



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Monterrey
Ingeniería y Física Biomédica

**Diseño y construcción de un circuito genético para comportamiento
predictor**

Tesis que presenta

David Israel Orozco Gómez

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en la especialidad de

Ingeniería y Física Biomédicas

Codirectores de la Tesis: Dr. Agustino Martínez Antonio,
Dr. Moisés Santillán Zerón

Agradecimientos

A CONACYT por los apoyos del proyecto N° 103686 y por la beca para tesis de Maestría N° 322858.

Al Cinvestav Monterrey por brindarme la formación y el apoyo necesarios para el desarrollo y conclusión satisfactoria del programa de Maestría.

Al Laboratorio de Biosistemas y Biología Sintética del Cinvestav Irapuato por las facilidades, materiales e infraestructura brindadas para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Agustino Martínez Antonio por su apoyo y dirección en la planeación y ejecución de este proyecto.

Así mismo, al Dr. Moisés Santillán Zerón por su apoyo, dirección y formación brindada para el desarrollo de los modelos matemáticos y aspectos teóricos de esta tesis.

A la Ing. Blanca Susana Ruíz Castro por su apoyo con múltiples aspectos técnicos concernientes a la ejecución experimental del proyecto.

Índice general

| | |
|--|------------|
| Agradecimientos | I |
| Índice general | III |
| Lista de figuras | VII |
| Lista de tablas | IX |
| Lista de abreviaturas | XI |
| Resumen | 1 |
| Abstract | 3 |
| Introducción | 5 |
| 1. La respuesta adaptativa y el comportamiento predictor | 5 |
| 2. Circuitos genéticos sintéticos | 8 |
| 3. El switch biestable | 9 |
| 3.1. Piezas del switch biestable | 10 |
| 3.2. Fundamento matemático del switch biestable | 10 |
| 4. Planteamiento del problema | 13 |

| | |
|---|-----------|
| Objetivos | 15 |
| 1. Objetivo General | 15 |
| 2. Objetivos Particulares | 15 |
| Aspectos técnicos | 17 |
| 1. Diseño del circuito | 17 |
| 1.1. Funcionamiento del circuito de comportamiento predictor | 19 |
| 1.2. Modelo matemático | 20 |
| 2. Ensamble de la construcción genética | 22 |
| 3. Selección y preparación de cepas receptoras | 26 |
| 4. Diseño experimental | 26 |
| 4.1. Medios y preparación de los inóculos | 26 |
| 4.2. Adquisición de datos de fluorescencia y crecimiento | 28 |
| Resultados | 29 |
| 1. Análisis matemático | 29 |
| 1.1. Biestabilidad y dinámica del switch | 29 |
| 1.2. Dinámica del gen reportero | 32 |
| 2. Construcción genética | 34 |
| 2.1. Resultados de secuenciaciones parciales | 36 |
| Discusión | 39 |
| Conclusiones | 43 |
| Perspectivas | 45 |
| Bibliografía | 47 |

| | |
|--|-----------|
| Apéndice | 53 |
| 1. Análisis de biestabilidad del switch | 55 |
| 2. Secuencias utilizadas por módulo de expresión | 56 |
| 2.1. Módulo <i>araC</i> | 56 |
| 2.2. Módulo <i>lacI</i> | 57 |
| 2.3. Módulo <i>ciTs</i> | 58 |
| 2.4. Módulo <i>gfp</i> | 59 |
| 3. Primers utilizados en el proyecto | 61 |
| 4. Secuencias generadas por síntesis comercial | 63 |
| 5. Secuenciaciones parciales por módulo | 64 |

Lista de figuras

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | Estrategias de regulación en respuesta a estímulos ambientales | 6 |
| 2. | Respuesta de promotores de los operones de maltosa y lactosa a ambos azúcares . | 7 |
| 3. | Predictibilidad de un evento aleatorio a partir de otro | 7 |
| 4. | Esquema de switch biestable | 10 |
| 5. | Análisis matemático del switch biestable | 12 |
| 6. | Circuito de comportamiento predictor | 20 |
| 7. | Ensamble individual por módulo | 24 |
| 8. | Estrategia de construcción por BioBricks© | 25 |
| 9. | Placa de lectura | 27 |
| 10. | Plano fase de switch biestable de Gardner et al. (2000) | 30 |
| 11. | Plano fase de switch biestable con inductores | 30 |
| 12. | Plano fase de switch biestable con aumento en IPTG | 31 |
| 13. | Plano fase de switch biestable con aumento en T | 32 |
| 14. | Efecto de la introducción de IPTG como preinductor | 33 |
| 15. | Efecto de la arabinosa en el switch biestable | 34 |
| 16. | Mapa del circuito incluido en un plásmido psB1A3 | 35 |
| 17. | Resultados de digestión y PCR | 35 |
| 18. | <i>Dotplot</i> de módulo CiTs | 36 |

| | | |
|-----|--|----|
| 19. | <i>Dotplot</i> de módulo LacI | 37 |
| 20. | <i>Dotplot</i> de módulo AraC | 37 |
| 21. | <i>Dotplot</i> de módulo GFP | 37 |
| 22. | Análisis de biestabilidad del switch | 55 |

Lista de tablas

| | | |
|----|--|----|
| 1. | Piezas utilizadas por módulo | 18 |
| 2. | Primers para amplificar un fragmento de <i>E. coli</i> que incluye <i>araC</i> | 61 |
| 3. | Primers para amplificar ORF de <i>araC</i> | 61 |
| 4. | Primers para amplificar ORF de <i>gfpmut3b</i> + RBS b | 61 |
| 5. | Primers para obtener péptido de degradación ssRa | 61 |
| 6. | Primers para Síntesis Gibson del promotor $P_{\lambda}S1con$ y RBS 1D | 62 |
| 7. | Primers para Síntesis Gibson del promotor PBAD | 62 |
| 8. | Primers para Síntesis Gibson del promotor Plac/ <i>ara</i> | 63 |

Lista de abreviaturas

ADN; Ácido desoxirribonucleico

b; Bases nitrogenadas

DO; Densidad óptica

GFP; Proteína verde fluorescente

IPTG; Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB; Medio Luria-Bertani

ORF; Marco de lectura abierta

pb; Pares de bases nitrogenadas

PCR; Reacción en cadena de la polimerasa

RBS; Sitio de unión de ribosomas

RK4; Método Runge-Kutta

rpm; Revoluciones por minuto

WT; Fenotipo silvestre

Resumen

Las bacterias requieren adaptarse a distintas formas de presión selectiva. Necesitan sentir y responder rápidamente a una gran variedad de señales que usualmente parecen ser completamente aleatorias. Estas respuestas están fuertemente reguladas en función a una variedad de estímulos iniciales ocurrientes en el medio. Existe una clase particular de regulación, aparentemente adaptativa, en que un gen o conjunto de genes preinducen sistemas de respuesta ajenos a estos mismos genes. Esta es la base del denominado comportamiento predictor en bacterias. Este fenómeno surge de la predictibilidad de algunos eventos en los que una primera señal o estímulo desencadena diferentes cascadas de regulación que preparan a la maquinaria molecular de los microorganismos para un cambio repentino y subsecuente en su medio.

El objetivo principal de este proyecto fue diseñar y construir un circuito genético sintético que mostrase comportamiento predictor. Para lograrlo, se desarrolló un modelo matemático determinista que describe las características que deben tener las partes genéticas necesarias para que el circuito muestre el comportamiento esperado. En base a las predicciones del modelo matemático, se propuso un circuito genético que fue construido y se desarrolló un protocolo para probarlo experimentalmente utilizando a *Escherichia coli* como chasis biológico. Este circuito podría ser utilizado como una nueva herramienta en proyectos de Biología Sintética, pues comparte características importantes con piezas ya conocidas y utilizadas como el switch biestable,

pero con miras a respuestas específicas en ciertas condiciones de operación.

Abstract

Homeostasis requires bacteria to adapt to different kinds of selective pressures. They must sense and quickly respond to a great variety of signals, which usually appear to be completely random. These responses are tightly regulated under a variety of situations depending on the initial stimulus. There is a particular kind of, apparently adaptive, regulations in which a gene (or a set of genes) pre-induce other response systems; this is the basis of the so-called predictive behavior in bacteria. This phenomenon arises from the predictability of some events, in which a first signal or stimulus unchains different pathways that prepare the molecular machinery of the microorganisms to face a sudden upcoming change in its surroundings.

The main objective of this project was to design and engineer a synthetic circuit that displays predictive behavior. To achieve this, we developed a deterministic mathematical model which depicts and describes the necessary parts for the circuit to work as expected; then, based on the predictions of the model, a circuit was proposed and built, then a protocol to test experimentally the circuit using *Escherichia coli* as a biological chassis was proposed. This circuit can be used as a new tool in Synthetic Biology projects, since it shares features with other well known pieces such as the bistable switches, but aims to more specific responses in certain operational scenarios.

Introducción

1. La respuesta adaptativa y el comportamiento predictor

Los seres vivos enfrentan constantemente una presión selectiva por parte del medio y su supervivencia depende de su capacidad para adaptarse a los cambios que esta presión conlleva. Este proceso de adaptación implica mantener constantes sus condiciones vitales a pesar de las variaciones externas. Las bacterias poseen diferentes estrategias que les permiten adaptarse exitosamente a estas situaciones, respuestas que pueden implicar activación de genes, inducción de cascadas metabólicas, etc. En la fig. 1 se ilustran algunos ejemplos de mecanismos conocidos que utilizan para regular sus respuestas a los cambios del medio. Son cuatro: en la regulación directa, a un par de estímulos específicos (**S1** y **S2**) corresponden respuestas específicas (**R1** y **R2**); en la conmutación estocástica ambos estímulos pueden desencadenar cualquier respuesta aleatoriamente; en el caso de la regulación anticipatoria simétrica, los dos estímulos pueden activar ambas respuestas y en la regulación anticipatoria asimétrica el microorganismo responde con R1 y pre induce R2 al detectar S1, mientras que S2 sólo invoca a R2.

Esto implica que la presencia de S1 anticipa la de S2, pero no al revés, pues la preinducción es costosa y sólo ocurre en caso de que esta reporte beneficios superiores a su costo energético, de modo que esta respuesta presenta una alta especificidad, pues tanto la inducción de R1 como la

pre-inducción de R2 sólo ocurren ante S1 y no ante cualquier otro estímulo. A este fenómeno se le denomina respuesta anticipatoria o comportamiento predictor (Mitchell et al., 2009).

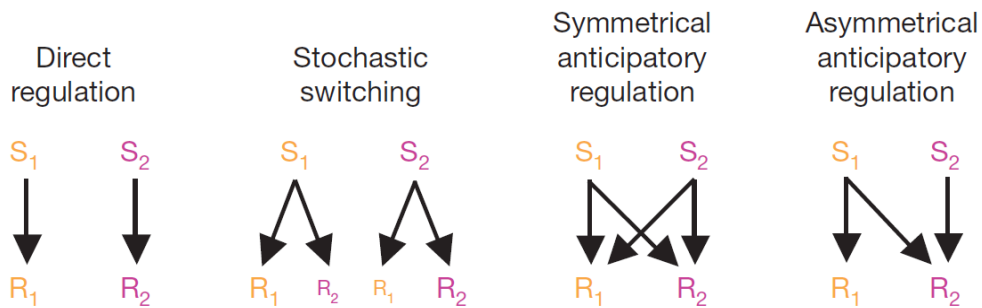


Figura 1: Estrategias de regulación en respuesta a estímulos ambientales. Tomado de Mitchell et al. (2009).

En un medio natural constantemente surgen señales y estímulos de una manera aleatoria sin aparente correlación o causalidad entre eventos. Sin embargo, existen fenómenos que preceden a otros, tales que sirven de señal anticipatoria. Como ejemplo, en la fig. 2 se ilustra un experimento de Mitchell et al. (2009) con promotores de los operones de maltosa y lactosa de *Escherichia coli* fusionados a GFP. Se demuestra que en presencia de lactosa todos los promotores estudiados muestran actividad mayor a la basal; pero, en presencia de maltosa el promotor de *lacZ* no presenta actividad significativa. Estos datos describen una respuesta anticipatoria a la presencia de maltosa como única fuente de carbono, siendo el pre-estímulo la presencia de lactosa. Este fenómeno ocurre en el tracto digestivo de los mamíferos, el cambio se da al transitar *E. coli* entre las zonas proximal (abundante en lactosa) y distal (abundante en maltosa) de este (Savageau, 1998; Mitchell et al., 2009).

Al analizar las variables que surgen en el ambiente aparentemente ruidoso en que existen los microorganismos, es posible obtener pistas que clarifiquen el origen del comportamiento predictor. Tagkopoulos et al. (2008) explican la predictibilidad de un evento a partir de otro al desacoplar dos señales distintas que se presentan en un mismo marco temporal.

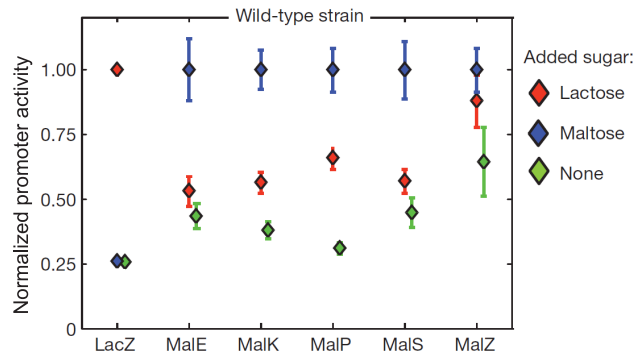


Figura 2: Respuesta de promotores de los operones de maltosa y lactosa a ambos azúcares. Tomado de Mitchell et al. (2009).

Esto último se ilustra en la figura 3, donde se observa la ocurrencia de dos eventos distintos en el mismo espacio temporal, X y Y : en ambos casos existe estructura temporal aleatoria que se manifiesta con una incertidumbre elevada en el intervalo entre eventos (τ_X y τ_Y); sin embargo, la ocurrencia del evento X es altamente predecible en el marco temporal del evento Y , donde la distribución de probabilidades correspondiente al retardo temporal entre ambos eventos ($\tau_{X,Y}$) es relativamente estrecha.

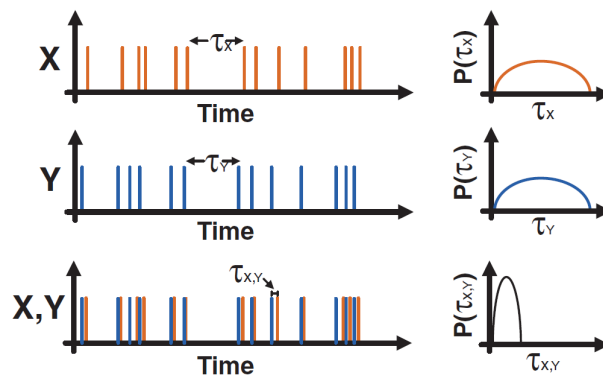


Figura 3: Predictibilidad de un evento aleatorio a partir de otro. Al desacoplar las variables que presenta el medio, se observan patrones aleatorios; pero al correlacionar la ocurrencia de los eventos, es posible predecir un evento a partir de otro. Tomado de Tagkopoulos et al. (2008).

Se han determinado varios mecanismos moleculares que resultan en comportamiento predictor, como los ritmos circadianos (Golden & Canales, 2003) que preparan la maquinaria celular para el cambio de condiciones asociadas al ciclo terrestre. La bacteria cronometra sus propios ciclos metabólicos, lo que le permite predecir cambios inminentes en el medio.

Ejemplos como el del ritmo circadiano y el del cambio de fuentes de carbono en *E. coli* sugieren que el comportamiento predictor está codificado en la red de regulación genómica del organismo (Tagkopoulos et al., 2008). De ser así, surge la posibilidad de construir un circuito genético sintético que emule comportamiento predictor.

2. Circuitos genéticos sintéticos

Un circuito es una red de elementos interconectados que en conjunto procesan operaciones lógicas (AND, OR, NOT, etc.). En electrónica se crean circuitos a partir de piezas como transistores, capacitores, resistencias, inductores, etc. (Darlington, 1999).

En biología, el control de la expresión genética está contenido en las redes de regulación transcripcional (Thieffry et al., 1998), que se conforman de piezas de ADN como operadores, promotores, factores de transcripción, etc. de forma análoga a los circuitos electrónicos; surgiendo así la posibilidad de diseñar y construir circuitos genéticos sintéticos haciendo uso de distintas piezas, independientemente de su origen natural (Jacob & Monod, 1961; Tajbakhsh et al., 2011).

Con el análisis de las redes de regulación transcripcional se han obtenido datos sobre el funcionamiento e interacción de los genes; que se pueden aplicar en la construcción de redes

sintéticas (Guet et al., 2002; Hasty et al., 2002). Es así que se han construido redes que funcionan como osciladores (Elowitz & Leibler, 2000; Stricker et al., 2008) y switches biestables (Gardner et al., 2000; Kim et al., 2006). Estas redes sintéticas se han utilizado como módulos en nuevos circuitos cada vez más complejos (Lu et al., 2009).

El diseño de estos circuitos a menudo se basa en modelos matemáticos (Ellis et al., 2009) tanto deterministas como estocásticos que describen su funcionamiento y permiten determinar las características de las piezas a utilizar (Novák & Tyson, 2008).

Estos modelos a menudo se basan en sistemas simples y bien conocidos, como la ley de acción de masas, que pueden escalarse hasta describir sistemas de alta complejidad como el sistema de control del ciclo celular. En síntesis, el modelado matemático y la simulación *in silico* de fenómenos moleculares es una herramienta poderosa para la formulación precisa de hipótesis mecánicas así como de deducciones confiables sobre las implicaciones fisiológicas de estas (Tyson et al., 2003).

3. El switch biestable

El switch biestable construido por Gardner et al. (2000) fue uno de los primeros circuitos genéticos sintéticos funcionales. Este se conforma de tres genes y dos promotores distintos. Uno de los genes es un reportero y los otros dos son genes reguladores cuyos productos inhiben la función de los promotores utilizados en el switch. En la fig. 4 se describen las relaciones entre los genes y los promotores del switch. Se observa que un gen, el Represor 1 (**R1**), reprime la actividad del Promotor 1 (**P1**) al expresarse. P1 regula la expresión del otro gen, el Represor 2 (**R2**). Si R2

llegara a expresarse, su producto reprimiría la actividad de P2 que a su vez regula la expresión de R1. Esta dinámica indica que el sistema tiene dos posibles estados estables: en uno R2 se expresa; y en el otro R1 y el gen reportero se expresan. Para cambiar el sistema entre un estado y otro entran en juego dos inductores; sustancias que inducen cambios en el sistema. El Inductor 1 (I1) inhibe al producto de R1, lo que da pie a la expresión del R2. Esto mismo ocurre al introducir al Inductor 2 (I2) al sistema, que se encarga de inhibir al producto de R2.

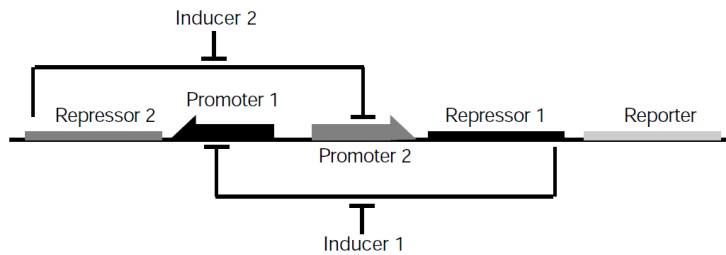


Figura 4: Esquema de switch biestable. Tomado de Gardner et al. (2000).

3.1. Piezas del switch biestable

En ese mismo trabajo (Gardner et al., 2000) se construyeron dos circuitos que cumplían las características del switch biestable: pTAK y pIKE. Para este proyecto sólo es relevante el circuito pTAK, que incluye al promotor placI como R2; al promotor p*s1con* como P1 y el gen *ciTs* como R1. Como gen reportero se utilizó el gen *gfpmut3b*. Se utilizó un pulso térmico como I1 e IPTG como I2. Para cada gen se asignó un RBS de fuerza específica; tanto los RBS como el resto de los componentes del circuito cumplían las características que demandaba el modelo matemático.

3.2. Fundamento matemático del switch biestable

La selección de los elementos de este circuito, el switch biestable, fue efectuada en función a los resultados del modelo matemático realizado para describir y predecir el comportamiento del

switch.

Las ecuaciones (1) y (2) describen la dinámica del switch biestable. Son ecuaciones simétricas que poseen términos y dinámicas similares, en donde $[u]$ y $[v]$ representan la concentración de cada represor; α_1 y α_2 son términos que representan la tasa máxima de síntesis de cada represor y β y γ son términos que describen la cooperatividad de cada promotor con su respectivo represor. Cada ecuación posee un término de producción y uno de degradación. El término de producción está dado por una función de Hill (Hill, 1913) decreciente dependiente de la concentración del represor opuesto: a mayor concentración de este, menor producción. El término de degradación está dado por la concentración misma del represor cuya dinámica describe la ecuación correspondiente.

$$[\dot{u}] = \alpha_1 \frac{1}{1 + [v]^\beta} - [u] \quad (1)$$

$$[\dot{v}] = \alpha_2 \frac{1}{1 + [u]^\gamma} - [v] \quad (2)$$

Al analizar este sistema se obtienen los planos fase mostrados en la fig. 5. En **a** se observa un sistema biestable con dos puntos fijos estables y uno inestable, lo que demuestra la existencia de dos posibles estados en el sistema; en **b**, por el contrario, se observa un sistema monoestable en donde solo hay un estado posible. Esta diferencia se explica al cambiar los valores de los parámetros del sistema, como se muestra en **c** y **d** donde se expone el espacio de los parámetros.

En **c** se observa la existencia de una región biestable y dos monoestables. Las rectas marcan la transición entre las regiones monoestables y la biestable, las pendientes de estas rectas están determinadas por los exponentes β y γ para valores grandes de α_1 y α_2 . En **d** se muestra el cambio en el área de biestabilidad del sistema dado por el cambio de los valores de los parámetros; al reducir la cooperatividad en la represión (dada por β y γ), se reduce el área de biestabilidad.

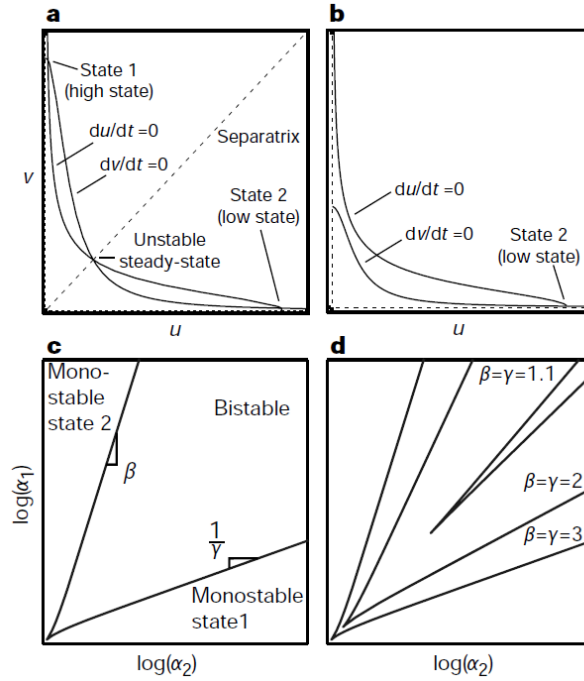


Figura 5: Análisis matemático del switch biestable. Tomado de Gardner et al. (2000).

En síntesis, la biestabilidad del circuito depende de la represión cooperativa de la transcripción de R1 y R2 y del equilibrio en las tasas de síntesis de los represores. La biestabilidad del sistema, a su vez, implica que existe un pozo de atracción en cada estado posible del sistema, por lo que un cambio en las condiciones iniciales del sistema puede provocar un desvío a alguno de estos pozos.

Biológicamente, la biestabilidad requiere que las fuerzas de los promotores y RBSs del switch sean similares. El circuito propuesto en este trabajo se basa en el mecanismo del switch biestable.

4. Planteamiento del problema

Existen diferentes circuitos genéticos sintéticos que emulan comportamientos complejos observados y descritos en microorganismos. Teniendo en cuenta como antecedentes que el diseño y construcción de estos circuitos no requiere utilizar las mismas piezas o rutas de regulación transcripcionales halladas en los organismos modelo, ¿Es posible diseñar y construir un circuito genético sintético que muestre comportamiento predictor?

Objetivos

1. Objetivo General

1. Diseñar y construir un circuito genético sintético que muestre comportamiento predictor

2. Objetivos Particulares

1. Elaborar un modelo determinista de un circuito genético para comportamiento predictor
2. Diseñar y construir el circuito en un chasis biológico

Aspectos técnicos

1. Diseño del circuito

El circuito está constituido por cuatro módulos de expresión; cada uno con un promotor, RBS, gen y doble terminador (a excepción del módulo **GFP** que contiene dos promotores). En la tabla 1 se enlistan las diferentes piezas utilizadas en cada módulo y su origen.

A partir de los resultados del análisis del modelo matemático se determinó la necesidad de utilizar un switch biestable robusto; por lo que se optó por incluir el switch biestable pTAK diseñado y construido por Gardner et al. (2000), compuesto por los módulos **LacI** y **CiTs**.

El módulo **AraC** contiene un promotor constitutivo que garantiza la expresión constante del gen *araC*, que en conjunto con arabinosa induce operadores de los promotores *plac/ara* y *pBAD* del módulo **GFP**. El promotor *plac/ara* es un promotor sintético diseñado por Lutz & Bujard (1997) que posee regulación dual dada por operadores o secuencias regulatorias de los operones *lac* y *araBAD*. Los operadores del operón *lac* (*lacO*) regulan negativamente cualquier gen río abajo de este en presencia de la proteína **LacI**. La represión ocasionada por **LacI** se anula en presencia de IPTG. Los operadores del operón *araBAD* (**I₁-I₂**) son regulados positivamente en presencia de la proteína **AraC** conjugada con arabinosa, como lo describen Seabold & Schleif (1998) y Schleif

(2010) para el promotor pBAD del operón *araBAD* en *E. coli*, mismo que es utilizado en el circuito como regulador positivo del gen reportero *gfpmut3b*.

El gen *gfpmut3b* es una mutación del gen *gfp* de *Aequorea victoria*. La proteína GFPmut3b es 20 veces más fluorescente que GFP WT cuando es estimulada a 480_{nm} (Cormack et al., 1996). El gen *gfpmut3B* fue modificado con un sufijo codificante para un péptido de degradación (ssRa) siguiendo el método de Andersen et al. (1998). El sufijo ssRa otorga inestabilidad a la proteína modificada, de modo que aumenta la resolución temporal del experimento al disminuir la vida media de la proteína.

Tabla 1: Piezas utilizadas por módulo

| Módulo | Pieza | Tamaño | Origen |
|---------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------------|
| LacI | Promotor p _i s1con | 90 pb | Síntesis Gibson |
| | RBS 1D | 10 pb | Inclusión por PCR |
| | Gen <i>lacI</i> lva | 1128 pb | Distribución iGEM 2012 |
| | Doble terminador BBa_B0014 | 95 pb | Distribución iGEM 2012 |
| CiTs | Promotor ptrc-2 | 90 pb | Síntesis comercial |
| | RBS E | 8 pb | Síntesis comercial |
| | Gen <i>ciTs</i> | 714 pb | Síntesis comercial |
| AraC | Promotor pJ23116 | 35 pb | Distribución iGEM 2012 |
| | RBS B | 10 pb | Inclusión por PCR |
| | Gen <i>araC</i> | 879 pb | Genoma de <i>E. coli</i> K-12 MG1655 |
| GFP | Promotor plac/ara | 308 pb | Síntesis Gibson |
| | Promotor pBAD | 130 pb | Síntesis Gibson |
| | RBS 1D | 10 pb | Inclusión por PCR |
| | Gen <i>gfpmut3b-ssRa</i> | 753 pb | Distribución iGEM 2012 |

Todos los módulos utilizan el mismo terminador.

1.1. Funcionamiento del circuito de comportamiento predictor

El diseño y la dinámica del circuito se ilustran en la figura 6, donde se aprecia la función de cada módulo y el efecto de los inductores sobre el sistema. Al expresarse LacI (que junto a CiTs forma el switch biestable), se reprime el promotor *ptrc-2*, que controla la producción de CiTs, y los operadores *lacO* del promotor *plac/ara*. La introducción de IPTG al medio anula la actividad de LacI, con la consecuente de-represión de los operadores mencionados, promoviendo la expresión de CiTs y la represión de la expresión de LacI. A su vez, el promotor constitutivo PJ23116 induce a una producción constante de AraC, que se adhiere a los operadores I_1 - I_2 de los promotores *plac/ara* y *pBAD*. *plac/ara* y *pBAD* regulan la expresión de GFPmut3b. Al introducir arabinosa al medio, esta se une a la proteína AraC ya presente en los operadores correspondientes, activándolos. El promotor *plac/ara* posee regulación dual, es decir, tanto negativa por parte de LacI como positiva por parte de AraC+Arabinosa; la introducción de un solo inductor no activa este promotor. En el caso de *pBAD*, basta la presencia de AraC+arabinosa para comenzar la actividad en ese promotor.

En síntesis, el IPTG funciona como pre inductor de la expresión de GFP, al introducirlo al sistema no se verá respuesta alguna. La arabinosa juega el papel de inductor de GFP en el sistema. La diferencia que hace la presencia de IPTG es una diferencia cuantitativa en la expresión de GFP subsecuente a la introducción de arabinosa.

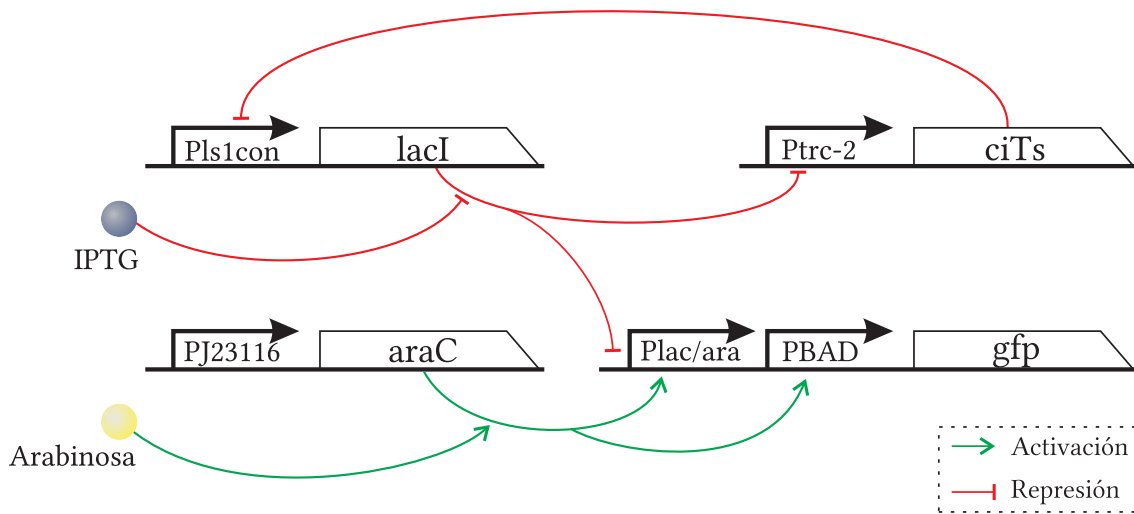


Figura 6: Circuito de comportamiento predictor. Sólo se representan los promotores y genes de cada módulo. Las flechas verdes indican activación y las rojas represión. IPTG y arabinosa actúan como inductores externos del sistema.

1.2. Modelo matemático

Se desarrolló un modelo matemático consistente en tres ecuaciones diferenciales deterministas que describen la dinámica del switch biestable y el comportamiento del gen reportero en función de la presencia de inductores en el medio.

$$[\dot{u}] = \alpha_1 \frac{1}{1 + \left(\frac{[v]}{1 + \left(\frac{[IPTG]}{K_I} \right)^{\eta_1}} \right)^{\beta}} - [u] \quad (3)$$

$$[\dot{v}] = \alpha_2 \frac{1}{1 + ([u]f(T))^{\gamma}} - [v] \quad (4)$$

$$f(T) = \begin{cases} 0 & T < 37,5 \\ 1 & T \geq 37,5 \end{cases}$$

$$[\dot{g}] = \alpha_3 \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{[v]}{1 + \left(\frac{[I]}{K_I} \right)^{\eta_1}} \right)^\beta} \cdot \frac{A}{1 + A} \right) + \alpha_4 \frac{A}{1 + A} - [g] \quad (5)$$

$$A = \frac{C \left(\frac{[a]}{K_a} \right)^{\eta_2}}{1 + \left(\frac{[a]}{K_a} \right)^{\eta_2}}$$

Las ecuaciones 3 y 4 son similares a las ecuaciones 1 y 2 y de hecho describen el mismo fenómeno: el switch biestable. La ecuación 3 describe la tasa de cambio en la síntesis de CiTs y está compuesta de un término de síntesis y uno de degradación, en donde $[u]$ representa la concentración de CiTs en el medio, α_1 es la tasa de síntesis de CiTs, β es la cooperatividad entre LacI y el promotor ptrc-2, $[v]$ es la concentración de LacI en el medio, $[I]$ es la concentración de IPTG, K_I es la constante de disociación de IPTG y LacI y η_1 es un término que describe la cooperatividad entre estos dos. Cuando el valor de $[v]$ es alto y el de $[I]$ es bajo, el valor del término de síntesis de la ecuación 3 tiende a cero, pues es una función de Hill decreciente. Cuando aumenta $[I]$, disminuye el efecto de $[v]$ sobre el valor de $[u]$ y el valor del término de síntesis tiende a aumentar. Similarmente, la ecuación 4 describe la tasa de cambio en la concentración de LacI; hay un término de síntesis y uno de degradación, α_2 representa la tasa de síntesis efectiva de LacI y γ es un término de cooperatividad entre CiTs y el promotor p_is1con. En este caso, el término de síntesis depende de el valor de $[u]$ y $f(T)$, este último es una función escalón que depende de la temperatura, donde al alcanzar T un valor mayor a 37.5, la función adquiere el valor de 1 y el valor del término de síntesis de LacI tiende a 0 en caso de que $[u]$ sea mayor a 0.

Finalmente, la ecuación 5 representa el cambio en la síntesis de GFP. Tiene un término de síntesis y uno de degradación. El término de síntesis describe la dinámica de los promotores plac/ara y

pBAD. En el subtérmino que representa el funcionamiento de *plac/ara*, α_3 es la tasa de síntesis efectiva de GFP asociada a este promotor. El primer elemento de este subtérmino es idéntico al término que describe la dinámica del promotor *ptrc-2* en la ecuación 3, pues el mecanismo de acción es similar. En el segundo elemento A representa una función de Hill creciente en donde C es la presencia constante de AraC en el sistema, $[a]$ es la concentración de arabinosa, K_a es la constante de disociación entre la arabinosa y AraC y η_2 representa la cooperatividad entre ambos. Al aumentar la concentración de arabinosa en el medio, la actividad de *plac/ara* aumenta siempre y cuando también haya IPTG presente. El segundo subtérmino se describe la dinámica del promotor pBAD. α_4 es la tasa de síntesis efectiva asociada a pBAD. En este subtérmino se encuentra una función similar a la que representa la regulación por arabinosa en *plac/ara*, pues es un mecanismo similar.

En síntesis, si sólo hay arabinosa en el medio, sólo se activará pBAD y habrá síntesis de GFP, pero si se introduce IPTG antes de la arabinosa la expresión de GFP será mayor, corroborando el papel de inductor de IPTG en el sistema al que otorga la capacidad de "predecir" la presencia de arabinosa en un evento cercano.

2. Ensamble de la construcción genética

Cada módulo siguió una estrategia de construcción diferente, ilustradas en la figura 7, determinada por las características de las piezas que lo conforman:

- **Mod. CiTs.** El promotor, RBS y el gen *ciTs* se obtuvieron mediante síntesis comercial obtenida de IDT®; posteriormente la secuencia se recuperó y se le añadieron el prefijo y sufijo de BioBricks®. El producto amplificado fue digerido e insertado en la pieza BBa_B0014

de la distribución iGEM 2012 utilizando la estrategia de BioBricks© (Shetty et al., 2008). La pieza BBa_B0014 contiene el doble terminador utilizado en todos los módulos de la construcción y se encuentra incluida en el plásmido psB1AK3.

- **Mod. LacI.** El promotor *p_{7s1}* fue sintetizado siguiendo el método de Gibson et al. (2010); se amplificó y se agregó el RBS 1D mediante PCR; el gen *lacI_{va}* fue recuperado mediante PCR de la pieza BBa_C0012 de la distribución 2012 de iGEM, posteriormente fue unida al promotor y RBS mediante el método de Shevchuk et al. (2004). Al producto obtenido se agregaron prefijo y sufijo de BioBricks© y se agregó a la pieza BBa_B0014 del mismo modo que el módulo CiTs.
- **Mod. AraC.** El promotor de este módulo se obtuvo de la pieza BBa_PJ23116 de la distribución iGEM2012. Para obtener el ORF del gen *araC* se utilizó la base de datos RegulonDB (Salgado et al., 2013) a partir de la cual fueron diseñados primers para amplificar la secuencia mediante PCR, que fue unida a las piezas BBa_PJ23116 y BBa_B0014, igualmente siguiendo la estrategia de BioBricks©.
- **Mod. GFP.** Los promotores *plac/ara* y *pBAD* fueron sintetizados utilizando el método de Gibson et al. (2010). El ORF del gen *gfp_{mut3b}* se obtuvo de la pieza BBa_E0040 de la distribución iGEM 2012 mediante PCR. A este producto se le añadieron el RBS B y la secuencia *ssRa* mediante PCR. Los promotores previamente sintetizados y el ORF modificado se unieron mediante el método de Gibson et al. (2009). Finalmente, la construcción se unió al doble terminador con el mismo método que los demás módulos.

Los módulos ya construidos fueron hospedados en la cepa de *E. coli* TOP10 mediante transformación genética por células quimiocompetentes. Cada construcción fue verificada por secuenciación parcial utilizando los primers estándar de BioBricks©. Todas las cepas fueron conservadas en glicerol al 15 % a -80 °C.

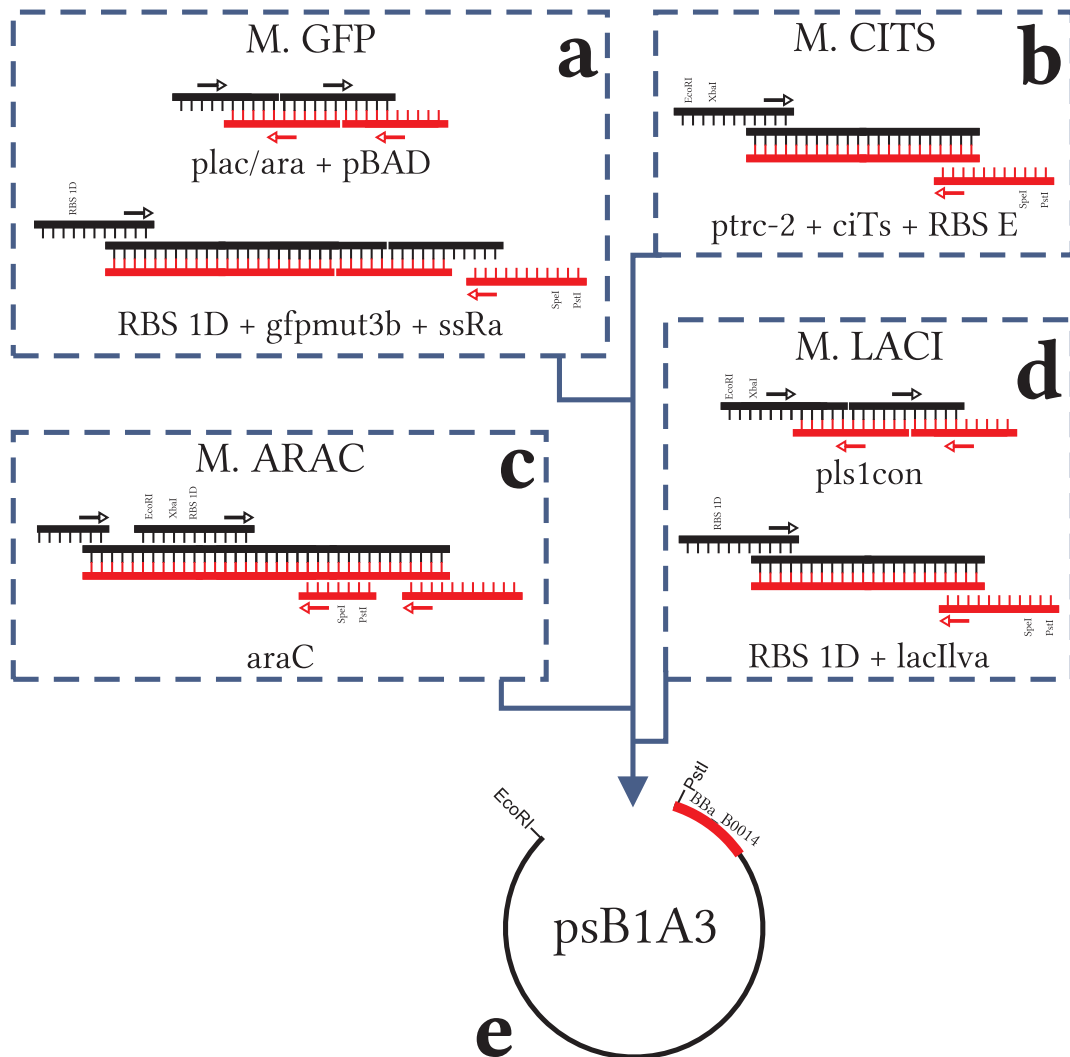


Figura 7: Ensamble individual por módulo. **a.** El módulo GFP fue construido en dos pasos; los promotores se ensamblaron con el método de Gibson et al. (2009), para unir un total de 21 primers, enlistados en las tablas 7 y 8. Para el RBS, el gen y el péptido de degradación se siguió una estrategia mixta de PCRs; finalmente los dos fragmentos se unieron con el método de Shevchuk et al. (2004). **b.** El módulo CITS se recuperó de una secuencia sintética comercial que incluye el promotor, el RBS y el gen correspondiente. **c.** El módulo ARAC también se ensambló en dos pasos; primero se recuperó del genoma de *E. coli* mediante dos PCRs consecutivos, el RBS se añadió en el segundo PCR. **d.** El módulo LACI se ensambló en dos pasos similares al mod. GFP; el promotor y RBS se ensamblaron con el método de Gibson et al. (2009), utilizando 6 primers (tabla 6) el gen se recuperó mediante PCR y ambos fragmentos se unieron siguiendo la metodología de Shevchuk et al. (2004). A todos los módulos se les añadió estándar de BioBricks® mediante PCR, previo a la adición del terminador; en el caso del mod. ARAC, se añadió el promotor pJ23116 de un modo similar al terminador. **e.** Una vez terminado el ensamble, cada módulo se digirió con las enzimas EcoRI y SpeI para ligarlo al plásmido psB1A3 previamente digerido con EcoRI y XbaI; este plásmido incluye el doble terminador BBa_B0014 que fue agregado a todos los módulos.

Los cuatro módulos se ensamblaron juntos en los plásmidos psB1AK3, de alto número de copias; y psB4K5, de bajo número de copias; siguiendo la estrategia de BioBricks®.

La estrategia de construcción por BioBricks® se esquematiza en la figura 7. Se observa en A y B las piezas que desean unirse. En A la pieza prefijo es digerida con **EcoRI** y **SpeI**; mientras que en B se utilizan **XbaI** y **PstI** para extraer la pieza sufijo. SpeI y XbaI forman extremos compatibles que pueden ser unidos por una ligasa. En C un plásmido específico es tratado con EcoRI y PstI. Posteriormente, en D, los tres fragmentos se juntan en una reacción de ligación sin necesidad de purificar mediante gel de agarosa. Como cada plásmido de origen tiene un gen de resistencia distinto, al cultivar la cepa receptora en medio selectivo con el antibiótico de resistencia del plásmido final sólo crecerán aquellas que contengan la construcción deseada.

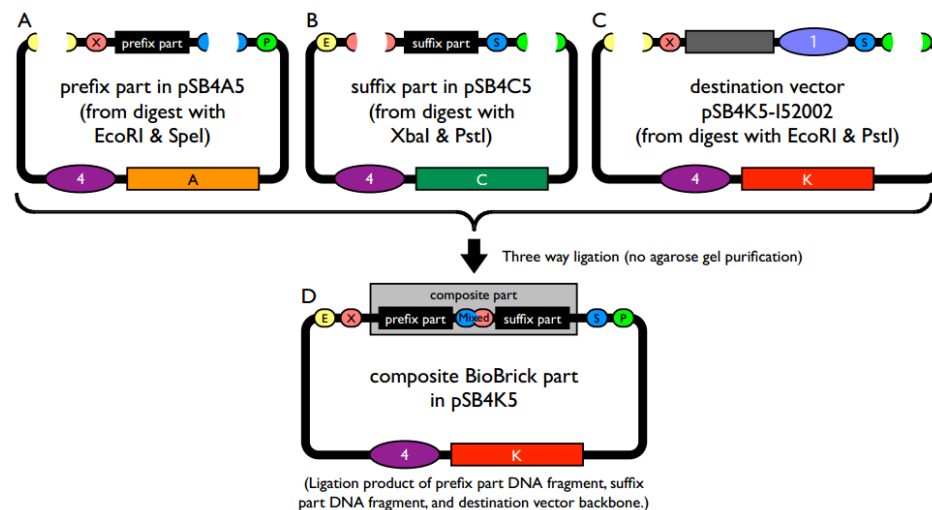


Figura 8: Estrategia de construcción por BioBricks®. Dos piezas (prefijo y sufijo) son unidas e incluidas en un plásmido mediante digestiones específicas utilizando las enzimas EcoRI, XbaI, SpeI y PstI. Tomado de Shetty et al. (2008).

3. Selección y preparación de cepas receptoras

Para evitar interferencias del genoma bacteriano con el funcionamiento del circuito se requirió obtener cepas que carecieran de los genes *lacI* y *araC*. La cepa *E. coli* K-12 MG1655 WT fue modificada siguiendo el método de Thomason et al. (2007) para transducción con bacteriófago P1 con el fin de incluir las mutaciones $\Delta lacI$ y $\Delta araC$ a partir de las cepas correspondientes de la colección Keio (Baba et al., 2006). Como resultado de este proceso se obtuvieron tres cepas distintas: *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta lacI$, *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta araC$ y *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta lacI \Delta araC$.

4. Diseño experimental

Para probar la funcionalidad del circuito se ha diseñado un protocolo experimental basado en el de Martínez-Antonio et al. (2012) que deberá ejecutarse posterior a la transformación de las cepas receptoras mediante electroporación. Este protocolo está basado en la cuantificación de fluorescencia de GFP como se describe en los siguientes apartados.

4.1. Medios y preparación de los inóculos

Se cultivarán pre-inóculos de cada cepa en medio LB líquido (Bertani, 1951) adicionado con 50 mg/ml del antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido incluido en cada cepa (kanamicina o ampicilina), durante 8 horas a 37 °C en agitación a 200 rpm. Al término de este tiempo, se realizará una dilución 1:100 de cada cultivo en medio M9 (Sambrook et al., 2001) suplementado con glucosa al 0.02 % y el antibiótico correspondiente. Posteriormente, se inocularán 200 μ l de cada cultivo en una placa de microtitulación de 96 pozos siguiendo el esquema de la figura 8. La placa se incubará a 37 °C en agitación dentro de un multilector de placas VICTOR

X3 Perkin Elmer™. A las dos horas de mantenerse en incubación, se añadirá arabinosa hasta una concentración del 1 % a cada pozo utilizado.

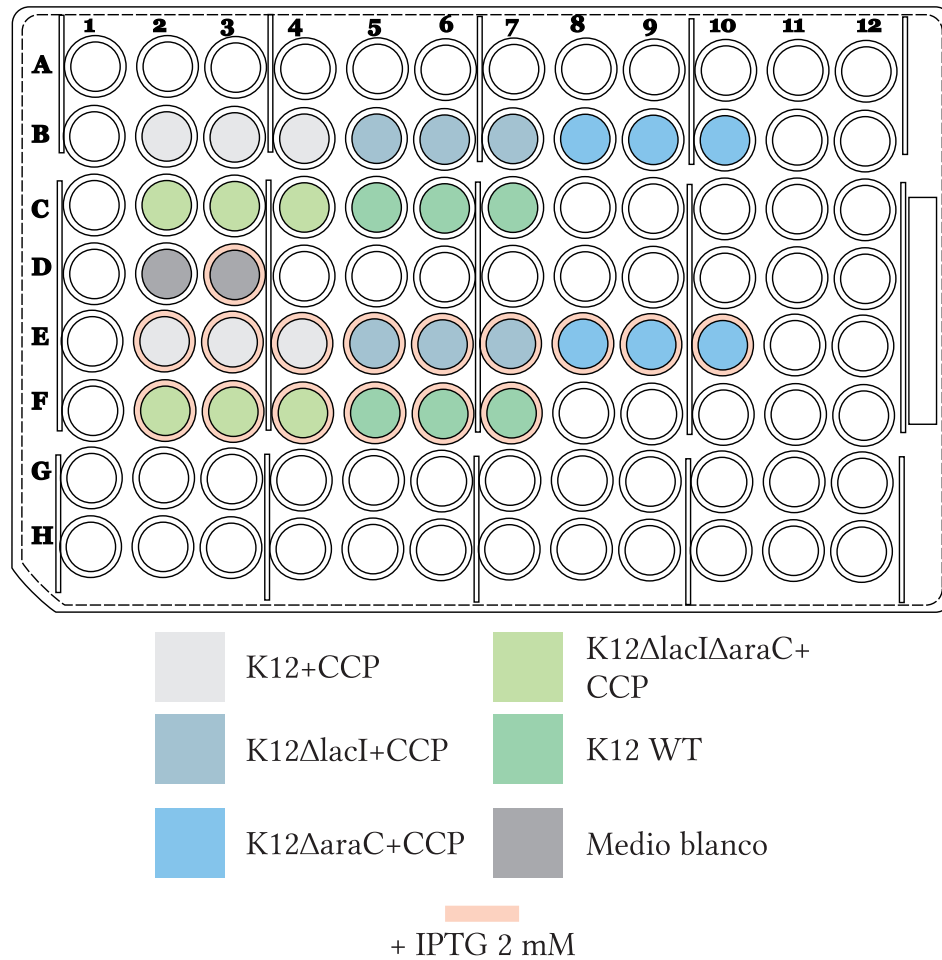


Figura 9: Placa de lectura. En cada pozo utilizado se inoculará la cepa indicada diluyendo el pre-inóculo correspondiente 1:100 en M9. El medio blanco sirve como control negativo así como la cepa WT sin el circuito de comportamiento predictor (CCP). Este esquema de lectura se utilizará tanto para el plásmido psB1A3 como para el psB4K5.

4.2. Adquisición de datos de fluorescencia y crecimiento

Dentro del multilector de placas se medirán la absorbancia a una longitud de onda de 595_{nm} y la fluorescencia a 480_{nm} en excitación y 535_{nm} en emisión a intervalos de 5 min durante 5 horas. Los datos obtenidos se procesarán siguiendo la metodología de Martínez-Antonio et al. (2012) a partir de las siguientes ecuaciones:

$$OD(t) = \frac{a_1 + b_1 e^{(t-t_1)/z_1}}{1 + e^{(t-t_1)/z_1}} \quad (6)$$

$$GFP(t) = \frac{a_2 + b_2 e^{(t-t_2)/z_2}}{1 + e^{(t-t_2)/z_2}} \quad (7)$$

En las ecuaciones 6 y 7 se ajustan las curvas de crecimiento y fluorescencia a la función sigmoideal de Boltzmann. En la ecuación 6, que describe el cambio de la DO en función del tiempo, a_1 y b_1 representan los valores mínimo y máximo de DO respectivamente; t_1 es el tiempo en que la función alcanza el valor medio entre a_1 y b_1 , este punto es también el punto de inflexión de la curva de crecimiento. Finalmente, z_1 determina el valor de la pendiente de la curva en el punto de inflexión. Valores más grandes de z_1 implican pendientes menores. En la ecuación 7, que describe el cambio en la fluorescencia, los parámetros a_2 , b_2 , t_2 y z_2 son equivalentes a sus contrapartes en la ecuación 6.

Resultados

1. Análisis matemático

1.1. Biestabilidad y dinámica del switch

Utilizando los datos de Gardner et al. (2000) sobre la robustez del switch biestable, se obtuvo un plano fase del sistema de ecuaciones 1 y 2, donde se demuestra la biestabilidad del sistema al cumplir los supuestos enlistados en el trabajo mencionado. En la figura 10 se observa el plano fase del switch biestable; existen 3 puntos fijos, en donde se intersectan las *nullclines*, uno inestable y dos estables que indican la existencia de dos posibles estados biológicos en el sistema. La tendencia del sistema a uno y otro estado depende de la variación en los valores de los parámetros, hecho que se obtiene al introducir inductores.

Al modificarse las ecuaciones 1 y 2 para describir la acción de los inductores utilizados en el sistema se obtienen las ecuaciones 3 y 4. Se obtuvo un plano fase con el sistema de ecuaciones 3 y 4 (figura 11) en el que se observa biestabilidad en el sistema cuando el valor de los inductores es igual a 0, sin alterar el valor de los demás parámetros.

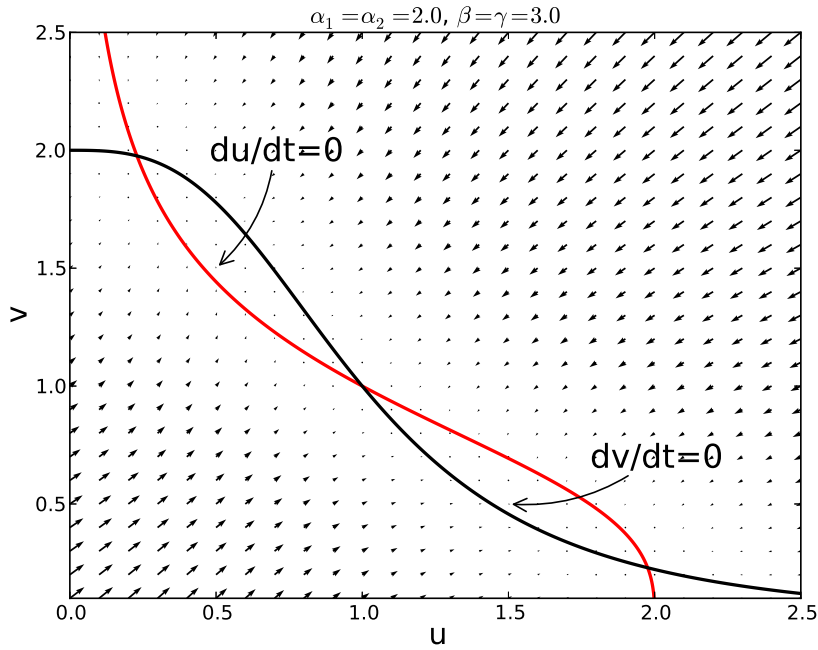


Figura 10: Plano fase de switch biestable de Gardner et al. (2000). Los valores de los parámetros se obtuvieron de las especificaciones para obtener biestabilidad en Gardner et al. (2000).

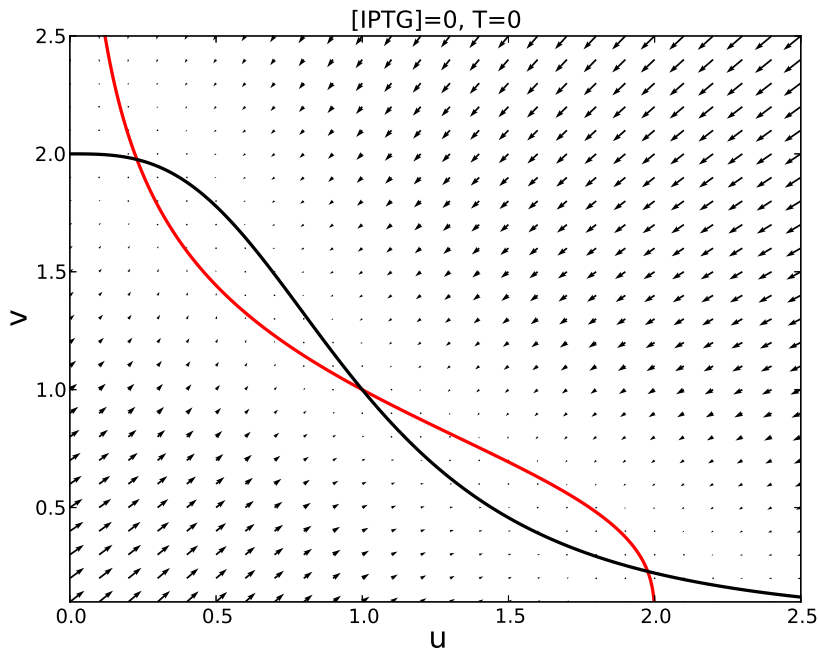


Figura 11: Plano fase de switch biestable con inductores. Cuando el valor de los inductores (Temperatura o concentración de IPTG) es igual a cero, el sistema muestra biestabilidad de la misma manera que con las ecuaciones 1 y 2.

Una vez verificada la biestabilidad del sistema, se observó el efecto de las variaciones en el valor de los inductores en los parámetros. En la figura 12 se ilustra el plano fase obtenido cuando se aumenta la concentración de IPTG. Se observa que el sistema tiende a un punto fijo, por ende, a la monoestabilidad.

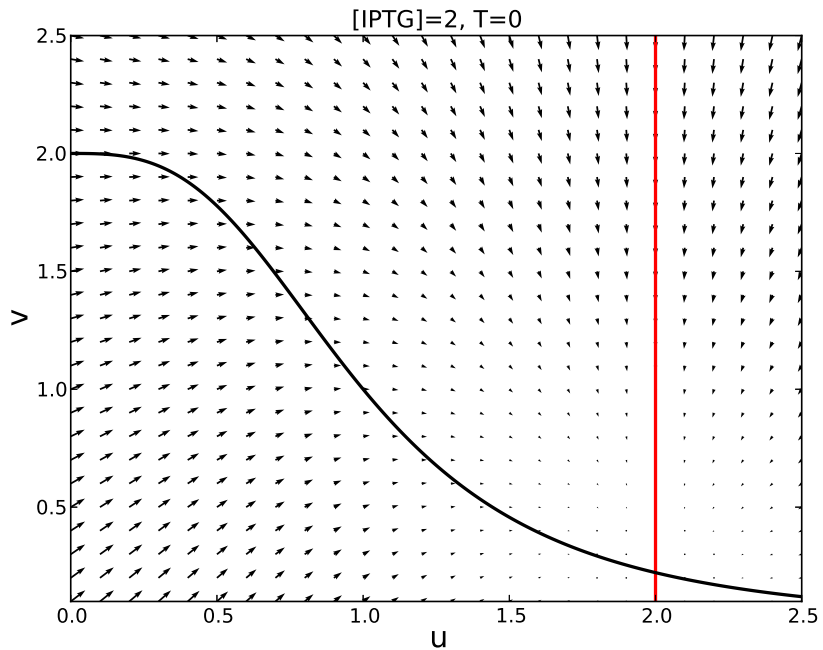


Figura 12: Plano fase de switch biestable con aumento en [IPTG]. El sistema tiende a uno de los dos puntos fijos, por lo tanto a un estado de monoestabilidad.

Igualmente, en la figura 13 se observa un comportamiento similar al aumentar el valor de la temperatura (T), pero en este caso el sistema tiende hacia el otro punto fijo estable.

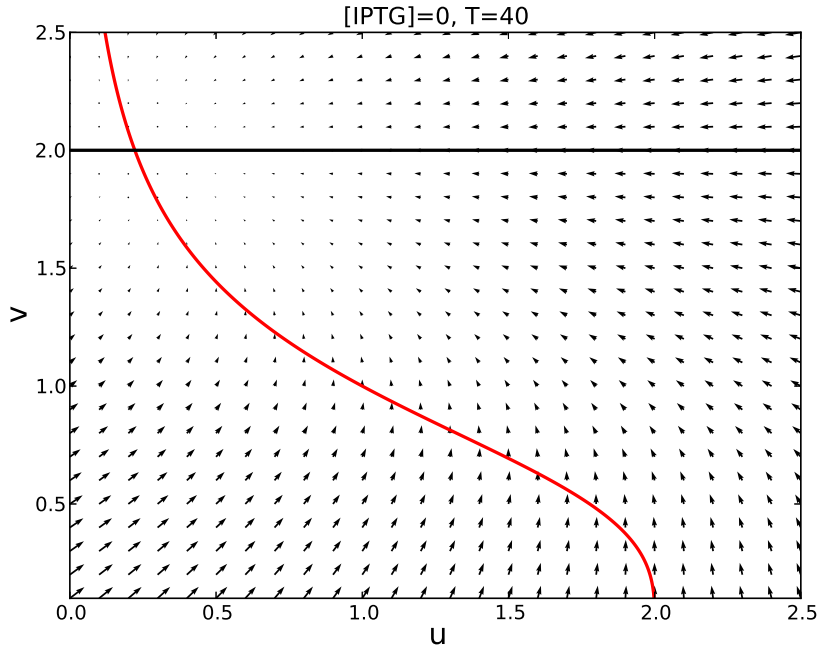


Figura 13: Plano fase de switch biestable con aumento en T . El sistema tiende a otro de los dos puntos fijos, por lo tanto a un estado de monoestabilidad.

1.2. Dinámica del gen reportero

Ya verificada la biestabilidad del sistema a partir de las ecuaciones 3 y 4, se obtuvo la solución numérica del sistema completo con diferentes condiciones mediante RK4. En la figura 14 se observa la predicción efecto del IPTG como preinductor del sistema en la expresión de GFP. En un caso se introduce IPTG previo a la arabinosa y en el otro solo se agrega arabinosa; en ambos caso se introduce la arabinosa al mismo tiempo. Se observa que cuando existe una exposición previa a IPTG, la expresión de GFP es mayor al introducir arabinosa que cuando no hay IPTG con anterioridad.

La presencia de arabinosa únicamente afecta a la expresión de GFP. En la figura 15 se observan 3 casos distintos. En **a**, sólo se agrega arabinosa al sistema durante un tiempo; no hay preinducción ni inclusión de IPTG. Al retirar la arabinosa, la expresión de GFP desaparece. En **b**, se introduce

IPTG al retirar la arabinosa, el resultado es el mismo que en **a**: la expresión de GFP disminuye; la presencia previa de arabinosa no afecta al funcionamiento del switch biestable. En **c** se introduce arabinosa y aumenta la expresión de GFP, al retirarla se activa el switch biestable al agregar IPTG, mientras no hay arabinosa en el medio no hay expresión de GFP, finalmente, se vuelve a introducir arabinosa al sistema y se observa expresión de GFP a un nivel superior al descrito previo a la introducción de IPTG.

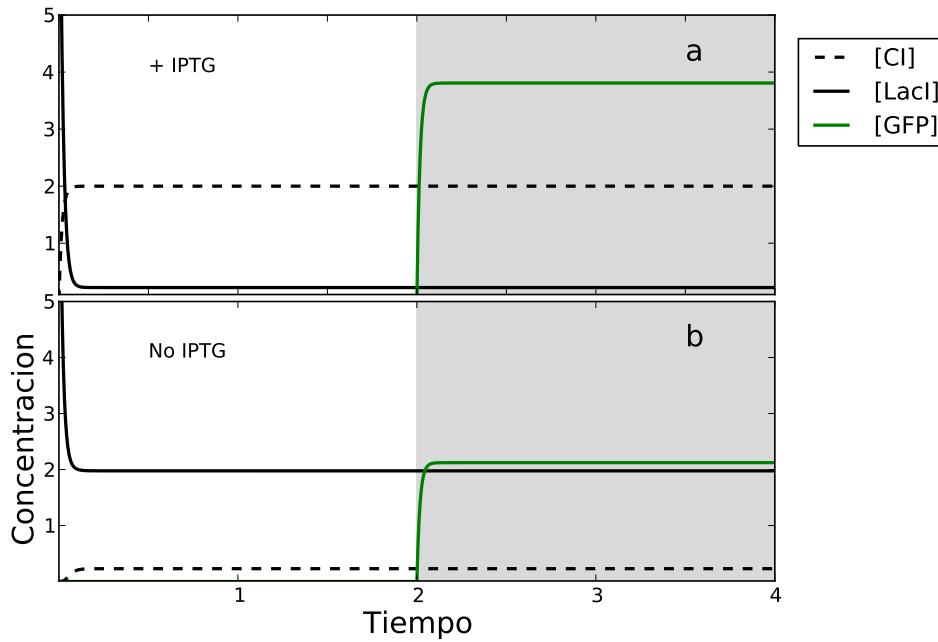


Figura 14: Efecto de la introducción de IPTG como preinductor. La zona sombreada indica adición de arabinosa en el sistema. En **a** se agrega IPTG previo a la introducción de arabinosa y se observa que la concentración de LacI disminuye hasta casi desaparecer, opuesto a la de CiTS, efecto del switch biestable. En este caso, la expresión de GFP es casi el doble que en **b**, en donde no hay preinducción por IPTG.

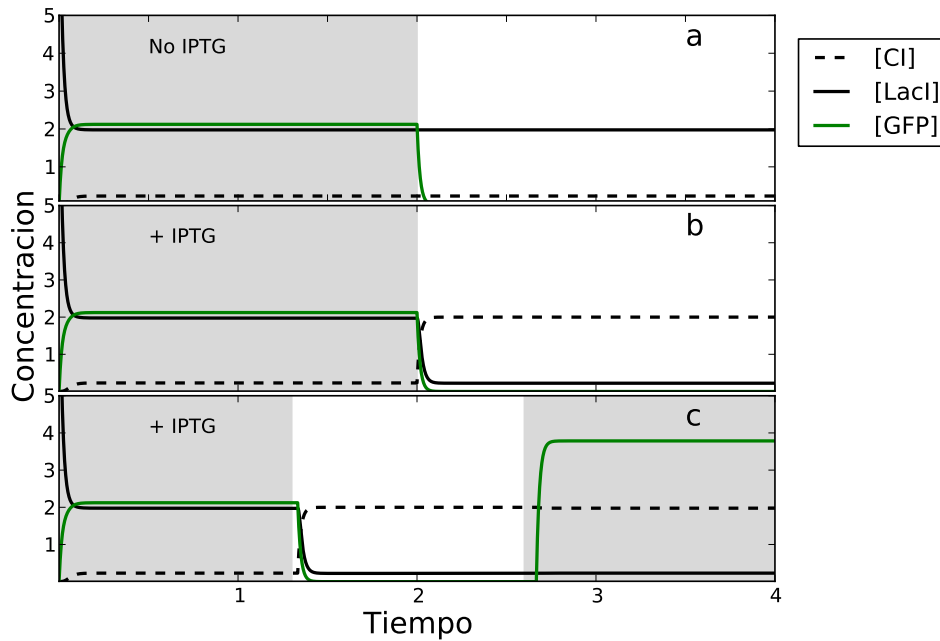


Figura 15: Efecto de la arabinosa en el switch biestable. La zona sombreada indica adición de arabinosa en el sistema. En **a** se agrega arabinosa pero no IPTG, al retirar la arabinosa, se interrumpe la expresión de GFP. En **b** Se agrega arabinosa y al retirarse se introduce IPTG; el switch biestable reacciona con normalidad pero no hay expresión de GFP. En **c**, se introduce arabinosa, al retirar se activa el switch biestable y finalmente se vuelve a introducir arabinosa. Se observa que la expresión de GFP prácticamente se duplica después de activar el switch biestable.

2. Construcción genética

Una vez ensamblados los 4 módulos de expresión juntos en un plásmido psB1A3, que se observa en la figura 16, se secuenciaron los módulos por separado. Finalmente, se digirió el plásmido con las enzimas EcoRI, XbaI, SpeI y PstI individualmente y con EcoRI y PstI juntas. En la figura 16 se observan los resultados de la digestión y un PCR del circuito completo. En el caso de la digestión, se observa que todas las bandas de digestión simple excepto SpeI linealizan el plásmido en 7811 pb, mientras que en la digestión doble se revelan dos bandas: una de 4565 pb y una de 3150 pb, correspondientes al circuito y al plásmido psB1A3, respectivamente. EL PCR arroja una banda en 4665 pb, correspondiente al circuito más las secuencias flanqueantes de BioBricks®.

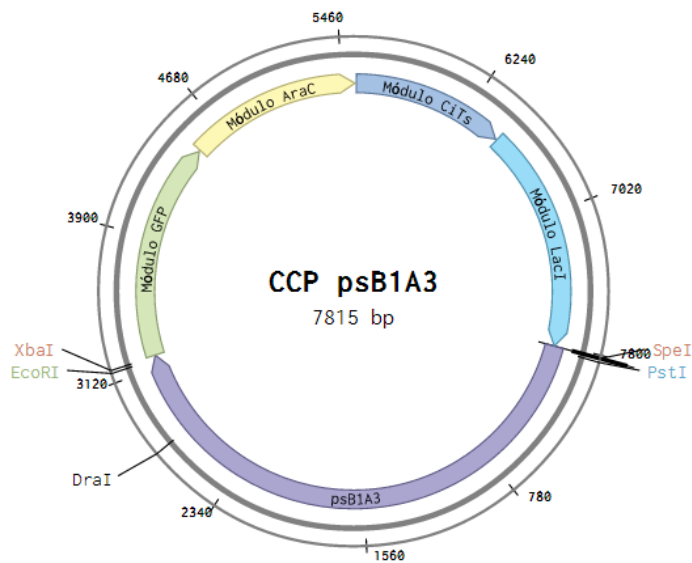


Figura 16: Mapa del circuito incluido en un plásmido psB1A3.

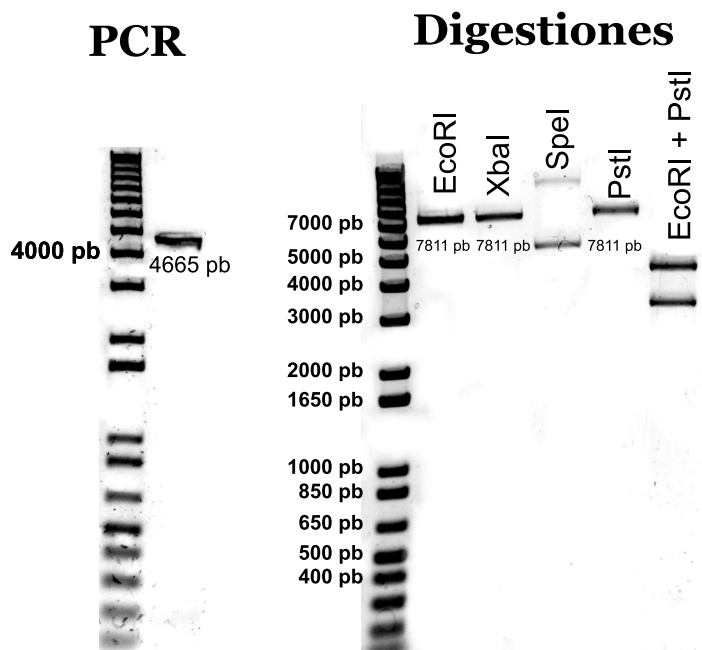


Figura 17: Resultados de digestión y PCR.

2.1. Resultados de secuenciaciones parciales

Los datos de las secuenciaciones parciales fueron procesados y se obtuvieron *dotplots* o matrices de similitud y alineamientos locales. En las figuras 18-20 se observan los *dotplots* de los módulos CiTs, LacI y AraC. En la sección **a** de cada figura se ilustra el alineamiento de la secuencia original con la obtenida mediante el primer *Forward* y en **b** los resultados para el primer *Reverse*. En el caso de los módulos CiTs y LacI el alineamiento demostró la ausencia de 1 y 2 bases respectivamente al inicio de los ORFs, provocando errores en la expresión de los genes codificados. En la figura 21 se observa el *dotplot* obtenido de la secuenciación parcial del módulo GFP. En **a** la zona sombreada en azul resalta la ausencia de un fragmento de aproximadamente 100 pb que abarca las zonas -30 y -10 del promotor *plac/ara* y el inicio del promotor *pBAD*. Esto se debe a la presencia de una secuencia simétrica entre las zonas -30 y -10 de *plac/ara*. Se rediseñaron los primers 508, 509 y 510 (tabla 8) y se replanteó la estrategia de ensamble añadiendo un paso de hibridación previo a la reacción de Gibson (Gibson et al., 2009). Los ORFs fueron reparados insertando las bases faltantes mediante PCR. Los 4 módulos fueron reensamblados en el plásmido *psB1A3* mediante reacción de Gibson.

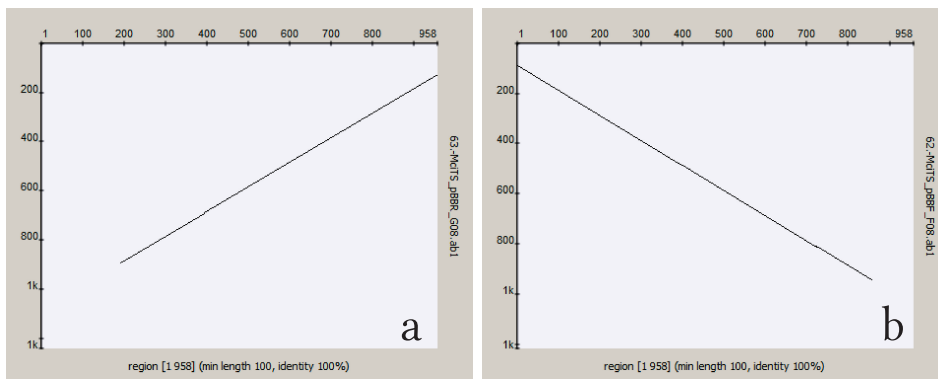


Figura 18: *Dotplot* de módulo CiTs.

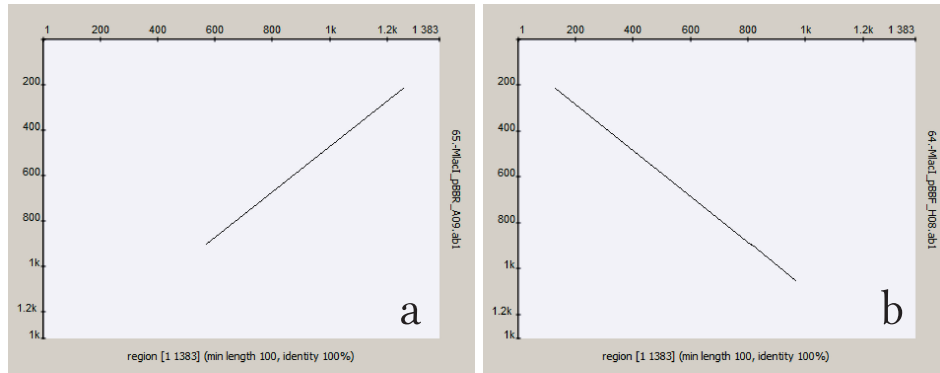


Figura 19: Dotplot de módulo LacI.

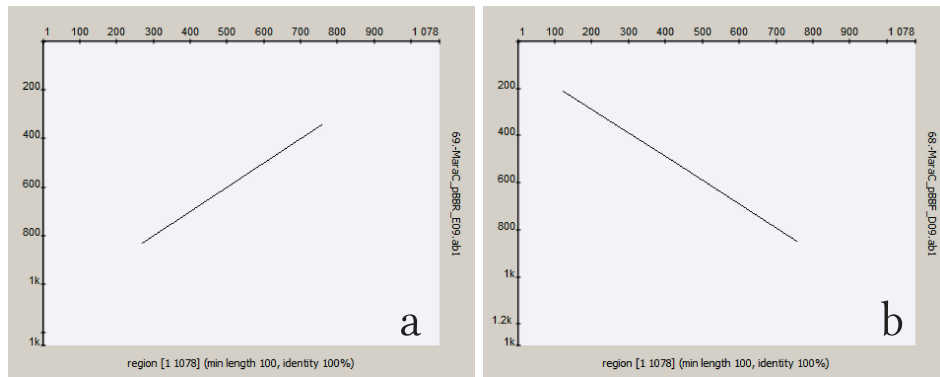


Figura 20: Dotplot de módulo AraC.

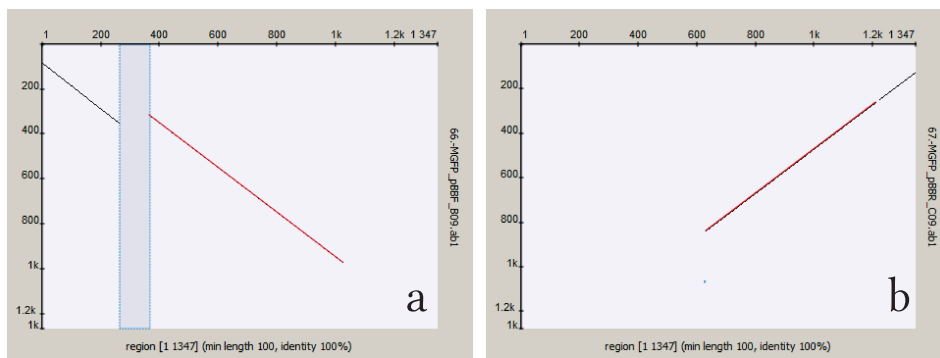


Figura 21: Dotplot de módulo GFP.

Discusión

Los circuitos genéticos sintéticos comúnmente se diseñan a partir de modelos matemáticos, ya sean deterministas o estocásticos, con el fin de evadir obstáculos como falta de información sobre parámetros celulares (Beckssei & Serrano, 2000; Cox et al., 2010). En este trabajo se elaboró un modelo determinista que describe la dinámica de un circuito de comportamiento predictor. La solución numérica de este modelo muestra similitud con la dinámica del comportamiento observado en organismos como *E. coli* (Mitchell et al., 2009).

El circuito genético construido en este proyecto basa su funcionamiento en la robustez del switch biestable diseñado y probado por Gardner et al. (2000). Para construir el switch se utilizaron las mismas piezas que en el trabajo citado asegurando así el funcionamiento del sistema. El modelo matemático propuesto arroja evidencias que soportan esta afirmación y a la vez demuestra que la inclusión de inductores externos no afecta el desempeño del switch biestable. Su estabilidad y el soporte teórico lo hacen apto para formar parte de un circuito más grande y complejo (Ellis et al., 2009; Guido et al., 2006), de modo que su inclusión como pieza basal garantiza el funcionamiento del circuito de comportamiento predictor. Sin embargo, es necesario destacar que por sí mismo el switch biestable no confiere al sistema la capacidad de predecir cambios en su entorno, sino que habilita esta al permitir la preinducción del circuito a la presencia de una señal determinada, logrando así una respuesta más intensa a esta.

El módulo AraC funciona como alimentador del módulo GFP, es decir, la expresión constante de la proteína AraC implica un exceso de esta en la célula bacteriana, de modo que se evita la competencia entre el circuito y el empleo normal de la proteína por parte de la célula, pues la demanda natural queda cubierta con una cantidad ínfima de esta (Johnson & Schleif, 1995), en otras palabras, si el sistema dependiera de la producción normal de AraC, es probable que su eficiencia disminuyera. El mecanismo de acción de AraC puede considerarse como regulación positiva, pues la presencia de arabinosa desencadena la actividad de los promotores regulados por esta proteína, pues en su estado inactivo forma horquillas de ADN que no permiten la actividad de la polimerasa (Soisson et al., 1997; Seabold & Schleif, 1998); en el contexto de una expresión constitutiva de AraC, como en el circuito propuesto, la acción de la arabinosa promueve la actividad del promotor, concordando con el concepto de regulación positiva (Eustance & Schleif, 1996; Khlebnikov et al., 2002). Por otro lado, la respuesta del promotor pBAD activado por AraC a la presencia de arabinosa es rápida en términos celulares (Frato & Schleif, 2010), lo que otorga una mejor resolución temporal al circuito.

La resolución temporal también puede verse incrementada por la modificación al gen *gfpmut3b* con una secuencia codificante para un péptido de degradación ssRa, pues disminuye la estabilidad del producto y su vida media, de modo que es posible obtener datos que verifiquen el funcionamiento del circuito; igualmente las características de esta variante particular de GFP (Cormack et al., 1996) permiten una respuesta más rápida y fácil de cuantificar. Finalmente, la eficiencia del promotor plac/ara ha sido verificada (Lutz & Bujard, 1997), de modo que su función en el circuito queda cubierta.

Si bien la base teórica del circuito de comportamiento predictor permite suponer el correcto

funcionamiento de este, aún quedan por resolver cuestiones de ruido bioquímico y carga de trabajo celular. El ruido bioquímico puede interferir con la toma de datos de un circuito y afectar el análisis consecuente (Cox et al., 2010; Elowitz et al., 2002). Un modo de reducir el ruido bioquímico es aumentando el número de copias del sistema por célula, sin embargo, este aumento puede implicar una carga metabólica a la célula, aunada a la ya existente por la mera presencia del circuito (Algar et al., 2013; Oyarzún & Stan, 2013). Una manera de solventar esta cuestión es comparando la respuesta del circuito en dos plásmidos distintos, uno de alto número de copias y otro de bajo número de copias, igualmente útil es la propuesta de un estudio *single cell* que permita la implementación de un modelo estocástico (Elowitz & Leibler, 2000; Danino et al., 2010). Por otro lado, el efecto del IPTG sobre el sistema podría interferir con la respuesta del promotor pBAD, pues al ser este un galactósido existe la posibilidad de que se una al sitio activo de AraC, bloqueando la acción de la arabinosa (Schleif, 2010); así mismo, una concentración elevada de IPTG puede ralentizar tanto el crecimiento como la actividad enzimática de *E. coli* (Law et al., 2002).

Los resultados obtenidos en el laboratorio, tanto de los análisis de digestión y PCR como de las secuenciaciones parciales, indican que si bien hubo problemas durante la construcción del circuito, al solucionarlos la construcción de los módulos se ajusta al diseño teórico de estos, por lo que se espera una respuesta positiva del sistema al aplicar el diseño experimental propuesto.

En síntesis, existe respaldo teórico tanto matemático como biológico para suponer que el sistema propuesto y construido en este trabajo es capaz de mostrar el comportamiento esperado, aunque existen factores que podrían ralentizar su respuesta; por lo tanto se requiere un diseño experimental bien calculado y preciso con el fin de solventar los posibles obstáculos que se pudieran presentar.

Conclusiones

En este proyecto se diseñó y desarrolló un circuito genético sintético basado en el funcionamiento de un switch biestable; cuyo objetivo es emular el comportamiento predictor observado en algunos microorganismos, usando la presencia de IPTG y arabinosa en el medio como señales inductoras. Las características de las piezas necesarias para la construcción fueron determinadas a partir de un modelo matemático conformado por tres ecuaciones diferenciales deterministas. El análisis del modelo arroja evidencias sobre la dependencia del circuito en la robustez del switch biestable utilizado. Dadas estas circunstancias se optó por utilizar un switch ya conocido y estudiado con amplitud con el fin de garantizar el correcto funcionamiento del circuito de comportamiento predictor.

Se diseñó un experimento para probar la efectividad del circuito mediante un lector multiplaca, tomando medidas de DO y fluorescencia a intervalos temporales determinados. Las cepas receptoras y plásmidos contenedores del circuito están preparados y verificados para llevar a cabo este experimento.

Perspectivas

Las evidencias del modelo matemático indican que el circuito propuesto en este proyecto puede mostrar comportamiento predictor parecido al observado en microorganismos como *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*, en donde una señal preinduce la maquinaria molecular del organismo en cuestión para enfrentar cambios súbitos en el medio en un futuro cercano. Dado el caso de que durante el desarrollo de este trabajo se crearon las herramientas necesarias para introducir el circuito en cepas de *E. coli* modificadas con el fin de reducir el posible ruido bioquímico inherente a la maquinaria molecular nativa del microorganismo. Queda pendiente su implementación en estas cepas, así como la experimentación siguiendo los pasos enlistados en el diseño experimental. Los datos así recuperados servirán para validar el modelo matemático. Una vez validado el modelo determinista, se propone la modificación del circuito con miras a reducir el ruido bioquímico al mínimo posible, implementando soluciones que permitan una pocas copias del circuito por célula, así como un circuito que carezca del promotor PBAD, aprovechando la permeabilidad del promotor Plac/ara. De este modo, podría llevarse a cabo un estudio comparativo *Single cell* similar a los implementados en los estudios citados en este trabajo. Así, con la generación de nuevos datos podría alimentarse un modelo estocástico que arroje luz sobre la naturaleza del comportamiento predictor en microorganismos, profundizando en cuestiones pertinentes al enfoque poblacional, pues ¿Es el comportamiento predictor una respuesta codificada naturalmente en el genoma bacteriano o es resultado de un fenómeno poblacional?

Bibliografía

- Algar, R., Ellis, T., & Stan, G. (2013). Modelling the burden caused by gene expression: an in silico investigation into the interactions between synthetic gene circuits and their chassis cell. *arXiv preprint arXiv:1309.7798*, pages 1–24.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjorn, S. P., Givskov, M., & Molin, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 64(6):2240–6.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. a., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*, 2:2006.0008.
- Beckssei, A. & Serrano, L. (2000). Engineering stability in gene networks by autoregulation. *Nature*, 405(6786):590–593.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 62(3):293–300.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., & Falkow, S. (1996). Facs-optimized mutants of the green fluorescent protein (gfp). *Gene*, 173(1):33 – 38. *Flourescent Proteins and Applications*.

- Cox, R. S., Dunlop, M. J., & Elowitz, M. B. (2010). A synthetic three-color scaffold for monitoring genetic regulation and noise. *Journal of biological engineering*, 4:10.
- Danino, T., Mondragón-Palomino, O., Tsimring, L., & Hasty, J. (2010). A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 463(7279):326–30.
- Darlington, S. (1999). A history of network synthesis and filter theory for circuits composed of resistors, inductors, and capacitors. *IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Fundamental Theory and Applications*, 46(1):4–13.
- Ellis, T., Wang, X., & Collins, J. J. (2009). Diversity-based, model-guided construction of synthetic gene networks with predicted functions. *Nature biotechnology*, 27(5):465–71.
- Elowitz, M. B. & Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 403(6767):335–8.
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., & Swain, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5584):1183–6.
- Eustance, R. J. & Schleif, R. F. (1996). The linker region of AraC protein. *Journal of bacteriology*, 178(24):7025–30.
- Frato, K. E. & Schleif, R. F. (2010). A DNA-Assisted Binding Assay for Weak Protein–Protein Interactions. *J Mol. Biol.*, 394(5):805–814.
- Gardner, T. S., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 403(6767):339–42.
- Gibson, D. G., Smith, H. O., Hutchison, C. a., Venter, J. C., & Merryman, C. (2010). Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nature methods*, 7(11):901–3.

- Gibson, D. G., Young, L., Chang, R.-J., Venter, J. C., Hutchinson, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of dna molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5):343–345.
- Golden, S. S. & Canales, S. R. (2003). Cyanobacterial circadian clocks—timing is everything. *Nature reviews. Microbiology*, 1(3):191–9.
- Guet, C. C., Elowitz, M. B., Hsing, W., & Leibler, S. (2002). Combinatorial synthesis of genetic networks. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5572):1466–70.
- Guido, N. J., Wang, X., Adalsteinsson, D., McMillen, D., Hasty, J., Cantor, C. R., Elston, T. C., & Collins, J. J. (2006). A bottom-up approach to gene regulation. *Nature*, 439(7078):856–60.
- Hasty, J., McMillen, D., & Collins, J. J. (2002). Engineered gene circuits. *Nature*, 420(6912):224–30.
- Hill, A. (1913). The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. I. *Biochemical journal*, 40(iv-vii):471–480.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3(3):318–356.
- Johnson, C. M. & Schleif, R. F. (1995). In vivo induction kinetics of the arabinose promoters in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177(12):3438–42.
- Khlebnikov, a., Skaug, T., & Keasling, J. D. (2002). Modulation of gene expression from the arabinose-inducible araBAD promoter. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 29(1):34–7.
- Kim, J., White, K. S., & Winfree, E. (2006). Construction of an in vitro bistable circuit from synthetic transcriptional switches. *Molecular systems biology*, 2:68.

- Law, J., Lee, S., Tseng, A. M. Y., Tsui, K. O. W., & Yu, N. (2002). The Role of Glycerol and Isopropyl Thiogalactoside in Escherichia coli Growth and Lactose Induction of β -Galactosidase. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, 2(April):97–102.
- Lu, T. K., Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2009). Next-generation synthetic gene networks. *Nature biotechnology*, 27(12):1139–50.
- Lutz, R. & Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic acids research*, 25(6):1203–10.
- Martínez-Antonio, A., Velázquez-Ramírez, D. a., Sánchez-Mondragón, J., & Santillán, M. (2012). Hierarchical dynamics of a transcription factors network in E. coli. *Molecular bioSystems*, 8(11):2932–6.
- Mitchell, A., Romano, G. H., Groisman, B., Yona, A., Dekel, E., Kupiec, M., Dahan, O., & Pilpel, Y. (2009). Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature*, 460(7252):220–4.
- Novák, B. & Tyson, J. J. (2008). Design principles of biochemical oscillators. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(12):981–91.
- Oyarzún, D. & Stan, G. (2013). Synthetic gene circuits for metabolic control: design trade-offs and constraints. *Journal of The Royal ...*, 10(78).
- Salgado, H., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S., Santos-Zavaleta, A., Muñoz Rascado, L., García-Sotelo, J. S., Weiss, V., Solano-Lira, H., Martínez-Flores, I., Medina-Rivera, A., Salgado-Ororio, G., Alquicira-Hernández, S., Alquicira-Hernández, K., López-Fuentes, A., Porrón-Sotelo, L., Huerta, A. M., Bonavides-Martínez, C., Balderas-Martínez, Y. I., Pannier, L., Olvera, M., Labastida, A.,

- Jiménez-Jacinto, V., Vega-Alvarado, L., Del Moral-Chávez, V., Hernández-Alvarez, A., Morett, E., & Collado-Vides, J. (2013). RegulonDB v8.0: omics data sets, evolutionary conservation, regulatory phrases, cross-validated gold standards and more. *Nucleic acids research*, 41(Database issue):D203–13.
- Sambrook, J., Russell, D. W. D. W., Janssen, K., Argentine, J., & Laboratory, C. S. H. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual on the web / [electronic resource]*. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Savageau, M. (1998). Demand theory of gene regulation. II. Quantitative application to the lactose and maltose operons of Escherichia coli. *Genetics*, 149(4):1677–1691.
- Schleif, R. (2010). AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in Escherichia coli, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS microbiology reviews*, 34(5):779–96.
- Seabold, R. R. & Schleif, R. F. (1998). Apo-AraC actively seeks to loop. *Journal of molecular biology*, 278(3):529–38.
- Shetty, R. P., Endy, D., & Knight, T. F. (2008). Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of biological engineering*, 2:5.
- Shevchuk, N. a., Bryksin, A. V., Nusinovich, Y. a., Cabello, F. C., Sutherland, M., & Ladisch, S. (2004). Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic acids research*, 32(2):e19.
- Soisson, S. M., MacDougall-Shackleton, B., Schleif, R., & Wolberger, C. (1997). Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5311):421–5.
- Stricker, J., Cookson, S., Bennett, M. R., Mather, W. H., Tsimring, L. S., & Hasty, J. (2008). A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature*, 456(7221):516–9.

- Tagkopoulos, I., Liu, Y.-C., & Tavazoie, S. (2008). Predictive behavior within microbial genetic networks. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5881):1313–7.
- Tajbakhsh, S., Cavalli, G., & Richet, E. (2011). Integrated gene regulatory circuits: celebrating the 50(th) anniversary of the operon model. *Molecular cell*, 43(4):505–14.
- Thieffry, D., Huerta, a. M., Pérez-Rueda, E., & Collado-Vides, J. (1998). From specific gene regulation to genomic networks: a global analysis of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 20(5):433–40.
- Thomason, L. C., Costantino, N., & Court, D. L. (2007). *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, Chapter 1(July):Unit 1.17.
- Tyson, J. J., Chen, K. C., & Novak, B. (2003). Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2):221–231.

Apéndice

1. Análisis de biestabilidad del switch

A partir de las ecuaciones 1 y 2 se obtuvieron las nullclines, igualando $[\dot{u}]$ y $[\dot{v}]$ a 0. De modo que:

$$\alpha_1 \frac{1}{1 + [v]^\beta} - [u] = 0, \quad \alpha_2 \frac{1}{1 + [u]^\gamma} - [v] = 0$$

Por lo tanto, las nullclines se obtienen a partir de:

$$[u] = \alpha_1 \frac{1}{1 + [v]^\beta}, \quad [v] = \alpha_2 \frac{1}{1 + [u]^\gamma}$$

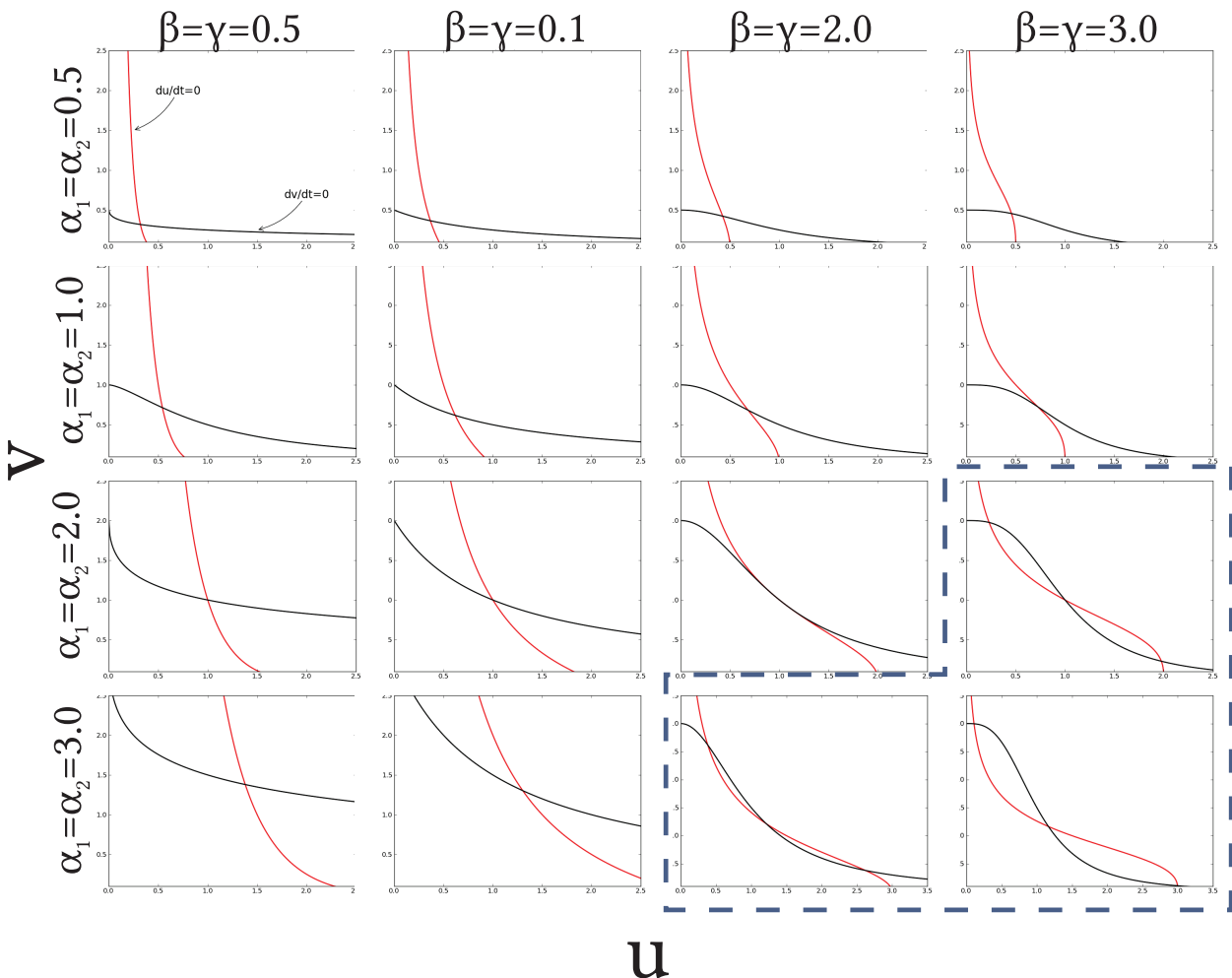


Figura 22: Análisis de biestabilidad del switch. Se obtuvieron nullclines a partir de diferentes valores de los parámetros. Las gráficas dentro de la línea punteada muestran biestabilidad.

En la figura 22 se observan varias gráficas que corresponden a las nullclines del sistema que ocurren al variar los valores de los parámetros α_1 , α_2 , β y γ . Las variaciones en los parámetros se asignaron siguiendo los requisitos de Gardner et al. (2000) para que ocurra biestabilidad en el switch, por lo que $\alpha_1 = \alpha_2$ y $\beta = \gamma$. En los casos en que ocurre biestabilidad los valores de todos los parámetros son iguales o mayores a 2.0; sin embargo, en el trabajo citado se afirma que puede existir biestabilidad cuando $\beta = \gamma = 1,1$ pero en un rango limitado para α_1 y α_2 . Tomando en cuenta que cuando $\alpha_1 = \alpha_2 = 2,0$ y $\beta = \gamma = 3,0$ es cuando más se aproxima la gráfica obtenida a la de Gardner et al. (2000) y que se utilizaron las mismas piezas genéticas en este proyecto, esos son los valores que se utilizaron durante el desarrollo de este trabajo.

2. Secuencias utilizadas por módulo de expresión

2.1. Módulo *araC*

Promotor PJ23116

5'-GTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGGACTATGCTAGCTACTAGAG-3'

RBS B

5'-AGGAATTTAATA-3'

Gen *araC*

5'-ATGGCTGAAGCGCAAAATGATCCCCTGCTGCCGGGATACTCGTTTAATGCCCATCTGG
TGGCGGGTTTAACGCCGATTGAGGCCAACGGTTATCTCGATTTTTTTTATCGACCGACCGC
TGGAATGAAAGGTTATATTCTCAATCTCACCATTTCGCGGTCAGGGGGTGGTGAAAAAT
CAGGGACGAGAATTTGTTTGCCGACCGGGTGATATTTTGCTGTTCCCGCCAGGAGAGATT
CATCACTACGGTCGTCATCCGGAGGCTCGCGAATGGTATCACCAGTGGGTTTACTTTCGT

CCGCGCGCCTACTGGCATGAATGGCTTAACTGGCCGTCAATATTTGCCAATACGGGGTTC
TTTCGCCCCGGATGAAGCGCACCCAGCCGCATTTTCAGCGACCTGTTTGGGCAAATCATTAAC
GCCGGGCAAGGGGAAGGGCGCTATTCGGAGCTGCTGGCGATAAATCTGCTTGAGCAATT
GTTACTGCGGCGCATGGAAGCGATTAACGAGTCGCTCCATCCACCGATGGATAATCGGG
TACGCGAGGCTTGTGAGTACATCAGCGATCACCTGGCAGACAGCAATTTTGATATCGCCA
GCGTCGCACAGCATGTTTGCTTGTGCGCCGTGCGGTCTGTCACATCTTTTCCGCCAGCAGTT
AGGGATTAGCGTCTTAAGCTGGCGCGAGGACCAACGTATCAGCCAGGCGAAGCTGCTTT
TGAGCACCACCCGGATGCCTATCGCCACCGTCGGTCGCAATGTTGGTTTTGACGATCAAC
TCTATTTCTCGCGGGTATTTAAAAAATGCACCGGGGCCAGCCCGAGCGAGTTCCGTGCCG
GTTGTGAAGAAAAAGTGAATGATGTAGCCGTCAAGTTGTCATAA-3'

Terminador BBa_B0014

5'-TCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATACTAGAGAGAGAATAT
AAAAAGCCAGATTATTAATCCGGCTTTTTTATTATTT-3'

2.2. Módulo *lacI*

Promotor $P_{\lambda}S1con$

5'-GCATGCACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATA
CCACTGGCGGTTATAATGAGCACATCAGCAGG-3'

RBS 1D

5'-AGGAAACCGGTTTCGTA TAGAG-3'

Gen *lacI_{lva}*

5'-ATGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTT
ATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAA
AAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACA
GGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCC

GTCGCAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGT
GTCGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCG
CGCAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTG
TGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCA
TCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTGC
CATTGGGTACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTC
TGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAAC
GGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAG
GGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGC
GCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGAT
ACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTG
CTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGG
CAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGC
AAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCC
GACTGGAAAGCGGGCAGGCTGCAAACGACGAAAACACTACGCTTTAGTAGCTTAATAA-3'

Terminador BBa_B0014

5'-TCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATACTAGAGAGAGAATAT
AAAAAGCCAGATTATTAATCCGGCTTTTTTATTATTT-3'

2.3. Módulo *ciTs*

Promotor Ptrc-2

5'-CCATCGAATGGCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTG
GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAC-3'

RBS E

5'-AGGAAACCGGTTTA-3'

Gen *ciTs*

5'-ATGAGCACAAAAAAGAAACCATTAACACAAGAGCAGCTTGAGGACGCACGTCGCCTT
AAAGCAATTTATGAAAAAAGAAAAATGAACTTGGCTTATCCCAGGAATCTGTTCGCAGA
CAAGATGGGGATGGGGCAGTCAGGCGTTGGTGCTTTATTTAATGGCATCAATGCATTAA
ATGCTTATAACGCCGCATTGCTTACAAAAATTCTCAAAGTTAGCGTTGAAGAATTTAGCC
CTTCAATCGCCAGAGAAATCTACGAGATGTATGAAGCGGTTAGTATGCAGCCGTCCTT
AGAAGTGAGTATGAGTACCCTGTTTTTCTCATGTTTCAGGCAGGGATGTTTCTCACCTGAG
CTTAGAACCTTTACCAAAGGTGATGCGGAGAGATGGGTAAGCACAACCAAAAAAGCCAG
TGATTCTGCATTCTGGCTTGAGGTTGAAGGTAATTCATGACCGCACCAACAGGCTCCAA
GCCAAGCTTTCCTGACGGAATGTTAATTCTCGTTGACCCTGAGCAGGCTGTTGAGCCAGG
TGATTTCTGCATAGCCAGACTTGGGGGTGATGAGTTTACCTTCAAGAACTGATCAGGGA
TAGCGGTCAGGTGTTTTTACAACCACTAAACCCACAGTACCCAATGATCCCATGCAATGA
GAGTTGTTCCGTTGTGGGGAAAGTTATCGCTAGTCAGTGGCCTGAAGAGACGTTTGGCTG
A-3'

Terminador BBa_B0014

5'-TCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATACTAGAGAGAGAATAT
AAAAAGCCAGATTATTAATCCGGCTTTTTTATTATTT-3'

2.4. Módulo *gfp*

Promotor Plac/ara

5'-AATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAATTCACGGTAAAACAGACAAAGAAATCCG
GCAAGTTACGTAGGGAAGGGGCCCGGAGACTAAAGAGGCCCGAACATCACACGTGTTCG
ACCCCTGACCCGAGACAAGACTTTACGACGTAATTGTTCCGGATCTTATCTATAAGTCCGA
TGCTGATTCCTTTTGTCCCTATGTTTCGCTAACATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGAT
CCTAAGCTTTACAATTGTGAGCGCTCACAAATTATGATAGATTCAATTGTGAGCGGATAAC

AATTTACACA-3'

Promotor PBAD

5'-ACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGA
TTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATAACCGTTTT
TTGGGCTAGC-3'

RBS B

5'-AGGAATTTAA-3'

Gen *gfpmut3b*

5'-ATGCGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATG
GTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATAC
GGAAAACCTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACA
CTTGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAA
CAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAAGACTATATTT
TTCAAAGATGACGGGAAGACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCT
TGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGAC
ACAAATTGGAATACAAGTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAG
AATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACT
AGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAA
CCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACA
TGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACA
AA-3'

Péptido de degradación ssRa

5'-CGCCCGCGCGCGAACGATGAAAAGTATGCGGCGGCGGTG-3'

Terminador BBa_B0014

5'-TCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATACTAGAGAGAGAATAT

AAAAAGCCAGATTATTAATCCGGCTTTTTTATTATTT-3'

3. Primers utilizados en el proyecto

Tabla 2: Primers para amplificar un fragmento de *E. coli* que incluye *araC*

| Núm. de registro | Secuencia | Tamaño |
|------------------|--------------------------------|--------|
| 332 | 5'-ACGCGTTTTTGTCATGGCTTTGGT-3' | 24 b |
| 333 | 5'-TGCCTGTCAAATGGACGAAGCAG-3' | 23 b |

Tabla 3: Primers para amplificar ORF de *araC*

| Núm. de registro | Secuencia | Tamaño |
|------------------|--|--------|
| 334 | 5'-AGGAATTTAAATGGCTGAAGCGCAAATG-3' | 29 b |
| 335 | 5'-ATTCGTTCTAGATTATGACAACCTTGACGGCT-3' | 31 b |

Tabla 4: Primers para amplificar ORF de *gfpmut3b* + RBS b

| Núm. de registro | Secuencia | Tamaño |
|------------------|------------------------------------|--------|
| 336 | 5'-AGGAATTTAAATGCGTAAAGGAGAAGAA-3' | 28 b |
| 337 | 5'-TTTGTATAGTTCATCCAT-3' | 18 b |

Tabla 5: Primers para obtener péptido de degradación ssRa

| Núm. de registro | Secuencia | Tamaño |
|------------------|---|--------|
| 338 | 5'-GCATGGATGAACTATACAAACGCCCGGGCGGCGA ACGATGA-3' | 40 b |
| 339 | 5'-GTGTGATCTAGATTATTACACCGCCGCGCATA GTTTCA-3' | 40 b |

Tabla 6: Primers para Síntesis Gibson del promotor P₁s1con y RBS 1D

| Núm. de registro | Secuencia | Tamaño |
|-------------------------|--|---------------|
| 358 | 5'-ACTAGTGCATGCACAGATAACCATCTGCGGTGA TAAATTA-3' | 40 b |
| 359 | 5'-ATGTCAACACCGCCAGAGATAATTTATCACCGC AGATGGT-3' | 40 b |
| 360 | 5'-ATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCACTGGC GGTTATA-3' | 40 b |
| 361 | 5'-TTTCCTGCTGATGTGCTCATTATAACCGCCAGTG GTATTT-3' | 40 b |
| 362 | 5'-ATGAGCACATCAGCAGGAAACCGGTTTCGTCTAG A-3' | 34 b |

Tabla 7: Primers para Síntesis Gibson del promotor PBAD

| Núm. de registro | Secuencia | Tamaño |
|-------------------------|---|---------------|
| 340 | 5'-ACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTA TGCCAT-3' | 40 b |
| 341 | 5'-ATCTTATGGATAAAAATGCTATGGCATAGCAAA GTGTGAC-3' | 40 b |
| 342 | 5'-AGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTAC CTGACGC-3' | 40 b |
| 343 | 5'-GTAGAGAGTTGCGATAAAAAGCGTCAGGTAGG ATCCGCTA-3' | 40 b |
| 344 | 5'-TTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATAACC GTTTTT-3' | 40 b |
| 345 | 5'-TTAAATTCCTGCTAGCCCCAAAAAACGGTATGG AGAAACA-3' | 40 b |
| 346 | 5'-TACCGTTTTTTTTGGGCTAGCAGGAATTTAAATG CGTAAAG-3' | 40 b |

Tabla 8: Primers para Síntesis Gibson del promotor Plac/ara

| Núm. de registro | Secuencia | Tamaño |
|------------------|---|--------|
| 347 | 5'-ACTAGTAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAC AATTCACGGTAAA-3' | 46 b |
| 348 | 5'-GCCGGATTTCTTTGTCTGTTTTACCGTGAATTGT GTGAAA-3' | 40 b |
| 349 | 5'-AAACAGACAAAGAAATCCGGCAAGTTACGTAG GGAAGGGG-3' | 40 b |
| 350 | 5'-GCCTCTTTAGTCTCCCGGGCCCCTTCCCTACGTA ACTTGC-3' | 40 b |
| 351 | 5'-GGCCCGGGAGACTAAAGAGGCCCGAACATCAC ACGTGTCG-3' | 40 b |
| 352 | 5'-CTTGTCTCGGGTCAGGGGTCGACACGTGTGATG TTCGGGC-3' | 40 b |
| 353 | 5'-CGACCCCTGACCCGAGACAAGACTTTACGACGT AATTGTT-3' | 40 b |
| 354 | 5'-GACTTATAGATAAGATCCGAACAATTACGTCGT AAAGTCT-3' | 40 b |
| 355 | 5'-TTCGGATCTTATCTATAAGTCCGATGCTGATTCC TTTTGT-3' | 40 b |
| 356 | 5'-CTATGTTAGCGAACATAGGACAAAAGGAATCA GCATCGGA-3' | 40 b |
| 357 | 5'-GTCCTATGTTGCTAACATAGCATTTTTATCCAT AAGATT-3' | 40 b |
| 508 | 5'-GCGCTCACAATTGTAAAGCTTAGGATCCGCTAA TCTTATGGATAAAAATGC-3' | 51 b |
| 509 | 5'-GCTTTACAATTGTGAGCGCTCACAATTATGATA GATTCAATTGTGAGCGG-3' | 50 b |
| 510 | 5'-GCCGTGCAAATAATCAATGTTGTGTGAAATTGT TATCCGCTCACAATTGA-3' | 50 b |

4. Secuencias generadas por síntesis comercial

Secuencia sintética que incluye al promotor Ptrc-2, RBS E y el gen *cits*

5'-CCATCGAATGGCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTG
TGGAAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAATTTAAATGAGCACAAAAAAGAAAC

CATTAACACAAGAGCAGCTTGAGGACGCACGTCGCCTTAAAGCAATTTATGAAAAAAG
AAAAATGAACTTGGCTTATCCCAGGAATCTGTTCGCAGACAAGATGGGGATGGGGCAGTC
AGGCGTTGGTGCTTTATTTAATGGCATCAATGCATTAAATGCTTATAACGCCGCATTGCT
TACAAAAATTCTCAAAGTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCCTTCAATCGCCAGAGAAATCT
ACGAGATGTATGAAGCGGTTAGTATGCAGCCGTCACCTTAGAAGTGAGTATGAGTACCCT
GTTTTTTCTCATGTTTCAGGCAGGGATGTTCTCACCTGAGCTTAGAACCTTTACCAAAGGT
GATGCGGAGAGATGGGTAAGCACAACCAAAAAAGCCAGTGATTCTGCATTCTGGCTTGA
GGTTGAAGGTAATTCCATGACCGCACCAACAGGCTCCAAGCCAAGCTTTCCTGACGGAA
TGTTAATTCTCGTTGACCCTGAGCAGGCTGTTGAGCCAGGTGATTTCTGCATAGCCAGAC
TTGGGGGTGATGAGTTTACCTTCAAGAACTGATCAGGGATAGCGGTCAGGTGTTTTTAC
AACCACTAAACCCACAGTACCCAATGATCCCATGCAATGAGAGTTGTTCCGTTGTGGGG
AAAGTTATCGCTAGTCAGTGGCCTGAAGAGACGTTTGGCTGATCACACTGGCTCACCTTC
GGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATACTAGAGAGAGAATATAAAAAGCCAGATTATTAATC
CGGCTTTTTTATTATTT-3'

5. Secuenciaciones parciales por módulo

Módulo CiTs, oligo *Forward*.

5'-TCTTACTGATTTAACCTATAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTCAGATAAAAAA
AATCCTTAGCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCCATCGA
ATGGCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTACACAGGAAACCGGTTATGAGCACAAAAAAGAAACCATTAACAC
AAGAGCAGCTTGAGGACGCACGTCGCCTTAAAGCAATTTATGAAAAAAGAAAAATGA
ACTTGGCTTATCCCAGGAATCTGTTCGCAGACAAGATGGGGATGGGGCAGTCAGGCGTTG
GTGCTTTATTTAATGGCATCAATGCATTAAATGCTTATAACGCCGCATTGCTTACAAAAA

TTCTCAAAGTTAGCGTTGAAGAATTTAGCCCTTCAATCGCCAGAGAAATCTACGAGATGT
ATGAAGCGGCTAGTATGCAGCCGTCACCTTAGAAGTGAGTATGAGTACCCTGTTTTTCTC
ATGTTTCAGGCAGGGATGTTCTCACCTGAGCTTAGAACCTTTACCAAAGGTGATGCGGAG
AGATGGGTAAGCACAACCAAAAAAGCCAGTGATTCTGCATTCTGGCTTGAGGTTGAAGG
TAATTCCATGACCGCACCAACAGGCTCCAAGCCAAGCTTTCCTGACGGAATGTTAATTCT
CGTTGACCCTGAGCAGGCTGTTGAGCCAGGTGATTTCTGCATAGCCAGACTTGGGGGTGA
TGAGTTTACCTTCAAGAACTGATCAGGGATAGCGGTCAGTGTTTTTACAACCACTAAAC
CCACAGTACCCAATGATCCCATGCAATGAGAGTTGTTCCGTTGTGGGGAAAGTTATCGCT
AGTCAGTGGCCTGAAGAGACGTTTGGCTGATACTAGAGTCACACTGGCTCACTTCGGGTG
GACTTTCTGCGTTTATATACTAGAGAGAGATATAAAGCCAGATTATAATCTGGCTTTTTA
TATTTAACTAGTAGCGGCTGCTGCGTCCGGCAAAAAGGCAGGGCCCCACCTGCCCTTTTA
CTAAACCGAAAAGATAATTTGCAGTTTGCAGGTTCTTCGCATCACTGATCCCTGCAGCTC
GGCGATCGGCGGCGGAGAGGATCCTTCACTCAAGTCGTATCGGTTCCCATCAGGGGAA
CCTGAACGACTCGTGCATCAATGCCC-3'

Módulo CiTs, oligo *Reverse*.

5'-TTTAAGCGTGCGCGGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCCTGCAT
AACGCGAAGTAATCTTTTCGGTTTTAAAGAAAAAGGGCAGGGTGGTGACACCTTGCCCTT
TTTTGCCGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTAAAATAATAAAAAAGCCGGATTAATAATC
TGGCTTTTTATATTCTCTCTCTAGTATATAAACGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCC
AGTGTGACTCTAGTATCAGCCAAACGTCTCTTCAGGCCACTGACTAGCGATAACTTTCCC
CACAACGGAACAACCTCTCATTGCATGGGATCATTGGGTACTGTGGGTTTAGTGTTGTAA
AAACACCTGACCGCTATCCCTGATCAGTTTCTTGAAGGTAAACTCATCACCCCAAGTCT
GGCTATGCAGAAATCACCTGGCTCAACAGCCTGCTCAGGGTCAACGAGAATTAACATTC
CGTCAGGAAAGCTTGGCTTGGAGCCTGTTGGTGCGGTCATGGAATTACCTTCAACCTCAA
GCCAGAATGCAGAATCACTGGCTTTTTTGGTTGTGCTTACCCATCTCTCCGCATCACCTTT

GGTAAAGGTTCTAAGCTCAGGTGAGAACATCCCTGCCTGAACATGAGAAAAACAGGGT
ACTCATACTCACTTCTAAGTGACGGCTGCATACTAGCCGCTTCATACATCTCGTAGATTT
CTCTGGCGATTGAAGGGCTAAATTCTTCAACGCTAACTTTGAGAATTTTTGTAAAGCAATG
CGGCGTTATAAGCATTTAATGCATTGATGCCATTAAATAAAGCACCAACGCCTGACTGCC
CCATCCCCATCTTGTCTGCGACAGATTCCTGGGATAAGCCAAGTTCATTTTTCTTTTTTCA
TAAATTGCTTTAAGCGACGTGCGTCCTCAAGCTGCTCTTGTGTTAATGGTTTCTTTTTGTG
CTCATAACCGGTTTCTGTGTGAAATTGTATCGCTCACATTCCACACATTATACGAGCGAT
GATATGTCACAGCTCATTTTCAGCATTTCGATGCTCTAGAAGCGCGCGGATTCAGGAAATCA
TTCTAGCGAGCTAGATTTTTTTTTATCTGAAATCTGCCTCGGATACGCATTTTAAGTAATGT
CATGAAATATGTTCCCTAACCAGGGCCCTCCGATGGGCCGGAACCCAATGTTATTCAAGCT
CATGTACGCTTTTGAACAACACTGTCAAGGCTCGTAATTGAACGA-3'

Módulo LacI, oligo *Forward*.

5'-CGCTACTGACTTACCTATAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTTTCAGATAAAAA
AATCCTTAGCTTTTCGCTAAGGATGATTTCTGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGCATGCA
CAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGAATAATACCACTGGCGGT
TATAATGAGCACATCAGCAGGAAACCGGTTTCGTA TAGATGGTGAATGTGAAACCAGTA
ACGTTATACGATGTCGCAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTG
AACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGG
AGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTG
ATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAATTGTGCGGCGGATT
AAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGG
CGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCAGTGGGCTGA
TCATTA ACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATG
TTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCA
TGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTTCGATTGGGTCACCAGCAAATCG

CGCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATA
AATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCC
ATGTCCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGAT
GCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGC
TGCGCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACGAAGAAAGCTCATGTT
ATATCCCGCCGTACCACCATCAACAGATTTTCGCCTGCTGGGCAAACAGCGTGGAACCGC
TTGCTGCACTCTTCTCAAGGCAAGGCGGGTGAAGGCAATCAGCTGTTGCCGCTCACATGG
TGAAAGAAAAAACCCTGGTAATAGCAACCGCCTCTTCCGGCGTGCGCAATCATATGGA
CCTGGCAGAACAGGTTCCGCACTGGAAGCGGGCGAGGCGTGTCTACTCCGACGAAAAC-
3'

Módulo LacI, oligo Reverse.

5'-CACGATGCGCAGCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCCTGCATAA
CGCGAAGTAATCTTTTCGGTTTTAAAGAAAAAGGGCAGGGTGGTGACACCTTGCCCTTTT
TTGCCGACTGCAGCGGCCGCTACTAGGTAGCGAAAAACCCCGCCGAAGCGGGGTTTT
TTGCGCTCTAGTAGAGATCTACACTAGCACTATCAGAGTTATTAAGCTACTAAAGCGTAG
TTTTTCGTCGTTTGCAGCCTGCCCCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATT
AATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCCAGGGTGGTTTT
TCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAG
TTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGT
TAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATC
CGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGAT
CGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTGTCATGGTTTTGTT
GAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGC
GAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGG
CCCCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGC

GTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAG
AAATAACGCCGGACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAG
CGGATAGTTAATGATCAGCCCCTGACGCGTTGCGCGAGAGATTGTGCACGCCGCTTTAC
AGGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACATCGACACCACCACGCTGGCACCAGTTGATCGGCGC
CGAGAATTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCCCCGGTGCAGGGCCAGACTGGGAGGG
TGGCCACGCATCAGCACCGAACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTTGTGCCACGCGGTGGAATG
TAATTAAGTTCGCATTGCGATTCAATTTTCCCGCGTTCCCGAACTGGCTGCTGTACACCC
GGAACGGTCTTGAATAGAGAGAACACAGGCAATATTCTTTGTGCGGAGAAACGTGTTAT
ATACGCGATC-3'

Módulo AraC, oligo *Forward*.

5'-TCTACTGACTTACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTCAGATAAAAAAAA
TCCTTAGCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGTTGACAGCT
AGCTCAGTCCTAGGGACTATGCTAGCTACTAGAGAGGAATTTAAATGATGGCTGAAGCG
CAAATGATCCCCTGCTGCCGGGATACTCGTTTAAACGCCCATCTGGTGGCGGGTTTAAACG
CCGATTGAGGCCAACGGTTATCTCGATTTTTTTATCGACCGACCGCTGGGAATGAAAGGT
TATATTCTCAATCTCACCATTTCGCGGTCAGGGGGTGGTGAAAAATCAGGGACGAGAATTT
GTCTGCCGACCGGGTGATATTTGCTGTTCCCGCCAGGAGAGATTCATCACTACGGTCGT
CATCCGGAGGCTCGCGAATGGTATCACAGTGGGTTTACTTTCGTCCGCGCGCCTACTGG
CATGAATGGCTTAACTGGCCGTCAATATTTGCCAATACGGGTTTCTTTCGCCCGGATGAA
GCGCACCGCCGCATTTTCAGCGACCTGTTTGGGCAAATCATTAACGCCGGGCAAGGGGA
AGGGCGCTATTCGGAGCTGCTGGCGATAAATCTGCTTGAGCAATTGTTACTGCGGCGCAT
GGAAGCGATTAACGAGTCGCTCCATCCACCGATGGATAATCGGGTACGCGAGGCTTGTC
AGTACATCAGCGATCACCTGGCAGACAGCAATTTTGATATCGCCAGCGTCGCACAGCAT
GTTTGCTTGTCGCCGTCGCGTCTGTCACATCTTTTCCGCCAGCAGTTAGGGATTAGCGTCT
TAAGCTGGCGCGGGGACCAACGCATTAGTCAGGCGAAGCTGCTTTTGAGCACTACCCGG

ATGCCTATCGCCACCGTCGGTCGCATGCTGGTTTTGACGATCACTCTATTTCTCGCGAGT
ATTTAAAAATGCACGGGGCAGCCCGAGCGAGTTTCGTGCCGGTGTGAAGAAAAGTGATG
ATGTAGCGTCAGTTGTCATAATACTAGTAGCGGCGCTGCAGTCGGCAAAGGCAGGTGT
CACCACCCTGCCTTTTCTTTAACGAAAAGAATTACTTCCGTTATGCAGCTCTCCGCTCACT
GACTCCGCTGGCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGGCGGCGAGCGTTACGCTCACTCTCAAGGCGG
GTAATACGTATCCAAGAATCAGGATACGAGGGAGACTGTGACTACGCGCAAGGCCGGAA
CGTAAGGCCGCGTCTCTCGGCTTCCAAGGGTTGCAGCTG-3'

Módulo AraC, oligo *Reverse*.

5'-CTCGATTGCGCAGCCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCCTGCAT
AACGCGAAGTAATCTTTTCGGTTTTAAAGAAAAGGGCAGGGTGGTGACACCTTGCCCTT
TTTTGCCGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTATTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTCA
CTTTTTCTTCACAACCGGCACGAACTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATA
CTCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAACCAGCATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGC
ATCCGGGTAGTGCTCAAAGCAGCTTCGCCTGACTAATGCGTTGGTCCCCGCGCCAGCTT
AAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCA
AACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTA
CTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTC
CATGCGCCGCAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCC
CTTCCCCTTGCCCGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCG
CTTCATCCGGGCGAAAGAAACCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCA
TGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATAACCATTGCGGAGCCTCCGG
ATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGCAAATATCACCCGGTCCGGC
AGACAAATTCTCGTCCCTGATTTTTTACCACCCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAA
TATAACCTTTCATTCCCAGCGGTTCGGTCGATAAAAAATCGAGATACCGTTGGCCTCAATC
GGCGTTAAACCCGCCACAGATGGGCGTTAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTG

CGCTCAGCATCATTAATCTCTCTAGTAGCTAGCATAGTCCCTAGGACTGAGCTAGCTGT
CACTCTAGAGCGGCGCGATCAGAATCATCTAGCGAAGCTAGATTTTTTATCTGAATTCGC
CTCGGATACGCCTATTTTTTACGTATGTCATGATATAATGTTCTTAACGCTCAGTGA
CTTC
CGGATGTGGCGAACATGTATTCAACTCATGATCGCTCTGAACATACCTGGAAAAGGCTC
A-3'

Módulo GFP, oligo *Forward*.

5'-TCTACTGACTTACCTATAAAATAGGCGTATCACGAGGCAGAATTCAGATAAAAAAA
TCCTTAGCTTTCGCTAAGGATGATTTCTGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGAATTGTGAG
CGGATAACAATTCACACAATTCACGGTAAAACAGACAAAGAAATCCGGCAAGTTACGT
AGGGAAGGGGCCCGGAGACTAAAGAGGCCCGAACATCACACGTGTCGACCCCTGACCC
GAGACAAGGCTTTACGACGTAATTGTTTCGGATCTTATCTATAAGTCCGATGCTGATTCCT
TTTGTCCCTATGTTTCGCTAACATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGAC
GCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCGTTTTTTTTGGGCTAGCAGGAATTA
AATGCGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGG
TGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACG
GAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACAC
TTGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTTCATGCTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAAC
AGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTT
TCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTT
GTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACA
CAAATTGGAATACAACCTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGA
ATGGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTA
GCAGACCATTATCAACAAATACTCCATTGCGATGGCCCTGTCCTTTACAGACACCATTAC
TGTCACACATCTGCCCTTCGAAGATCCCACGAAAGAGAGACACATGTCTCTGAGTTGTAC
AGCTGCTGGGATACCATGCATGATGACTATACAACGCCCGCGGCGACGATGAACTATGG

CGGCGGTGAAACTAGAGTCAACTGCTCACTCGTGGCTTCGGTTTATATCTAGAGAGAAAT
AAAGCGAATTATTATCCCGCTTAATTACAGTAGCCCTGCATTTCGCTAAGGCAGGTTACAC
ACCTGCTTTCTCTTA-3'

Módulo GFP, oligo Reverse.

5'-CCGATGGCGCAGCGACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCCTGCATAA
CGCGAAGTAATCTTTTCGGTTTTAAAGAAAAAGGGCAGGGTGGTGACACCTTGCCCTTTT
TTGCCGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGTAAAATAATAAAAAAGCCGGATTAATAATCTG
GCTTTTTATATTCTCTCTCTAGTATATAAACGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAG
TGTGACTCTAGTTTTACCGCCGCCCATAGTTTTCATCGTTCGCCGCCGGGCGTTTGTATA
GTTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTTACAACTCAAGAAGGACCATGTGGT
CTCTCTTTTCGTTGGGATCTTTCGAAAGGGCAGATTGTGTGGACAGGTAATGGTTGTCTG
GTAAGGACAGGGCCATCGCCAATTGGAGTATTTTGTTGATAATGGTCTGCTAGTTGAA
CGCTTCCATCTTCAATGTTGTGTCTAATTTGAAGTTAACTTTGATTCCATTCTTTTGTTG
TCTGCCATGATGTATACATTGTGTGAGTTATAGTTGTATTCCAATTTGTGTCCAAGAATGT
TTCCATCTTCTTTAAAATCAATACCTTTTAACTCGATTCTATTAACAAGGGTATCACCTTC
AACTTGACTTCAGCACGTGTCTTGTAGTTCCCGTCATCTTTGAAAAATATAGTTCTTTCC
TGTACATAACCTTCGGGCATGGCACTCTTGAAAAAGTCATGCTGTTTCATATGATCTGGG
TATCTCGCAAAGCATTGAACACCATAACCGAAAGTAGTGACAAGTGTTGGCCATGGAAA
CAGGTAGTTTTCCAGTAGTGCAAATAAATTTAAAGGGTAAGTTTTCCGTATGTTGCATCA
CCTTACCCTCTCCACTGACAGAAAATTTGTGCCATTAACATCACCATCTAATTCAACA
GATTGGGCACTCCAGTGAAAGTCTTCTTTTACGCATTTAATTCCTGCTAGCCCAAAAA
CGGTATGGAGAAACAGTAGAGAGTGCGATAAAAGCGTCAGGTAGATCCGCTATCTTATG
GATAAAATGCTATTGTAGCGAACATAGACAAAGGGATCAGCATCGACTATAGATAAGAT
CGGAACATACGTCGTAAGCTGTTCCCTCGGGTCAGGGGTCGACCGTGTGTATGTTCCGGCC
TCTTTTATCCTTCCGGCCGTCCTACGTAAGTCCGATCACTGTCCGGTTTACCGGTGAATG

TGTGTGAAATGGTAATC-3'