



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DEL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL
POR INVESTIGACION

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGIA

**Diseño de un vector de clonación para la expresión de
una proteína antimicrobiana de *Lacp. plantarum* en
Escherichia coli TOP10**

Que presenta la alumna:

Frida Alejandra Parcero Montoya
Matrícula: 2173082036

ASESORES:

Dra. Estela Teresita Méndez Olvera
No. Económico 29747

Mtra. Jessica Josefina Hurtado Ríos
No. Cedula 9950736

Ciudad de México

Agosto 2023

INDICE

RESUMEN	3
PALABRAS CLAVE	3
1. INTRODUCCION	4
2. OBJETIVO GENERAL	5
3. OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
4. METODOLOGIA UTILIZADA	5
4.1 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LA CEPA <i>LACP. PLANTARUM</i>	5
4.2 MALDI-TOF-MS.	6
4.5 EXTRACCION DE ADN GENOMICO.	6
4.3 IDENTIFICACION POR EL GEN <i>RECA</i>	7
4.7 AMPLIFICACION DEL GEN <i>RP uLI4</i>	8
4.8 PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR.	9
4.6 DISEÑO DE CEBADORES	9
4.9 PCR DE CLONACION	10
4.10 DIGESTION	10
4.11 LIGACION.	11
4.12 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES <i>E. COLI</i> TOP10	11
4.13 TRANSFORMACION.....	11
4.14 TENS-MINI PREP	12
4.15 CONFIRMACION DE LA TRANSFORMACION	12
5. ACTIVIDADES REALIZADAS	14
6. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS	14
7. RESULTADOS	14
CRECIMIENTO	14
EXTRACION DE ADN GENOMICO DE <i>LACP. PLANTARUM</i>	15
CUANTIFICACIÓN DE ADN	16
IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA	16
AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>RP uLI4</i>	18
PCR DE CLONACION.....	19
DIGESTION	19
TRANSFORMACION	20
TENS-MINI PREP ADN PLASMÍDICO CON INSERTO.....	21
CONFIRMACION DE LA TRANSFORMACION	22
8.CONCLUSIONES	24
9.RECOMENDACIONES	24
10.BIBLIOGRAFIA	25
ANEXOS	27

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, entre otras de este género son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria sobre todo en la producción de alimentos fermentados como yogurt, queso, kimchi, entre otros. Las BAL otorgan características sensoriales a los alimentos como textura y aroma, además de acidez (Tian, 2019). Aunado a esto las BAL son capaces de producir un efecto bioconservador en ciertos alimentos debido a la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, peptidoglicanohidrolasas (PGH) y proteínas ribosomales (RP), estas últimas han presentado recientemente tener potencial antimicrobiano (Hurtado et al, 2022).

Se ha demostrado que la resistencia a los antimicrobianos convencionales está incrementando aceleradamente y representa un problema de salud mundial, poniendo en riesgo a la humanidad; es por esto que el estudio de alternativas a estos antimicrobianos es de vital importancia. El objetivo del presente trabajo fue clonar una proteína con potencial antimicrobiano, obtenida de *Lacp. plantarum* con la finalidad de incrementar su producción y posteriormente llevar a cabo su sobreexpresión y posteriores estudios enfocados a comprender su mecanismo antimicrobiano. Para esto, primeramente, se realizó la identificación de la cepa mediante el gen *recA* y espectrometría de masas MALDI-TOF-MS, se extrajo ADN genómico de la cepa utilizando un kit comercial, posteriormente se llevó a cabo la amplificación del gen de interés que codifica para la proteína ribosomal con potencial antimicrobiano, RP uL14. Se utilizó el vector de clonación pTWIN1 y la digestión se realizó mediante enzimas de restricción XhoI y NdeI. Para la ligación se utilizó la enzima T4 ADN ligasa, para posteriormente, llevar a cabo la transformación por choque térmico en células de *E. coli* TOP10. Finalmente, se extrajo ADN plasmídico y se confirmó la clonación mediante PCR con cebadores específicos.

Se identificó la cepa de estudio como *Lacp. plantarum* y se logró amplificar el gen *RP uL14*, así mismo se logró la ligación del vector con el fragmento de interés. Posteriormente, se obtuvieron colonias transformadas, a las cuales se les extrajo el ADN plasmídico y mediante PCR se obtuvieron amplicones que sugieren la presencia del gen *RP uL14* dentro del vector de clonación.

PALABRAS CLAVE

BAL, *Lactiplantibacillus plantarum*, proteína ribosomal, actividad antimicrobiana, clonación

1. INTRODUCCION

Lactiplantibacillus plantarum es una bacteria que pertenece al género *Lactobacillus*, el más abundante de las bacterias ácido lácticas (BAL), pertenece al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae*. Este microorganismo Gram positivo tiene forma de bacilo corto, es considerado anaerobio facultativo, catalasa negativo, tolerante a las condiciones ácidas, no forma esporas y no es móvil. Es una bacteria heterofermentativa, es decir, es capaz de producir ácido láctico, ácido acético y ácido succínico a partir de la fermentación de carbohidratos. La principal aplicación de las BAL en la producción de los alimentos se debe a las características sensoriales que otorga a los alimentos, debido a que participan en la hidrólisis de proteínas, contribuyendo a la textura y sabor de los alimentos fermentados (Tian, 2019). También, las BAL, así como *Lacp. plantarum* producen un efecto bioconservador en ciertos alimentos, debido a la producción de compuestos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, péptidos antimicrobianos (AMPs), como las bacteriocinas, aplicadas en la industria alimentaria como conservadores al mejorar la seguridad y preservación de los alimentos, extendiendo así su vida útil (Shrivastava *et al.*, 2019). Entre otros AMPs se encuentran las peptidoglicano hidrolasas (PGHs) y recientemente, las proteínas ribosomales (RP).

La resistencia a los antimicrobianos representa una amenaza para la salud humana y animal, así como para la inocuidad y seguridad alimentaria, afectando a la economía mundial y al medio ambiente. Se prevé que para el 2050 este problema será la principal causa de muerte en seres humanos y que se presente una crisis economía mundial severa, por esta razón es de vital importancia la investigación y caracterización de nuevos compuestos antimicrobianos que ayuden a combatir la resistencia, abordando un enfoque multisectorial que nos permita usar estos compuestos no solo en la industria farmacéutica sino también en la industria alimentaria, la sanidad animal entre otras. («El Plan de Acción de la FAO Sobre la Resistencia A los Antimicrobianos (2021-2025)», 2021)

En investigaciones previas en el grupo de trabajo de la Dra. Edith Ponce Alquicira (Laboratorio W-207, Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa); Salas en el 2018 aisló una cepa bacteriana procedente de una muestra de salami comercial (Murgati, S.A. de C.V.), la cual, a partir de su extracto crudo extracelular, mostró actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*. Posteriormente, Hurtado-Rios *et al.* (2019), identificó a la cepa como *Lacp. paraplantarum*; así como a las proteínas extracelulares responsables de la actividad antimicrobiana producidas por la cepa. Lo anterior se realizó mediante un análisis de geles de poliacrilamida y zimografía. Posteriormente, empleando espectrometría de masas, se identificó a la proteína ribosomal L14 como una de las proteínas responsables de la actividad antimicrobiana.

Debido al bajo rendimiento para su obtención y purificación siguiendo la metodología de adsorción y desorción descrita por Moslem y colaboradores (2023); así como a la escasa información que explique el mecanismo de acción de las RP con actividad antimicrobiana, es de interés clonar y expresar el gen de la proteína ribosomal con actividad antimicrobiana para llevar a cabo diversos estudios. Por lo anterior, se utilizó un vector que proporcione un

marcador de reconocimiento, como es el caso del plásmido pTWIN1 de la marca New England Bio Labs®, el cual contiene un dominio de unión a quitina (CBD), que permite simplificar el proceso de purificación. Además, contiene sitios de corte Sap I que permiten clonar el gen de interés entre las inteínas sin añadir residuos derivados del vector en ninguno de los extremos del gen diana. Asimismo, utiliza un promotor T7 para proporcionar un control estricto de la expresión del gen de interés, lo que es de utilidad para controlar la expresión de la RP uL14 (IMPACT™-TWIN Purification, Ligation and Cyclization of Recombinant Proteins Using Self-Cleavable Affinity Tags, n.d.). Adicionalmente, se utilizó la cepa de *E. coli* TOP-10 con una alta eficacia de propagación para la clonación de plásmidos. a (*C404010 E. coli* químicamente competente *One Shot™ TOP10*).

2. OBJETIVO GENERAL

- Diseñar un vector de clonación para la expresión de una proteína antimicrobiana.

3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar la cepa aislada de un producto alimenticio, por medio de la técnica Espectrometría de masas MALDI-TOF-MS y gen *RecA*
- Extraer ADN genómico de *Lacp. plantarum*.
- Clonar el gen estructural RP uL14 en el vector de expresión pTWIN1.
- Transformar genéticamente *E. coli* TOP-10 con el vector de expresión que contiene el inserto de la RP uL14.

4. METODOLOGIA UTILIZADA

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Macromoléculas del departamento de biotecnología de la UAM-Iztapalapa, ubicado en el edificio W, laboratorio 207.

4.1 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LA CEPA *Lacp. plantarum*

La cepa con actividad antimicrobiana aislada de un producto alimenticio (salami), previamente identificada por el equipo de trabajo como *Lacp. paraplantarum*, se creció utilizando un inóculo del 1% (v/v) en 10 mL de medio CGB a pH 6.8, cuya composición fue la siguiente: peptona biotriptasa (20 g/L), glucosa (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), citrato de amonio (2 g/L), fosfato disódico (2 g/L), sulfato de magnesio (0.1 g/L), sulfato de manganeso (0.05 g/L) y Tween 80 al 0.01%, incubando a 29 °C por 24 h y utilizando como control negativo un tubo con 10 mL de medio CGB sin inóculo.

El inóculo se sembró en 10 mL de medio CGB al 1% (v/v), el cual fue incubado a 29 °C por 18 h.

4.2 MALDI-TOF-MS.

Para verificar la autenticidad de la cepa *Lacp. plantarum*, se realizó una identificación mediante espectrometría de masas siguiendo la técnica de extracción etanol/ácido fórmico a partir de colonias puras aisladas en medio CGB. Después de 18 horas de resiembra a 29 °C de la cepa de estudio, se sembró por estriado en placas Petri con medio CGB al 1% de agar y se incubó a 29 °C durante 18 h. Lo anterior se realizó por triplicado, tomándose en cuenta las cajas que contenían colonias aisladas de la cepa de estudio, así como del control (*Lacp. plantarum*). Se recolectaron por separado las colonias aisladas y se resuspendieron en agua Mili-Q® y etanol absoluto. Posteriormente, se centrifugó y se eliminaron los restos de etanol. En seguida, se añadió ácido fórmico al 70% y la misma cantidad de acetonitrilo para lograr la disrupción de la pared celular, después de centrifugaron las muestras y nuevamente se recogió el sobrenadante del cual se depositó 1 µl en una placa de metal pulido y se cubrió con 1 µl de matriz (Ácido alfaciano-4-hidroxicinámico) y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, se introdujo la placa de metal en el espectrómetro de masas MALDI TOF-MS (Autoflex Speed, Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) para su análisis. El espectro obtenido se comparó con la base de datos de Bruker DALTONIC MALDI (Biotyper, versión 4.1.60).

Como estándar de calibración y optimización del espectro de masas Bruker MALDI-TOF-MS se utilizó IVD Bacterial Test Standard (“IVT BTS”), que contiene un extracto de *E. coli* DH5α, el cual muestra un perfil de péptidos y proteínas característico en los espectros de masas MALDI-TOF-TOF. El extracto está modificado con dos proteínas adicionales que amplían el límite superior del rango de masas cubierto por IVD BTS, donde el rango general de masa cubierto por IVD BTS va de 3.6 a 17 kDa.

4.5 EXTRACCION DE ADN GENOMICO.

La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó con el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, E.U.A.) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Se realizó la extracción a partir del pellet resultante de la centrifugación a 14,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente de 1 mL de cultivo incubado durante 18 h de cada tubo inoculado. La integridad del ADN se verificó mediante un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), utilizando un tampón TAE 1X (Tris-acetato 10 mM; Bio-Rad, E.U.A.), EDTA 1 mM (J.T. Baker, México), pH 8.0. El gel se colocó en un sistema de electroforesis horizontal Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad, Beijing, China), y se llevó a cabo la electroforesis a 80 V durante 40 minutos, utilizando el marcador GeneRule 1 kb ADN (Thermo Scientific). Posteriormente, se determinó la concentración y pureza del ADN total extraído, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro METTLER TOLEDO UV5 nano. Finalmente, el gel se visualizó en un analizador de imágenes Molecular Imager GelDoc™ XR+ System (Bio-Rad, California, E.U.A), utilizando el software Image Lab versión 5.0.

4.3 IDENTIFICACION POR EL GEN *recA*.

Adicionalmente, se utilizó el gen *recA* para la identificación de la cepa. Para ello, se empleó la metodología descrita por Torriani y colaboradores (2001) con modificaciones; donde se realizaron por triplicado reacciones de PCR a las extracciones de ADN genómico de la cepa de interés y del control *Lacp. plantarum*, utilizando cebadores directos específicos para cada especie, *paraF* para *Lacp. plantarum*, *pentf* para *Lacp. pentosus* y *paraF* para *Lacp. paraplantarum* y un único cebador reverso (*pREV*) para todas las reacciones (Tabla 1). Lo anterior con el objetivo de obtener diferentes tamaños de amplicones que permitieran la identificación de la correspondiente especie. Para la amplificación del gen *recA* se utilizó la enzima DreamTaq Hot Start PCR Master Mix de la marca Thermo Scientific® y los componentes descritos en la Tabla 2. Por último, se programaron las condiciones para dichas reacciones en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, California, E.U.A.) descritas en la Tabla 3.

Cebador	Secuencia 5'—3'	Temperatura de alineación (T _m)	Tamaño amplicon (pb)
<i>paraF</i>	GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC	60.0 °C	101
<i>pentF</i>	CAG TGG CGC GGT TGA TAT C	64.0 °C	218
<i>planF</i>	CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA	61.9 °C	318
<i>pREV</i>	TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC	62.2 °C	-

Tabla 1. Cebadores para la amplificación del gen *recA*.

Componente	Volumen final (µl)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	13	
10X PCR Master Mix*, -Mg	5.0	1X
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP Mix	1.0	0.2 mM
10 µM cebador directo**		
<i>paraF</i>	1.0	0.2 µM
<i>pentF</i>	1.0	0.2 µM
<i>planF</i>	0.5	0.2 µM
10 µL cebador reverso (<i>pREV</i>)	1.0	0.2 µM
ADN templado	1.0	10 pg–1 µg
Dream Taq Hot start PCR ADN polimerasa	25	

Tabla 2. Componentes de PCR para la amplificación del gen *recA*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	1-3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	25-40
Alineación	60	30 s	25-40
Extensión	72	1 min	25-40
Extensión final	72	5-15 min	1
Enfriamiento	12	∞	

Tabla 3. Condiciones para la PCR en la amplificación del gen *recA*

Se verificó el tamaño de los amplicones mediante un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, 0.001%), empleando amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), tanto para la realización del gel como para la electroforesis que se llevó a cabo durante 50 minutos a 70 Volts. Se utilizó un marcador ADN de 100 pb (Quick Load 100pb DNA Ladder N0467 New England Biolabs®). Para el control positivo se utilizó una cepa previamente identificada como *Lacp. plantarum*.

4.7 AMPLIFICACION DEL GEN *RP uL14*.

La amplificación del gen estructural *RP uL14* se realizó mediante la técnica de PCR, a partir del ADNg purificado de la cepa aislada del salami e identificada como *Lacp. plantarum*. En la Tabla 4 se muestran los cebadores diseñados para este experimento y en la Tabla 5 las concentraciones utilizadas. a. La reacción se llevó a cabo en un termociclador T100 Thermo cycler BIO RAD, configurado con las condiciones de la Tabla 6.

Cebador	Secuencia 5'—3'	Temperatura de alineación (Tm)	Tamaño amplicon(pb)
Forward	GTGCCCGTGAAAT CCTTACT	62.8 °C	104
Reverse	ACCGGGTGTGCT TGTTTA	63 °C	

Tabla 4. Cebadores para la amplificación del gen *RP uL14*.

Componente	Volumen final (µl)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	13.0	
10X PCR Master Mix*, -Mg	5.0	1X
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP Mix	1.0	0.2 mM
10 µM cebador f	1.0	1.0 mM
10 µL cebador reverso (pREV)	1.0	0.2 µM
ADN templado	1.0	10 pg–1 µg
Dream Taq Hot start PCR ADN polimerasa	25.0	

Tabla 5. Componente de la PCR para la amplificación del gen *RP uL14*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	1-3 min	1
Desnaturalización	95	30s	25-40
Alineación	63.1°	30s	25-40
Extensión	72	1 min	25-40
Extensión final	72	5-15 min	1
Enfriamiento	12	∞	

Tabla 6. Condiciones de la PCR para la amplificación del *gen RP uL14*.

4.8 PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR.

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery siguiendo las especificaciones del proveedor. Se cortó la banda con el producto de amplificación del gel de agarosa y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 2 ml, posteriormente se añadió el buffer ADB (Agarose Dissolving Buffer) en un volumen de 3 veces el peso de la banda cortada y se procedió a incubar a 55°C durante 10 minutos. Posteriormente, después de asegurar que el gel estuviera completamente disuelto se pasó la muestra a una columna Zymo-spin en un tubo receptor, se centrifugó por 1 minuto a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de DNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó nuevamente por 30 segundos a 12000 rpm. Por último, se eluyó la muestra en un tubo nuevo con 30 µl de agua libre de nucleasas.

4.6 DISEÑO DE CEBADORES

El diseño de cebadores para la proteína de interés se realizó en seis etapas. En la primera etapa, se buscaron secuencias de aminoácidos de la proteína en diferentes genomas ensamblados de la cepa de estudio. Esta búsqueda se realizó en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En la segunda etapa, se alinearon las secuencias de aminoácidos obtenidas utilizando el servidor MultAlin, el cual genera alineamientos múltiples y muestra las regiones conservadas y variables. En la tercera etapa, se llevó a cabo un BLAST traducido (tblastn) de las secuencias de aminoácidos para compararlas con la base de datos de la proteína ribosomal (RP uL14) en nucleótidos y para la cepa de estudio (*Lacp. plantarum*). En la cuarta etapa, se alinearon las secuencias de nucleótidos obtenidas del tblastn, utilizando el servidor MultAlin. En la quinta etapa, se diseñaron los cebadores *in silico* a partir de las regiones consenso de las secuencias obtenidas del tblastn. Se siguieron reglas específicas para el diseño de cebadores, considerando la temperatura de fusión (T_m), el contenido de GC (guaninas y citocinas), el tamaño (18 a 30 pb) y la complementariedad de la secuencia. Para lo anterior se utilizó el programa PrimerQuest de Integrated DNA Technologies (IDT). Finalmente, en la sexta etapa, se verificó la amplificación de los cebadores mediante un PCR punto final *in silico*, utilizando la plataforma Sequence Manipulation Suite (SMS).

4.9 PCR DE CLONACION

A partir de los cebadores diseñados en la plataforma del IDT (Tabla 7), se llevó a cabo la PCR de clonación con los componentes descritos en la Tabla 8, así como bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 9. Finalmente, se purificaron los productos de PCR utilizando el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery siguiendo la metodología descrita en el punto 7.3.6.

Cebador	Secuencia 5'—3'	Temperatura de alineación (T _m)	Tamaño amplicon(pb)
Forward	GTGCCCCGTGAAAT CCTTACT	62.8 °C	375
Reverse	ACCGGGTGTTGCT TGTTTA	63 °C	

Tabla 7. Cebadores para la PCR de clonación.

Componente	Volumen final (μl)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	13.0	
10X PCR Master Mix*, -Mg	5.0	1X
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP Mix	1.0	0.2 mM
10 μM cebador f	1.0	1.0 mM
10 μL cebador reverso (pREV)	1.0	0.2 μM
ADN templado	1.0	10 pg–1 μg
Dream Taq Hot start PCR ADN polimerasa	25.0	

Tabla 8. Componentes de la PCR de clonación

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	1-3 min	1
Desnaturalización	95	30s	25-40
Alineación	*	30s	25-40
Extensión	72	1 min	25-40
Extensión final	72	5-15 min	1
Enfriamiento	12	∞	

Tabla 9. Condiciones para la PCR de clonación. *T_m de acuerdo con el cebador.

4.10 DIGESTION

Se realizó la digestión de los productos de PCR del punto anterior, utilizando la enzima de restricción XhoI (Promega, Madison, U.S.A), así mismo como la digestión del plásmido

pTWIN1, siguiendo las especificaciones del proveedor. Concluida la primera digestión, se purificaron las digestiones para posteriormente realizar la segunda digestión con la enzima de restricción NdeI, siguiendo las especificaciones del proveedor. Finalmente, se llevó a cabo la purificación de ambas digestiones con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery.

4.11 LIGACION.

La ligación se llevó a cabo utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega, Madison, U.S.A), como se muestra en la Tabla 10 empleando la metodología descrita por el proveedor. Con respecto a las condiciones de incubación se incubó a 4 °C durante 5 días.

Componente	Volumen (µl)	Volumen utilizado (µl)
Vector ADN digestión 100 ng	52.5	2.0
Inserto ADN digestión 17 ng	17.5	3.0
Buffer Ligasa 10x	1.0	1.0
ADN Ligasa T4	1.0	1.0
Agua libre de nucleasas	2.0	3.0
Volumen final	10.0	10.0

Tabla 10. Componentes para la ligación.

4.12 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES *E. coli* TOP10

Se inocularon colonias de *E. coli* TOP10 de aproximadamente 3 mm de diámetro en 25 ml de medio LB (Luria Broth, Anexo 1) y se incubaron a 37 °C por 10h. Posteriormente, se integraron 2.5 ml del pre-inoculo en 250 ml de medio LB y se dejó crecer en agitación constante a 250 rpm a 18 °C hasta que la densidad óptica alcanzó 0.5-0.6 nm a 600 nm. En seguida, se colocó el inóculo en un baño de hielo por 10 minutos, para después centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. A continuación, se resuspendió el pellet en 20 ml de medio TB adicionado con 1.4 ml de DMSO (Dimetilsulfóxido) y en seguida, se incubó en hielo por 10 minutos. Por último, se almacenaron las células en tubos de 1.5 ml a una temperatura de -80 °C.

4.13 TRANSFORMACION.

La mezcla de la transformación se preparó agregando 10 µl del producto de la ligación más 100 µl de células competentes de *E. coli* TOP10. Se realizaron los siguientes controles: positivo, 100 µl de células competentes más 10 µl de plásmido intacto en placas con Ampicilina; negativo, 100µl de células competentes sin plásmido en placas con antibiótico y por último 100 µl de células competentes en placas sin antibiótico. En seguida, tanto la mezcla de transformaciones, como los controles se incubaron en hielo por 30 min: seguida de una segunda incubación a 42 °C por 1 min. Posteriormente, se incubó en hielo por 2 min, esto con el fin de crear un gradiente de temperatura tanto en la célula como en el medio para que el plásmido arrastre al interior de las células. A continuación, se añadió 800 µl de LB, y se incubó a 37 °C por 1 h. En seguida, se sembraron las células competentes en agar LB al

1% con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C. Por último, se examinaron las placas y se verificó el desarrollo de colonias bacterianas.

4.14 TENS-MINI PREP

De los productos de la transformación se tomó una colonia con ayuda de un palillo de madera estéril y se suspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas estéril, 350 µl de buffer TENS (Anexo 2) y 1.5 µl de RNAsa. Posteriormente, la suspensión se mezcló en vórtex por 2 segundos, se agregaron 200 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y finalmente se resuspendieron las células cuidadosamente. En seguida, se mezcló en vórtex 2 segundos y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm, transfiriendo el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL estéril y se añadieron 600 µl de isopropanol, mezclando por inversión, para después incubar a -20 °C por 5 min. A continuación, se llevó a la centrífuga por 5 min a 14,000 rpm. Al finalizar, se removió el sobrenadante y se enjuagó el pellet con 900 ml de etanol frío al 70%. En seguida, se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm y se removió el sobrenadante, dejando secar al aire por 10 min. Por último, se resuspendió el pellet en 50 µl de agua libre de nucleasas estéril.

4.15 CONFIRMACION DE LA TRANSFORMACION

Para confirmar la transformación se utilizó la técnica de PCR con los componentes de la Tabla 11. Para dichas reacciones se utilizó la polimerasa DreamTaq Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific) y los cebadores específicos descritos en la Tabla 12. Las PCR se realizaron en el Termociclador T100 (Thermo cycler, BIO RAD®) configurado con las condiciones de la Tabla 13.

Componente	Volumen final (µl)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	13.0	
10X PCR Master Mix*, -Mg	5.0	1X
50 mM MgCl ₂	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP Mix	1.0	0.2 mM
10 µM cebador f	1.0	1.0 mM
10 µL cebador reverso (pREV)	1.0	0.2 µM
ADN templado	1.0	10 pg–1 µg
Dream Taq Hot start PCR ADN polimerasa	25.0	

Tabla 11. Componentes para las 12 PCR de confirmación.

Productos de PCR	Cebadores	T _m (°C)	Tamaño de amplicon
ConsL14pTWIN1	Forward	58	378 pb
	TGTGAGCGGATAACAATTC		
	Reverse	63	
	GGGCAACTAGTGCATCTC		
ER+L14	Forward	62	384pb
	GGTGGTCATATGATCCAACAAGAAAGTCGTTTAAAA		
	Reverse	62	
	GTGGTCTCGAGCAGAACTTCTGGCGCTAAT		
RPL14	Forward	62.8	104pb
	GTGCCCGTGAAATCCTTACT		
	Reverse	63	
	ACCGGGTGTTGCTTGTTTA		

Tabla 12. Cebadores para la PCR de confirmación.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	1-3 min	1
Desnaturalización	95	30s	25-40
Alineación	*	30s	25-40
Extensión	72	1 min	25-40
Extensión final	72	5-15 min	1
Enfriamiento	12	∞	

Tabla 13. Condiciones para las PCR de confirmación. *T_m de acuerdo al cebador

5. ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante los primeros tres meses se llevó a cabo la reactivación de la cepa de estudio aislada del salami. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN para corroborar su identificación mediante métodos moleculares, como la identificación mediante el gen *recA* y métodos de espectrometría de masas como MALDI-TOF-MS. Una vez identificada la cepa como *Lactiplantibacillus plantarum* se procedió a realizar el diseño de cebadores específicos para la amplificación del gen *RP uL14* y la PCR de clonación, la cual amplifica el gen *RP uL14* con las enzimas de restricción seleccionadas. Posteriormente, se corroboró el buen diseño de los cebadores mediante la técnica de PCR, en donde se obtuvo el amplicón específico para el gen *RP uL14*, el cual se cortó la banda correspondiente al amplicón en el gel de agarosa y se procedió a su purificación. Así mismo, se llevó a cabo la PCR de clonación, obteniendo finalmente un amplicón el cual fue purificado para su posterior uso. El siguiente paso fue realizar la digestión con las enzimas de restricción tanto en el producto purificado de PCR de clonación, así como en el vector pTWIN1, al finalizar se purificaron ambas digestiones. Durante los últimos tres meses, se llevó a cabo la ligación de los productos purificados de la digestión y la preparación de las células competentes de *E. coli* TOP10 para la transformación. Posteriormente, se llevó a cabo la transformación del plásmido con el inserto L14 y las células *E. coli* TOP10. Por último, se realizó la TENS-Mini prep de las transformantes y la PCR para la confirmación de la clonación.

6. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Se concluyeron todos los objetivos específicos del trabajo, lo que llevó a consumir satisfactoriamente el objetivo general que fue el diseño del vector de clonación.

Como estudiante se desarrollaron diversas habilidades con respecto a las técnicas de biología molecular y microbiología, así como el cultivo de cepas bacterianas, extracción de ADN genómico y plasmídico, del mismo modo se desarrollaron habilidades como el diseño de cebadores y el uso de herramientas bioinformáticas o bases de datos relacionadas a la biología molecular.

7. RESULTADOS

CRECIMIENTO

En la Figura 1 se muestra el crecimiento aislado de la cepa de interés a las 24 h de la reactivación, observándose colonias aisladas grandes, color beige, cremosas, cóncavas y con bordes homogéneos, las cuales corresponden a lo reportado por Zapata y colaboradores (2009) para la especie de *Lacp. plantarum*.



Figura 1. Colonias aisladas de *Lacp. plantarum* en medio CGB 1%Agar.

EXTRACION DE ADN GENOMICO DE *Lacp. plantarum*

Se extrajo exitosamente ADNg de cada una de las muestras de *Lacp. plantarum* reactivadas, como se muestra en la Figura 2, en donde se pueden observar bandas íntegras con un peso mayor a los 1,500 pb. Lo anterior es de importancia en estudios moleculares, sobre todo cuando se planea realizar PCR con dicha extracción ya que el ADN debe ser de calidad para que la reacción en cadena de la polimerasa se lleve a cabo correctamente, algunos compuestos como fenoles, glicógeno y otras sustancias orgánicas pueden actuar como inhibidores de la PCR lo que puede proporcionar falsos negativos (López DA, L., & Mejía G, C. 2012)

Además de la integridad, la pureza de los ácidos nucleicos es de vital importancia para obtener un buen resultado en los procesos moleculares posteriores, para asegurar dicho parámetro se cuantificó el ADN con ayuda de un espectrofotómetro METTLER TOLEDO UV5 nano que nos proporcionó la cantidad en ng/μl; además de una relación entre valores de absorbancia a 260 nm frente 280nm, los cuales son un indicador de pureza, donde el rango de valores estándar 1.85-1.88 se incrementa (mayor a 1.88) cuando hay contaminación con ARN y cuando los valores decrecen puede existir contaminación por proteínas (menor a 1.85) La relación 260/230 cuyos valores estándar van de 1.8 a 2.2, es un indicador sensible de contaminantes que absorber la luz uv a 230 nm, estos contaminantes pueden ser sales como el tiocinato de guanidina (GTC) y clorhidrato de guanidina (GuHCl), EDTA, entre otros.

El promedio de la cantidad de ADNg fue de 2 ng/μl y la relación 260/280 se encuentra en 1.8, lo que indica que no hay contaminación de proteínas o ARN. Con respecto a la relación 260/230 el valor promedio fue de 2.0, lo que sugiere que no hay presencia de contaminantes como sales. (Desjardins & Conklin, 2010).

Cuantificación de ADN

Muestra	ng/ μ l	Relación 260/280	Relación 260/230
1	17.270	1.797	1.949
2	27.386	1.843	3.016
3	12.736	1.774	4.239
4	15.037	1.806	2.463
5	20.218	1.842	2.345
6	15.149	2.847	2.253

Tabla 14. Cuantificación de ADN y relación de absorbancia 260/280 y 260/230.

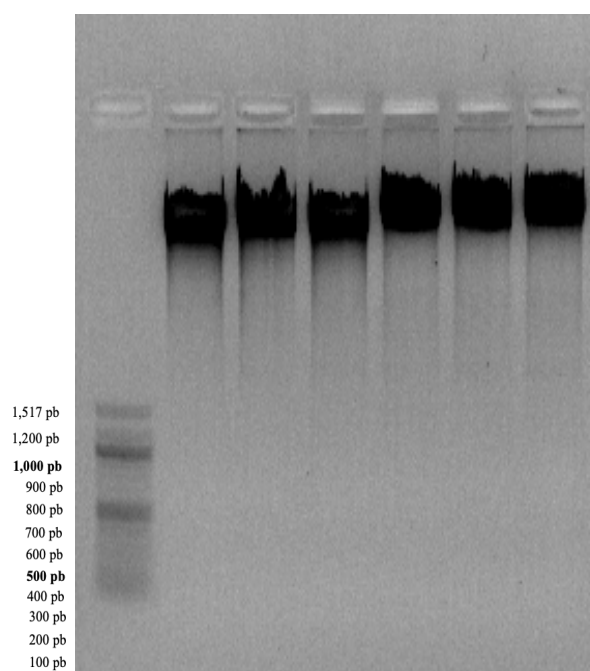


Figura 2. Productos de extracción ADN genómico de *Lacp. plantarum*.

IDENTIFICACION DE LA CEPA

La espectrometría de masas MALDI-TOF es una metodología ampliamente utilizada para la identificación rápida y confiable de cepas bacterianas, que nos permitió corroborar en este caso la identificación de la cepa de interés, cuyos resultados fueron 2.27 y 2.21 (Figura 3), los cuales indican una identificación fiable a nivel de especie, como lo mencionan Maldonado *et al.* (2017) donde se clasifican las identificaciones con un valor ≥ 2.0 como fiable a nivel de

especie, $\geq 1,7$ fiable a nivel de género y $< 1,7$ no fiable (Figura 4). La cepa fue identificada con valores de alta confianza, siendo esta *Lactiplantibacillus plantarum*.

G3 (+++)(A)	Para_r1 (standard)	Lactobacillus plantarum	2.27	Lactobacillus plantarum	2.21
G4 (-)(C)	Para_r2 (standard)	no se han encontrado picos	0.00	no se han encontrado picos	0.00
G5 (+)(B)	Plan_r1 (standard)	Lactobacillus plantarum	1.95	Lactobacillus plantarum	1.88
G6 (-)(C)	Plan_r2 (standard)	no se han encontrado picos	0.00	no se han encontrado picos	0.00

Figura 3. Resultados del análisis MALDI-TOF-MS

Gama de valores	Descripción	Símbolos	Color
2.00 - 3.00	Identificación de alta confianza	(+++)	verde
1.70 - 1.99	Identificación de baja confianza	(+)	amarillo
0.00 - 1.69	Sin identificación posible	(-)	rojo

Figura 4. Gama de valores MALDI-TOF-MS

Algunos autores como Torriani *et.al* (2001) reportan problemas con la identificación de las especies del grupo *Lacp. plantarum*, que corresponden a *Lacp. plantarum*, *Lacp. paraplantarum* y *Lacp. pentosus*; ya que algunos de los métodos moleculares como la secuenciación del gen 16s ARNr tiene un poder de discriminación demasiado bajo para este grupo. Por lo anterior, algunos investigadores proponen el gen *recA* como un marcador molecular más certero en su identificación. Al llevar a cabo este método, los productos de PCR realizados y analizados electroforéticamente arrojaron como resultado la amplificación con los cebadores específicos para la especie *Lacp. plantarum* (Figura 5) mostrados en los carriles 1 y 4, para la cepa de estudio y el control, respectivamente, indicando una identificación a nivel de género y especie.

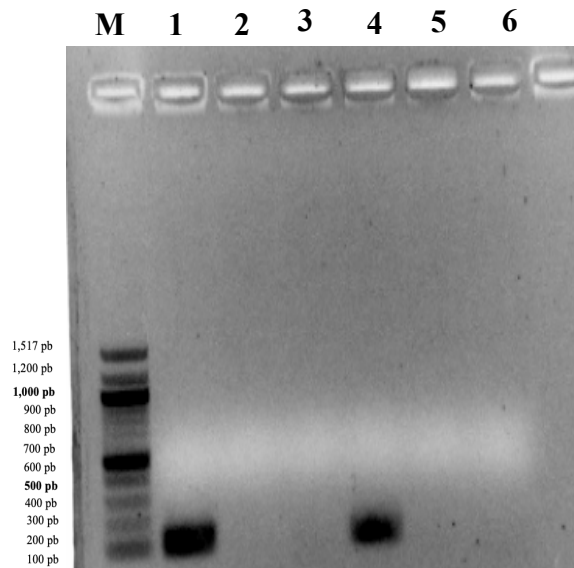


Figura 5. Amplificación del gen *recA* a partir de ADNg de la cepa de estudio con cebadores específicos para el grupo de *Lacp. plantarum* en gel de agarosa al 1%. Carril 1: cebador para *Lacp. plantarum*. Carril 2: cebador para *Lacp. paraplantarum*. Carril 3: cebador para *Lacp. pentosus*. Carril 4: cebador para *Lacp. plantarum*. Carril 5: cebador para *Lacp. paraplantarum*. Carril 6: cebador para *Lacp. plantarum* (control positivo, cepa *Lacp. plantarum*).

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *RP uL14*.

Con el fin de verificar la presencia del gen *RP uL14* en la cepa de *Lacp. plantarum*, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de dicho gen. En la Figura 6, se observa en los carriles 1 y 2 un amplicon con un peso aparente de 104 pb, el cual coincide con el tamaño esperado en el diseño de los cebadores para la amplificación del fragmento de interés.

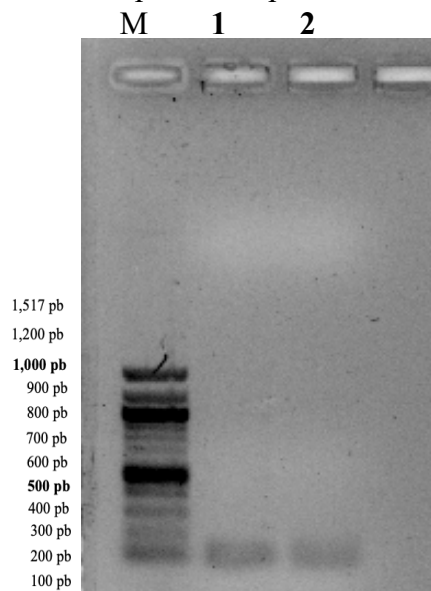


Figura 6. Productos de amplificación del gen *RP uL14* a partir del ADNg de *Lacp. plantarum*.

PCR DE CLONACION

La PCR de clonación consiste en añadir en los extremos del gen que codifica para la proteína RP uL14 las secuencias de las enzimas de restricción a utilizar, XhoI y NdeI. Lo anterior, con la finalidad realizar posteriormente la digestión y ligación con el vector de clonación utilizado. De acuerdo con Bertero et al. (2017) un paso fundamental en la preparación del inserto es añadir extremos que sean compatibles con los del vector para que la ligación sea exitosa. Se decidió trabajar con las enzimas de restricción XhoI y NdeI debido a que se encuentran en un sitio muy cercano al promotor T7 de la transcripción lo que será de vital importancia para llevar a cabo y controlar la sobreexpresión de la proteína *RP uL14*.

A partir del ADNg de *Lacp. plantarum* se llevó a cabo la PCR de clonación con los cebadores previamente diseñados. En la Figura 7 se observan los amplicones obtenidos de la PCR con un tamaño aproximado de 375 pb, que es el esperado en la unión de la secuencia del gen *RP uL14* y los extremos de restricción.

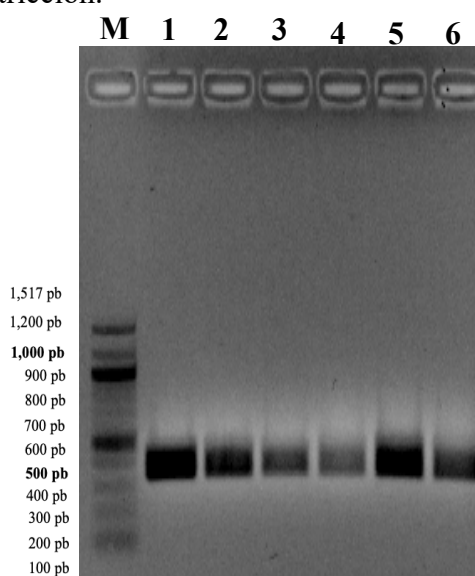


Figura 7. Productos de la PCR de clonación a partir del ADNg de *Lacp. plantarum*.

DIGESTION

Para llevar a cabo la ligación entre el plásmido y el gen *RP uL14* es necesario realizar una digestión de estas secuencias para que el gen y el plásmido tengan extremos compatibles entre sí (Das & Dash, 2015). Esta digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción XhoI y NdeI, que en el caso del gen *RP uL14* dio como resultado fragmentos de 375 pb aproximadamente (Figura 8), al cual llamaremos inserto. Con respecto a la digestión del plásmido, en la Figura 9 se puede observar, en el carril 1 el plásmido PTWIN1 sin ninguna modificación, es decir, en forma circular y sin el inserto, esto se observa en el gel de agarosa como 2 bandas, debido principalmente a las diferentes formas que puede adoptar el plásmido siendo estas: covalentemente cerrada, enrollada, súper enrollada y lineal (Schmidt et al., 1999). En contraste los carriles 2, 3 y 4 donde los plásmidos han sido digeridos y linearizados, es decir, cortados en ambas cadenas, en sitios específicos, lo que se muestra como una sola banda, con un peso aparente de mayor a los 1575 pb.

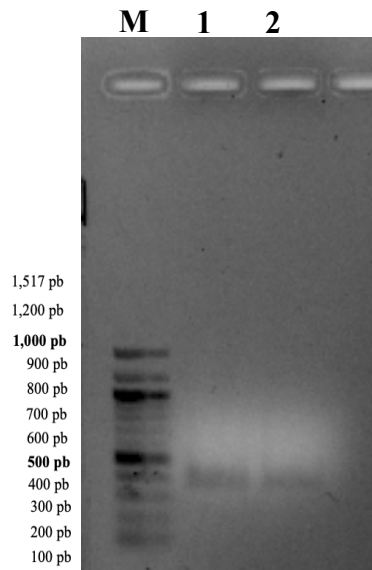


Figura 8. Digestión de la PCR de clonación

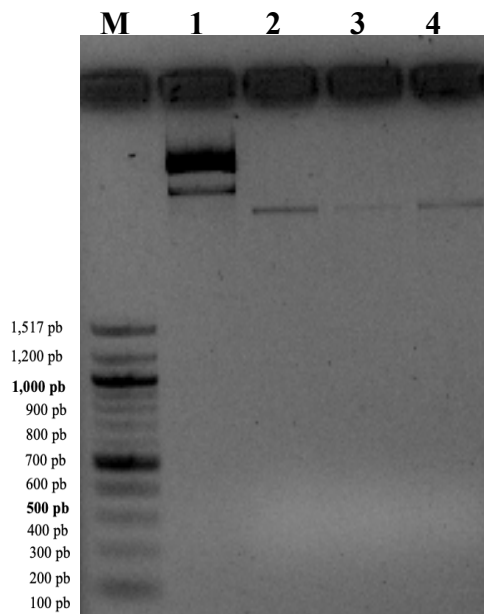


Figura 9. Digestión del plásmido pTWIN1

TRANSFORMACION

Se transformaron las células de *E. coli* TOP 10 con el plásmido recombinante, y para su selección se sembraron dichas células en medio LB con agar al 1%, el medio se adiciono con ampicilina ya que el vector pTWIN1 contiene un marcador de selección que confiere resistencia a dicho antibiótico. Los marcadores de selección como los antibióticos permiten elegir correctamente las colonias transformadas ya que limitan el crecimiento de las no transformadas bajo presión de selección, es decir, las células que contienen el plásmido con el gen de resistencia crecerán en el medio y las que no lo contengan no podrán crecer (Das & Dash, 2015).

Se obtuvo crecimiento de colonias en el control positivo (Figura 10A), lo que indica una correcta integración del plásmido dentro de las células de *E. coli* TOP 10. En el caso del control negativo (Figura 10B) no se obtuvo crecimiento debido a que se sembró únicamente la célula sin el vector, y al no contener el gen de resistencia a ampicilina las células mueren. En cuanto a la muestra experimental donde se utilizó el vector de clonación previamente ligado con el inserto (gen codificante de RP uL14) (Figura 10C y D) se obtuvo crecimiento de colonias aisladas, lo sugiere la integración del vector recombinante dentro de las células de *E. coli* TOP10.

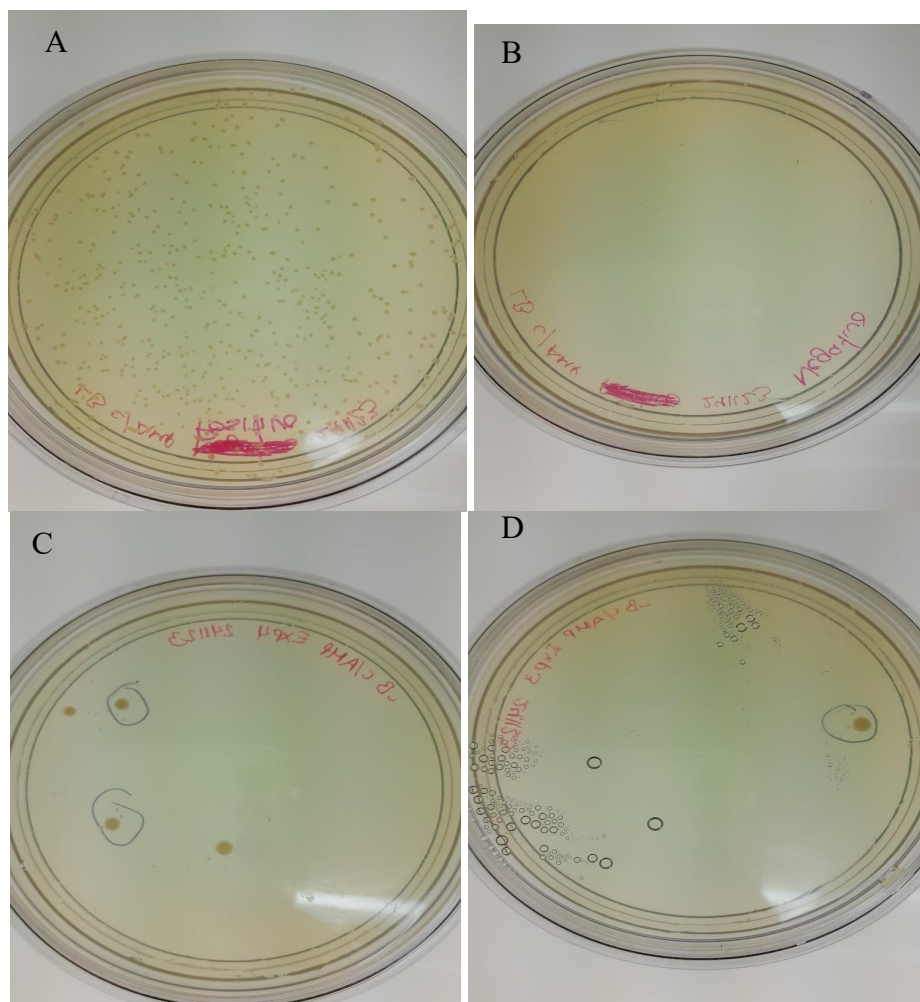


Figura 10. Transformación de células de *E. coli* TOP10 con inserto. A) Control positivo. B) Control negativo. C) Experimental 1. D) Experimental 2.

TENS-MINI PREP ADN plasmídico con inserto

Se extrajo el ADN plasmídico de las células transformadas de *E. coli* TOP10 y para su visualización se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, como se muestra en la Figura 11, donde se puede observar en todos los carriles un patrón similar de dos bandas,

indicando la extracción del ADN plasmídico. Este tipo de bandeo se puede asociar a las diferentes formas que puede tener un mismo plásmido, siendo la forma covalentemente cerrada, covalentemente abierta, super enrollada y lineal, estas formas se pueden observar con facilidad en el gel de agarosa, sin embargo, al tener una conformación distinta su tiempo de migración en el gel es diferente por ello, aunque se trate del mismo plásmido se puede observar en diferentes bandas en el gel (Schmidt et al., 1999).

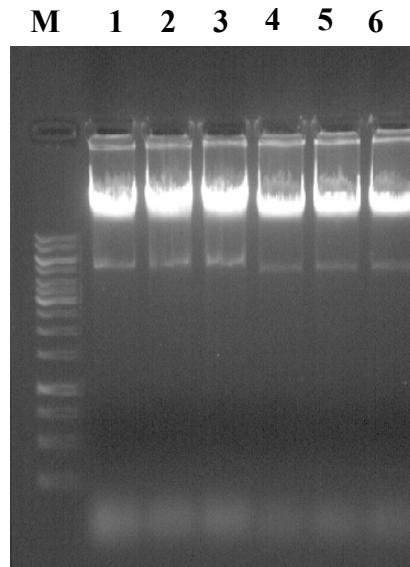


Figura 11. Electroforesis del ADN plasmídico de células transformadas de *E. coli* TOP10 con inserto de la RP uL14.

CONFIRMACION DE LA TRANSFORMACION

Cuando se utiliza la técnica de clonación y transformación, es importante verificar que el plásmido contiene el inserto con el gen de interés a clonar. Hoy en día existen diversas técnicas para la detección y selección de transformantes positivos, como la selección azul-blanca que requiere el gen *LacZ* dentro del vector de clonación, el estrés antibiótico, entre otras. Estas técnicas pueden dar falsos positivos debido a que existe la posibilidad de que el plásmido no contenga el inserto. En este sentido, un método que resulta aún más preciso es la confirmación por PCR, donde se pueden utilizar cebadores específicos que amplifican la secuencia del inserto (Das & Dash, 2015).

Se confirmó la presencia de vectores transformados en las células de *E. coli* TOP10 empleando la técnica de PCR, donde se utilizó el ADN plasmídico extraído en la TENS-MINI prep y los cebadores específicos (Tabla 12) que amplifican el fragmento codificante de la RP uL14; la PCR de clonación (enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I unidas al gen codificante de RP uL14, ER+L14) y la secuencia que comprende la unión del vector y el gen RP uL14 (ConsL14pTWIN1). Adicionalmente se utilizó como control el ADNg de *Lacp. plantarum* (Figura 12B). En los carriles 1 y 4 se amplificó el gen RP uL14, donde se obtuvo

en ambos casos una banda de 104 pb de peso aparente lo que coincide con el tamaño de secuencia del fragmento de dicho gen. En los carriles 2 y 5 correspondientes a la amplificación del gen RPuL14 unido a enzimas de restricción, se observan bandas de aproximadamente 375 pb en ambos casos, lo que coincide con el tamaño de unión de ambas secuencias. Por último, se observa en el carril 3 la amplificación de una banda de 800 pb aproximadamente que es el tamaño de banda esperado para la unión de secuencias del vector-sitios de restricción y el gen de interés.

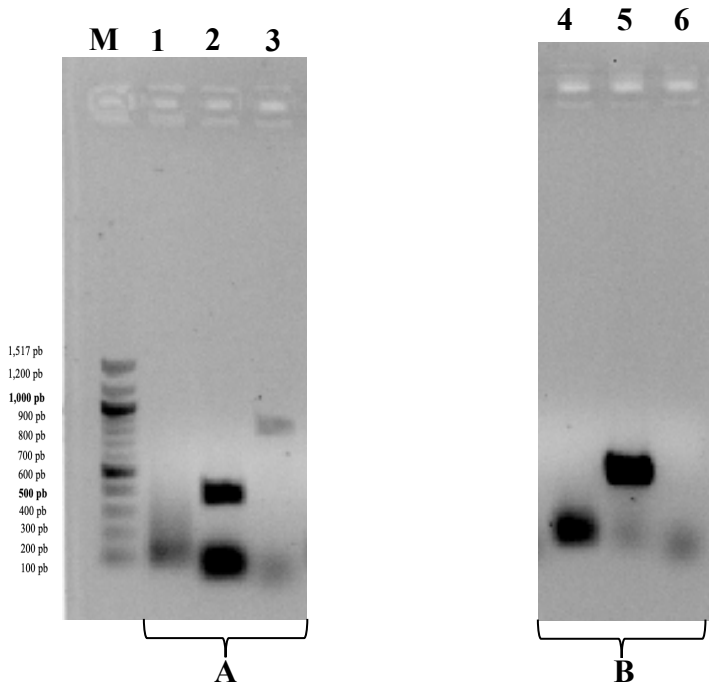


Figura 12. Confirmación de la transformación mediante PCR.

8.CONCLUSIONES

Se identificó la cepa de estudio como *Lacp. plantarum* mediante la amplificación del gen *recA* y se corroboró su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-MS.

Los cebadores diseñados permitieron amplificar el gen que codifica para la proteína RP uL14.

Se obtuvieron los fragmentos digeridos del gen de interés (RP uL14) y del vector de clonación pTWIN1, así mismo se logró ligación entre el gen de interés y el vector.

Se logró la transformación del vector pTWIN1 con el inserto en células competentes de *E. coli* TOP10.

Se extrajo ADN plasmídico de las células transformadas de *E. coli* TOP10 con el inserto.

Utilizando la técnica de PCR, cebadores específicos para el gen L14, ERL14, constL14 y el ADN plasmídico, en la electroforesis en gel se obtuvieron bandas que sugieren la presencia de la RP uL14 en el plásmido.

9.RECOMENDACIONES

Secuenciar los amplicones obtenidos en la PCR de confirmación mediante secuenciación de Sanger con la finalidad de conocer su secuencia en nucleótidos y confirmar la presencia del gen *RP uL14*.

Llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) con el objetivo de controlar su producción mediante el promotor T7 inducido por IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido).

Realizar la caracterización bioquímica de RP uL14, así como el estudio de su mecanismo de acción antimicrobiano, para poder considerar su uso en la industria farmacéutica, alimentaria y agropecuaria como una alternativa antimicrobiana.

10. BIBLIOGRAFIA

Bertero, A., Brown, S., & Vallier, L. (2017). Methods of Cloning. En *Elsevier eBooks* (pp. 19-39). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803077-6.00002-3>

Das, S., & Dash, H. R. (2015). Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems. En *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2095-4>

Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal Of Visualized Experiments*, 1. <https://doi.org/10.3791/2565>

Hurtado, J. (2019) Tesis de Maestría. Identificación y caracterización parcial de proteínas con actividad antimicrobiana producidas por *Lactobacillus paraplantarum* aislada de un producto cárnico. Universidad Autónoma Metropolitana, México, Ciudad de México. <https://bindani.izt.uam.mx/concern/tesiuams/h702q639b?locale=es>

Hurtado-Rios, J. J., Carrasco-Navarro, U., Almanza-Pérez, J. C., & Ponce-Alquicira, E. (2022). Ribosomes: The New Role of Ribosomal Proteins as Natural Antimicrobials. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(16), 9123. <https://doi.org/10.3390/ijms23169123>

IMPACTTM-TWIN Purification, Ligation and Cyclization of Recombinant Proteins Using Self-Cleavable Affinity Tags. (n.d.). www.neb.com

López DA, L., & Mejía G, C. (2012). Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba*, 17(3), 3169-3175.

Maldonado, I., Ramírez, D. G., Striebeck, P., Lafage, M., & Canigia, L. F. (2017). Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.001>

Moslem, M. N., Ghasemi, M. F., Amirmozafari, N., and Ranji, N. (2023). Antimicrobial Activity of *Pediococcus Acidilactici* PTCC 1954 and *Leuconostoc Mesenteroides* PTCC 1953 strains Isolated from Organic Meat Sausages. *Biological Journal of Microorganism*, 11(44).

Kalhor, M. S., Anal, A. K., Kalhor, D. H., Hussain, T., Murtaza, G., & Mangi, M. H. (2023). Antimicrobial Activities and Biopreservation Potential of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Raw Buffalo (*Bubalus bubalis*) Milk. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2023, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2023/8475995>

Nie, R., Zhu, Z., Qi, Y., Wang, Z., Sun, H., & Liu, G. (2023). Bacteriocin production enhancing mechanism of *Lactiplantibacillus paraplantarum* RX-8 response to *Wickerhamomyces anomalus* Y-5 by transcriptomic and proteomic analyses. *Frontiers In Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1111516>

El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos (2021-2025). (2021). FAO eBooks. <https://doi.org/10.4060/cb5545es>

Ramírez, J. I., Ovando, S. L., Luján, M. C., Álvarez, P. E., Grajales, A., & Abud, M. (2021). Potencial de siete cepas de *Lactobacillus* spp. como cultivos iniciadores en la industria alimentaria [PDF]. En LOS RETOS SOCIOECONÓMICOS Y DE INGENIERÍA. Una mirada desde la investigación aplicada (1.a ed., Vol. 1, pp. 139-148). GRUPO EDITORIAL HESS,S.ADEC.V.https://normateca.eadtecnm2.net/images/repositorio/Comunicacion_y_Difusion/los-retos-socioeconomicos-y-de-ingenieria.pdf

Salas, V. (2018). Tesis de licenciatura. Identificación de la actividad antibacteriana producida por una bacteria ácido láctica aislada de un producto cárnico. Universidad Nacional Autónoma de México, México, Ciudad de México

Schmidt T, Friehs K, Schleef M, Voss C, Flaschel E. Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1999 Oct 15;274(2):235-40. doi: 10.1006/abio.1999.4291. PMID: 10527521.

Shrivastava, A., Shrivastava, N., and Singh, P. K. (2019). Enzymes in Pharmaceutical Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, 591–602.

Surve, S., Shinde, D.B. & Kulkarni, R. Isolation, characterization and comparative genomics of potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains from *Indian foods*. *Sci Rep* 12, 1940 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05850-3>

Tian, F. (2019). Introduction. En *Lactic Acid Bacteria, Omics and Functional Evaluation*. Singapore: *Science Press Beijing*. 1-35.

Torriani, S., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(8), 3450-3454. <https://doi.org/10.1128/aem.67.8.3450-3454.2001>

Zapata, S. M., Muñoz, J., Ruíz, O., Montoya, O. L. Q., & Gutiérrez, P. A. (2009). ISOLATION OF *Lactobacillus plantarum* LPBM10 AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF ITS BACTERIOCIN. *Vitae*, 16(1). <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.1428>

ANEXOS

Componentes para 1L	Cantidad (g)
Peptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	10.0

Anexo 1. Componentes de Luria Broth, concentraciones para 1L a pH 7.0.

Buffer TENS		
Componentes	Concentración	Cantidad en g para 100 ml
Tris-HCl (pH 8)	10 mM	0.121
EDTA (pH 8)	1 mM	0.037
NaOH	1 N	0.4
SDS	0.5 % p/v	0.5

Anexo 2. Componentes, concentración y cantidad en gramos para preparación de 100 mL de buffer TENS.

Diseño de un vector de clonación para la expresión de una proteína antimicrobiana de *Lacp. plantarum* en *Escherichia coli* TOP10

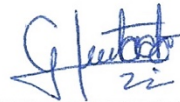
Informe final de servicio social por investigación para obtener el grado de Licenciada en Biología realizado por:

Frida Alejandra Parcero Montoya

Aprobado en contenido y estilo por:



Dra. Estela Teresita Méndez Olvera
Asesora Interna



Mtra. Jessica Josefina Hurtado Ríos
Asesora externa