa transformada con esta pieza. Brazo homólogo de 50 pb. RBS: Sitio de unión a ribosoma. cI: Marco de lectura abierto que codifica para la proteína represora λ . Ter: Terminador de la transcripción. Brazos homólogos: Secuencias de 50 pb que son exactamente iguales a donde se integrará en el genoma de *E. coli C* mediante recombinación homóloga.

5.1.3. Diseño de la pieza Bac7.

Por último, se diseñó el gen sintético Bac7. Este gen sintético tiene un tamaño de 1231 pb. Los elementos que contiene este gen son los siguientes. Un promotor constitutivo, RBS, marco de lectura abierto que codifica para la proteína represora λ , Brazo Homólogo en 5', promotor pR del fago λ , RBS, marco de lectura abierto que codifica par el péptido antimicrobiano Bac7(1-35), terminador, promotor D del fago ϕ X174, Brazo homólogo 3'. Al insertar este gen en el genoma de ϕ X174, el bacteriófago será incapaz de empaquetar su genoma (ya que este gen sustituye el gen F del bacteriófago) y podrá producir el péptido antimicrobiano cuando infecte una *E. coli C* diferente a la productora. En la figura 4 se muestra el diagrama de la pieza sintética Bac7.

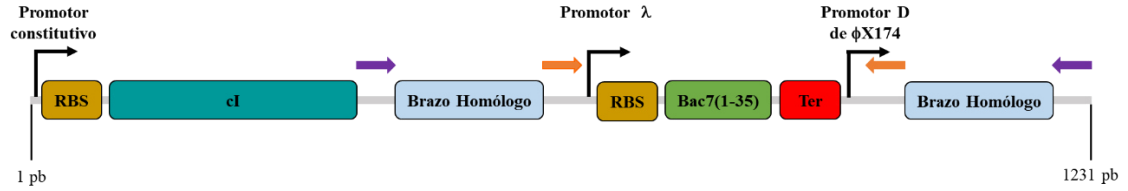


Figura 4. Estructura de la pieza “Bac7”. Las flechas moradas ejemplifican primers de extensión que hacen posible la producción de más piezas mediante PCR. Las flechas naranjas ejemplifican los primers de identificación que facilitan la selección de la cepa transformada con esta pieza. RBS: Sitio de unión a ribosoma. cI: Marco de lectura abierto que codifica para la proteína represora λ . Bac7(1-35): Marco de lectura abierta que codifica para el péptido antimicrobiano. Ter: Terminador de la transcripción. Brazos homólogos: Secuencias de 50 pb que son exactamente iguales a donde se integrará en el genoma de *E. coli* C mediante recombinación homóloga.

5.2. Construcción de *E. coli* C pKM208

5.2.1. Extracción y caracterización del vector pKM208

De la extracción realizada se utilizaron 3 preparaciones de DNA plasmídico, cuya concentración inicial fue: 13094 ng/ μ L (M1), 760 ng/ μ L (C1) y 9522 ng/ μ L (M2). Para verificar la integridad del vector pKM208. En la Figura 5 se muestra el análisis en gel de agarosa 0.8% del vector. Las bandas presentes en la parte superior pertenecientes a las conformaciones de los plásmidos indica buena integridad del DNA plasmídico. El barrido que se presenta en la parte inferior del gel es debido a RNA degradado.

En la Figura 6 se muestra el análisis de gel de agarosa del producto amplificado por PCR del vector pKM208, aislado de la cepa *E. coli* DH5 α empleando los primers 5'pKM208 (5' – GAAAACAGTACGAGAACGAC -3') y 3'pKM208 (5'-GTCATAGTTGGCAAAGTACC -3'), específicos para amplificar una secuencia interna del *exo* dando como resultado un amplicon de 287 pb. La presencia de la banda de 287 pb confirma la identidad del vector pKM208.

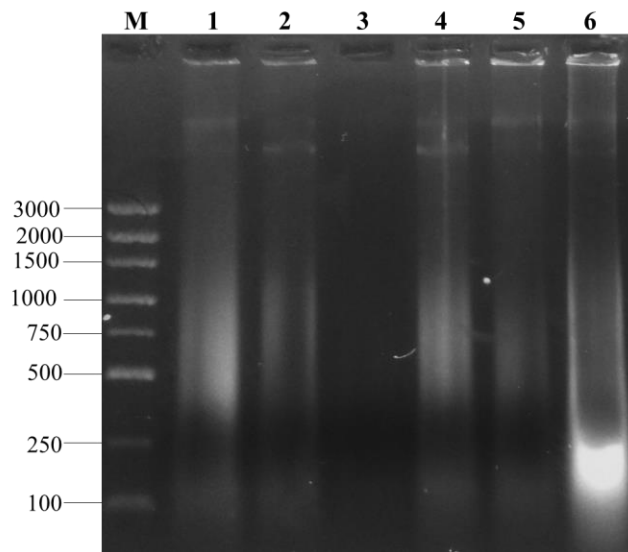


Figura 5. Análisis del DNA plasmídico aislado de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pKM208. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Ready-to-Use TM Plus 100 bp DNA Ladder. Carril 1-6: DNA plasmídico de pKM208.

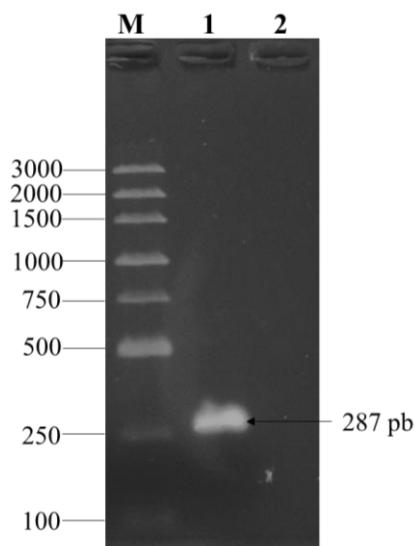


Figura 6. Análisis del ensayo de PCR del DNA plasmídico aislado de las clonas de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pKM208 utilizando los primers: 5'pKM208 y 3'pKM208, específicos para amplificar una secuencia interna del gen *exo*. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Ready-to-Use TM Plus 100 bp DNA Ladder. Carril 1: Producto de PCR. Carril 2: Control negativo.

5.2.2. Transformación y caracterización de *E. coli* C pKM208

Al DNA plasmídico obtenido en el apartado anterior, se le aplicó un tratamiento para la remoción de fragmentos pequeños de RNA (Apartado 4.6.3.) Posterior al tratamiento, presentó una concentración de: 130 ng/ μ L (M1), 56 ng/ μ L (C1) y 104 ng/ μ L. Estos últimos se utilizaron en la transformación. Como resultado de la transformación, se obtuvieron: 0 colonias en la caja Petri “C1”, 2 colonias en la caja Petri “M1” y 1 colonia en la caja Petri “M3”. En la Figura 7 se muestra el análisis en gel de agarosa del vector pKM208 purificado después de ser tratado para la remoción de fragmentos pequeños.

En los carriles 1 y 2 se observan las 2 bandas características del DNA plasmídico de manera muy tenue, lo que indica una baja concentración de DNA plasmídico. En el carril 3 se observan estas 2 bandas con una intensidad mayor, lo que indica una mayor cantidad de DNA plasmídico. La ausencia de barrido en la parte inferior indica una buena integridad del material genético.

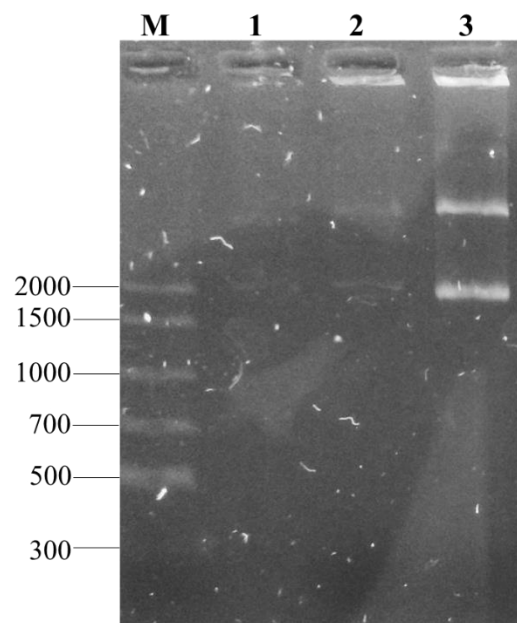


Figura 7. Análisis del vector pKM208 purificado, después del tratamiento para la remoción de fragmentos pequeños. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular PCR DNA Ladder. Carril 1: Vector pKM208 (M1). Carril 2: Vector pKM208 (C1). Carril 3: Vector pKM208 (M3).

En la Figura 8 se muestra el análisis en gel de agarosa del ensayo de PCR para la identificación de la cepa *E. coli* C pKM208 de las 3 colonias transformantes que crecieron. Al ser específicos para una parte interna de la secuencia del gen *exo*, la presencia de la banda de 287 pb confirma la identidad del vector pKM208.

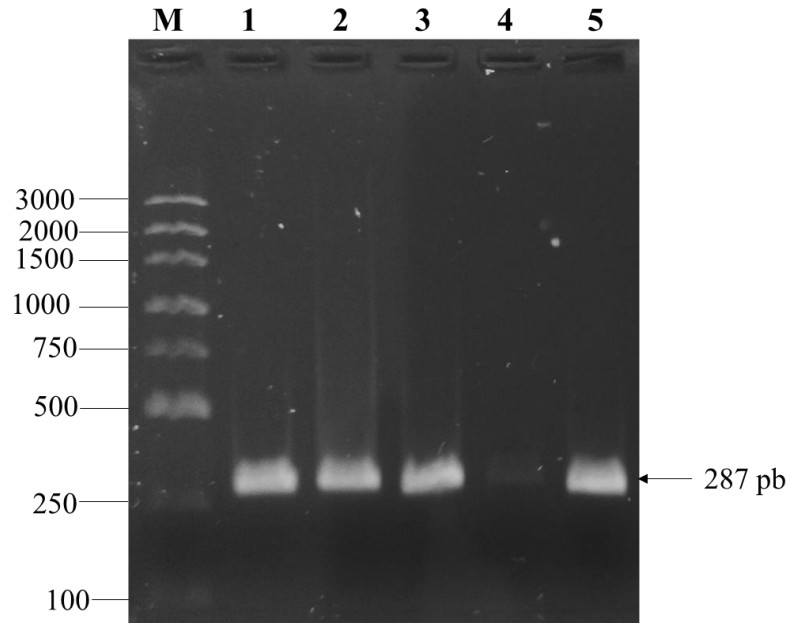


Figura 8. Análisis del ensayo de PCR del DNA plasmídico aislado de las colonias de *E. coli C* transformadas con el vector pKM208 utilizando los primers: 5'pKM208 y 3'pKM208, específicos para amplificar una secuencia interna del gen *exo*. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Ready-to-Use TM Plus 100 bp DNA Ladder. Carril 1: DNA plasmídico aislado de la colonia 1. Carril 2: DNA plasmídico de la colonia 2. Carril 3: DNA plasmídico de la colonia 3. Carril 4: Control negativo. Carril 5: DNA plasmídico aislado de *E. coli DH5 α* .

5.3. Construcción de *E. coli* DH5 α pUC57genF

5.3.1. Transformación y caracterización de *E. coli* DH5 α pUC57genF

En la **Figura 9** se muestra las cajas Petri cultivadas con *E. coli* DH5 α después de la transformación mediante electroporación del vector pUC57genF. En donde no se observa crecimiento en la caja del control negativo, crecimiento en la caja de viabilidad sin ampicilina y crecimiento esperado en la caja F1 y F2 correspondientes a la transformación.

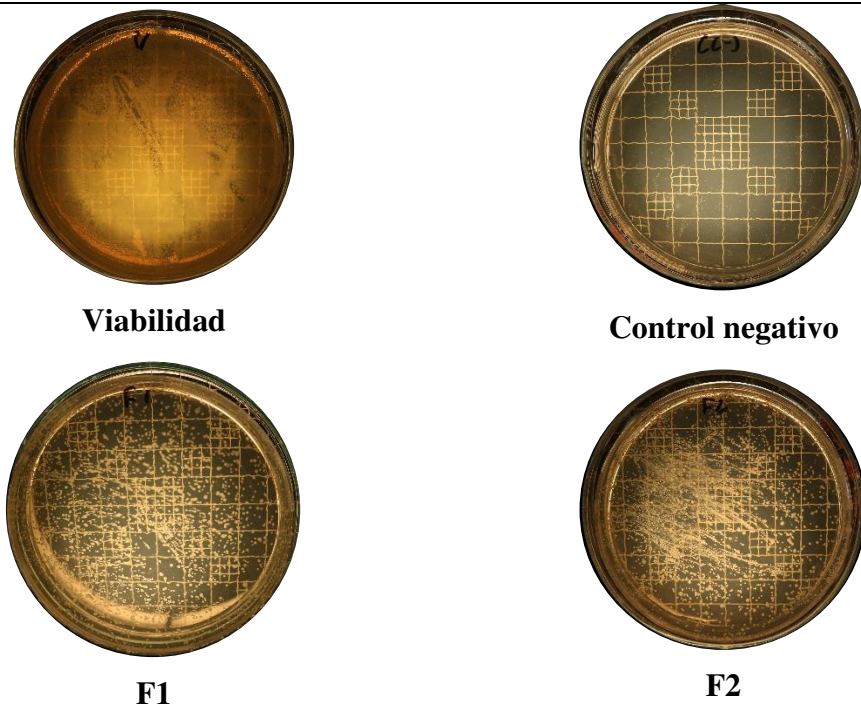


Figura 9. Crecimiento de colonias transformadas con el vector pUC7genF. Las placas correspondientes a control negativo, F1 y F2 contienen ampicilina mientras en la caja Petri correspondiente a la viabilidad no contiene ampicilina. Al no presentarse crecimiento en la caja Petri de control negativo y crecimiento en las cajas Petri correspondientes a F1 y F2, indica que muy probablemente estas colonias incorporaron el vector pUC57genF

En la Figura 10 se muestra el análisis en gel de agarosa 0.8% del vector extraído de 3 colonias transformantes. Las bandas presentes en la parte superior pertenecientes a las conformaciones de los plásmidos indica buena integridad del DNA plasmídico.

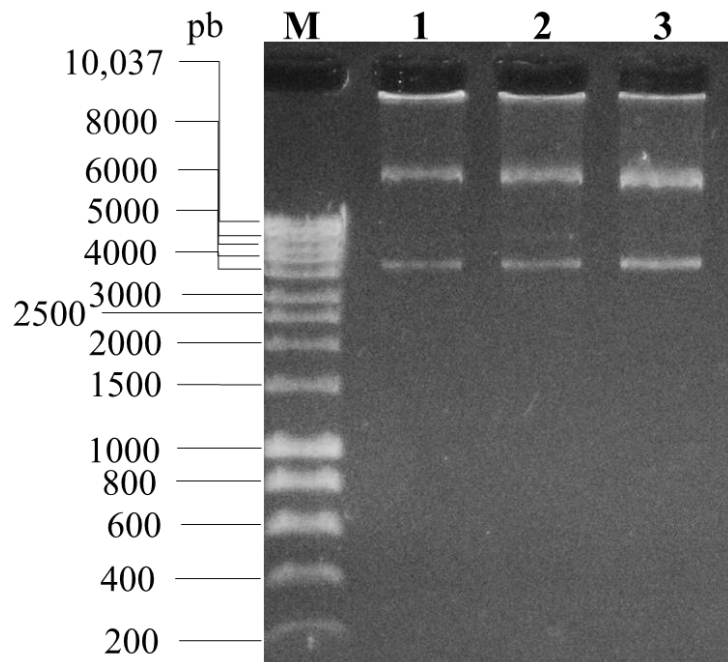


Figura 10. Análisis del DNA plasmídico aislado de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pUC57genF. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1-3: Vector pUC57genF.

En la Figura 11 se muestra el análisis de gel de agarosa de los productos amplificados por PCR del vector pUC57genF, aislado de la cepa *E. coli* DH5 α empleando los primers IdGenFf (5'- CTTGCTATTGACTCTACTGT -3') y IdGenFr (5'- ATGGTCCTACTATTCGTATC -3'), específicos para amplificar una secuencia interna del gen F dando como resultado un amplicon de 1,177 pb. La presencia de esta banda confirma la identidad del vector pUC57genF.

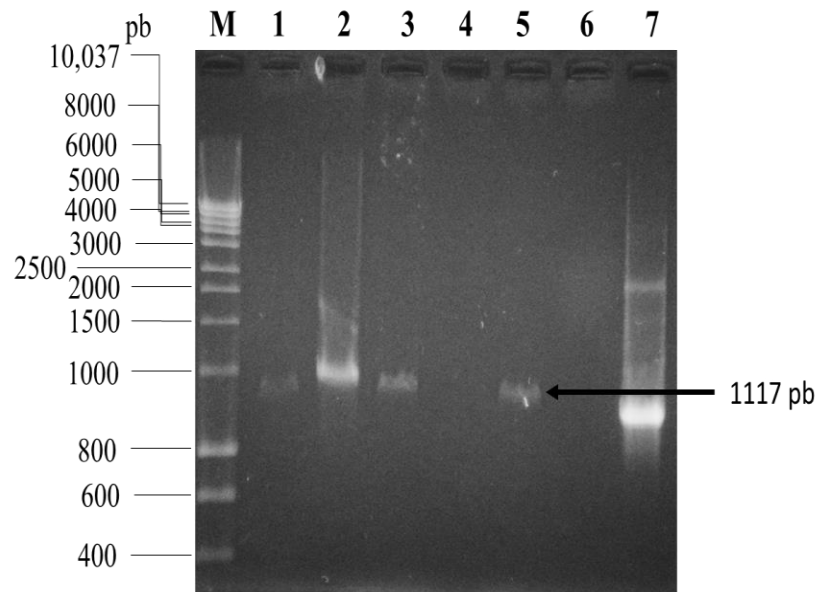


Figura 11. Análisis del ensayo de PCR del DNA plasmídico aislado de las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pUC57genF utilizando los primers: IdGenFf y IdGenFr específicos para amplificar una secuencia interna del gen F. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1-5: DNA plasmídico aislado de diferentes colonias. Carril 6: Control negativo. Carril 7: Control positivo, pUC57genF enviado por la compañía.

5.4. Construcción de *E. coli* DH5 α pUC57cI

5.4.1. Transformación y caracterización de *E. coli* DH5 α pUC57genF

En la Figura 12 se muestra las cajas Petri cultivadas con *E. coli* DH5 α después de la transformación mediante electroporación del vector pUC57cI. En donde no se observa crecimiento en la caja del control negativo, crecimiento en la caja de viabilidad sin ampicilina y crecimiento esperado en la caja R1 y R2 correspondientes a la transformación.

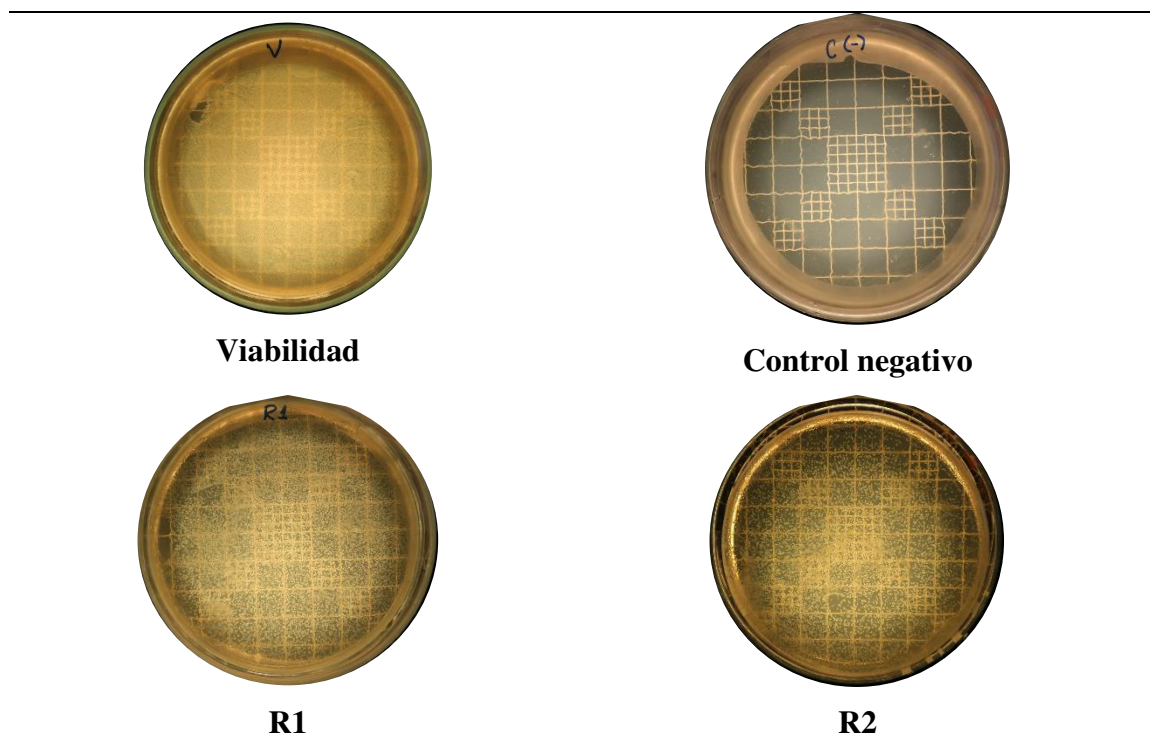


Figura 12. Crecimiento de colonias transformadas con el vector pUC7cI. Las placas correspondientes a control negativo, R1 y R2 contienen ampicilina mientras en la caja Petri correspondiente a la viabilidad no contiene ampicilina. Al no presentarse crecimiento en la caja Petri de control negativo y crecimiento en las cajas Petri correspondientes a R1 y R2, indica que muy probablemente estas colonias incorporaron el vector pUC57cI.

En la Figura 13 se muestra el análisis en gel de agarosa 0.8% del vector pUC57cl aislado de 7 colonias transformantes. Las bandas presentes en la parte superior pertenecientes a las conformaciones de los plásmidos indica buena integridad del DNA plasmídico.

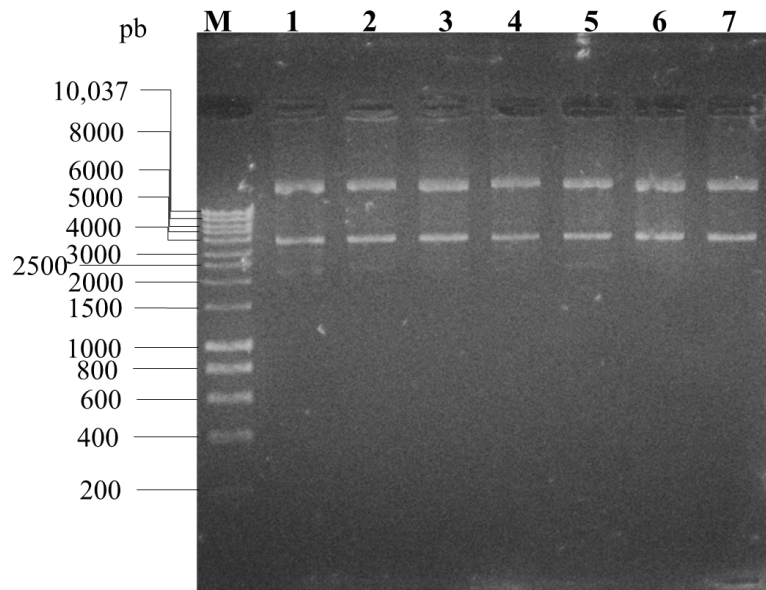


Figura 13. Análisis del DNA plasmídico aislado de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pUC57cl. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1-7: Vector pUC57cl.

En la Figura 14 se muestra el análisis de gel de agarosa de los productos amplificados por PCR del vector pUC57cI, aislado de la cepa *E. coli* DH5 α empleando los primers IdRepLf (5'- GATAACTACTATCCCGTTCT -3') y IdRepLr (5'- GTGTGTCATTGAAGTAAGAG -3'), específicos para amplificar una secuencia interna del gen F dando como resultado un amplicon de 860 pb. La presencia de esta banda confirma la identidad del vector pUC57cI.

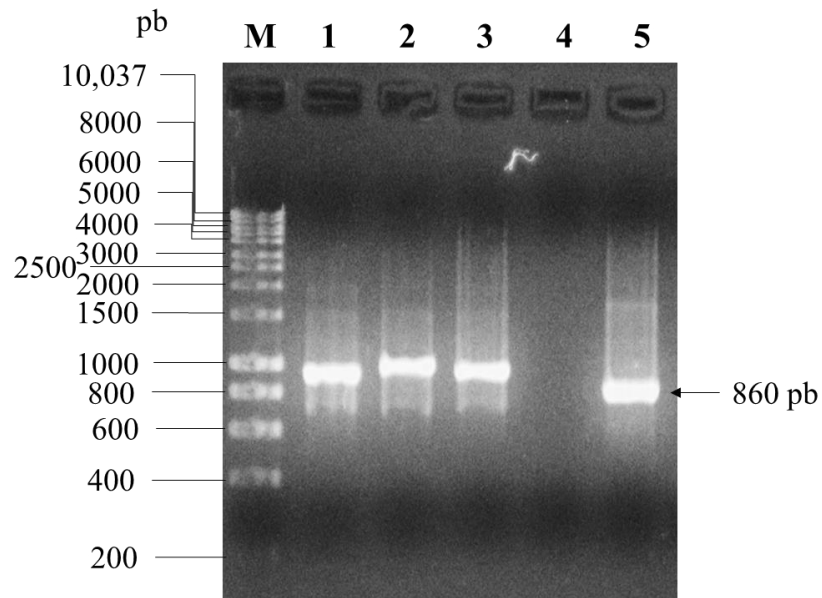


Figura 14. Análisis del ensayo de PCR del DNA plasmídico aislado de las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pUC57cI utilizando los primers: IdRepLf y IdRepLr específicos para amplificar una secuencia interna del gen cI. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1-3: DNA plasmídico aislado de diferentes colonias. Carril 4: Control negativo. Carril 5: Control positivo: pUC57cI enviado por la compañía.

5.5. Construcción del fragmento genF-cl

5.5.1. Síntesis de los fragmentos genF y cl

En la **Figura 15** se muestra el análisis de gel de agarosa de los productos amplificados por PCR del vector pUC57genF, aislado de la cepa *E. coli* DH5 α empleando los primers ExtGenFf (5'- ACTGTACGCACTATTTACTC -3') y OverGenFr (5'- AGAACGGGATAGTAGTTATCATGGTCCTACTATTCGTATC -3') que amplifican completamente el fragmento genF y agregan 20 pb en el extremo 3', dando como resultado un amplicón de 1,478 pb y los productos amplificados por los primers OverGenFf (5'- GATACGAATAGTAGGACCATGATAACTACTATCCCGTTCT -3') y ExtRepLr (5'- TTAGTTCCTCACCTACTTTC -3') que amplifican completamente el fragmento cl y agregan 20 pb en el extremo 3', dando como resultado un amplicón de 950 pb.

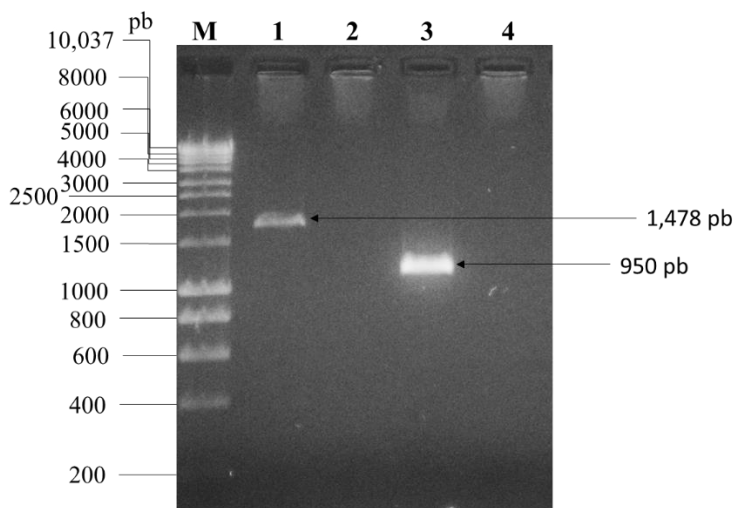


Figura 15. Análisis del ensayo de PCR de alta fidelidad del DNA plasmídico del vector pUC57genF utilizando los primers: ExtGenFf y OvergenFcIr y del vector pUC57cl utilizando los primers: OvergenFcIf y pUC57cl. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: Fragmento genF. Carril 2: Control negativo genF. Carril 3: Fragmento cl. Carril 4: Control negativo cl.

5.5.2. PCR overlap

En la **Figura 16** se muestra el análisis de gel de agarosa de los productos amplificados mediante la técnica PCR overlap empleando los primers ExtGenFf (5'-ACTGTACGCACTATTTACTC -3') y ExtRepLr (5'- TTAGTTCCTCACCTACTTTC -3') y los productos de la reacción de PCR para amplificar genF y cI. Los fragmentos genF y cI contienen 40 pb de homología y funcionan como primers, para generar el fragmento geF-cI mientras que los primers ExtgenFf y ExtRepLr amplifican el fragmento completo dando como resultado una amplicón de 2,388 pb. También se observan 2 bandas más: la primera de 1,478 pb que corresponde al fragmento genF y otra de 950 pb que corresponde al fragmento cI.

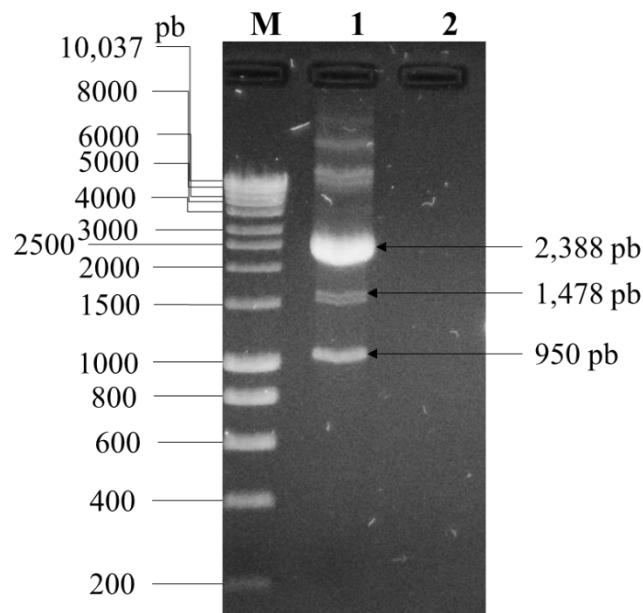


Figura 16. Análisis del ensayo de PCR overlap utilizando los primers ExtGenFf y ExtRepLr. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: PCR overlap. Carril 2: Control negativo.

En la **Figura 17** se muestra el análisis en gel de agarosa del fragmento genF-cl purificado del gel de agarosa. Se observa solamente la banda de 2,388 pb lo que indica que solo se purificó el DNA de esta banda.

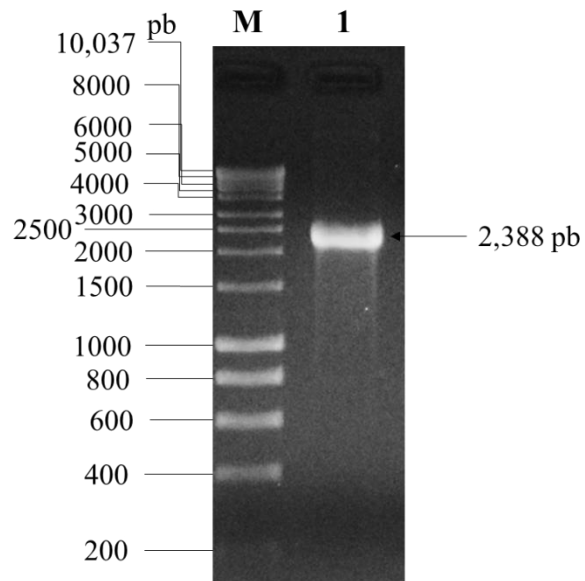


Figura 17. Análisis de la integridad del fragmento genF-cl purificado. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: fragmento genF-cl

En la **Figura 18** se observa el análisis en gel de agarosa del PCR de alta fidelidad del fragmento genF-cI utilizando los primers ExtGenFf (5'-ACTGTACGCACTATTTACTC -3') y ExtRepLr (5'- TTAGTTCCTCACCTACTTTC -3') que generan un amplicón de 2,388 pb.

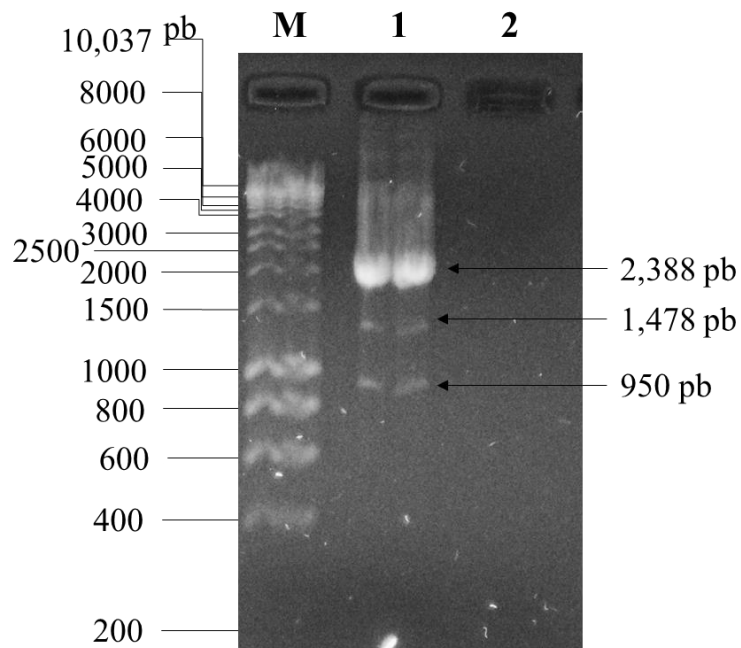


Figura 18. Análisis del ensayo de PCR de alta fidelidad del fragmento genF-cI utilizando los primers ExtGenFf y ExtRepLr. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: Fragmento genF-cI. Carril 2: Control negativo.

En la Figura 19 se muestra el análisis en gel de agarosa al 1% del fragmento genF-cI purificado utilizando el kit SureClean Plus. La usencia de bandas indica buena integridad del fragmento.

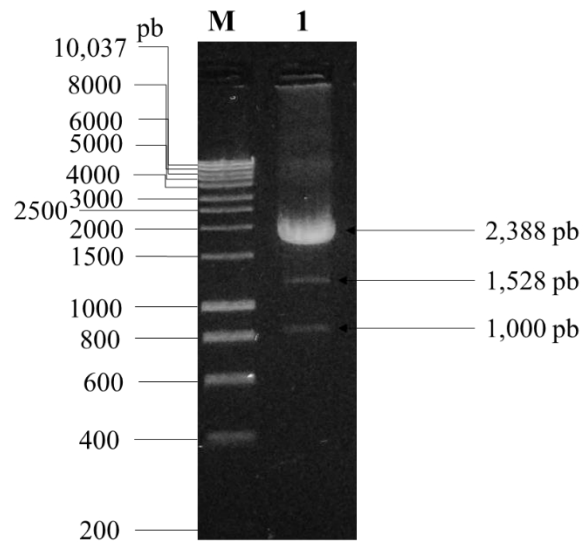
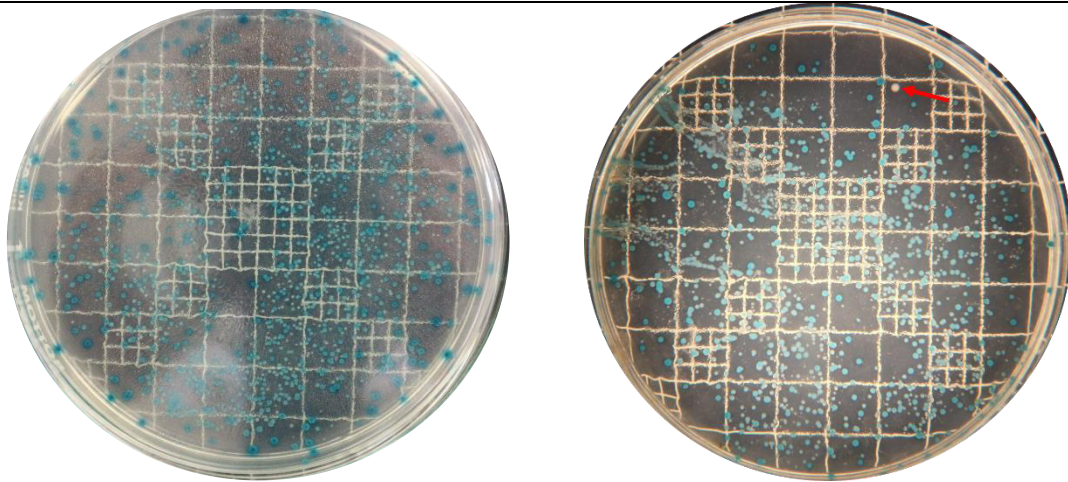


Figura 19. Análisis del producto amplificado genF-cI purificado con el kit SureClean plus. Electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE 1X. M: Marcador de tamaño molecular Hyperladder 1 Kb. Carril 1: Fragmento genF-cI.

5.6. Construcción de la cepa *E. coli* C genF-cl

En la Figura 20 se muestran 2 placas de las 40 que fueron sembradas. A la derecha se puede observar una colonia blanca (señalada con flechas) entre las colonias azules, mientras que la del lado izquierdo representa una de las cajas Petri en donde las bacterias no fueron transformadas (todas se muestran en color azul).



Caja Petri sin colonias transformadas
(todas presentan color azul)

Caja Petri con 1 colonia transformada
(Señalada por la flecha roja)

Figura 20. Cajas Petri para la selección de *E. coli* C transformada. A la izquierda *E. coli* C sin transformar. A la derecha *E. coli* C transformada. La flecha roja señala una colonia blanca que fue transformada. Ambas cajas Petri contienen Agar LB 2% con IPTG 1mM, X-Gal (100 ng/ μ L).

En la Figura 21 se observa la resiembra de las colonias que fueron tomadas como positivas a la transformación en agar LB 2% con IPTG 1mM y X-Gal (100 ng/ μ L). A la derecha se observa que el cultivo es totalmente blanco (*E. coli* C genF-cl), mientras a la izquierda se muestra el control negativo (*E. coli* C) totalmente en azul.

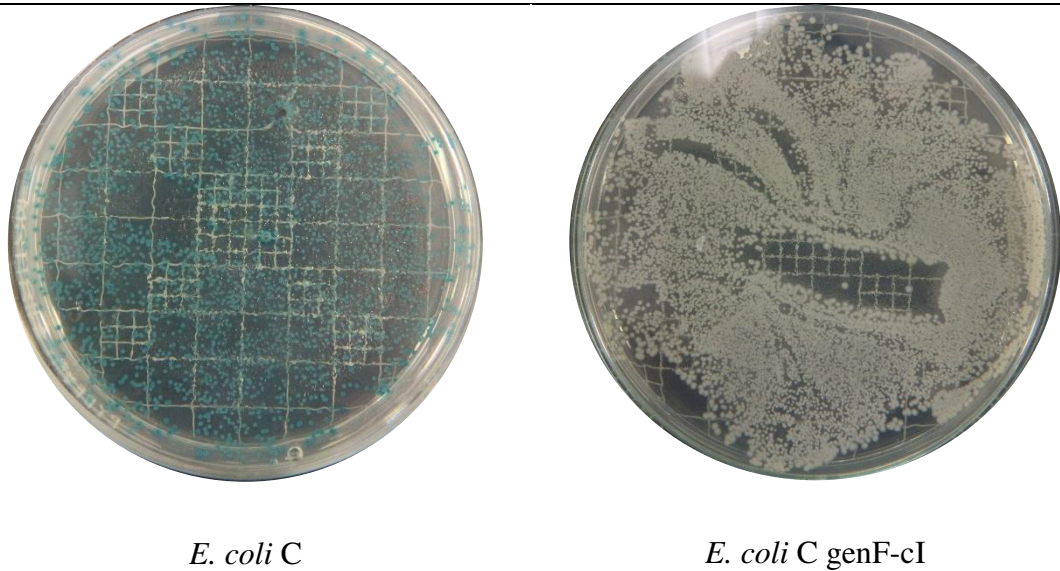
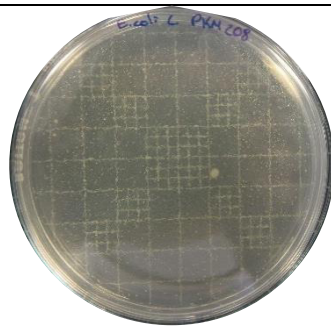


Figura 21. Cajas Petri con agar LB 2% IPTG 1mM X-Gal 100 ng/mL. En la imagen de la izquierda (control negativo) se observan colonias de *E. coli* C de color azul, debido a que pueden hidrolizar el X-Gal. En la imagen de la derecha se observan colonias de *E. coli* C genF-cl (transformada) de color blanco debido a su incapacidad de hidrolizar el X-Gal.

5.6.1. Infección de la cepa *E. coli* C genF-cl con ϕ X174

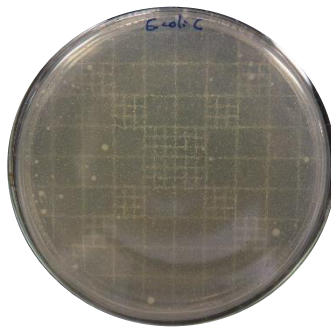
En la Figura 22 se muestran las cajas Petri que contienen agar LB 2% de base y agar LB 0.5% en la parte superior, donde se realizaron los ensayos de infección. En la caja Petri correspondiente a *E. coli* C se observa lisis (Control negativo), en la que corresponde a *E. coli* C pKM208 se observa lisis, en la correspondiente a *E. coli* C genF-cl se observa lisis y en la correspondiente a DH5 α no se observa lisis. Esto demuestra que la cepa transformada conserva la característica de ser susceptible al fago ϕ X174.



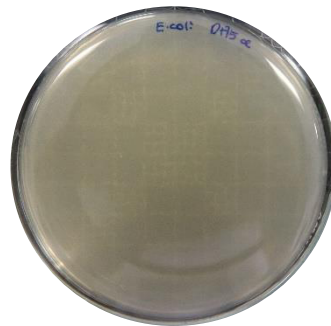
E. coli C pKM208



E. coli C genF-cl



E. coli C



E. coli DH5 α

Figura 22. Pruebas de infección de diferentes cepas de *E. coli* con el bacteriófago ϕ X174. *E. coli* C presentó lisis (control negativo). La cepa *E. coli* C pKM208 fue de donde se partió para realizar la transformación. La cepa *E. coli* C genF-cl presenta lisis en menor medida que la cepa *E. coli* C y *E. coli* C pKM208. *E. coli* DH5 α no presentó lisis (control negativo).

CAPITULO 6

DISCUSIÓN

Con el fin de evitar la diseminación de genes de resistencia a antibióticos causada por su empaquetamiento de los bacteriófagos y evitar reacciones inmunes causadas por los bacteriófagos, se buscó controlar el empaquetamiento (y por lo tanto la replicación) y la replicación del bacteriófago ϕ X174 y a la vez potenciar su actividad antimicrobiana. El primer cuestionamiento antes de diseñar los genes para lograr este fin fue elegir un gen esencial para el empaquetamiento fuera fácil de manipular. Después de un análisis, dio como resultado que el gen F era un buen candidato para realizar la sustitución genética debido a que no presenta genes dentro de su marco de lectura abierto y las secuencias reguladoras de los genes adyacentes están muy cerca del 5' y del 3' del marco de lectura abierto del gen F, por lo que la parte interna era un buen blanco. Expresar el gen F desde un plásmido es eficiente para producir bacteriófagos viables (Jaschke et al., 2012). Integrar esta secuencia en el genoma de *E. coli* permitiría replicar fagos deficientes del gen F. Se eligió al bacteriófago ϕ X174 debido al tamaño de su genoma y a lo estudiado la regulación de todos sus genes. Para conseguir el objetivo, se construyeron 3 piezas sintéticas.

La pieza sintética “Bac7” fue integrada en la posición 991 a la posición 1309 (GenBank: CP004084.1), por lo que elimina desde el sitio de unión a ribosoma del gen F (RBS), el inicio del marco de lectura abierto del gen F (posición 1001) y hasta una parte central del marco de lectura abierto del gen F (posición 1309).

Este diseño evita la traducción de la proteína F al no contar con un sitio de unión a ribosoma ni el inicio del marco de lectura abierto del gen F. Se tomó esta posición para respetar los sitios regulatorios que se encuentra río arriba del gen F y eliminar, tanto el RBS natural del gen F como el inicio del marco de lectura para evitar su traducción. El gen está regulado por el promotor pR (GenBank: M25081.1) y un sitio de unión a ribosoma ideal para *E. coli* (Chen, Bjerknes, Kumar, & Jay, 1994). Un terminador sintético fuerte que es independiente de proteína Rho ($\Delta G = -19.31$ Kcal/mol), 2 codones de termino (codón ópalo “UGA”, codón ocre “UAA”). Se agrego al diseño el promotor del Gen D del bacteriófago después del terminador, debido a que los genes G y H del bacteriófago natural, están regulados por el promotor del gen D y es probable que el terminador sintético ($\Delta G = -19.31$ Kcal/mol) termine la transcripción y los genes G y H del bacteriófago no se transcriban. El transcrito generado naturalmente, comienza en el gen D pasa por las secuencias terminadores de los genes J, F, G y H (Brendel, 1985). El promotor agregado en la secuencia sintética pasa por el terminador F por lo que, al colocar este promotor, se completa el transcrito faltante para la traducción de las proteínas G y H.

Posteriormente se diseñaron las piezas genéticas “gen F” y “cI”. El diseño del gen sintético “genF” tiene el promotor lacUV5, que es independiente de la unión de la lactosa al sitio de unión CAP para iniciar la transcripción por lo que se agregó para no depender de la lactosa. Se agregó el sitio a unión a ribosomas del gen F y el marco de lectura abierto del gen F natural de $\phi X174$ (GenBank: CP004084.1), el mismo terminador sintético fuerte que es independiente de proteína Rho ($\Delta G = -19.31$ Kcal/mol) usado con el fragmento “Bac7” y 2 codones de termino (codón ópalo “UGA”, codón ocre “UAA”).

En la pieza sintética cI, el represor de lambda está bajo la regulación de un promotor constitutivo por lo que siempre se estará expresando. Esta cepa se diseñó de esta forma para que sea la única en donde el bacteriófago ϕ X174 sea capaz de completar su replicación. Al tener el *gen F* del bacteriófago en su genoma, es capaz de otorgarle la proteína F (complementación) y completar su empaquetamiento. Al tener el *gen cI* con expresión constitutiva, es capaz de producir la proteína represora de λ que regula el promotor lambda y evita la producción del péptido antimicrobiano Bac 7(1-35) durante la replicación del ADN y empaquetamiento de ϕ X174 y por lo tanto no inducir a la muerte a *E. coli* C. Los brazos homólogos utilizados para todas las piezas genéticas son de 50 pb de longitud. Murphy y colaboradores recomiendan una longitud de entre 35-50 pb para el brazo homólogo, por lo que se eligió la longitud de 50 pb. (Murphy & Campellone, 2003).

El vector en donde fue enviado la pieza Bac7 es el pBR322, debido a que es un vector de bajas copias y de esta forma, reducir la toxicidad. También cuenta con el gen que codifica para la proteína represora de lambda (cI) y evitar su producción durante la propagación del vector.

pKM208 es un plásmido de bajas copias construido por Murphy y colaboradores (Murphy & Campellone, 2003). Este vector tiene un rendimiento de 3 colonias cada 10,000 (3×10^{-4}). Tiene un origen de replicación termosensible y se encuentran aproximadamente 5 copias del plásmido por célula, debido al origen de replicación pSC101 (Manen & Caro, 1991) . Este plásmido se aisló utilizando la técnica de lisis alcalina y por la naturaleza de la propia técnica, se obtiene una gran cantidad de RNA junto con el DNA plasmídico, por lo tanto, se obtuvo un bajo rendimiento del vector (como se puede ver en la Figura 5).

Debido a lo anterior, se realizó una extracción a partir de 5 mL de cultivo, sin embargo, la medición en el nano espectrofotómetro (2,000 ng/ μ L) no correspondía a lo que se observaba en el gel de agarosa cuando se realizó la electroforesis de este vector aún y cuando se trató con RNAasa (*Roche*), por lo que se llegó a la conclusión que en proporción, las moléculas pequeños de RNA eran mucho más que las copias de DNA, que como ya se mencionó anteriormente son aproximadamente 5 copias de vector por célula (Manen & Caro, 1991), por lo que se decidió remover estos fragmentos utilizando LiCl (Ausubel et al., 2003). Después del tratamiento, la medición obtenida en el nano espectrofotómetro era mucho menor que antes del tratamiento (60 ng/ μ L), sin embargo, esta vez la concentración dada por el equipo correspondía con lo observado en el gel, por lo que se tomó como medición real. Tu y colaboradores, mencionan que la eficiencia de transformación es de 6×10^6 bacterias transformadas por mL utilizando diferentes cepas de *E. coli*. Sin embargo, en este trabajo se obtuvieron 3 colonias utilizando 150 ng totales del vector pKM208. Lo anterior se pudo deber a que la concentración de DNA plasmídico era menor a la indicada en el nano espectrofotómetro (contaminación con RNA). Esto es lo más probable debido a que en el gel (Figura 7) se observa el vector con bandas definidas e integro al no presentar barridos hacia abajo (indicador de degradación).

Se transformó pUC57genF y pUC57cI en la cepa *E. coli* DH5 α (en células diferentes, no la misma célula) debido a que esta cepa de *E. coli* es apta para el mantenimiento de plásmidos de altas copias (pUC57 tiene aproximadamente 700 copias por célula).

En diferentes geles (Figura 11, Figura 14 y Figura 15) las bandas de las muestras no corresponden al tamaño esperado comparado con los del marcador del peso molecular usado en cada gel. Esto se debió a problemas con la cámara de electroforesis, en las que las bandas del centro migraban menos que las de los extremos. Sin embargo, el resultado de todos los ensayos de PCR se hicieron con primers específicos por lo que no deben de generar bandas inespecíficas. Todos los primers utilizados fueron analizados con el programa AmplifX que permite realizar PCR *in silico* y no se obtuvieron bandas inespecíficas.

Todos los fragmentos fueron sintetizados con la polimerasa de alta fidelidad Accuzyme (*BioLine*) que tiene una tasa de error de 3×10^{-6} y se realizó la reacción con pocos ciclos (20 ciclos) para minimizar los errores de la enzima (Kadkhodaei et al., 2016).

Para realizar el protocolo PCR overlap no se purificaron las bandas correspondientes a genF y cI, se tomaron directamente de los tubos donde se realizó la PCR de alta fidelidad para amplificar ambos fragmentos. Según Luo y colaboradores, tuvieron mejores resultados al realizar PCR overlap de esta manera en lugar de purificar los fragmentos del gel (Luo et al., 2013). Siguiendo este protocolo se puede observar claramente la banda correspondiente al fragmento genF-cI con un tamaño de 2,388 pb, otra banda de 1,478pb y 950 pb (Figura 16). Estas últimas 2 bandas corresponden al fragmento genF y cI respectivamente. Al no usar primers para amplificar estos fragmentos, probablemente fueron amplificados por los primers tomados de los tubos donde se realizó la reacción de amplificación de los fragmentos genF y cI.

En la Figura 17 se observa el fragmento genF-cI purificado del gel de agarosa y no se observan las bandas correspondientes al fragmento genF ni cI, lo que indica que se realizó un corte exacto del gel de agarosa donde se encontraba el fragmento genF-cI, sin embargo, en la Figura 18 correspondiente al PCR de alta fidelidad del fragmento genF-cI se vuelven a apreciar estas 2 bandas (genF de 1,478 pb y cI de 950 pb). Probablemente algunas moléculas de genF y cI se quedaron atascadas junto con las del fragmento genF-cI y en el momento de purificar esta banda, también se purificaron estos 2 fragmentos y se logran apreciar en la electroforesis.

Para tener un cálculo acertado de la cantidad de copias del fragmento genF-cI fue necesario purificarlo de los demás componentes que hay en la reacción (enzimas, buffer, primers) ya que estos componentes intervienen en la medición. El kit SureClean Plus (*BioLine*) fue usado para purificar este fragmento.

Posterior al tratamiento se midió con el nano espectrofotómetro dando una concentración de 349 ng/μL (Para llevar a cabo la transformación son necesarios al menos 500 ng totales de DNA de doble cadena puro).

Todos los primers utilizados para la identificación de las cepas recombinantes no amplifican otras secuencias de su genoma, según el programa “PCR *in silico*” (Bikandi, San Millán, Rementeria, & Garaizar, 2004).

El PCR overlap se realizó para unir a los fragmentos genF y cI creando un fragmento de 2,388 pb con brazos homólogos (50 pb) para recombinarse en el extremo 5' del gen *lacZ*. Se decidió unir a los fragmentos para hacer más fácil su selección utilizando de sustrato X-Gal.

Al inducir con IPTG, *E. coli C* produce la enzima β -galactosidasa que es capaz de hidrolizar el X-Gal y por lo tanto formar un compuesto azul insoluble. (Ausubel et al., 2003). Al dirigir la integración en este locus, se truncó la enzima β -galactosidasa, por lo que la cepa de *E. coli C* transformada fue incapaz de producir esta enzima de manera funcional y de hidrolizar el X-Gal y por lo tanto se generaron colonias blancas. Para realizar la selección de la colonia transformada se prepararon 40 cajas Petri con X-Gal e IPTG. En pruebas anteriores, se concluyó que diluyendo un cultivo de *E. coli C* con OD₆₀₀ de aproximadamente 0.5 en una proporción 1:100 y sembrando 100 μ L, se podían contar alrededor de 500 colonias de *E. coli C*. Por lo tanto, en 40 cajas Petri crecerían 20,000 colonias, lo que nos permitiría tener aproximadamente 6 colonias transformantes tomando en cuenta que la eficiencia de transformación de 3 células cada 10,000 que se obtiene utilizando el sistema de pKM208 (Murphy & Campellone, 2003).

En la Figura 21 se muestran los ensayos de lisis con diferentes cepas de *E. coli*. Se utilizó la cepa *E. coli C* como control negativo para observar la lisis natural. La cepa *E. coli C* pKM208, que fue la cepa de donde se partió para realizar la transformación con el fragmento genF-cI la cual presentó lisis de manera similar a la *E. coli C*. *E. coli* DH5 α no es susceptible a la infección del bacteriófago ϕ X174 por lo que se usó como control negativo para observar el crecimiento de la bacteria sin lisis y finalmente, la cepa *E. coli C* genF-cI también presentó lisis, pero en menor medida a la de *E. coli C*. Al presentar lisis, nos indica que se trata de la cepa *E. coli C* pura, ya que este cultivo partió de una sola colonia de la caja Petri donde se tenía cultivada *E. coli* genF-cI (Figura 21). Por lo que no puede haber contaminación con otras cepas.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

- En este trabajo se lograron diseñar las 3 piezas sintética genF, Bac7 y cI, las cuales fueron sintetizadas en pUC57 (genF y cI) y pBR322 (Bac7).
- Se logró transformar el vector pKM208 en la cepa *E. coli* C.
- Se transformó el vector pUC57genF en la cepa *E. coli* DH5 α para conseguir la propagación del vector.
- Se logró transformar el vector pUC57cI en la cepa *E. coli* DH5 α para conseguir la propagación del vector.
- Se consiguió unir los fragmentos genF y cI mediante el procedimiento de PCR overlap para crear el fragmento genF-cI con un tamaño de 2,388 pb.
- Utilizando el sistema λ -Red presente en el vector pKM208, se construyó la cepa *E. coli* C genF-cI integrando el fragmento genF-cI en el locus de lacZ y se seleccionó utilizando X-Gal e IPTG.
- La cepa *E. coli* C genF-cI recién construida conservó la susceptibilidad a la infección por el bacteriófago ϕ X174.

CAPITULO 8

REFERENCIAS

1. Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697–705.
2. Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC), 1–7.
3. Ashkenazi, S. (2013). Beginning and possibly the end of the antibiotic era. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 49(3), 179–182.
4. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. a, ... Blackshaw, S. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. *Molecular Biology* (Vol. 1).
5. Bechinger, B., & Gorr, S.-U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260.
6. Benincasa, M., Pelillo, C., Zorzat, S., Garrovo, C., Biffi, S., Gennaro, R., & Scocchi, M. (2010). The proline-rich peptide Bac7(1-35) reduces mortality from *Salmonella typhimurium* in a mouse model of infection. *BMC Microbiology*, 10(1), 178.
7. Benincasa, M., Scocchi, M., Podda, E., Skerlavaj, B., Dolzani, L., & Gennaro, R. (2004). Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides*, 25(12), 2055–2061.
8. Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., & Garaizar, J. (2004). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(5), 798–9.
9. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 47(14), 4055–4061.
10. Brendel, V. (1985). Mapping of transcription terminators of bacteriophages phi X174 and G4 by sequence analysis. *Journal of Virology*, 53(1), 340–2.
11. Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50.
12. Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B., & Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(5), 465–478.
13. Brown, C. J., Millstein, J., Williams, C. J., & Wichman, H. A. (2013). Selection Affects Genes Involved in Replication during Long-Term Evolution in Experimental Populations of the Bacteriophage ϕ X174. *PLoS ONE*.
14. Brüssow, H., & Hendrix, R. W. (2002). Phage Genomics: Small is beautiful. *Cell*, 108(1), 13–16.
15. Bruttin, A., Brüssow, H., & Bru, H. (2005). Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally : a Safety Test of Phage Therapy These include : Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally : a

- Safety Test of Phage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2874–2878.
16. Casto, A., Hurwitz, A., Kou, K., Mansour, G., Policke, R., Schmidt, Snyder, A. (2016). Bacteriophages: The Answer to Antibiotic Resistance ? *James Madison Undergraduate Research Journal Volume*, 3(1), 36–41.
 17. Chan, L. Y., Kosuri, S., & Endy, D. (2005). Refactoring bacteriophage T7. *Molecular Systems Biology*, 1, 2005.0018.
 18. Chatterjee, M., Anju, C. P., Biswas, L., Anil Kumar, V., Gopi Mohan, C., & Biswas, R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*,
 19. Chen, H., Bjercknes, M., Kumar, R., & Jay, E. (1994). Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *E. coli* mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 22(23),
 20. Christakos, K. J., Chapman, J. A., Fane, B. A., & Campos, S. K. (2016). PhiXing-it, displaying foreign peptides on bacteriophage Φ X174. *Virology*, 488,
 21. Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2017). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current Microbiology*, 74(2), 277–283.
 22. Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V. A., ... Rex, J. H. (2016). Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 239–251.
 23. de León-Rosales, S. P., Arredondo-Hernández, R., & López-Vidal, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gaceta Medica de Mexico*, 151(5), 681–689.
 24. Dimasi, J. A., Hansen, R. W., & Grabowski, H. G. (2003). The price of innovation : new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, 22, 151–185.
 25. Domingo-Calap, P., Georgel, P., & Bahram, S. (2016). Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools. *HLA*, 87(3), 133–140.
 26. Dubos, R. J. (1939). STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS : II. PROTECTIVE EFFECT OF THE BACTERICIDAL AGENT AGAINST EXPERIMENTAL PNEUMOCOCCUS INFECTIONS IN MICE. *The Journal of Experimental Medicine*, 70(1), 11–7.
 27. Fehér, T., Karcagi, I., Blattner, F. R., & Pósfai, G. (2012). Bacteriophage recombineering in the lytic state using the lambda red recombinases. *Microbial Biotechnology*, 5(4), 466–476.
 28. Feige, U., & Stirm, S. (1976). On the structure of the *Escherichia coli* C cell wall lipopolysaccharide core and on its phiX174 receptor region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(2), 566–73.
 29. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2011). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(1), 37–51.
 30. Frank, R. W., Gennaro, R., Schneider, K., Przybylski, M., & Romeo, D. (1990). Amino acid sequences of two proline-rich bacteriocins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(31), 18871–4.
 31. Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., & Lehrer, R. I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human

- neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1427–35.
32. Gennaro, R., Skerlavaj, B., & Romeo, D. (1989). Purification, composition, and activity of two bactericins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infection and Immunity*, 57(10), 3142–6.
 33. Gennaro, R., & Zanetti, M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55(1), 31–49.
 34. Gennaro R., Zanetti M., Benincasa M, Podda E, M. M. (2002). Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Current Pharmaceutical Design*, 8(9), 763–78.
 35. Groves, M. L., Peterson, R. F., & Kiddy, C. A. (1965). Polymorphism in the red protein isolated from milk of individual cows. *Nature*, 207(5000), 1007–1008. <https://doi.org/10.1038/2071007a0>
 36. Jaschke, P. R., Lieberman, E. K., Rodriguez, J., Sierra, A., & Endy, D. (2012). A fully decompressed synthetic bacteriophage ϕ X174 genome assembled and archived in yeast. *Virology*, 434(2), 278–284.
 37. Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511.
 38. Kadkhodaei, S., Memari, H. R., Abbasiliasi, S., Rezaei, M. A., Movahedi, A., Shun, T. J., & Ariff, A. Bin. (2016). Multiple overlap extension PCR (MOE-PCR): an effective technical shortcut to high throughput synthetic biology. *RSC Adv.*, 6(71), 66682–66694.
 39. Kang, H., Kim, C., Seo, C. H., & Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 55(1), 1–12.
 40. Kiro, R., Shitrit, D., & Qimron, U. (2014). Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biology*, 11(1), 42–4.
 41. Le, S., He, X., Tan, Y., Huang, G., Zhang, L., Lux, R., ... Hu, F. (2013). Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004. *PloS One*, 8(7), e68562.
 42. Li, J., Koh, J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Frontiers in Neuroscience*, 11(February), 73.
 43. Lin, T. Y., Lo, Y. H., Tseng, P. W., Chang, S. F., Lin, Y. T., & Chen, T. S. (2012). A T3 and T7 recombinant phage acquires efficient adsorption and a broader host range. *PLoS ONE*, 7(2), 1–10.
 44. Lu, T. K., & Collins, J. J. (n.d.). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage.
 45. Lu, T. K., & Koeris, M. S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), 524–31.
 46. Luo, W.-G., Liu, H.-Z., Lin, W.-H., Kabir, M., & Su, Y. (2013). Simultaneous splicing of multiple DNA fragments in one PCR reaction. *Biological Procedures Online*, 15(1), 9.
 47. Madigan, M. ., Clark, D. P., Stahl, D., & Martinko, J. M. (2015). *Brock Biology of Microorganisms, 14th Edition- Madigan. Pearson Education.*
 48. Manen, D., & Caro, L. (1991). The replication of plasmid pSC101. *Molecular*

- Microbiology*, 5(2), 233–237.
49. Mardirossian, M., Grzela, R., Giglione, C., Meinnel, T., Gennaro, R., Mergaert, P., & Scocchi, M. (2014). The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chemistry and Biology*, 21(12), 1639–1647.
 50. Marinelli, L. J., Piuri, M., Swigoňová, Z., Balachandran, A., Oldfield, L. M., van Kessel, J. C., & Hatfull, G. F. (2008). BRED: A simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS ONE*, 3(12).
 51. Matsuda, T., Freeman, T. A., Hilbert, D. W., Duff, M., Fuortes, M., Stapleton, P. P., & Daly, J. M. (2005). Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model. *Surgery*, 137(6), 639–46.
 52. Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: A revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11(5), 211–219.
 53. Miedzybrodzki, R., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B., & Górski, A. (2007). Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczałnej (Online)*, 61, 461–5.
 54. Morel, C. M., & Mossialos, E. (2010). Stoking the antibiotic pipeline. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 340(may), c2115.
 55. Murphy, K. C., & Campellone, K. G. (2003). Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic E. coli. *BMC Molecular Biology*, 4, 11.
 56. Nicolaou, K. C., & Rigol, S. (2017). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*, (April), 1–32.
 57. O' Neill, J. (2016). Vaccines and alternative approaches: reducing our dependence on antimicrobials, (February).
 58. Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., & Pompliano, D. L. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(1), 29–40.
 59. Pelillo, C., Benincasa, M., Scocchi, M., Gennaro, R., Tossi, A., & Pacor, S. (2014). Cellular internalization and cytotoxicity of the antimicrobial proline-rich peptide Bac7(1-35) in monocytes/macrophages, and its activity against phagocytosed Salmonella typhimurium. *Protein and Peptide Letters*, 21(4), 382–90.
 60. Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20(4), 5286–5298.
 61. Phoenix, D. A., Dennison, S. R., & Harris, F. (2013). Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity. In *Antimicrobial Peptides* (pp. 1–37). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
 - 62.
 63. Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., & Lu, T. K. (2016). Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 80(3), 523–43.
 64. Podda, E., Benincasa, M., Pacor, S., Micali, F., Mattiuzzo, M., Gennaro, R., &

- Scocchi, M. (2006). Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(11), 1732–1740.
65. Ruboyianes, M. V, Chen, M., Dubrava, M. S., Cherwa, J. E., & Fane, B. A. (2009). The Expression of N-Terminal Deletion DNA Pilot Proteins Inhibits the Early Stages of ϕ X174 Replication. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 83(19), 9952–9956.
66. Sagona, A. P., Grigonyte, A. M., MacDonald, P. R., & Jaramillo, A. (2016). Genetically modified bacteriophages. *Integrative Biology : Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 8(4), 465–74.
67. Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(12), 777–86.
68. Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
69. Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., ... Smith, M. (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *Journal of Molecular Biology*, 125(2), 225–246.
70. Sathaliyawala, T., Rao, M., Maclean, D. M., Birx, D. L., Alving, C. R., & Rao, V. B. (2006). Assembly of human immunodeficiency virus (HIV) antigens on bacteriophage T4: a novel in vitro approach to construct multicomponent HIV vaccines. *Journal of Virology*, 80(15), 7688–98.
71. Scocchi, M., Romeo, D., & Zanetti, M. (1994). Molecular cloning of Bac7, a proline- and arginine-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. *FEBS Letters*, 352(2), 197–200.
72. Seed, K. D., Lazinski, D. W., Calderwood, S. B., & Camilli, A. (2013). A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature*, 494(7438), 489–491.
73. Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., Harwig, S. S., & Lehrer, R. I. (1985). Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 4579–84.
74. Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAR), 1–13.
75. Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62(1), 17–55.
76. Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71–109.
77. Sommer, M. O. A., Munck, C., Toft-kehler, R. V., & Andersson, D. I. (2017). Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nature Publishing Group*.
- 78.
79. Summers, W. C. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2(2), 130–133.
80. Toke, O. (2005). Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*, 80(6), 717–735.
81. Travkova, O. G., Moehwald, H., & Brezesinski, G. (2017). The interaction of

- antimicrobial peptides with membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, (June), 0–1.
82. Tu, Q., Yin, J., Fu, J., Herrmann, J., Li, Y., Yin, Y., ... Zhang, Y. (2016). Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombinering efficiency. *Scientific Reports*, 6(April), 24648.
 83. Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* (2015), 40(4), 277–83.
 84. Viertel, T. M., Ritter, K., & Horz, H.-P. (2014). Viruses versus bacteria--novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2326–2336.
 85. Woodman, M. E., Savage, C. R., Arnold, W. K., & Stevenson, B. (2016). Direct PCR of Intact Bacteria (Colony PCR). In *Current Protocols in Microbiology* (Vol. 42, p. A.3D.1-A.3D.7). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
 86. Yacoby, I., Bar, H., & Benhar, I. (2007). Targeted drug-carrying bacteriophages as antibacterial nanomedicines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2156–63.
 87. Yeaman, M. R. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.
 88. Yoichi, M., Abe, M., Miyanaga, K., Unno, H., & Tanji, Y. (2005). Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect Escherichia coli O157:H7. *Journal of Biotechnology*, 115(1), 101–7.
 89. Yosef, I., Kiro, R., Molshanski-mor, S., Edgar, R., & Qimron, U. (2014). Different approaches for using bacteriophages against antibiotic-resistant bacteria. *Bacteriophage*, 4(1), 19549–19554.
 90. Zahn, M., Kieslich, B., Berthold, N., Knappe, D., Hoffmann, R., & Strater, N. (2014). Structural identification of DnaK binding sites within bovine and sheep batenecin Bac7. *Protein and Peptide Letters*, 21(4), 407–12.