



**Adaptación del sistema CRISPR /Cas9 para edición genética en el microorganismo no modelo
Burkholderia sacchari.**

Chile Miranda, Sebastián Andrés

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

22 de septiembre 2020



Document Information

Analyzed document	Proyecto de Investigacion SEBASTIAN CHILE .docx (D79115612)
Submitted	9/14/2020 5:19:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://docplayer.es/49016896-Tesina-de-grado-de-licenciatura-en-ciencias-biologic ... Fetched: 1/21/2020 4:58:08 AM		1
SA	Tesis - copia.docx Document Tesis - copia.docx (D43018276)		2
SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Acurio-Ayala-P1-Biotecnologia-Animal-3777.docx Document Acurio-Ayala-P1-Biotecnologia-Animal-3777.docx (D43447553) Submitted by: osacurio@espe.edu.ec Receiver: machavez.espe@analysis.arkund.com		1
W	URL: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162016000500429&ln ... Fetched: 9/14/2020 5:20:00 PM		1
W	URL: https://docplayer.es/74959279-Analisis-de-la-funcion-del-gen-sav4194-sobre-la-expo ... Fetched: 3/6/2020 4:34:38 PM		1
W	URL: https://docplayer.es/68680739-Edicion-genica-bialelica-mediante-insercion-autocata ... Fetched: 9/24/2019 6:05:45 PM		2





DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Adaptación del sistema CRISPR /Cas9 para edición genética en el microorganismo no modelo *Burkholderia sacchari***” fue realizado por el señor **Chile Miranda, Sebastián Andrés** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 22 de septiembre de 2020.



Firmado electrónicamente por:
**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**

Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

C.C.: 1713443479001



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Chile Miranda, Sebastián Andrés**, con cédula de ciudadanía n° 1723208474, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Adaptación del sistema CRISPR /Cas9 para edición genética en el microorganismo no modelo *Burkholderia sacchari*** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 22 de septiembre de 2020.



Chile Miranda, Sebastián Andrés
C.C.. 1723208474



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Chile Miranda, Sebastián Andrés**, con cédula de ciudadanía n°1723208474, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Adaptación del sistema CRISPR /Cas9 para edición genética en el microorganismo no modelo *Burkholderia sacchari*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 22 de septiembre de 2020.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several large, overlapping loops and flourishes, positioned above a horizontal line.

Chile Miranda, Sebastián Andrés

C.C.. 1723208474

Dedicatoria

A mis padres el Josema y la Meyi por el apoyo, el cariño y la paciencia que me han brindado en cada etapa de mi vida estudiantil y personal. A mis abuelitas, que siempre han añorado verme como un profesional y de quienes he aprendido que la verdadera calidad humana nace de la humildad, el amor y la perseverancia. A todas las personas que han creído en mí, incluso más de lo que yo podía creer. Y a la compañera de aulas, amiga incondicional, colega y enamorada, Abbyzu, mi tiempo en la universidad no hubiera sido lo mismo sin ti.

Chile Miranda, Sebastián Andrés

Agradecimientos

A la Doctora Linda Guamán Bautista, sin ella no hubiera sido posible que este trabajo se lleve a cabo. A todo el equipo de investigadores, trabajadores y pasantes que conforman el Centro de Investigación Biomédica (CENBIO) de la universidad UTE, en especial a la ingeniera Pamela Mosquera y al ingeniero Eduardo Moncayo, por su valiosa enseñanza y colaboración en la realización de este proyecto.

A mi tutor, Doctor Francisco Flores Flor, por su gran labor como docente universitario y como director de este trabajo de investigación.

A mis hermanos, porque de cada uno de ellos me llevo un ejemplo a seguir, por ser unos excelentes padres para mis sobrinos y por estar siempre pendientes de mí.

Y a Dios por bendecirme día a día.

Chile Miranda, Sebastián Andrés

Índice de contenido

Adaptación del sistema CRISPR /Cas9 para edición genética en el microorganismo no modelo <i>Burkholderia sacchari</i>	1
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido	8
Índice de tablas	12
Índice de figuras.....	14
Abreviaturas utilizadas.....	16
Resumen	17
Palabras clave:	17
Abstract.....	18
Keywords:	18
Capítulo 1: Introducción.....	19
Formulación del problema y antecedentes	19
Justificación del Problema	21
Objetivos del proyecto.....	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Marco teórico	23
CRISPR/Cas9	23
Plásmidos	24

Gibson assembly.....	25
Polihidroxicanoatos	26
Plásmidos de vectores BglBrick	27
Hipótesis	28
Capítulo 2: Materiales y métodos	29
Caracterización microbiológica de <i>Burkholderia sacchari</i>	29
Prueba de catalasa	30
Prueba de oxidasa	30
Curva de crecimiento microbiano	30
Pruebas de clonación en <i>Burkholderia sacchari</i>	31
Obtención de clones.....	31
Preparación de células competentes.	31
Transformación de células competentes.	32
Diseño in silico	32
Diseño del ensamble Gibson	32
Diseño de primers	35
Estandarización de las PCR de los fragmentos de ADN	37
Estandarización de las reacciones Gibson.....	38
Primer ensayo	38
Segundo ensayo	39
Tercer ensayo	40
Tratamiento A	40
Tratamiento B	41
Tratamiento C	41
Comprobaciones.....	42

Capítulo 3: Resultados	43
Caracterización microbiológica de <i>Burkholderia sacchari</i>	43
Diseño in silico del plásmido para la expresión de la proteína Cas9 en <i>Burkholderia sacchari</i>	48
Construcción del plásmido de expresión de la proteína Cas9, para <i>Burkholderia sacchari</i> , mediante la técnica Gibson assembly.....	49
Obtención de los amplicones para el ensamble Gibson.	49
Estandarización de PCR con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.	50
Amplificación del fragmento Cas1.....	51
Amplificación del fragmento Cas2.....	52
Amplificación del fragmento Cas3.....	53
Amplificación del fragmento ORI.	54
Amplificación del fragmento Cm.	55
Amplificación de los fragmentos de interés mediante PCR con Phusion™ DNA Polimerasa.	57
Amplificación del fragmento Ori.	58
Amplificación del fragmento Cm.	59
Amplificación del fragmento Cas1.....	60
Amplificación del fragmento Cas2.....	61
Amplificación del fragmento Cas3.....	62
Amplificación del fragmento de unión Cas1+Cas2+Cas3.	62
Amplificación del fragmento unión Cm+Ori.	64

Resultados de las reacciones Gibson	65
Primer Ensayo.	65
Segundo Ensayo..	73
Tercer Ensayo.....	74
Obtención de clones de <i>Burkholderia sacchari</i> , con el plásmido de expresión de la proteína Cas9.	79
Pruebas de clonación en <i>Burkholderia sacchari</i>	79
Capítulo 4: Discusión.....	81
Caracterización microbiológica de <i>Burkholderia sacchari</i>	81
Diseño y construcción del plásmido para la expresión de la endonucleasa Cas9 mediante el ensamblaje de Gibson.	82
Clonación de <i>Burkholderia sacchari</i>	83
Capítulo 5: Conclusiones	85
Capítulo 6: Recomendaciones.....	86
Capítulo 7: Bibliografía.....	87
Capítulo 8: Anexos	91

Índice de tablas

Tabla 1 Cepas de <i>Burkholderia sacchari</i> utilizadas para análisis microbiológico	29
Tabla 2 Diseño de primers utilizados en la construcción del plásmido de expresión de la proteína Cas9.....	36
Tabla 3 Temperaturas de anelign iniciales y tamaños esperados de los fragmentos de PCR	37
Tabla 4 Concentraciones de los fragmentos de PCR utilizados en el primer ensayo del ensamble Gibson	38
Tabla 5 Concentraciones de los fragmentos de PCR utilizados en el segundo ensayo del ensamble Gibson	39
Tabla 6 Resultados de las pruebas de catalasa y oxidasa de las cepas S019 y S0220 de <i>B. sacchari</i>	43
Tabla 7 Valores de absorbancia a 600nm del cultivo de la cepa S020 de <i>Burkholderia sacchari</i> a 30 °C.....	43
Tabla 8 Valores cinéticos de la cepa S020 del organismo <i>Burkholderia sacchari</i> a 30 °C.....	46
Tabla 9 Volúmenes de reacción para las PCR de los fragmentos; Cas1, Cas2, Cas3, ORI y Cm con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.....	50
Tabla 10 Condiciones de PCR de los fragmentos: Cas1, Cas2, Cas3, ORI y Cm con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.....	50
Tabla 11 Volúmenes de reacción para PCR de los fragmentos; Cas1, Cas2, Cas3, ORI y Cm con Phusion™ DNA Polimerasa.....	57
Tabla 12 Condiciones de PCR de los fragmentos; Cas1, Cas2, Cas3, ORI y Cm con Phusion™ DNA Polimerasa	57
Tabla 13 Volúmenes de reacción para PCR del fragmento de unión Cas1+Cas2+Cas3 con Phusion™ DNA Polymerase.....	62
Tabla 14 Condiciones de PCR del fragmento de unión Cas1+Cas2+ Cas3 con Phusion™ DNA Polymerase	63
Tabla 15 Volúmenes de reacción para PCR del fragmento de unión Cm+Ori con Phusion™ DNA Polymerase	64

Tabla 16 Condiciones de PCR del fragmento de unión Cm+Ori con Phusion™ DNA Polymerase	64
Tabla 17 Cuantificación del ADN plasmídico mediante el equipo Cytation™ 5	66
Tabla 18 Volumen de reactivos utilizados en la digestión de los plásmidos obtenidos del primer ensayo de la reacción de Gibson	67
Tabla 19 Volúmenes de reacción para PCR de confirmación del primer ensayo con Platinum™ DNA Polimerasa	69
Tabla 20 Condiciones de PCR de confirmación del primer ensayo con Platinum™ DNA Polimerasa	69
Tabla 21 Cuantificación del ADN plasmídico mediante el equipo Cytation™ 5	71
Tabla 22 Volumen de reactivos utilizados en la digestión con la enzima SacI del plásmido obtenido del primer ensayo de la reacción de Gibson.....	72
Tabla 23 Volúmenes de reacción para PCR de confirmación del tercer ensayo con Platinum™ DNA Polimerasa	75
Tabla 24 Condiciones de la PCR de confirmación del tercer ensayo con Platinum™ DNA Polimerasa	75
Tabla 25 Cuantificación del ADN plasmídico extraído de 5 colonias del tercer ensayo, mediante el equipo Cytation™ 5	76
Tabla 26 Volumen de reactivos utilizados en la digestión con las enzimas Sall+KpnI y SacI de los plásmidos obtenidos del tercer ensayo de la reacción de Gibson.	77
Tabla 27 Cuantificación de los plásmidos: pA1C_RFP, pB5C_GFP, pS5C_GFP con el equipo Cytation™ 5.....	79

Índice de figuras

Figura 1 Método de ensamblaje Gibson.	26
Figura 2 Selección del origen de replicación (Ori) de 1908pb en el plásmido pBBR5K_RFP.....	33
Figura 3 Selección del marcador de resistencia a cloranfenicol (Cm) de 989pb en el plásmido pB5C_GFP, mediante el software SnapGene®	34
Figura 4 Selección del plásmido de expresión de la proteína Cas9 (9727pb).....	35
Figura 5 Verificación de la complementariedad de los overhangs de los primers diseñados para la reacción de Gibson.....	36
Figura 6 Curva de crecimiento Burkholderia sacchari, cepa S020.....	45
Figura 7 Curva del logaritmo natural de los valores de absorbancia a 600nm versus el tiempo.	46
Figura 8 Construcción in silico del plásmido de expresión de la proteína Cas9, adaptado para el organismo Burkholderia sacchari.	49
Figura 9 Comprobación de la amplificación del fragmento Cas1(4559pb) a Ta=50°C con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.	51
Figura 10 Comprobación de la amplificación del fragmento Cas2(3232pb) a Ta=55°C con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.	52
Figura 11 Comprobación de la amplificación del fragmento Cas3(1968pb) a Ta=50°C con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.	53
Figura 12 Comprobación de la amplificación del fragmento Ori(1908pb) a Ta=60°C con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.	54
Figura 13 Comprobación de la amplificación del fragmento Cm (989pb) a Ta=55°C con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.	55
Figura 14 Prueba de controles negativos de los fragmentos Ori(1908pb) y Cm (989pb) con Blastaq™ y Platinum™ Taq DNA Polimerasa.	56
Figura 15 Amplificación del fragmento Ori (1908pb) a Ta=60°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa	58

Figura 16 Amplificación del fragmento Cm (989pb) a Ta=60°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.....	59
Figura 17 Amplificación del fragmento Cas1 (4559pb) a Ta=60°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.....	60
Figura 18 Amplificación del fragmento Cas2 (3232pb) a Ta=55°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.....	61
Figura 19 Amplificación del fragmento Cas3 (1968pb) a Ta=50°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.....	62
Figura 20 Comprobación de la amplificación del fragmento de unión Cas1+Cas2+Cas3 (9727pb) a Ta=51°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.....	63
Figura 21 Mutante de Escherichia coli, cepa DH10B con plásmido resultante del primer ensayo de la reacción de Gibson.....	65
Figura 22 Control negativo del primer ensayo de la reacción de Gibson.....	66
Figura 23 Digestión de las muestras de ADN plasmídico del primer ensayo mediante enzimas de restricción Sall y KpnI.....	68
Figura 24 Comprobación de la amplificación del fragmento de confirmación (4872pb) del primer ensayo a Ta=65°C con Platinum™ Taq DNA Polymerase.....	70
Figura 25 Selección de los fragmentos de unión Ori+Cm.....	71
Figura 26 Digestión de las muestras de ADN plasmídico del primer ensayo mediante la enzima de restricción Sacl.....	72
Figura 27 Resultado del cultivo del segundo ensayo de la reacción de Gibson.....	73
Figura 28 Mutantes de Escherichia coli, cepa DH10B con plásmido resultante del tercer ensayo de la reacción de Gibson.....	74
Figura 29 Comprobación de la amplificación del fragmento de confirmación (4872pb) del tercer ensayo a Ta=65°C con Platinum™ Taq DNA Polymerase.....	76
Figura 30 Digestión de las muestras de ADN plasmídico del tercer ensayo mediante enzimas de restricción.....	77
Figura 31 Pruebas de clonación en Burkholderia sacchari cepa S020.....	80

Abreviaturas utilizadas

BHI: Infusión Cerebro Corazón

LB: Medio Luria-Bertani

Kan: Kanamicina

Cm: Cloranfenicol

Amp: Ampicilina

pb: pares de bases

Resumen

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo principal adaptar el sistema CRISPR/Cas9 para edición genética en el organismo no modelo *Burkholderia sacchari*. Esta bacteria Gram-negativa tiene el potencial de producir moléculas de alto valor a escala industrial a partir de fuentes de carbono renovables como: glucosa, sacarosa, xilosa y arabinosa.

Adyacente a las secuencias de ADN denominadas CRISPR, se encuentran diferentes tipos de nucleasas. Las endonucleasas Cas9 se pueden programar con moléculas de ARN individuales para escindir zonas de ADN específicas. Se realizó un estudio cinético de la curva de crecimiento de este organismo y se logró determinar su tiempo de adaptación (3h-3.5h) y fase exponencial (3.5h hasta 8.5 h). Se utilizó el método de ensamblaje de Gibson para construir el plásmido de expresión de la endonucleasa Cas9, se realizó un diseño in silico de dicho plásmido y posteriormente se desarrollaron tres ensayos in vivo, obteniéndose resultados desfavorables, en consecuencia, no se logró adaptar el sistema CRISPR/Cas9 en *B. sacchari* por posibles problemas de hibridación entre los oligonucleótidos a causa de la formación de estructuras secundarias. Se recomienda realizar un análisis previo de las estructuras secundarias de los primers utilizados en un ensamble Gibson.

Palabras clave:

- **BURKHOLDERIA SACCHARI**
- **ENSAMBLE DE GIBSON**
- **CURVA DE CRECIMIENTO**
- **CRISPR-CAS9**
- **EDICIÓN GENÉTICA**

Abstract

The main objective of this research project is to adapt the CRISPR / Cas9 system for gene editing in the non-model organism *Burkholderia sacchari*. This Gram-negative bacterium has the potential to produce high-value molecules on an industrial scale from renewable carbon sources such as: glucose, sucrose, xylose and arabinose. Adjacent to the DNA sequences called CRISPR are different types of nucleases. Cas9 endonucleases can be programmed with individual RNA molecules to cleave specific areas of DNA. A kinetic study of the growth curve of this organism was carried out and its adaptation time (3h-3.5h) and exponential phase (3.5h to 8.5h) was determined. The Gibson assembly method was used to construct the Cas9 endonuclease expression plasmid, an in silico design of said plasmid was carried out and subsequently three in vivo tests were developed, obtaining unfavorable results, consequently, it was not possible to adapt the system CRISPR / Cas9 in *B. sacchari* due to possible hybridization problems between the oligonucleotides due to the formation of secondary structures. A preliminary analysis of the secondary structures of the primers used in a Gibson assembly is recommended.

Keywords:

- **BURKHOLDERIA SACCHARI**
- **GIBSON ASSEMBLY**
- **GROWTH CURVE**
- **CRISPR-CAS9**
- **GENETIC EDITION**

Capítulo 1: Introducción

Formulación del problema y antecedentes

El desarrollo de aplicaciones con microorganismos no modelo se ve obstaculizado en gran medida por la falta de herramientas genéticas moleculares y al déficit de conocimiento sobre sus complejas vías metabólicas y su regulación (Yan & Fong, 2017). La mejora continua de herramientas genéticas moleculares permite alcanzar construcciones exitosas, replicaciones estables y expresión eficiente en microorganismos no modelo (Huang, Camsund, Lindblad, & Heidorn, 2010). Las herramientas de ingeniería genómica proporcionan nuevas plataformas de edición, lo que se ve reflejado en una mayor eficiencia, precisión y menor costo de mano de obra (W. Jiang, Bikard, Cox, Zhang, & Marraffini, 2013). Dado que el sistema CRISPR/Cas9 se ha convertido en una herramienta de edición genética revolucionaria con numerosas aplicaciones, especialmente en investigación biomédica, este proyecto está enfocado en su utilización para modificar un organismo no modelo, y de esta manera aportar al desarrollo y optimización de aplicaciones futuras.

La posibilidad de alterar las secuencias de ADN dentro de la célula de manera controlada, nos permite comprender la funcionalidad de un gen. En células eucariotas, la mutagénesis de sitio específico se consigue mediante el uso de nucleasas de secuencia específica que promueven la recombinación homóloga de una plantilla de ADN que contiene la mutación de interés. Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), las nucleasas efectoras activadoras de la transcripción (TALEN) y las meganucleasas orientadoras pueden ser programadas para cortar genomas en ubicaciones específicas, pero esto requiere una ingeniería difícil y costosa (W. Jiang et al., 2013).

Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) son enzimas que se unen y cortan secuencias distintas de ADN de doble cadena (dsDNA). Tienen una unidad funcional que consta de dos proteínas monoméricas individuales que se unen a un sitio de ADN de aproximadamente 15-18 nucleótidos. Cuando dos de estos monómeros se dirigen a sus sitios objetivo adyacentes, los dominios de escisión del ADN se dimerizan y crean una ruptura de doble cadena (DSB) en el ADN. La introducción de los DSB mediados por ZFN en el genoma sienta las bases para una edición genómica altamente eficiente (Hansen et al., 2012).

Las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) han surgido como alternativas a los ZFN para realizar modificaciones dirigidas del genoma, y se ha demostrado que tienen un gran potencial para la manipulación precisa del mismo. Al igual que los ZFN, los TALEN consisten en un dominio de unión específico de ADN y un dominio de escisión. El dominio de unión al ADN es diseñado a conveniencia, y está compuesto por varias matrices de repetición en tándem casi idénticas. En los últimos años, la modificación del genoma mediada por TALEN ha sido ampliamente aplicada en levaduras, nematodos, mosca de la fruta, rata, células somáticas y pluripotentes humanas, gusano de seda, ganado, plantas, embrión de *Xenopus*, pez cebra y muchos otros organismos, y es reconocido como un gran avance en la tecnología de la ingeniería del genoma (Chen & Gao, 2013).

Para realizar la mutagénesis de organismos procariotas, se precisa introducir un marcador de selección en el locus editado o se requiere de un proceso de dos pasos que incluya un sistema de contraselección. Por otro lado, las proteínas de recombinación de fagos se han utilizado para realizar técnicas de recombinación homóloga de ADN u oligonucleótidos lineales, pero debido a que no existe ninguna selección de mutaciones, la eficiencia de recombinación puede ser relativamente baja. De modo que, es imprescindible continuar desarrollando y aplicando tecnologías que sean de fácil acceso, fáciles de usar y con una alta eficiencia para el

desarrollo de la ingeniería genética de los organismos eucariotas y procariotas (W. Jiang et al., 2013).

Justificación del Problema

Burkholderia sacchari es una bacteria gramnegativa que tiene el potencial para producir moléculas de alto valor a escala industrial, por ejemplo: ácido xilónico, xilitol y poli-3-hidroxi-butirato [P (3HB)], a partir de fuentes de carbono renovables tales como: glucosa, sacarosa, xilosa, arabinosa. Esta bacteria puede producir copolímeros híbridos de polihidroxi-alcanoatos (PHA), los cuales son biopolímeros renovables que presentan propiedades de interés como: biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja citotoxicidad, convirtiéndolos en sustitutos ideales para los plásticos derivados del petróleo. A pesar de este gran potencial, la falta de herramientas moleculares disponibles para este organismo son un obstáculo que impiden aprovechar su potencial de producción a escala industrial (Guamán et al., 2018).

Los estudios genéticos realizados con algunas especies de *Burkholderia*, se ven imposibilitados por la escasa disponibilidad de vectores de clonación y por la resistencia innata de estos organismos a los antibióticos más comunes utilizados para la selección (Lefebvre & Valvano, 2002). Es por eso que se requiere una herramienta de edición eficiente a escala del genoma para la construcción de microorganismos industrialmente útiles. Actualmente existen estrategias de edición multigénica continua y dirigida, aplicadas al genoma de *Escherichia coli* utilizando el sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes* tipo II que permite realizar una variedad de modificaciones precisas del genoma, incluyendo la eliminación e inserción de genes, alcanzando eficiencias elevadas (Y. Jiang et al., 2015).

Existen investigaciones que indican que la eliminación de los genes *fadA* y *fadB* que codifican para 3-cetoacil-CoA-tiolasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa respectivamente en *Pseudomonas putida* KT2442, debilitan la vía de la beta-oxidación y de esta manera se

incrementa la producción de los PHA (Ouyang et al., 2007). De acuerdo con los estudios de secuenciación del genoma de *Burkholderia sacchari* LMG 19450, aislada del suelo de una plantación de caña de azúcar en Brasil, los genes que están involucrados para el catabolismo de ácidos grasos son: acil-CoA sintetasa (*fadD*), acil-coenzima A (CoA) deshidrogenasa (*fadE*), enoil-CoA hidratasa- S- específica (*fadB - fadJ*); y para el metabolismo de PHA: ácido polihidroxicanoico sintasa (*phaC*) y 3-cetoacil-CoA tiolasa (*phaA*)(Raduan Alexandrino et al., 2015). Por lo tanto, este estudio se enfocará en utilizar el sistema CRISPR/Cas9 en *B. sacchari* para eliminar el gen *fadD*, y de esta manera atenuar la vía de la beta-oxidación con el fin de incrementar la producción de polihidroxicanoatos (PHA).

Objetivos del proyecto

Objetivo general

Adaptar el sistema CRISPR /Cas9 para edición genética en el microorganismo no modelo *Burkholderia sacchari*.

Objetivos específicos

- Caracterizar de forma microbiológica a *Burkholderia sacchari*.
- Diseñar in silico el plásmido para la expresión de la proteína Cas9 en *Burkholderia sacchari*.
- Construir el plásmido de expresión de la proteína Cas9, para *Burkholderia sacchari*, mediante la técnica Gibson assembly.
- Obtener clones de *Burkholderia sacchari*, que contengan los plásmidos de expresión de la proteína Cas9.

Marco teórico

CRISPR/Cas9

Las secuencias CRISPR son una familia de secuencias de ADN que se repiten continuamente en los genomas de los organismos procariotas y están ausentes en eucariotas y virus. Para referirse a estas secuencias, los investigadores les han dado el nombre de: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas por su significado en inglés (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Adicionalmente se ha descubierto que los genes *cas* en su mayoría se ubican de manera adyacente a un locus CRISPR, lo que denota una relación funcional: por ejemplo, el gen *cas3* tiene actividad helicasa, y el gen *cas 4* tiene actividad exonucleasa RecB, lo que sugiere que estos genes están comprometidos en el metabolismo del ADN o la expresión génica (Jansen, Van Embden, Gaastra, & Schouls, 2002).

Los sistemas CRISPR asociados a proteínas *cas*, proporcionan a bacterias y arqueas inmunidad adaptativa contra virus y plásmidos, es decir, establece un sistema de defensa mediante el uso de pequeños ARN para la detección de secuencias específicas y el silenciamiento de ácidos nucleicos extraños. En particular, las endonucleasas Cas9 se pueden programar con moléculas de ARN individuales para lograr escindir zonas de ADN específicos (Jinek et al., 2012).

La tecnología CRISPR-Cas9 se inicia con la endonucleasa Cas9 guiada por un ARN, que induce roturas de doble cadena (DSB) adyacentes a una secuencia corta reconocida por Cas9 denominada PAM, en el genoma de las células. Estas rupturas posteriormente activan los mecanismos de reparación del ADN a través de dos posibles vías: la ruta de unión de extremos no homólogos (NHEJ) que introduce inserciones o eliminaciones aleatorias (indels), y la

reparación dirigida por homología (HDR) que con ayuda de un donante de ADN exógeno, puede introducir inserciones precisas, (You et al., 2019).

Se han desarrollado varios plásmidos que codifican algunos componentes de CRISPR/Cas9 para realizar ediciones del genoma, entre otras aplicaciones. Estos incluyen vectores convencionales y virales que codifican tanto para la endonucleasa Cas9 como para el RNA guía (gRNA). Dichos vectores también expresan marcadores de selección en forma de genes que otorgan resistencia a fármacos químicos o se fusionan con proteínas fluorescentes. Se han desarrollado plásmidos que codifican módulos individuales de estos sistemas, y algunos están disponibles en la plataforma online: Addgene. Se pueden usar métodos virales (adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus: lentivirus y lentivirus deficientes en integrasa y baculovirus) o no virales para administrar los reactivos CRISPR-Cas9. Por otro lado, los sistemas de administración no virales usan métodos físicos y / o químicos para administrar los componentes, tales como: electroporación, transfección química, transducción de estrés mecánico o microinyección de partículas o plásmidos de ribonucleoproteína que codifican diversos componentes del sistema. Existe una manera de administrar Cas9 a través de vías endocíticas, utilizando péptidos que penetran en las células fusionadas genéticamente o químicamente con Cas9. Los métodos de administración tanto virales como no virales se han utilizado con éxito in vivo, ex vivo e in vitro (Pelletier, 2017).

Plásmidos

Dentro de la biología molecular, los plásmidos son elementos de diseño que se utilizan para: estudiar genes, codificar programas e incluso editar células humanas. Tienen procedencia bacteriana y en su mayoría poseen una composición simple que consta de: un origen de replicación, un marcador de resistencia y una región de ADN exógeno compuesta por algunos

elementos utilizados para el diseño de nuevos sistemas biológicos o circuitos genéticos (Timmons & Densmore, 2020) (Brophy & Voigt, 2014).

En su mayoría, los plásmidos son moléculas circulares de ADN bicatenario. Son bastante diversos y su tamaño puede variar entre 2 a cientos de pares de kilobases. Se replican por medio de diferentes mecanismos moleculares, generándose en un número diferente de copias por célula. Los plásmidos no codifican para funciones celulares esenciales, pero pueden incluir genes específicos para desempeñar acciones especializadas como: factores de virulencia, resistencia a los antibióticos o vías metabólicas que sirve para acondicionar el crecimiento de las células huésped (Tolmasky, 2017).

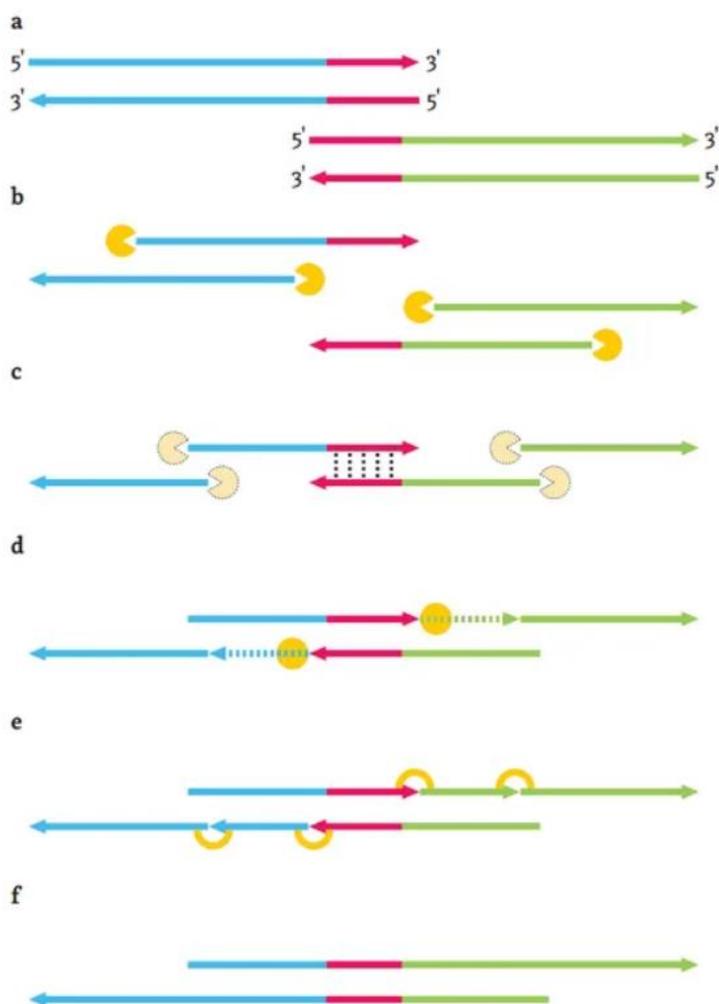
Gibson assembly

La técnica de Gibson assembly es un sistema in vitro de recombinación isotérmico de un solo paso, con capacidad de ensamblar y reparar moléculas de ADN superpuestas, con el objetivo de simplificar la construcción de grandes moléculas de ADN (~900Kb) a partir de fragmentos constituyentes como se representa en el literal (a) de la Figura 1 (Gibson et al., 2009).

Dicho método de recombinación se basa en un enfoque básico (Geneious, 2020): (b) Primero una exonucleasa elimina los extremos del ADN bicatenario para dejar expuestos a los fragmentos de simple cadena (overhangs) que son complementarios al fragmento de ADN que se desea unir. Cuando las moléculas complementarias de ADN monocatenario se unen (c), una polimerasa rellena los espacios faltantes (d) y finalmente una ligasa sella las roturas (e). Este método de ensamblaje puede ser una herramienta de ingeniería molecular muy útil para construir genes sintéticos y naturales, así como vías genéticas y genomas completos (Gibson, 2011).

Figura 1

Método de ensamblaje Gibson.



Nota: Imagen recuperada de Gibson Assembly Tutorial. Copyright © 2005-2020 por la compañía Geneious. Significado de los literales: a) Fragmentos Constituyentes. b) Actividad exonucleasa. c) Unión moléculas complementarias. d) Actividad polimerasa. e) Actividad ligasa. f) Producto final.

Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros de hidroxicanoatos generalmente acumulados por diversos microorganismos, cuando se encuentran en presencia de una fuente

de carbono en exceso y bajo condiciones nutricionales limitadas. Los PHA pueden ser termoprosesables, elastoméricos, capaces de contener gases y líquidos, no son tóxicos, son piezoeléctricos, biocompatibles, biodegradables y enantioméricamente puros. Debido a estas características son considerados como una alternativa a los plásticos no biodegradables que se producen a partir de combustibles fósiles no renovables. Existen algunos productos derivados de los PHA tales como: películas, espumas, fibras, aditivos alimentarios, implantes médicos, portadores de medicamentos, andamios médicos para la regeneración de tejidos y biocombustibles, así como en la composición de alimentos para animales. Al tratarse de una materia prima renovable, los PHA deben estar enfocados a un mercado donde prime la sostenibilidad. Sin embargo, solo unos pocos PHA se producen a gran escala con bajo éxito en el mercado, por ejemplo: poli-3-hidroxibutirato (PHB), poli-4-hidroxibutirato (P4HB) (Zheng, Chen, Ma, & Chen, 2019).

Bajo este contexto, se introduce el término de bioeconomías emergentes, donde los biopolímeros compostables, es decir, los polihidroxialcanoatos (PHA), son productos deseables debido a su similitud con los petropolímeros. La producción a escala industrial de PHA ha crecido rápidamente, lo que demanda obtener una fuente de carbono económica y sostenible. Entre las materias primas biológicas principales, se encuentra la lignocelulosa, ya que es una fuente de carbono barata, abundante y potencialmente sostenible (Dietrich, Dumont, Del Rio, & Orsat, 2019).

Plásmidos de vectores BglBrick

En el campo de la biología sintética, los plásmidos de vectores BglBrick surgen del diseño y ensamblaje de distintas partes biológicas, específicamente de la unión de varios vectores en combinación con distintos orígenes de replicación, promotores y marcadores de resistencia a

antibióticos, con la finalidad de probar y optimizar la producción de moléculas diana específicas (Lee et al., 2011).

El plásmido BglBrick (pBb) está compuesto por tres módulos:

1. Módulo de resistencia a antibióticos: a: ampicilina, k: kanamicina y c: cloranfenicol.
2. Módulos de origen de replicación: E: colE1(copia alta), A: p15a (copia media), S: SC101(copia baja), B: BBR1(Amplio rango de hospedador, copia media)
3. Módulo de expresión, que a su vez incluye el represor (LacI), promotor, gen de interés (RFP o GFP), y el terminador. Dentro de los promotores se encuentran: inducibles por IPTG (1: Trc, 7: T7, 5: LacUV5, 6: LlacO-1), regulado por tetraciclina (2: Tet), regulado por propionato (3: ProS, 4: ProE) e inducible por arabinosa (8: BAD).

Y se nombra de la siguiente manera utilizando las abreviaturas que se indicó previamente: prefijo, origen, promotor, resistencia y proteína. Ejemplo pBb E 5 a –RFP (Lee et al., 2011).

Hipótesis

Es posible adaptar el sistema CRISPR/Cas9, por medio de la técnica de ensamblaje de Gibson, al organismo no modelo *Burkholderia sacchari*.

Capítulo 2: Materiales y métodos

Caracterización microbiológica de *Burkholderia sacchari*

Se analizaron dos muestras provenientes de Brasil, identificadas previamente como pertenecientes a la especie *Burkholderia sacchari* (**Tabla 1**). Estas muestras se encuentran almacenadas en glicerol al 20% y a una temperatura de -80°C en el cepario del laboratorio CENBIO de la universidad UTE.

Tabla 1

Cepas de Burkholderia sacchari utilizadas para análisis microbiológico .

Código	Microorganismo	Fecha de almacenamiento	Observaciones
UTE_PM_S019	<i>Burkholderia sacchari</i>	8 de marzo 2019	resistente a kan y amp
UTE_EM_S020	<i>Burkholderia sacchari</i>	20 de marzo 2019	resistente a kan

Nota: En esta tabla se indican los códigos que se utilizaron para nombrar a las dos cepas de *Burkholderia sacchari*

Se realizó un cultivo líquido en 5ml de medio BHI (infusión de cerebro y corazón) con 5µl de kanamicina para cada cepa, y se incubó a 30°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 5000 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante.

A continuación, se realizaron lavados de cada muestra, para lo cual se tomó 2ml de medio mínimo y se resuspendieron las células, seguidamente se centrifugó a 5000 rpm por 3 minutos y descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces.

Finalmente se efectuaron las pruebas de catalasa y oxidasa que se detallan a continuación:

Prueba de catalasa

Se tomó una pequeña cantidad de muestra lavada de la cepa S019 y S020, y se colocó por separado en un portaobjetos limpio. Se añadió una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% en cada muestra. El resultado es positivo cuando la reacción ocurre de manera instantánea y se observa el desprendimiento de oxígeno en forma de burbujas. Caso contrario, el resultado es negativo si no se observa burbujeo.

Prueba de oxidasa

De la misma manera, se tomó una pequeña cantidad de muestra de cada cepa y se colocó en la superficie de los discos de oxidasa por separado y se deja reaccionar por 40 segundos aproximadamente. El resultado es positivo cuando el disco de oxidasa se torna azul en el lugar donde se colocó la muestra, y es negativo si no presenta ninguna coloración.

Curva de crecimiento microbiano

Al término de las pruebas de oxidasa y catalasa, se resolvió con cuál de las dos cepas se continuaría trabajando y se procedió a realizar la curva de crecimiento del microorganismo. Primero se preparó un cultivo de partida en medio líquido BHI (5ml) más kanamicina (5 μ l) y se incubó durante toda la noche a 30 °C. Al día siguiente se midió la absorbancia a 600 nm del cultivo y se realizaron diluciones hasta llegar a 0,1. Seguidamente se cargó por triplicado 200 μ l de muestra y 200 μ l de blanco (medio líquido BHI sin inocular) en una placa de 96 pocillos. Finalmente se procedió a realizar el cultivo de las muestras en el equipo Cytation™ 5 a 30°C y se programó para que mida la absorbancia a 600nm cada media hora durante 22 horas con 30 minutos.

Pruebas de clonación en *Burkholderia sacchari*

Se realizó la extracción de tres plásmidos: pA1C_RFP, pB5C_GFP y pS5C_GFP con ayuda del kit ZR Plasmid Miniprep™ – Classic. Posteriormente se cuantificó cada muestra de plásmido obtenido con la ayuda del equipo Cytation™ 5.

Una vez extraídos los plásmidos de prueba, se procedió a clonarlos a cada uno por separado en la bacteria *Burkholderia sacchari*, siguiendo el protocolo que se detalla en los apartados posteriores.

Obtención de clones

Preparación de células competentes. Se realizó un raspado del stock de células congeladas a -80°C. Se incubaron toda la noche a 30°C en medio líquido BHI con kanamicina. Al día siguiente se diluyó 1 ml de cultivo en 50 ml de BHI más glucosa al 2% y sulfato de magnesio 35 mM. Se agitó durante 2 horas aproximadamente hasta conseguir una OD600 de 0.6.

Se transfirió el cultivo a un tubo estéril de 50 ml e incubó en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.

Nota: No se debe permitir que las células se calienten a más de 4°C durante todo el procedimiento.

Las células se resuspendieron en 10 ml de TFB1. (Se homogenizó gentilmente). Se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.

Finalmente, se resuspendieron las células en 2 ml de TFB2. (Se homogenizó gentilmente). Y se hicieron alícuotas en volúmenes de 100µl en tubos de 1.5 ml previamente enfriados. Las células se almacenaron en un congelador de -80°C (Hanahan, 1983).

Transformación de células competentes. Se descongelaron 100µl de células competentes en hielo, durante 10 minutos. Luego se colocó 2µg de DNA. Se recomienda que el volumen máximo de DNA esté en relación 1/10 con respecto al volumen de células.

Se incubó en hielo durante 30 minutos y seguidamente se realizó el shock térmico de las células en un baño María a 42°C durante 60 segundos.

Posteriormente se retornaron las células al hielo durante 2 minutos y después se añadió 900µl de medio de recuperación (BHI + Glucosa al 2% +Sulfato de magnesio 35 mM).

Finalmente se incubó a 30°C para *Burkholderia sacchari* y a 37°C para *Escherichia coli* durante 4 horas. Luego de este tiempo se realizó el plaqueo de la muestra con 0.2 ml de células transformadas en un medio de cultivo sólido con el respectivo antibiótico y se mantuvo en incubación (Hanahan, 1983).

Diseño in silico

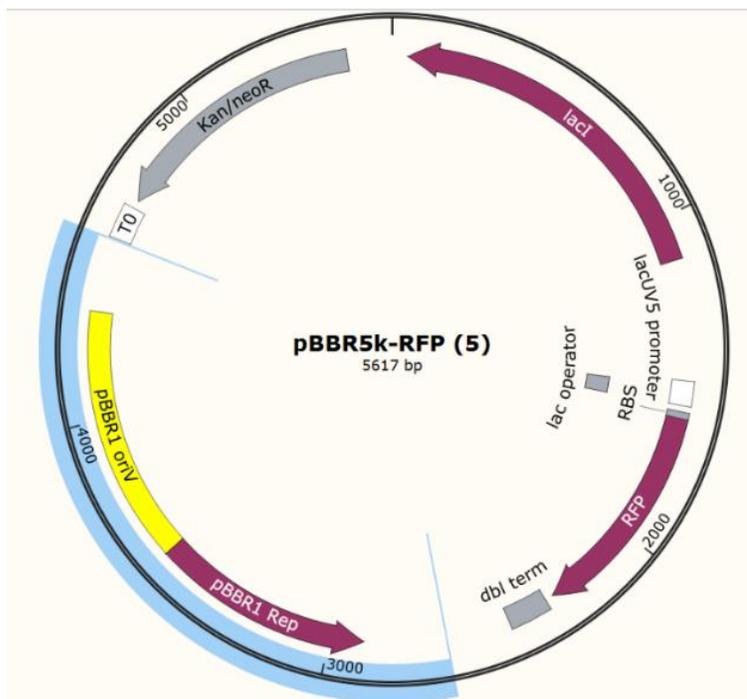
Diseño del ensamble Gibson

Para construir el plásmido de interés, se precisaron 3 partes fundamentales: el origen de replicación, el marcador de resistencia a cloranfenicol y la proteína Cas9. El diseño se realizó en el software SnapGene®, como se muestra en las siguientes imágenes:

La secuencia de nucleótidos que expresan el origen de replicación (Ori) de tamaño igual a 1908pb (Figura 2), se extrajo del plásmido pBBR5K_RFP, desde la posición 2642pb hasta 4549pb.

Figura 2

Selección del origen de replicación (Ori) de 1908pb en el plásmido pBBR5K_RFP

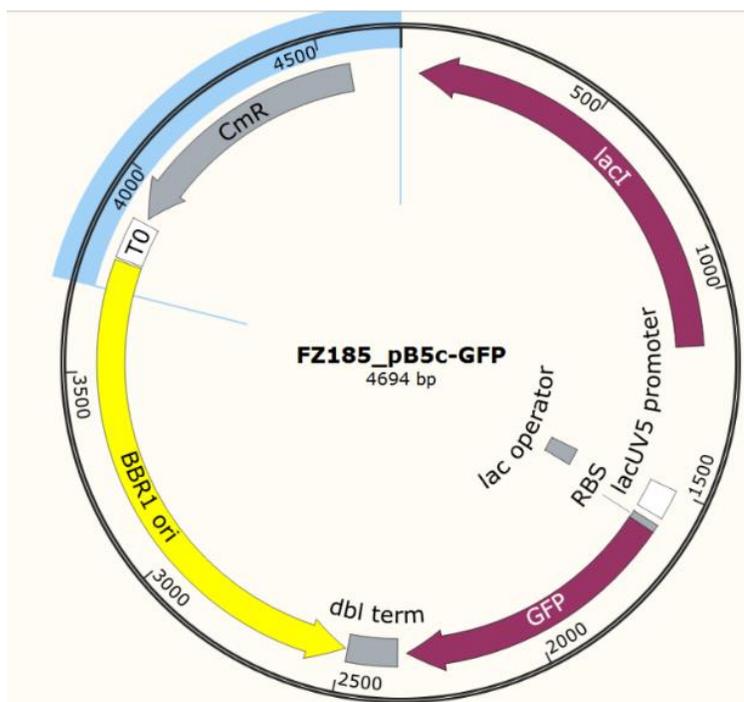


Nota: Imagen generada mediante el software SnapGene®

En la Figura 3 se indica la selección de la secuencia que codificará para el marcador de resistencia al antibiótico cloranfenicol (Cm) de tamaño igual a 989pb, se extraerá del plásmido PB5C_GFP desde la posición 3706pb hasta 4694pb.

Figura 3

Selección del marcador de resistencia a cloranfenicol (Cm) de 989pb en el plásmido pB5C_GFP, mediante el software SnapGene®



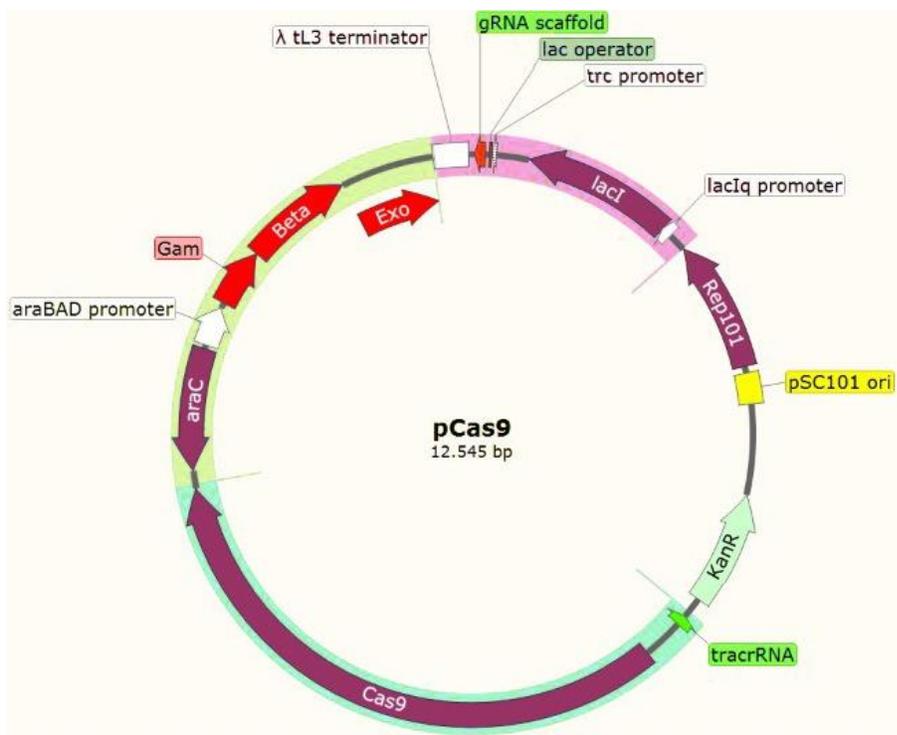
Nota: Imagen generada mediante el software SnapGene®

Debido a que el gen que codifica para la proteína Cas9 (Figura 4), tiene un tamaño de 9727pb, se decidió fragmentarlo en 3 partes, de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit de ensamblaje Gibson utilizado (Invitrogen™, 2014). En el apartado de “Eficiencia de clonación, flexibilidad y precisión” de las instrucciones del kit de ensamblaje se indica que “el principal factor que afecta la eficiencia de la clonación es el tamaño de los elementos de ADN (100 pb a 5 Kb)”. Se dividió el plásmido de la siguiente manera, tratando de escoger los sitios de corte donde no se altere la estructura de la proteína ni de sus promotores:

- Cas1(4551pb): desde la posición 4504pb hasta 9054pb
- Cas2(3216pb): desde la posición 9055pb hasta 12270pb
- Cas3(1960pb): desde la posición 12271pb hasta 1685pb

Figura 4

Selección del plásmido de expresión de la proteína Cas9 (9727pb).



Nota: La selección se enseña dividida en tres partes: Fragmento Cas1 seleccionado en color turquesa, fragmento Cas2 en color verde y fragmento Cas3 en color morado. Imagen generada mediante el software SnapGene®

Diseño de primers

Para realizar el diseño de primers se utilizó el software GeneArt® Primer and Construct Design Tool, proporcionado por la empresa Thermo Fisher Scientific en su página web:

<https://www.thermofisher.com/order/oligoDesigner>.

En la Tabla 2 se detalla la información de cada primer originado por el software antes mencionado y se resalta en amarillo los overhangs requeridos en la reacción de Gibson para unir todos los fragmentos.

Tabla 2

Diseño de primers utilizados en la construcción del plásmido de expresión de la proteína Cas9.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	%GC
Ori_fwd	CAGATATCCTGAGGCCAGTTTGCTCAGGCTCT	67	53
Ori_rev	CAAACCCCTCTGCCCTCCCTTTGGTGTCCA	70	59
Cas1_fwd	GGGGCAGGAGGGTTGCAGTCAGAGTAGAATA	65	53
Cas1_rev	ATGTCTAGATTAAGAAATAATCTTCATCTAAA	53	22
Cas2_fwd	TTCTTAATCTAGACATGAGCGGATACATATTT	58	31
Cas2_rev	AGGATGCGTCATCGCCATTGCTCCCCAAATAC	69	53
Cas3_fwd	GCGGATGACGCATCCTCACGATAATATCCGGG	69	56
Cas3_rev	GCGCAGCGTCTTGTATCTATCAGTGAAGCATC	65	50
Cm_fwd	ATACAAGACGCTGCGCGAGCCTTGACCCGCCT	75	63
Cm_rev	GGCCTCAGGATATCTGGCGAAAATGAGACGTT	67	50

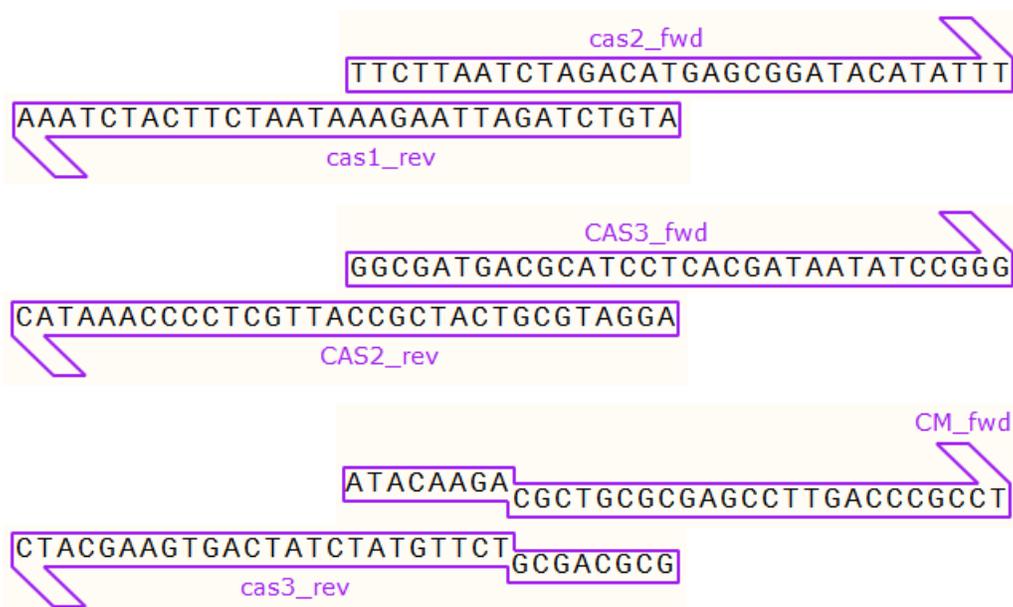
Nota: Los overhangs de cada primer se encuentran resaltados en amarillo.

A continuación, se detalla la complementariedad de los overhangs de cada primer. Cada overhang tiene una hibridación de 15pb, divididos en dos partes, tanto en el primer forward como en el reverse (Figura 5).

Figura 5

Verificación de la complementariedad de los overhangs de los primers diseñados para la reacción de Gibson.





Nota: La complementariedad se da por pares entre los primers: Ori_fw y Cm_rev; Cas1_fwd y Ori_rev; Cas2_fwd y Cas1_rev; Cas3_fwd y Cas3_rev; Cm_fwd y Cas3_rev. Imágenes generadas mediante el software SnapGene®.

Estandarización de las PCR de los fragmentos de ADN

Para estandarizar las condiciones de PCR de cada una de las partes de interés, se utilizó la Taq DNA Polimerasa Platinum™ que presenta una fidelidad estándar. A continuación (Tabla 3) se detallan las condiciones iniciales propuestas para dicha estandarización:

Tabla 3

Temperaturas de anelign iniciales y tamaños esperados de los fragmentos de PCR

Plásmido	Tamaño fragmento esperado (pb)	Primer	Temperatura de Melting (°C)	Temperatura de Anneling (°C)
pCas9	4559	Cas1_fwd	57	50
		Cas1_rev	53	
	3232	Cas2_fwd	58	55
		Cas2_rev	69	
	1968	Cas3_fwd	69	50
		Cas3_rev	53	
pBBR5K_RFP	1908	Ori_fwd	67	60
		Ori_rev	66	
pB5C_GFP	989	Cm_fwd	75	55
		Cm_rev	58	

Una vez estandarizadas las condiciones de PCR con la polimerasa de fidelidad estándar, se procedió a utilizar la Taq DNA Polimerasa de alta fidelidad Phusion™, para la obtención de los fragmentos que se destinaron al ensamblaje de la reacción de Gibson.

Los amplicones obtenidos fueron concentrados y purificados con ayuda del kit Oligo Clean & Concentrator™ de la empresa Zymo Research®. De igual manera los fragmentos de PCR que requerían ser extraídos directamente del gel de agarosa, se lo hizo con la ayuda del kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery perteneciente a la misma empresa.

Estandarización de las reacciones Gibson

Las reacciones de Gibson se llevaron a cabo con GeneArt™ Seamless Cloning and Assembly Kit, número de catálogo: A13307.

Primer ensayo

El primer ensayo se realizó luego de obtener los fragmentos específicos de PCR, purificados y luego de alcanzar las concentraciones que se indican en la Tabla 4:

Tabla 4

Concentraciones de los fragmentos de PCR utilizados en el primer ensayo del ensamble Gibson

Fragmento	Concentración (ng/μl)
Cas1	125.93
Cas2	97.87
Cas3	98.75
Ori	132.3
Cm	129.03

El volumen final de la reacción fue de 10μl, distribuidos de la siguiente manera:

- 2μl de Buffer de reacción 5X
- 1μl de Mix de enzima 10X
- 140ng de cada fragmento de PCR

Cas1 1.11 μl

Cas2	1.43 μ l
Cas3	1.42 μ l
Ori	1.06 μ l
Cm	1.09 μ l
Total = 6.11 μ l	

- 0.89 μ l de Agua ultra pura

El tiempo de incubación de la reacción de Gibson fue de 45 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a clonar el plásmido obtenido en la cepa DH10B de *Escherichia coli*.

Segundo ensayo

El segundo ensayo se realizó luego de volver a amplificar por PCR los fragmentos específicos requeridos, y de purificarlos y concentrarlos hasta alcanzar los valores que se muestran en la **Tabla 5**:

Tabla 5

Concentraciones de los fragmentos de PCR utilizados en el segundo ensayo del ensamble Gibson

Fragmento	Concentración (ng/μl)
Cas1	278.61
Cas2	171.3
Cas3	131.6
Ori	161.3
Cm	232.31

El volumen final de la reacción fue de 10 μ l, distribuidos de la siguiente manera:

- 2 μ l de Buffer de reacción 5X
- 1 μ l de Mix de enzima 10X
- 200ng de cada fragmento de PCR

Cas1	0.72 μ l
Cas2	1.17 μ l
Cas3	1.47 μ l
Ori	0.62 μ l
Cm	0.5 μ l
Total = 4.48 μ l	

- 2.52 μl de Agua ultra pura

En este ensayo se consideró variar dos aspectos con respecto al primero: en primer lugar, la temperatura de incubación se incrementó a 50°C en baño maría y, en segundo lugar, se aumentó la concentración de cada fragmente de PCR de 140 ng a 200ng, siendo este último el valor máximo que recomienda el inserto para realizar la reacción de Gibson. El tiempo de incubación de la reacción se mantuvo en 45 minutos y seguidamente se procedió a clonar el plásmido obtenido en la cepa DH10B de *Escherichia coli*.

Tercer ensayo

Para el tercer ensayo se planificó montar dos tratamientos, para los cuales, primero se amplificó un fragmento de 9727pb (inserto) que contiene a los subfragmentos: Cas1, Cas2 y Cas3. Dicho fragmento se obtuvo del plásmido pCas9 y los primers que se utilizaron fueron Cas1_fwd y Cas3_rev con una temperatura de Anneling de 51°C. Su concentración fue de 63.8ng/ μl .

Simultáneamente se amplificó otro fragmento (vector) que abarca la unión de dos subfragmentos: Cm y Ori, cuya unión se obtuvo previamente como resultado del primer ensayo. Para lo cual, se utilizaron los primers Cm_fwd y Ori_rev; la temperatura de Anneling determinada luego de realizar un gradiente fue de 66°C. La concentración del fragmento Cm+Ori fue de 34.9ng/ μl .

Tratamiento A

El volumen final de la reacción se mantuvo en 10 μl , distribuidos de la siguiente manera:

- 2 μl de Buffer de reacción 5X
- 1 μl de Mix de enzima 10X
- 20 ng de vector (0.57 μl)
- 134.3 ng de inserto (2.1 μl)

- 4.33 μ l de Agua ultra pura

Tratamiento B

En este caso el volumen final de la reacción fue de 20 μ l, distribuidos de la siguiente manera:

- 4 μ l de Buffer de reacción 5X
- 2 μ l de Mix de enzima 10X
- 100 ng de vector (2.87 μ l)
- 671.5 ng de inserto (10.53 μ l)
- 0.6 μ l de Agua ultra pura

En ambos tratamientos se mantuvo la relación 2:1 inserto-vector que recomienda el kit, pero se varió la cantidad (ng) tanto del vector como del inserto.

Tratamiento C

Para el tratamiento C, se consideró al fragmento Cm como vector, mientras que los insertos fueron los fragmentos Ori (1908pb) y el fragmento de unión de Cas1+Cas2+Cas3 (9727pb). En este caso se utilizó 30 ng de vector y ambos insertos se colocaron en relación 1:1 con respecto al vector. El volumen final de la reacción fue de 10 μ l distribuidos de la siguiente manera:

- 2 μ l de Buffer de reacción 5X
- 1 μ l de Mix de enzima 10X
- 30 ng de vector Cm (0.15 μ l)
- 295 ng de inserto Ori (5 μ l)
- 57.8 ng de inserto (0.35 μ l)
- 1.5 μ l de Agua ultra pura

De la misma manera que en los ensayos anteriores, el tiempo de incubación de la reacción se mantuvo en 45 minutos y posteriormente se recogió 10 µl del plásmido resultante y se clonó en la cepa DH10B de *Escherichia coli*.

Comprobaciones

Para verificar si la reacción de Gibson tuvo éxito y se unieron todas las partes que conforman el plásmido de interés, se emplearon dos tipos de comprobaciones. La primera fue realizar Colony PCR, para lo cual se utilizaron los primers Cas3_fwd y Ori_rev, cuyo fragmento esperado fue de 4872 pb.

Otra forma de confirmar el ensamblaje del plásmido, fue mediante enzimas de restricción. Se eligieron dos enzimas que presentaban un solo corte dentro del plásmido: Sall y KpnI, de esta manera se esperaba obtener dos fragmentos, uno de 8449 pb y otro de 4174pb. Adicionalmente se utilizó la enzima SacI, que corta dentro del fragmento vector, es decir, de la unión de la resistencia al antibiótico y el origen de replicación, para verificar si las colonias obtenidas eran producto de una recircularización de dicho vector.

Capítulo 3: Resultados

Caracterización microbiológica de *Burkholderia sacchari*

Las pruebas de oxidasa y catalasa realizadas a las dos cepas de *Burkholderia sacchari* (Tabla 6), reflejaron lo siguientes resultados:

Tabla 6

Resultados de las pruebas de catalasa y oxidasa de las cepas S019 y S0220 de B. sacchari.

Código	Microorganismo	Catalasa	Oxidasa
UTE_PM_S019	<i>Burkholderia sacchari</i>	Positivo	Negativo
UTE_EM_S020	<i>Burkholderia sacchari</i>	Positivo	Positivo

Las pruebas se realizaron por triplicado, obteniéndose el mismo resultado en cada una de ellas. Por lo tanto, se decidió continuar los demás ensayos con la cepa S020 puesto que se conoce de ante mano que *Burkholderia sacchari* es positiva para catalasa y oxidasa (Brämer, Vandamme, Da Silva, Gomez, & Steinbüchel, 2001) .

Los datos obtenidos correspondientes a la curva de crecimiento (Tabla 7) del microorganismo *Burkholderia sacchari* cultivada a 30°C en medio liquido BHI, se detalla a continuación:

Tabla 7

Valores de absorbancia a 600nm del cultivo de la cepa S020 de Burkholderia sacchari a 30 °C.

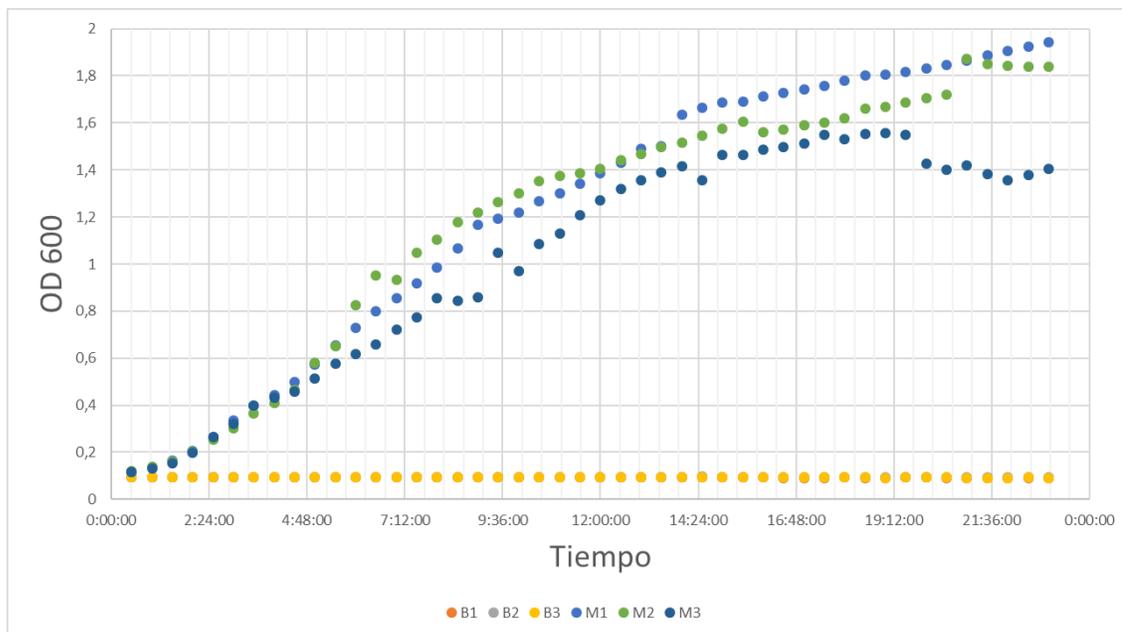
Tiempo	Temperatura (°C)	B1	B2	B3	M1	M2	M3
0:29:44	30	0,094	0,094	0,094	0,118	0,121	0,118
0:59:44	30	0,094	0,093	0,094	0,135	0,137	0,131
1:29:44	30,1	0,094	0,094	0,094	0,165	0,161	0,154
1:59:44	30,2	0,094	0,094	0,094	0,207	0,201	0,197
2:29:44	30,2	0,094	0,093	0,094	0,263	0,255	0,264
2:59:44	30,2	0,093	0,093	0,093	0,335	0,302	0,321
3:29:44	30,2	0,094	0,093	0,093	0,398	0,365	0,4
3:59:44	30,2	0,093	0,093	0,095	0,444	0,408	0,432
4:29:44	30,3	0,094	0,093	0,093	0,497	0,465	0,458

Tiempo	Temperatura (°C)	B1	B2	B3	M1	M2	M3
4:59:44	30,3	0,093	0,093	0,093	0,574	0,581	0,514
5:29:44	30,3	0,093	0,093	0,093	0,655	0,651	0,577
5:59:44	30,3	0,093	0,093	0,093	0,73	0,824	0,617
6:29:44	30,2	0,093	0,093	0,093	0,799	0,953	0,659
6:59:44	30,2	0,093	0,093	0,093	0,854	0,933	0,723
7:29:44	30,2	0,093	0,093	0,093	0,919	1,048	0,775
7:59:44	30,2	0,093	0,093	0,093	0,986	1,105	0,855
8:29:44	30,2	0,093	0,093	0,093	1,067	1,178	0,845
8:59:44	30,2	0,093	0,093	0,093	1,167	1,219	0,857
9:29:44	30,2	0,093	0,093	0,093	1,194	1,263	1,047
9:59:44	30,2	0,093	0,093	0,093	1,219	1,3	0,969
10:29:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,268	1,351	1,086
10:59:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,302	1,374	1,131
11:29:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,343	1,386	1,209
11:59:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,387	1,406	1,272
12:29:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,432	1,44	1,32
12:59:44	30,1	0,093	0,094	0,093	1,489	1,468	1,356
13:29:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,5	1,497	1,391
13:59:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,633	1,517	1,416
14:29:44	30,1	0,093	0,098	0,093	1,666	1,547	1,355
14:59:44	30,1	0,093	0,095	0,093	1,687	1,577	1,463
15:29:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,692	1,604	1,463
15:59:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,711	1,56	1,488
16:29:44	30,1	0,092	0,093	0,093	1,727	1,57	1,499
16:59:44	30,1	0,092	0,093	0,094	1,741	1,589	1,511
17:29:44	30,1	0,092	0,093	0,093	1,756	1,6	1,548
17:59:44	30,1	0,093	0,093	0,093	1,78	1,619	1,53
18:29:44	30,1	0,092	0,093	0,093	1,8	1,662	1,552
18:59:44	30,1	0,092	0,093	0,092	1,807	1,667	1,556
19:29:44	30,1	0,093	0,093	0,094	1,816	1,687	1,551
19:59:44	30,1	0,093	0,093	0,095	1,832	1,706	1,428
20:29:44	30,1	0,092	0,093	0,093	1,845	1,719	1,401
20:59:44	30,1	0,092	0,093	0,092	1,863	1,873	1,42
21:29:44	30,1	0,092	0,093	0,092	1,888	1,849	1,383
21:59:44	30,1	0,092	0,093	0,092	1,905	1,841	1,356
22:29:44	30,1	0,092	0,093	0,093	1,923	1,837	1,38
22:59:44	30,2	0,092	0,093	0,092	1,942	1,839	1,406

Nota: Esta tabla muestra las mediciones de absorbancia a 600nm en intervalos de 30 minutos, de tres blancos (B1, B2 y B3) y de tres repeticiones de una muestra tomada de la cepa S020 (M1, M2 y M3)

Figura 6

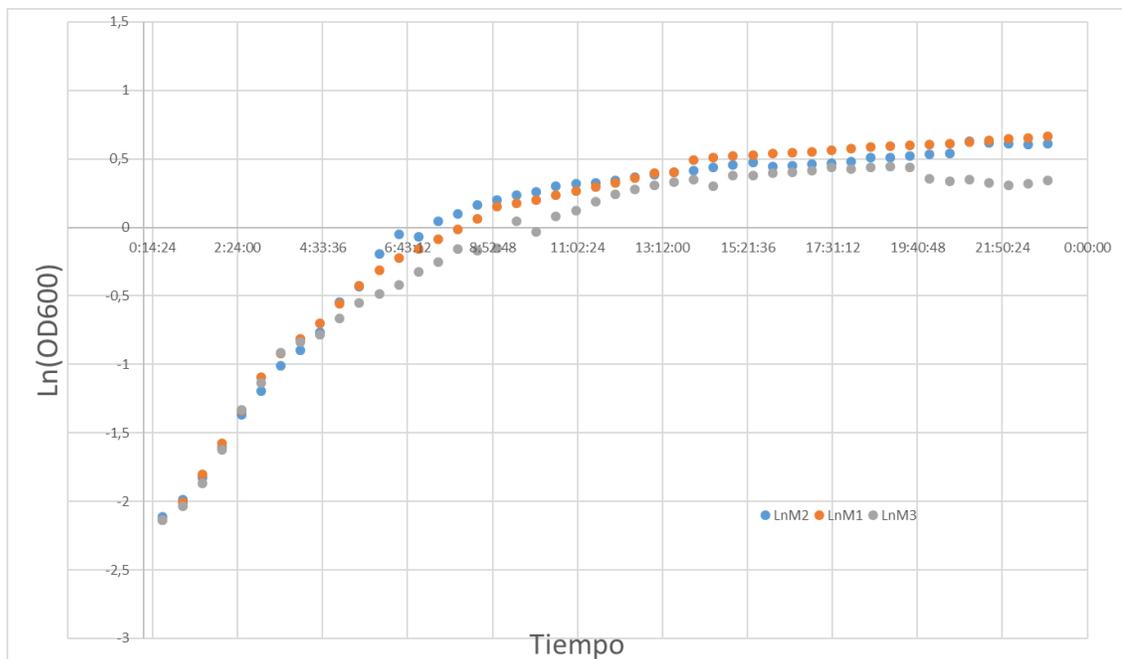
Curva de crecimiento *Burkholderia sacchari*, cepa S020.



Nota: Los datos obtenidos son a partir de un cultivo realizado a 30°C. El eje Y representa los valores de las absorbancias medidas a 600nm y el eje X representa el tiempo en intervalos de 30 minutos. Los puntos amarillos indican los valores de los blancos (B) y los puntos de colores verde y azul indican los valores de las 3 muestras tomadas (M). Imagen generada en el software Microsoft® Excel 2016.

Figura 7

Curva del logaritmo natural de los valores de absorbancia a 600nm versus el tiempo.



Nota: El eje Y representa el logaritmo natural de los valores de absorbancia a 600nm. El eje X representa el tiempo en intervalos de 30 minutos. La gráfica de puntos color naranja representa los valores de la muestra 1 (LnM1), en azul los valores de la muestra 2 (LnM2) y en gris los valores de la muestra 3 (LnM3). Imagen generada en el software Microsoft® Excel 2016.

Tabla 8

Valores cinéticos de la cepa S020 del organismo *Burkholderia sacchari* a 30 °C.

Tiempo	Pendiente LnM1	Pendiente LnM2	Pendiente LnM3
0:30:00	6,460	5,961	5,017
1:00:00	9,632	7,748	7,764
1:30:00	10,885	10,651	11,820
2:00:00	11,493	11,422	14,052
2:30:00	11,615	8,120	9,384
3:00:00	8,271	9,095	10,561
3:30:00	5,250	5,346	3,694
4:00:00	5,413	6,277	2,805
4:30:00	6,914	10,690	5,537
5:00:00	6,336	5,460	5,550
5:30:00	5,204	11,312	3,217

Tiempo	Pendiente LnM1	Pendiente LnM2	Pendiente LnM3
6:00:00	4,335	6,981	3,161
6:30:00	3,195	-1,018	4,449
7:00:00	3,521	5,579	3,334
7:30:00	3,378	2,542	4,715
8:00:00	3,790	3,071	-0,565
8:30:00	4,300	1,642	0,677
9:00:00	1,098	1,702	9,612
9:30:00	0,995	1,386	-3,716
10:00:00	1,892	1,847	5,472
10:30:00	1,270	0,810	1,949
11:00:00	1,488	0,417	3,201
11:30:00	1,547	0,688	2,438
12:00:00	1,533	1,147	1,778
12:30:00	1,874	0,924	1,292
13:00:00	0,353	0,939	1,223
13:30:00	4,078	0,637	0,855
14:00:00	0,960	0,940	-2,114
14:30:00	0,601	0,922	3,681
15:00:00	0,142	0,815	0,000
15:30:00	0,536	-1,335	0,813
16:00:00	0,447	0,307	0,354
16:30:00	0,388	0,577	0,383
17:00:00	0,412	0,331	1,161
17:30:00	0,652	0,567	-0,561
18:00:00	0,536	1,258	0,685
18:30:00	0,186	0,144	0,124
19:00:00	0,238	0,572	-0,154
19:30:00	0,421	0,538	-3,966
20:00:00	0,339	0,364	-0,916
20:30:00	0,466	4,118	0,647
21:00:00	0,640	-0,619	-1,267
21:30:00	0,430	-0,208	-0,946
22:00:00	0,451	-0,104	0,842
22:30:00	0,472	0,052	0,896

Nota: En esta tabla se muestran los valores de las pendientes calculadas a partir de logaritmo natural de la absorbancia a 600nm perteneciente a cada muestra de *B. sacchari* (LnM) versus el tiempo. En verde se destaca su fase exponencial. En naranja se señala su fase estacionaria y en amarillo se fase de muerte.

Tras el análisis de los datos obtenidos a partir de la curva de crecimiento de *B. sacchari* incubada en medio líquido BHI sin adición de ningún sustrato (Figura 6), y la logaritmicación de dichos datos (Figura 7), podemos observar que la fase de crecimiento exponencial de este microorganismo empieza alrededor de las tres horas y media de cultivo y finaliza a las ocho horas y media (Tabla 8) es decir que, *B. sacchari* requiere de un tiempo de adaptación de tres horas aproximadamente.

Diseño in silico del plásmido para la expresión de la proteína Cas9 en *Burkholderia sacchari*

Una vez definidos los componentes que van a conformar el plásmido de expresión de la proteína Cas9 y sus primers con los respectivos overhangs, se procedió a realizar una simulación de la reacción de Gibson con la ayuda de los softwares en línea Benchling® y SnapGene®. El resultado fue un plásmido de 12623 pb (Figura 8), que contiene la proteína Cas9, el marcador de resistencia a cloranfenicol y el origen de replicación.

Estandarización de PCR con Platinum™ Taq DNA Polimerasa. Los volúmenes de reacción utilizados para ensamblar los diferentes masters mix (Tabla 9) y las condiciones de PCR (Tabla 10) que se utilizaron con la taq polimerasa de la marca Platinum™ para cada fragmento se detallan a continuación:

Tabla 9

Volúmenes de reacción para las PCR de los fragmentos; Cas1, Cas2, Cas3, ORI y Cm con Platinum™ Taq DNA Polimerasa

Componentes	Volumen de reacción (µl)
Agua	26,8
Buffer	5
MgCl	1,5
Dntp's	1
Betaina	10
DMSO	1,5
primer_fwd	1
primer_rev	1
Taq Platinum	0,3
ADN	1 (20 ng/ µl)

Tabla 10

Condiciones de PCR de los fragmentos: Cas1, Cas2, Cas3, ORI y Cm con Platinum™ Taq DNA Polimerasa

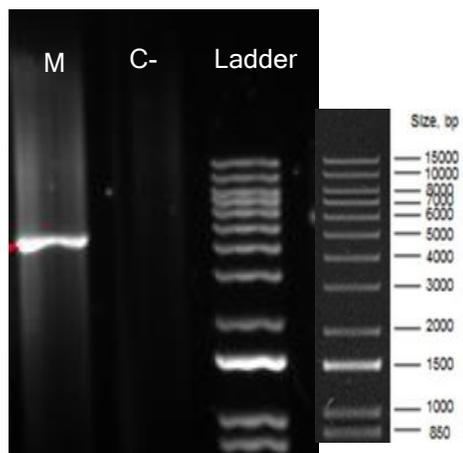
	Cas1		Cas2		Cas3		ORI		Cm	
	°C	s	°C	s	°C	s	°C	s	°C	s
Desnaturalización inicial	94	120	94	120	94	120	94	120	94	120
Desnaturalización	94	30	94	30	94	30	94	30	94	30
Anneling	50	30	55	30	50	30	60	30	55	30
Extensión	72	330	72	200	72	120	72	120	72	60
Ciclos	x35									
Extensión final	72	900	72	600	72	360	72	360	72	180

Amplificación del fragmento Cas1.

Figura 9

Comprobación de la amplificación del fragmento Cas1(4559pb) a Ta=50°C con Platinum

™ Taq DNA Polimerasa.



Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

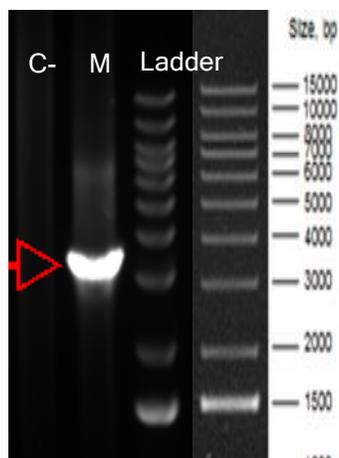
Se observa la presencia de una banda de 4559pb (Figura 9) perteneciente al fragmento Cas1, no se evidenciaron fragmentos inespecíficos y el control negativo no amplificó.

Amplificación del fragmento Cas2.

Figura 10

Comprobación de la amplificación del fragmento Cas2(3232pb) a Ta=55°C con Platinum

™ Taq DNA Polimerasa.



Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

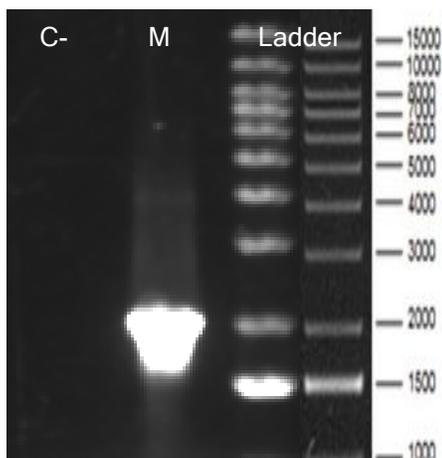
En la Figura 10 se puede apreciar una banda intensa de 3.2 kb que corresponden al tamaño del fragmento de PCR Cas2, no existe amplificación del control negativo, pero si se puede observar una ligera banda inespecífica con tamaño de 6.5 kb.

Amplificación del fragmento Cas3.

Figura 11

Comprobación de la amplificación del fragmento Cas3(1968pb) a Ta=50°C con Platinum

™ Taq DNA Polimerasa.



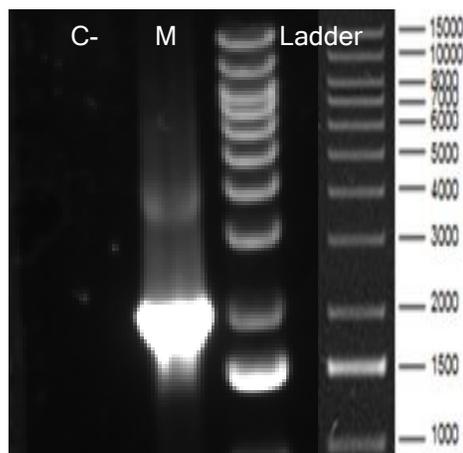
Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

Se puede evidenciar una banda intensa correspondiente al fragmento de interés Cas3 de tamaño igual a 1968pb (Figura 11). No se observan bandas inespecíficas ni amplificación del control negativo.

Amplificación del fragmento ORI.

Figura 12

Comprobación de la amplificación del fragmento Ori(1908pb) a Ta=60°C con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.



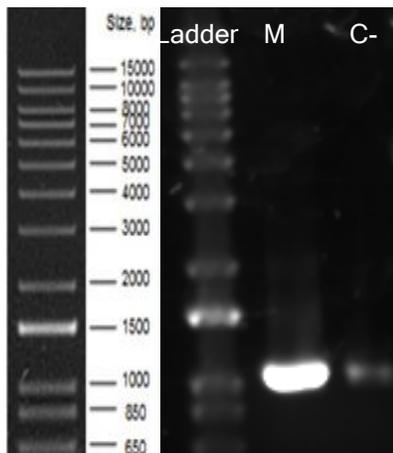
Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

En la Figura 12 se muestra una banda intensa correspondiente al fragmento de interés Ori(1908pb), además se observa una banda inespecífica de aproximadamente 3500pb. El control negativo no amplificó.

Amplificación del fragmento Cm.

Figura 13

Comprobación de la amplificación del fragmento Cm (989pb) a Ta=55°C con Platinum™ Taq DNA Polimerasa.

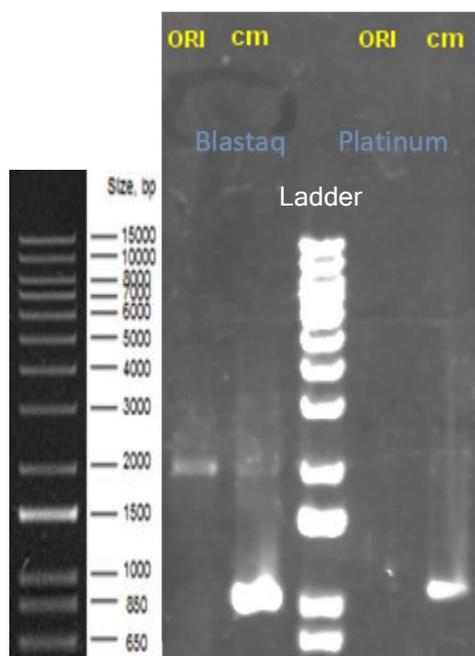


Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

En la Figura 13 se muestra una banda intensa que corresponde al fragmento de interés de 989pb, pero también se aprecia que el control negativo amplificó en el mismo tamaño de banda, por lo que se procedió a realizar una prueba de controles negativos. Para la prueba de controles negativos se decidió amplificar los fragmentos Ori y Cm utilizando solo primers y sin añadir ADN template. Se utilizaron 2 taq DNA polimerasa: Platinum™ y Blastaq™, siendo esta última una polimerasa de alta fidelidad, pero de bajo costo perteneciente a la empresa ABM®.

Figura 14

Prueba de controles negativos de los fragmentos Ori(1908pb) y Cm (989pb) con Blastaq™ y Platinum™ Taq DNA Polimerasa.



Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. A la izquierda del ladder se encuentran los controles negativos de ORI y Cm con la enzima Blastaq™. Y a la derecha del ladder los controles negativos de ORI y Cm con la enzima Platinum™.

La polimerasa Blastaq™ amplificó los controles negativos correspondientes a los fragmentos Ori y Cm, mientras que la polimerasa Platinum™ amplificó solo el control negativo del fragmento Cm (Figura 14). Por lo tanto, se procedió a resuspender los primers de todos los fragmentos, el stock de agua y Dntp's para evitar futuras contaminaciones.

Amplificación de los fragmentos de interés mediante PCR con Phusion™ DNA

Polimerasa. Una vez determinadas las condiciones de PCR de cada fragmento de interés, se procedió a amplificar dichos fragmentos con la polimerasa de alta fidelidad Phusion™. De la misma manera, en la Tabla 11 se detallan los volúmenes de reacción empleados y en la Tabla 12 las condiciones aplicadas para realizar las PCR con Phusion™ DNA Polimerasa.

Tabla 11

Volúmenes de reacción para PCR de los fragmentos; Cas1, Cas2, Cas3, ORI y Cm con Phusion™ DNA Polimerasa

Componentes	Volumen de reacción (µl)
Agua	20
Buffer	10
Dntp's	1
Betaina	10
DMSO	1,5
primer_fwd	2,5
primer_rev	2,5
Taq Phusion	0,5
ADN	1(20 ng/ µl)

Tabla 12

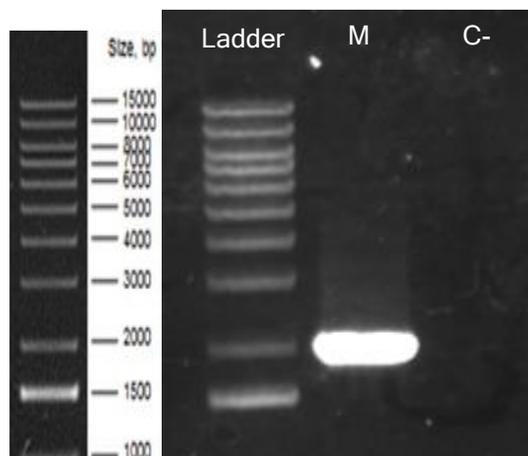
Condiciones de PCR de los fragmentos; Cas1, Cas2, Cas3, ORI y Cm con Phusion™ DNA Polimerasa

	Cas1		Cas2		Cas3		ORI		Cm	
	°C	s	°C	s	°C	s	°C	s	°C	s
Desnaturalización inicial	98	30	98	30	98	30	98	30	98	30
Desnaturalización	98	10	98	10	98	10	98	10	98	10
Anneling	50	30	50	30	50	30	60	30	60	30
Extensión	72	150	72	90	72	60	72	60	72	30
Ciclos	x35									
Extensión final	72	450	72	180	72	180	72	180	72	90

Amplificación del fragmento Ori.

Figura 15

Amplificación del fragmento Ori (1908pb) a $T_a=60^{\circ}\text{C}$ con Phusion™ Taq DNA Polimerasa



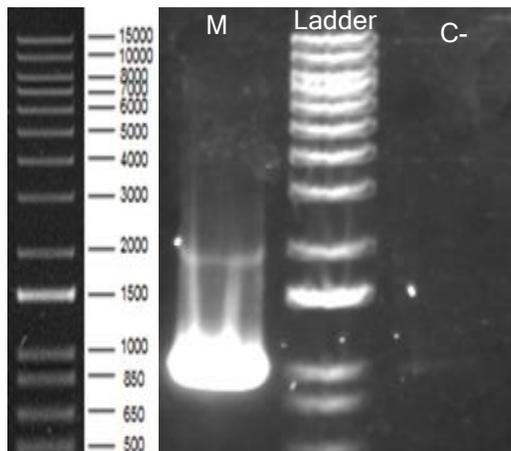
Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

Se confirma la amplificación del fragmento Ori (Figura 15) utilizando la enzima polimerasa de alta fidelidad, por lo tanto se realizaron 3 reacciones adicionales para alcanzar una concentración alta del amplicón.

Amplificación del fragmento Cm.

Figura 16

Amplificación del fragmento Cm (989pb) a Ta=60°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.



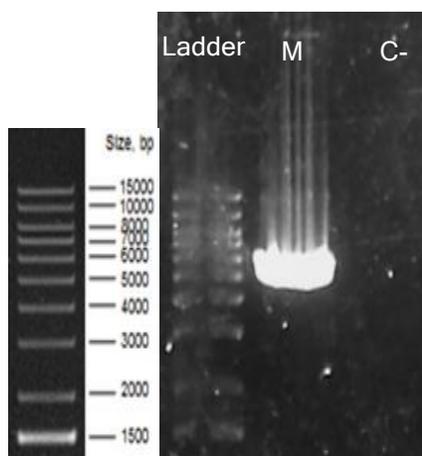
Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

La amplificación del fragmento Cm sigue presentando una banda inespecífica de aproximadamente 1900 pb (Figura 16), por lo tanto, se decidió realizar 3 reacciones adicionales para colocarlas en un solo pocillo del gel de agarosa al 7%, realizar la electroforesis y cortar la banda de interés correspondiente a las 989pb.

Amplificación del fragmento Cas1.

Figura 17

Amplificación del fragmento Cas1 (4559pb) a Ta=60°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.



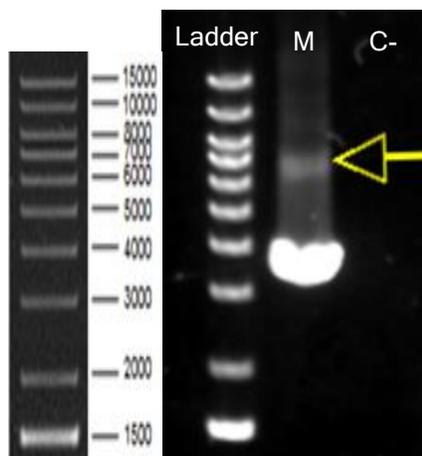
Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

En la amplificación del fragmento Cas1 (Figura 17) con la enzima de alta fidelidad se visualiza una sola banda específica de 4559pb, de modo que se realizaron 3 adicionales para conseguir la mayor concentración de amplicón posible.

Amplificación del fragmento Cas2.

Figura 18

Amplificación del fragmento Cas2 (3232pb) a Ta=55°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.



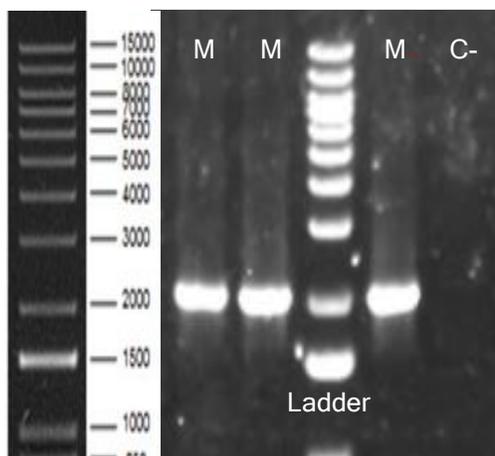
Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

Puesto a que la electroforesis del fragmento Cas2 amplificado con la polimerasa de alta fidelidad (Figura 18) indica una banda inespecífica de 6.5kb (flecha amarilla), se procedió a realizar 3 reacciones adicionales para purificar la banda requerida de 3232 pb directamente del gel de agarosa.

Amplificación del fragmento Cas3.

Figura 19

Amplificación del fragmento Cas3 (1968pb) a Ta=50°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.



Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

La amplificación del fragmento Cas3 no generó bandas inespecíficas, por consiguiente, se realizaron 3 reacciones adicionales para obtener la máxima concentración de amplicón posible. En la visualización del gel de agarosa (Figura 19) se aprecian las 3 reacciones con la banda de 1968pb y el control negativo sin ninguna banda.

Amplificación del fragmento de unión Cas1+Cas2+Cas3.

Tabla 13

Volúmenes de reacción para PCR del fragmento de unión Cas1+Cas2+Cas3 con Phusion™ DNA

Polymerase

Componentes	Volumen de reacción (µl)
Agua	31
Buffer	10
Dntp's	1
DMSO	1,5
Cas1_fwd	2,5
Cas3_rev	2,5
Taq Phusion	0,5

Componentes	Volumen de reacción (μl)
ADN	0,5

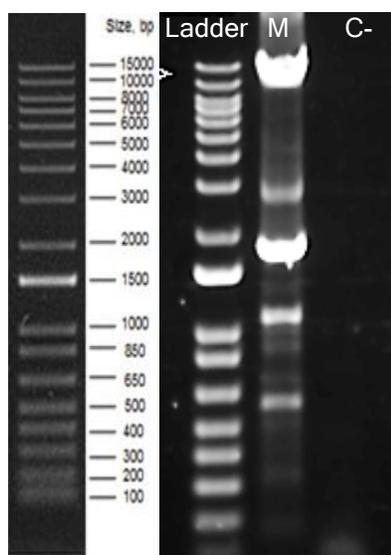
Tabla 14

Condiciones de PCR del fragmento de unión Cas1+Cas2+ Cas3 con Phusion™ DNA Polymerase

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	98	30
Desnaturalización	98	10
Anneling	51	30
Extensión	72	291
Ciclos	x35	
Extensión final	72	873

Figura 20

Comprobación de la amplificación del fragmento de unión Cas1+Cas2+Cas3 (9727pb) a Ta=51°C con Phusion™ Taq DNA Polimerasa.



Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra (M). Control negativo (C-).

La amplificación del fragmento de unión Cas1+Cas2+Cas3 bajo las condiciones establecidas en la Tabla 13 y Tabla 14, generó la aparición de fragmentos inespecíficos y

adicionalmente el fragmento de interés de 9727pb (Figura 20). Con este resultado, se procedió a realizar 3 reacciones adicionales para poder incrementar la concentración y extraer el fragmento objetivo directamente desde el gel de agarosa.

Amplificación del fragmento unión Cm+Ori. Para amplificar el fragmento de unión Cm+Ori, primero se realizó un gradiente de 5 reacciones de PCR, desde 65°C hasta 70°C, para determinar la temperatura de Anneling. El resultado indicó que la temperatura optima de Anneling es de 66°C, aunque también se evidenciaron fragmentos inespecíficos (resultados no mostrados), por lo tanto, se procedió a realizar cuatro reacciones adicionales para obtener la máxima concentración de amplicón posible del fragmento de unión Cm+Ori (2912pb) y poder extraerlo directamente del gel de agarosa. A continuación, se indican los volúmenes de reacción (*Tabla 15*) y las condiciones empleadas (*Tabla 16*) para la amplificación de dicho fragmento:

Tabla 15

Volúmenes de reacción para PCR del fragmento de unión Cm+Ori con Phusion™ DNA Polymerase

Componentes	Volumen de reacción (µl)
Agua	62
Buffer	20
Dntp's	2
DMSO	3
Cm_fwd	5
Ori_rev	5
Taq Phusion	1
ADN	0,5

Tabla 16

Condiciones de PCR del fragmento de unión Cm+Ori con Phusion™ DNA Polymerase

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	98	30
Desnaturalización	98	10
Anneling	66	30
Extensión	72	90
Ciclos		x35

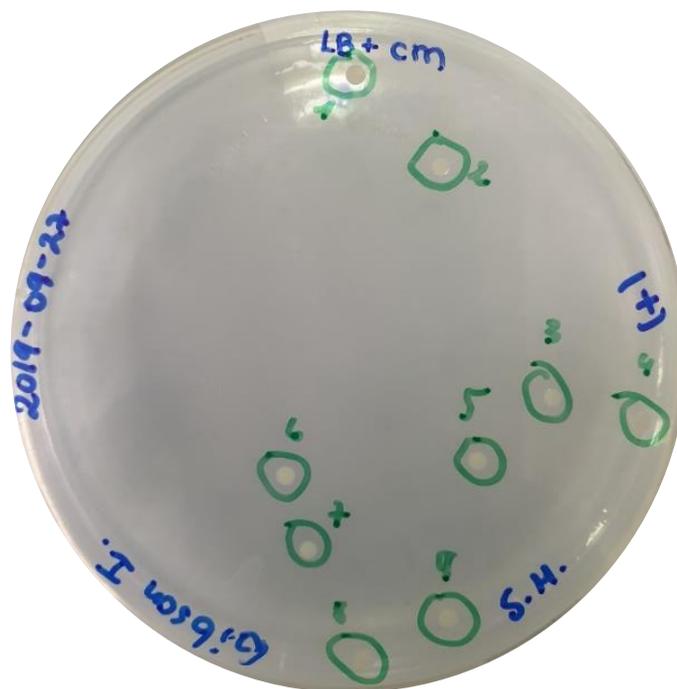
	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Extensión final	72	270

Resultados de las reacciones Gibson

Primer Ensayo. Como resultado del primer ensayo se obtuvieron nueve colonias aisladas de morfología y tamaño uniforme (Figura 21). No se observó el crecimiento de colonias en el control negativo (Figura 22).

Figura 21

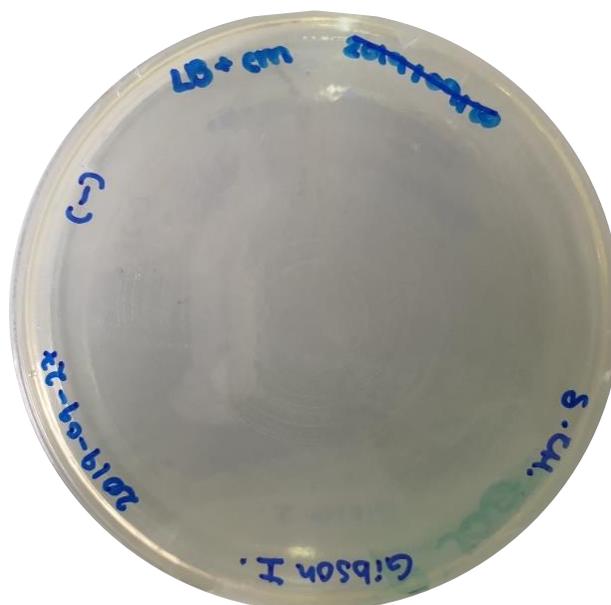
Mutante de Escherichia coli, cepa DH10B con plásmido resultante del primer ensayo de la reacción de Gibson.



Nota: Cultivo realizado en medio LB agar con cloranfenicol

Figura 22

Control negativo del primer ensayo de la reacción de Gibson.



Nota: Cultivo realizado en medio LB agar con cloranfenicol

Para confirmar que las nueve colonias obtenidas en el primer ensayo contengan el plásmido de expresión de la proteína Cas9, se realizó un cultivo líquido de cada colonia en 5ml de medio BHI con 5 μ l de cloranfenicol. Se incubó por 24 horas a 37°C y se procedió a extraer dicho plásmido con la ayuda del kit ZR Plasmid Miniprep™ -Classic.

Posteriormente a la extracción de plásmido, se procedió a cuantificar el ADN presente en cada muestra con ayuda del equipo Cytation™ 5, y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 17).

Tabla 17

Cuantificación del ADN plasmídico mediante el equipo Cytation™ 5

Colonia	Concentración (ng/ μ l)
1	54,8
2	56,2
3	133,6
4	91,3
5	57,2

Colonia	Concentración (ng/ μ l)
6	122,2
7	79,2
8	71,3
9	19,38

Seguidamente al proceso de cuantificación, se efectuó una digestión con las enzimas de restricción Sall y KpnI (Tabla 18) de los plásmidos generados en el primer ensayo de la reacción de Gibson (Figura 22).

Tabla 18

Volumen de reactivos utilizados en la digestión de los plásmidos obtenidos del primer ensayo de la reacción de Gibson

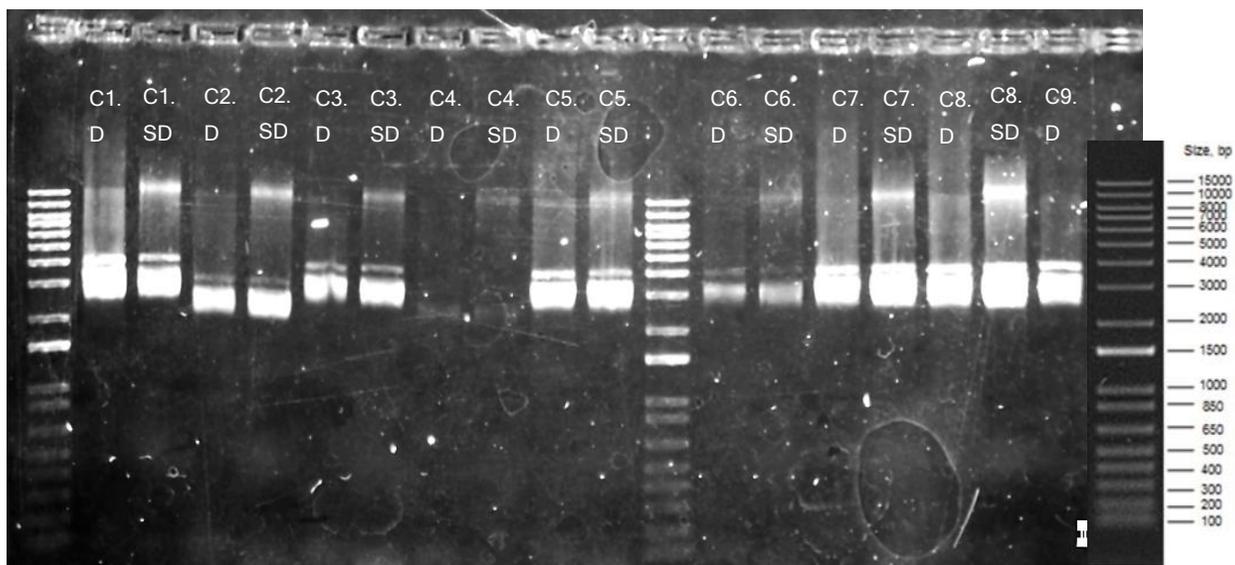
Volumen (μ l)	Coloni a 1	Coloni a 2	Coloni a 3	Coloni a 4	Coloni a 5	Coloni a 6	Coloni a 7	Coloni a 8	Coloni a 9
ADN	9,26	8,9	3,74	5,5	8,7	4,1	6,3	7	17
Agua	7,74	8,1	13,26	11,5	8,3	12,9	10,7	10	0
Buffer	2	2	2	2	2	2	2	2	2
KpnI	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sall	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Nota: Las reacciones de digestión se realizaron a un volumen final de 20 μ l para cada muestra de ADN plasmídico

Figura 23

Digestión de las muestras de ADN plasmídico del primer ensayo mediante enzimas de restricción

Sall y KpnI.



Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra digerida (D). Muestra sin digerir (SD).

Después de realizar la electroforesis y revelar el gel en el transiluminador, se observaron que las muestras digeridas (D) y sin digerir (SD) pertenecientes a la misma colonia tenían un aspecto semejante (Figura 23), esto quiere decir que el plásmido no se digirió. Se esperaba obtener un fragmento de 8449pb y otro de 4174pb, pero no se logró conseguir dicho resultado.

La siguiente comprobación que se realizó fue mediante PCR utilizando los primers Cas3_fwd y Ori_rev (Tabla 20). Debido a que el tamaño del fragmento esperado era de 4872pb, se añadió a la reacción un KB Extender, que por recomendaciones del fabricante se lo puede añadir para amplificar secuencias mayores a 5kb. Se ensambló un master mix de 10 reacciones pertenecientes a las 9 muestras de las colonias obtenidas y el control negativo (Tabla 19).

Tabla 19

Volúmenes de reacción para PCR de confirmación del primer ensayo con Platinum™ DNA

Polimerasa

Componentes	Volumen de reacción (µl)
Agua	201,15
Buffer	27,5
MgCl	8,3
Dntp's	5,5
DMSO	8,3
Cas3_fwd	5,5
Ori_rev	5,5
KB Extender	1,25
Taq Platinum	1,1

Tabla 20

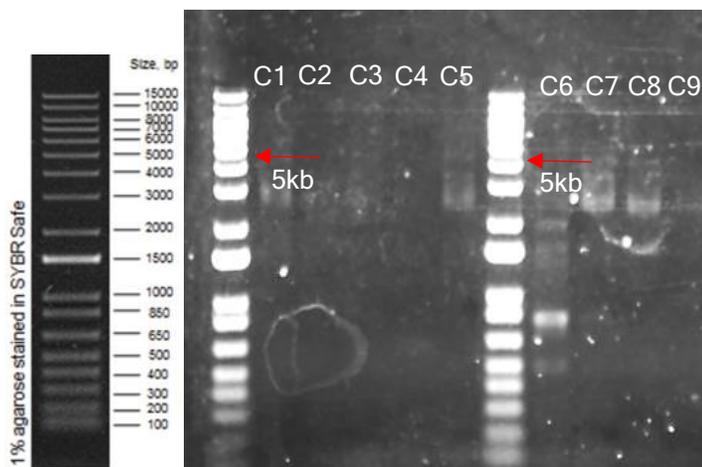
Condiciones de PCR de confirmación del primer ensayo con Platinum™ DNA Polimerasa

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	94	120
Desnaturalización	94	30
Anneling	65	30
Extensión	72	300
Ciclos		x35
Extensión final	72	900

El resultado de la electroforesis en gel de agarosa no fue positivo, puesto que se evidenció que no hubo amplificación del fragmento de interés en ninguna de las nueve muestras que se utilizaron (Figura 24).

Figura 24

Comprobación de la amplificación del fragmento de confirmación (4872pb) del primer ensayo a Ta=65°C con Platinum™ Taq DNA Polymerase.

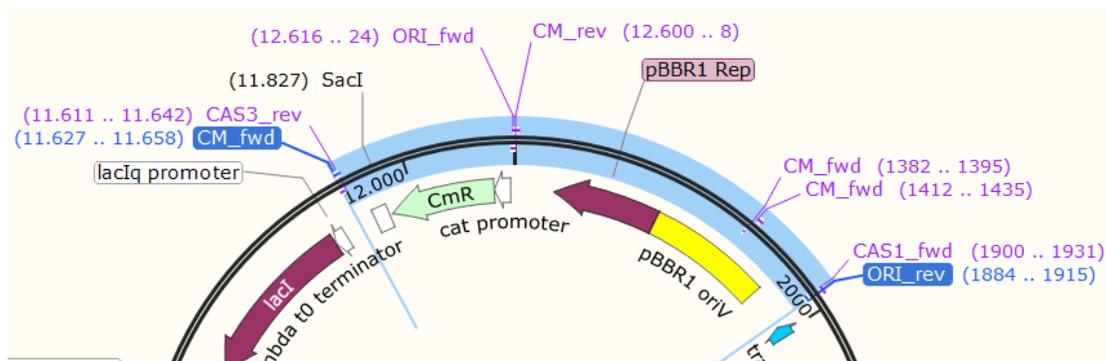


Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Colonia (C).

De manera que las comprobaciones para confirmar la construcción del plásmido de expresión de la proteína Cas9 en su primer ensayo resultaron fallidas, surgió la hipótesis de que las nueve colonias obtenidas en este primer intento, contenían un plásmido recircularizado con el origen de replicación (Ori) y el marcador de resistencia al antibiótico cloranfenicol (Cm), dado que estos dos elementos son fundamentales para promover la replicación y sobrevivencia de la bacteria donde se produjo su clonación.

Figura 25

Selección de los fragmentos de unión Ori+Cm.



Nota: Imagen generada por el software SnapGene®, de la construcción in silico del plásmido de expresión de la proteína Cas9, adaptado para el organismo *Burkholderia sacchari*. (Figura 8)

Para confirmar la hipótesis antes mencionada, se procedió a extraer nuevamente el plásmido de las nueve colonias (Tabla 21) con el objetivo de realizar una digestión con la enzima de restricción SacI (Tabla 22), que sabemos de antemano y gracias al diseño in silico del plásmido, que corta dentro del marcador de resistencia a cloranfenicol (Figura 25).

Tabla 21

Cuantificación del ADN plasmídico mediante el equipo Cytation™ 5

Colonia	Concentración (ng/μl)
1	24,5
2	31,3
3	24,1
4	35,1
5	22,94
6	32,8
7	62,7
8	40,1
9	29,6

Tabla 22

Volumen de reactivos utilizados en la digestión con la enzima SmaI del plásmido obtenido del primer ensayo de la reacción de Gibson.

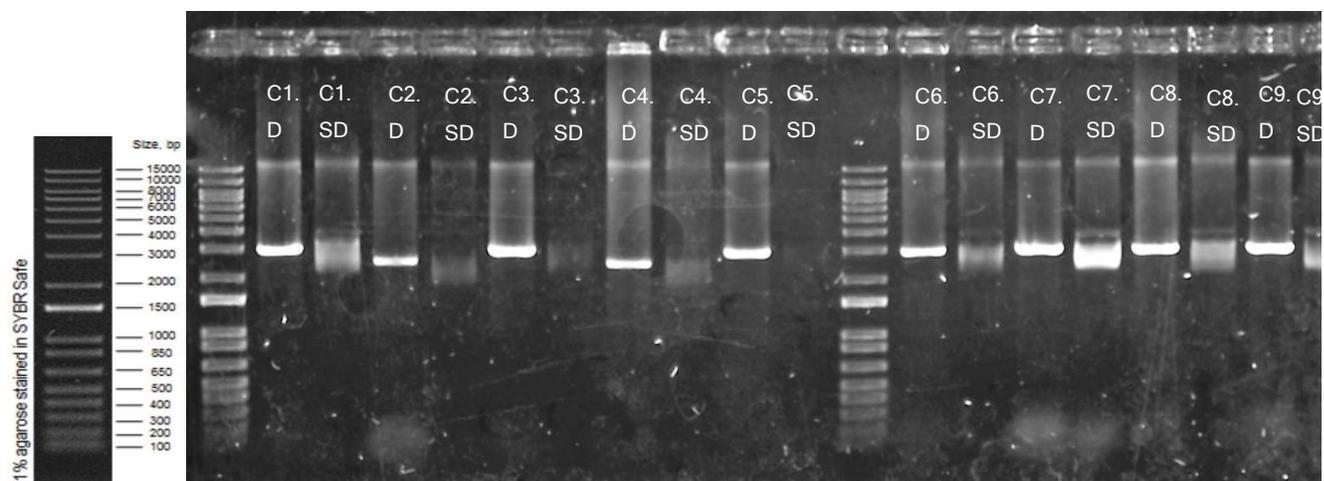
Volumen (μ l)	Coloni a 1	Coloni a 2	Coloni a 3	Coloni a 4	Coloni a 5	Coloni a 6	Coloni a 7	Coloni a 8	Coloni a 9
ADN	17	17	17	17	17	17	14,4	17	17
Agua	0	0	0	0	0	0	2,6	0	0
Buffer	2	2	2	2	2	2	2	2	2
SmaI	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Nota: Las reacciones de digestión se realizaron a un volumen final de 20 μ l para cada muestra de ADN plasmídico

El resultado de la digestión realizada con la enzima SmaI confirma el tamaño esperado de 2912 pb correspondiente a la unión de los fragmentos: Ori extraído del plásmido pBBR5K_RFP y del fragmento Cm obtenido del plásmido pB5C_GFP. Se observa que las muestras digeridas (D) presentan una banda intensa en la posición de 3kb mientras que las muestras sin digerir (SD) no presentan dicha banda, solo se logra evidenciar la presencia del plásmido entero (Figura 26).

Figura 26

Digestión de las muestras de ADN plasmídico del primer ensayo mediante la enzima de restricción SmaI.

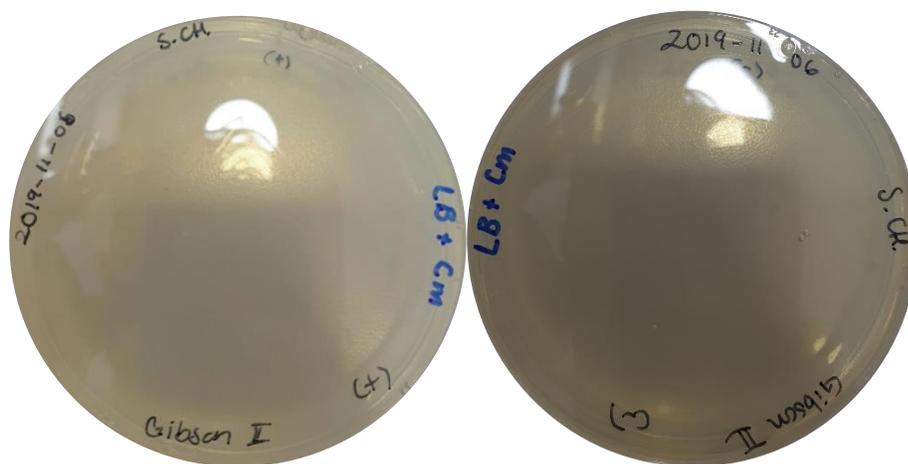


Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra digerida (D). Muestra sin digerir (SD).

Segundo Ensayo. El medio de cultivo del segundo ensayo muestra una ausencia total de colonias al igual que el control negativo (Figura 27). Este resultado puede deberse al incremento de temperatura de incubación de la reacción de Gibson.

Figura 27

Resultado del cultivo del segundo ensayo de la reacción de Gibson

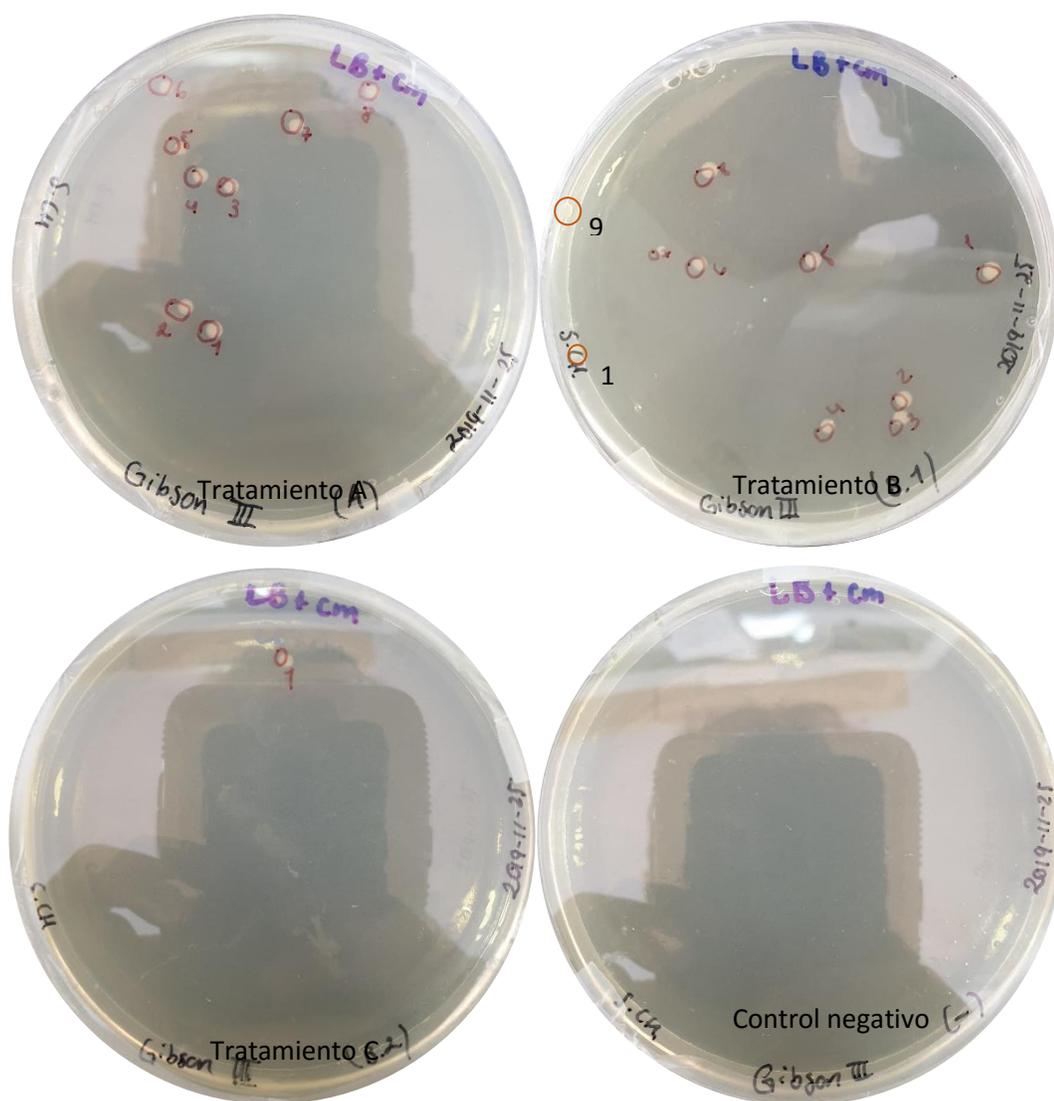


Nota: Cultivo sin crecimiento bacteriano con plásmido resultante del segundo ensayo de la reacción de Gibson (Izquierda). Control negativo sin crecimiento microbiano (Derecha)
Cultivos realizados en medio LB agar con cloranfenicol

Tercer Ensayo. Como resultado del tercer ensayo (Figura 28), en su tratamiento A se consiguió un cultivo con ocho colonias de morfología y tamaño similar. En el tratamiento B se obtuvieron diez colonias de morfología y tamaño uniforme, a excepción de la colonia número siete que es de menor tamaño que el resto. Por su parte, en el tratamiento C, solo se consiguió una sola colonia. En cuanto al control negativo no hubo presencia de crecimiento bacteriano.

Figura 28

Mutantes de Escherichia coli, cepa DH10B con plásmido resultante del tercer ensayo de la reacción de Gibson.



Nota: En orden de izquierda a derecha y de arriba abajo se muestran los tratamientos A, B, C y control negativo. Cultivos realizados en medio LB agar con cloranfenicol.

Así mismo, se efectuaron las confirmaciones correspondientes para verificar la presencia del plásmido de expresión de la proteína Cas9 en las colonias obtenidas del ensayo número tres. Se realizó un mastermix para 21 reacciones (Tabla 23) y se ejecutó una Colony PCR de las 19 muestras resultantes de los tres tratamientos y sus respectivos controles negativos (Tabla 24).

Tabla 23

Volúmenes de reacción para PCR de confirmación del tercer ensayo con Platinum™ DNA

Polimerasa

Componentes	Volumen de reacción (µl)
Agua	426,8
Buffer	55
MgCl	16,5
Dntp's	11
DMSO	16,5
Cas3_fwd	11
Ori_rev	11
Taq Platinum	2,2

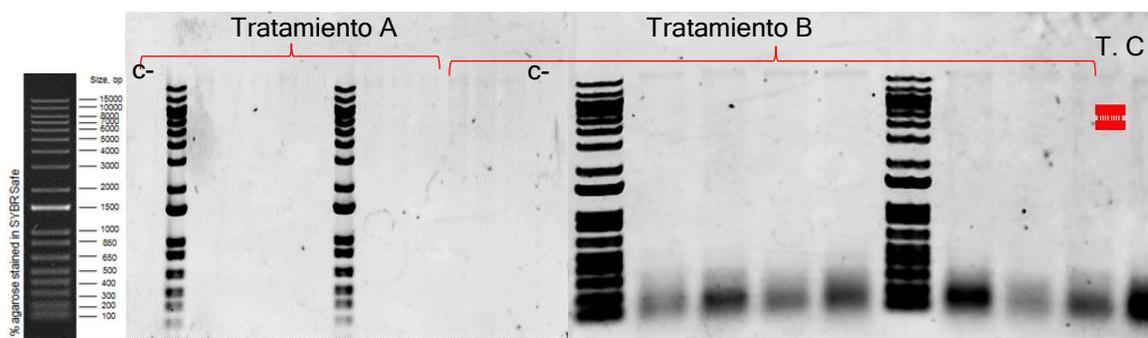
Tabla 24

Condiciones de la PCR de confirmación del tercer ensayo con Platinum™ DNA Polimerasa

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	94	120
Desnaturalización	94	30
Anneling	65	30
Extensión	72	300
Ciclos	x35	
Extensión final	72	900

Figura 29

Comprobación de la amplificación del fragmento de confirmación (4872pb) del tercer ensayo a Ta=65°C con Platinum™ Taq DNA Polymerase.



Nota: Visualización de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. De izquierda a derecha: Tratamiento A, tratamiento B y tratamiento C (T.C.). Control negativo (C-).

No se pudo evidenciar la amplificación del fragmento esperado (4872pb) en ninguna de las 19 muestras obtenidas del ensayo número tres (Figura 29). De tal manera que, para continuar con la confirmación de las colonias por medio de digestión con enzimas de restricción Sall+KpnI y SacI (Tabla 26), se seleccionaron al azar 5 muestras de las 19 en total y se procedió a extraer y cuantificar los plásmidos de las mismas (Tabla 25).

Tabla 25

Cuantificación del ADN plasmídico extraído de 5 colonias del tercer ensayo, mediante el equipo Cytation™ 5

Tratamiento	Colonia	Concentración (ng/μl)
A	1	16,1
A	7	11,4
B	4	5,5
B	8	8,1
C	1	7,9

Tabla 26

Volumen de reactivos utilizados en la digestión con las enzimas Sall+KpnI y SacI de los plásmidos obtenidos del tercer ensayo de la reacción de Gibson.

Volumen (μ l)	Colonia A1	Colonia A7	Colonia B4	Colonia B8	Colonia C1
ADN	17	17	17	17	17
Agua	0	0	0	0	0
Buffer	2	2	2	2	2
SacI	1	1	1	1	1
Sall	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KpnI	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Nota: Las reacciones de digestión se realizaron a un volumen final de 20 μ l para cada muestra de ADN plasmídico. La digestión con la enzima SacI se realizó por separado de la digestión con las enzimas Sall+KpnI.

Figura 30

Digestión de las muestras de ADN plasmídico del tercer ensayo mediante enzimas de restricción



Nota: Digestiones realizadas a 5 muestras tomadas de forma aleatoria del tercer ensayo: Tratamiento A/colonia1 (A1); tratamiento A/colonia 7 (A7); tratamiento B/colonia 4 (B4); tratamiento B/colonia 8 (B8); tratamiento C/colonia 1 (C1). A la izquierda las digestiones de las muestras con las enzimas KpnI+Sall y a la derecha con la enzima SacI. Visualización de la

electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. Muestra digerida (D). Muestra sin digerir (SD).

Las enzimas de restricción KpnI y Sall no digirieron el plásmido de ninguna muestra proveniente del tercer ensayo. Mientras que la enzima SacI si logró digerir el plásmido de las 5 muestras antes mencionadas (Figura 30), obteniendo así una banda de aproximadamente 3000pb que corresponden a la unión de los fragmentos Ori y Cm, cómo se obtuvo en resultados anteriores (Figura 26).

Obtención de clones de *Burkholderia sacchari*, con el plásmido de expresión de la proteína Cas9.

Pruebas de clonación en *Burkholderia sacchari*

Las tres pruebas de clonación realizadas en *B. sacchari* resultaron exitosas. Tomando en cuenta los valores de concentración inicial de los plásmidos de prueba (Tabla 27), en el proceso de transformación se utilizó 2µl del plásmido pA1C_RFP, mientras que de los plásmidos pB5C_GFP y pS5C_GFP solo se usó 1µl de cada uno.

Tabla 27

Cuantificación de los plásmidos: pA1C_RFP, pB5C_GFP, pS5C_GFP con el equipo Cytation™ 5

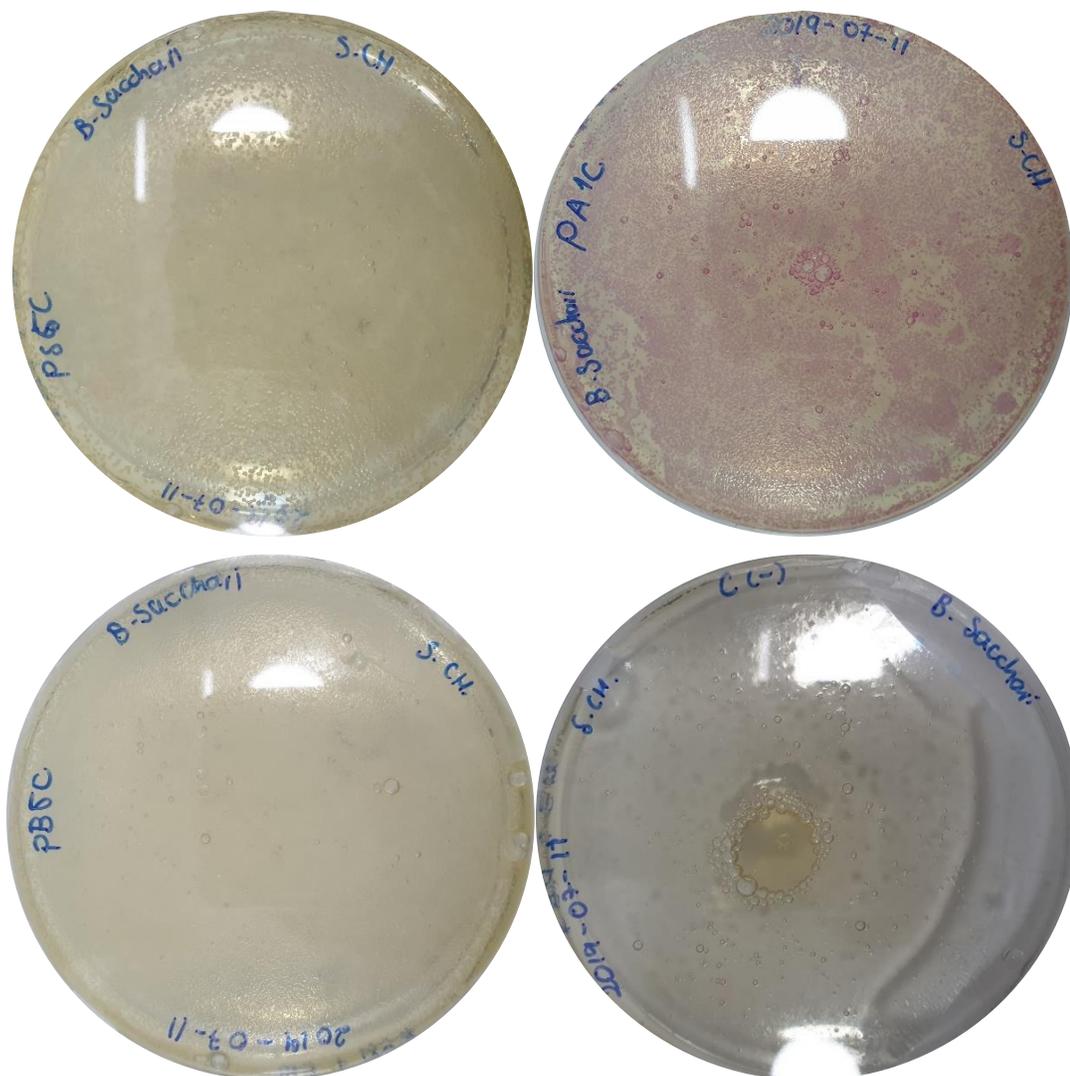
Plásmido	Concentración (ng/µl)	Cantidad de plásmido utilizado (ng)
pA1C_RFP	87,2	174,4
pB5C_GFP	106,5	106,5
pS5C_GFP	133	133

El tiempo de recuperación se determinó gracias al resultado obtenido de la cinética de crecimiento de *B. sacchari* (Tabla 8), es decir, se mantuvo a las células en medio de recuperación durante 4 horas y posteriormente se hizo un plaqueo de las mismas en medio sólido BHI agar junto con los antibióticos kanamicina y cloranfenicol.

Como se puede observar en la Figura 31, el crecimiento de las colonias fue masivo en cada una de las transformaciones realizadas. En el control negativo no se evidenció crecimiento de ninguna colonia. Este resultado nos indica que *B. sacchari* es apta para realizar cualquier tipo de transformación con ADN exógeno.

Figura 31

Pruebas de clonación en Burkholderia sacchari cepa S020



Nota: En orden de izquierda a derecha y de arriba abajo se muestran las clonaciones realizadas con los plásmidos: pS5C_GFP, pA1C_RFP, pB5C_GFP y el control negativo. Cultivos realizados en medio BHI agar con kanamicina y cloranfenicol.

Capítulo 4: Discusión

Caracterización microbiológica de *Burkholderia sacchari*

Las cepas S019 y S020 fueron aisladas e identificadas en Brasil como pertenecientes a la especie *Burkholderia sacchari*. En su registro del laboratorio CENBIO, consta la fecha de almacenamiento como marzo de 2019. En el presente trabajo se decidió realizar las pruebas de catalasa y oxidasa a dichas cepas, para descartar posibles contaminaciones u otros inconvenientes que pudieran presentar. Efectivamente se encontró que la cepa S019 estaba contaminada con algún tipo de microorganismo negativo para oxidasa, mientras que la cepa S020, al dar positivo tanto a catalasa como para oxidasa (Brämer et al., 2001), se supuso que esta se mantenía pura y por lo tanto se continuó desarrollando los ensayos con dicha cepa.

Con los datos obtenidos de la curva de crecimiento de *Burkholderia sacchari* se logró determinar que su tiempo de adaptación en el medio de cultivo BHI es de tres horas aproximadamente, su fase de crecimiento exponencial inicia cerca de las tres horas y media de cultivo y finaliza a las ocho horas y media. Estos análisis se realizaron en base a: “Tutorial de estadísticas: análisis instrumental y calibración” (Stone & Ellis, 2008) y “Cálculo de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano” (Arana, Orruño, & Barcina, 2012). Los valores cinéticos de *Burkholderia sacchari* reportados en este estudio concuerdan con los que se publicaron en “Evaluación del Crecimiento De *Burkholderia sacchari* en Diferentes Azúcares” donde se menciona que los tiempos de adaptación de *B. sacchari* en un cultivo que contiene una sola fuente de carbono son: glucosa (3.0 h), fructosa (5.5 h.- 6.0h.) y sacarosa (3.5h.- 4.0 h.) (Souza, Gonçalves, & Fonseca, 2011). Cabe recalcar que en la composición del medio de cultivo líquido BHI, en donde se realizaron los ensayos cinéticos, tiene aproximadamente 4% de glucosa por litro de agua (Dickinson, 2013).

Diseño y construcción del plásmido para la expresión de la endonucleasa Cas9 mediante el ensamblaje de Gibson.

Los resultados obtenidos en el primer y tercer ensayo de la reacción de Gibson, fueron semejantes. En ambos ensayos se obtuvieron entre ocho y diez colonias aisladas que al analizarlas se pudo notar que la mayoría de ellas contenían el plásmido recircularizado entre los fragmentos Ori+Cm, excluyendo al fragmento de expresión de la proteína Cas9. Este resultado nos indica que el kit de ensamblaje es funcional, ya que logró unir dos de los cinco fragmentos esperados, de modo que nos lleva pensar en otras posibles razones por las cuales no se pudo construir el plásmido de interés mediante la reacción de Gibson.

Pese a que la técnica de ensamblaje de Gibson ha sido reconocida como una herramienta de clonación rápida, eficiente y confiable (Grozdanov & MacDonald, 2015). Los resultados in vivo obtenidos en el presente estudio hacen notar los inconvenientes de utilizar dicho método de construcción. Se han identificado dos desventajas al diseñar y utilizar el ensamblaje de Gibson, primero se debe tomar en cuenta la actividad exonucleasa de la reacción, debido que algunas funcionan de mejor manera con fragmentos amplios y pueden escindir los pedazos de menor tamaño antes de iniciar las etapas de hibridación y polimerización en dicha reacción. Segundo, se debe considerar la formación de estructuras secundarias (horquillas, autodímeros y heterodímeros) en los extremos de los primers utilizados para amplificar y ensamblar los fragmentos de interés, ya que esto competiría de manera directa con las secuencias requeridas (Pyhtila, 2016).

En este estudio no se realizó un análisis previo de las estructuras secundarias de los primers que se utilizaron para llevar a cabo la reacción de Gibson, pudiendo ser la razón de no conseguir la construcción in vivo del plásmido deseado. Sin embargo, si se realizó un análisis posterior de los primers, con ayuda de los softwares en línea: Multiple Primer Analyzer by

Thermo Fisher Scientific™ y OligoAnalyzer by IDT™, donde efectivamente se constató que los primers: Ori_fwd, Cas1_rev y Cas2_fwd forman autodímeros, con valores de energía libre de Gibbs (ΔG°) de: -9.8kcal/mol, -7.55 kcal/mol y -7.31kcal/mol respectivamente, esto quiere decir que los autodímeros se producen de manera espontánea. En cuanto a los heterodímeros, se identificó la formación de 4 estructuras secundarias no deseadas que se producen de manera espontánea, entre los primers: Ori_fwd con Cas3_fwd (-8,2 kcal / mol), Cas1_fwd con Cm_fwd (-7,48 kcal / mol), Cas2_rev con Cas3_rev (-8,7 kcal / mol) y Cas3_rev con Cm_rev (-8,13 kcal / mol). Se han realizado varios estudios donde se demuestra que las estructuras secundarias de cadenas simples de ADN termodinámicamente favorables ($0 < \Delta G^\circ$), afectan las propiedades cinéticas de hibridación de los oligonucleótidos (Gao, Wolf, & Georgiadis, 2006; Schreck et al., 2015).

En consecuencia, para evitar la formación de estructuras secundarias que se crearon a temperatura ambiente, se realizó el segundo ensayo con una temperatura de incubación de 50 °C, pero el resultado fue desfavorable ya que no creció ninguna colonia bacteriana, esto quiere decir que no se ensambló ninguna parte del plásmido o al menos el fragmento que contenía el marcador de resistencia al antibiótico y por esa razón la bacteria no pudo sobrevivir en el medio de cultivo con cloranfenicol (Figura 27). Así mismo, el incremento de temperatura pudo resultar perjudicial para las enzimas del kit de reacción: GeneArt™ Seamless Cloning and Assembly Kit.

Clonación de *Burkholderia sacchari*

En este estudio se comprobó de manera cualitativa que el método de transformación química con RbCl, es eficaz en la transformación de *B. sacchari*, ya que las tres pruebas de clonación que se realizaron fueron exitosas y se obtuvo crecimiento masivo en cada una de ellas. Este resultado corrobora a los obtenidos en el trabajo de investigación de Barreno (2018) donde reportó una eficiencia de clonación de plásmidos BglBricks en *B. sacchari* utilizando el

método de RbCl entre: $3.66 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^6$ UFC/ μg DNA (Barreno, 2018). Aunque en este estudio no se logró construir y en consecuencia clonar el plásmido de expresión de la proteína Cas9, con esta información se sabe que es factible clonar el plásmido antes mencionado de 12623 pares de bases en el microorganismo *Burkholderia sacchari*.

Otro punto a destacar en la clonación de *B. sacchari*, es la correcta selección del origen de replicación. En este estudio se utilizó el origen de replicación de amplio rango de hospedadores: BBR1, procedente de los BglBricks, ya que se ha demostrado alcanzar transformaciones exitosas en *B. sacchari* (Garcez, Cabrera, & Ferreira, 2009). Pero en el estudio realizado por Guamán y colaboradores (2018), obtuvieron resultados negativos al clonar el plásmido pB8k-RFP que contiene el origen de replicación BBR1, por lo que sustituyeron dicho origen de replicación por el del plásmido pBBR1MCS-2 y al plásmido resultante lo denominaron pF8k-RFP cuyo origen de replicación contiene secuencias de importancia en la interacción con la proteína iniciadora de la replicación: DnaA y otras con proteínas relevantes para la replicación y estabilidad del plásmido en bacterias Gram-negativas (Guamán et al., 2018).

Capítulo 5: Conclusiones

- Se encontró que la cepa S019 correspondiente al microorganismo previamente identificado como *Burkholderia sacchari*, se encuentra contaminada con algún microorganismo negativo para oxidasa.
- El análisis cinético de la curva de crecimiento de *Burkholderia sacchari* a 30°C y en medio BHI, describe la fase de adaptación de 3 a 3.5 horas y su fase de crecimiento exponencial se encuentra en el rango de 3.5 a 8.5 horas.
- Se realizó el diseño in silico del plásmido de expresión de la endonucleasa Cas9, capaz de expresarse en *Burkholderia sacchari*.
- La formación de estructuras secundarias durante la reacción de Gibson, dificultaron el ensamblaje del plásmido de expresión de la endonucleasa Cas9.
- No se logró construir in vivo el sistema CRISPR/Cas9 en el organismo no modelo *Burkholderia sacchari*.
- Se comprobó de manera cualitativa la eficiencia de clonación de la bacteria *Burkholderia sacchari*.

Capítulo 6: Recomendaciones

- Se recomienda realizar una identificación molecular de las muestras existentes en el cepario del laboratorio CENBIO de la Universidad UTE, previamente identificadas como pertenecientes a la especie *Burkholderia sacchari*.
- Dentro del diseño in silico de los primers que van a llevar a cabo el ensamble de Gibson, se recomienda realizar un análisis previo de las estructuras secundarias que estos puedan formar.
- Se debe continuar desarrollando herramientas de edición genética para el microorganismo *Burkholderia sacchari*, debido a su gran potencial de producción de moléculas de interés industrial.

Capítulo 7: Bibliografía

Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2012). COMO ABORDAR Y RESOLVER ASPECTOS PRÁCTICOS DE MICROBIOLOGÍA. Retrieved September 4, 2020, from Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea website: https://ocw.ehu.eus/file.php/48/Tema_4._calculo_de_los_parametros_que_definen_el_crecimiento_bacteriano.pdf

Barreno, M. J. (2018). “Desarrollo de herramientas de biología sintética para la bacteria no modelo *Burkholderia sacchari*: Una nueva plataforma para una producción más limpia” (UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO). Retrieved from https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/29053/1/BQ_169.pdf

Brämer, C. O., Vandamme, P., Da Silva, L. F., Gomez, J. G. C., & Steinbüchel, A. (2001). *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(5), 1709–1713. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1709>

Brophy, J. A. N., & Voigt, C. A. (2014). Principles of genetic circuit design. *Nature Methods*, Vol. 11, pp. 508–520. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2926>

Chen, K., & Gao, C. (2013). TALENs: Customizable Molecular DNA Scissors for Genome Engineering of Plants. *Journal of Genetics and Genomics*, *40*(6), 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.03.009>

Dickinson, B. (2013). BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar USO PREVISTO REACTIVOS BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar Fórmula* por litro de agua purificada. *BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar*, p. 1. Retrieved from <http://www.bd.com>

Dietrich, K., Dumont, M.-J., Del Rio, L. F., & Orsat, V. (2019). Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology*, *49*, 161–168. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2018.11.004>

Gao, Y., Wolf, L. K., & Georgiadis, R. M. (2006). Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: A solution versus surface comparison. *Nucleic Acids Research*, *34*(11), 3370–3377. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl422>

Garcez, M., Cabrera, J., & Ferreira, L. (2009). Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. *Canadian Journal of Microbiology*, *55*(8), 1012–1015. <https://doi.org/10.1139/W09-055>

- Geneious. (2020). Gibson Assembly Tutorial. Retrieved August 5, 2020, from Gibson Assembly Learn how to simulate Gibson Assembly in Geneious Prime. For Geneious R10.1 and above. website: <https://www.geneious.com/tutorials/gibson-assembly-10-dot-1-plus/>
- Gibson, D. G. (2011). Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. In *Methods in Enzymology* (Vol. 498, pp. 349–361). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Grozdanov, P. N., & MacDonald, C. C. (2015). Generation of plasmid vectors expressing FLAG-tagged proteins under the regulation of human elongation factor-1 α promoter using Gibson assembly. *Journal of Visualized Experiments*, (96). <https://doi.org/10.3791/52235>
- Guamán, L. P., Barba-Ostria, C., Zhang, F., Oliveira-Filho, E. R., Gomez, J. G. C., & Silva, L. F. (2018). Engineering xylose metabolism for production of polyhydroxybutyrate in the non-model bacterium *Burkholderia sacchari*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0924-9>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hansen, K., Coussens, M. J., Sago, J., Subramanian, S., Gjoka, M., & Briner, D. (2012). Genome editing with CompoZr custom zinc finger nucleases (ZFNs). *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (64), e3304. <https://doi.org/10.3791/3304>
- Huang, H.-H., Camsund, D., Lindblad, P., & Heidorn, T. (2010). Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Research*, 38(8), 2577–2593. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq164>
- Invitrogen™. (2014). GeneArt™ Seamless Cloning and Assembly Kit. Retrieved June 4, 2020, from Publication Number MAN0003222 website: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A13288#/A13288>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>

- Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., & Yang, S. (2015). Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(7), 2506–2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Lee, T. S., Krupa, R. A., Zhang, F., Hajimorad, M., Holtz, W. J., Prasad, N., ... Keasling, J. D. (2011). BglBrick vectors and datasheets: A synthetic biology platform for gene expression. *Journal of Biological Engineering*, *5*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-5-12>
- Lefebvre, M. D., & Valvano, M. A. (2002). Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 5956–5964. <https://doi.org/10.1128/aem.68.12.5956-5964.2002>
- Ouyang, S.-P., Luo, R. C., Chen, S.-S., Liu, Q., Chung, A., Wu, Q., & Chen, G.-Q. (2007). Production of Polyhydroxyalkanoates with High 3-Hydroxydodecanoate Monomer Content by *fadB* and *fadA* Knockout Mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules*, *8*(8), 2504–2511. <https://doi.org/10.1021/bm0702307>
- Pelletier, S. (2017, January 1). CRISPR–Cas9 (S. J. C. R. Hospital, Ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12229-0>
- Pyhtila, B. (2016). Plasmids 101: Gibson Assembly and Other Long-Homology Based Cloning Methods. Retrieved September 2, 2020, from Addgene’s Blog / Post website: <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gibson-assembly>
- Raduan Alexandrino, P. M., Mendonça, T. T., Guamán Bautisa, L. P., Cherix, J., Lozano-Sakalauskas, G. C., Fujita, A., ... Silva, L. F. (2015). Draft genome sequence of the polyhydroxyalkanoate-producing bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 isolated from Brazilian sugarcane plantation soil. *Genome Announcements*, *3*(3). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00313-15>
- Schreck, J. S., Ouldrige, T. E., Romano, F., Šulc, P., Shaw, L. P., Louis, A. A., & Doye, J. P. K. (2015). DNA hairpins destabilize duplexes primarily by promoting melting rather than by inhibiting hybridization. *Nucleic Acids Research*, *43*(13), 6181–6190. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv582>
- Souza, E., Gonçalves, F., & Fonseca, G. (2011). AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BURKHOLDERIA SACCHARI EM DIFERENTES AÇÚCARES EVALUATION OF BURKHOLDERIA SACCHARI GROWTH IN

SEVERAL SUGARS. *II Simpósio Internacional Sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA*, 2, 3.

Stone, D., & Ellis, J. (2008). Estadística en Química Analítica. Retrieved September 4, 2020, from Departamento de Química, Universidad de Toronto website: <https://sites.chem.utoronto.ca/chemistry/coursenotes/analsci/stats/LinPortion.html>

Timmons, J. J., & Densmore, D. (2020). Repository-based plasmid design. *PLoS ONE*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223935>

Tolmasky, M. E. (2017). Plasmids. In *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06917-X>

Yan, Q., & Fong, S. S. (2017). Challenges and Advances for Genetic Engineering of Non-model Bacteria and Uses in Consolidated Bioprocessing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2060. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02060>

You, L., Tong, R., Li, M., Liu, Y., Xue, J., & Lu, Y. (2019). Advancements and Obstacles of CRISPR-Cas9 Technology in Translational Research. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 13, 359–370. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2019.02.008>

Zheng, Y., Chen, J.-C., Ma, Y.-M., & Chen, G.-Q. (2019). Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering*. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2019.07.004>

Capítulo 8: Anexos