



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA BIOTECNÓLOGA**

**Construcción de un vector plasmídico para la edición genética
del promotor del gen RIN4 asociado a la resistencia de
fusariosis en banano.**

Autora: Guamán Cañar, Carolina Sthefanya

Director: Flores Flor, Francisco Javier PhD.

Sangolquí, 29 de agosto del 2023



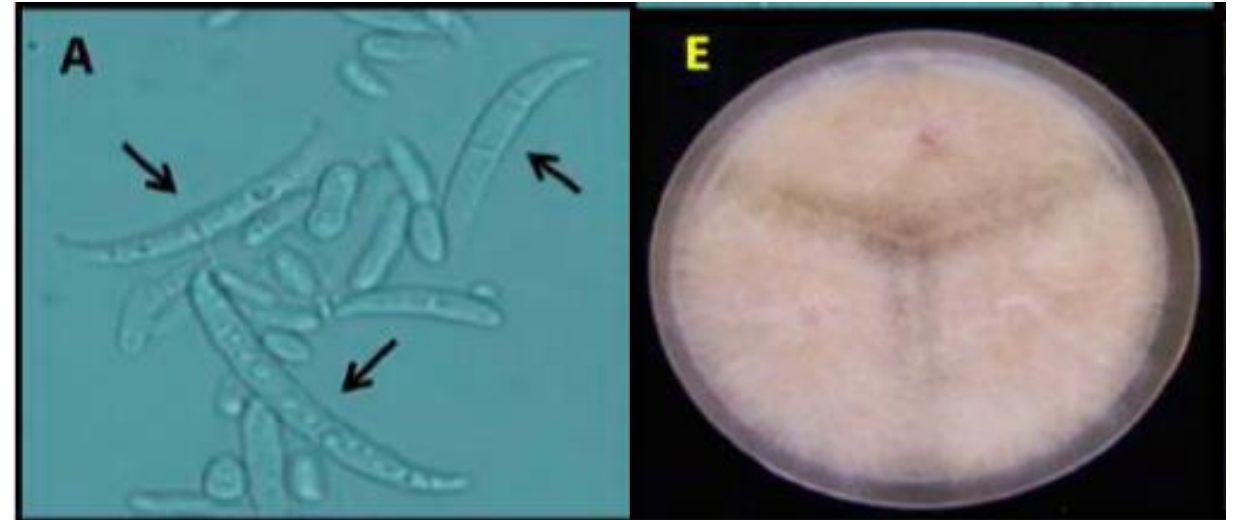
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Cavendish



Musa acuminata

Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* raza tropical 4



Macroconidios

Foc R4T en medio de cultivo
PDA



47% de la producción mundial



PIB Agrícola del 35%

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Estrategias para el combate de FocR4T

Siembra certificada
libre de patógenos

Biofortalecimiento

Herramientas
biotecnológicas

Hibridación de bananos

Mutagénesis

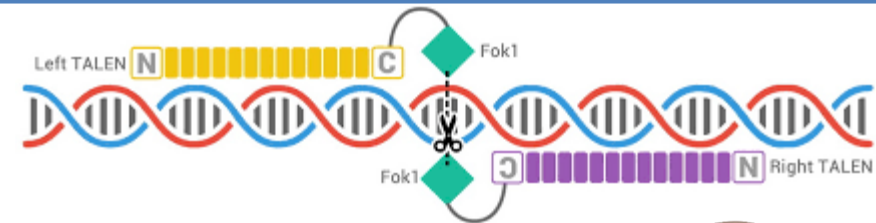
Variación somaclonal

Edición genética

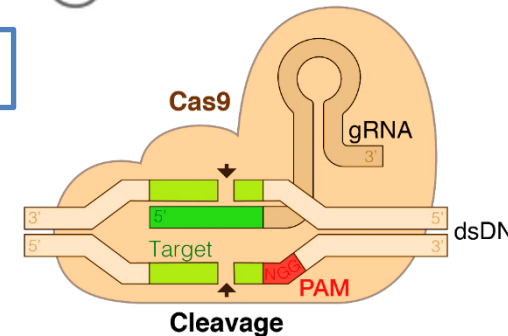
Nucleasas dedos de Zinc (ZFN)



Proteínas efectoras de transcripción TALEN



CRISPR





- Formulación del problema
- Justificación del problema
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

Objetivo General



Construir un vector plasmídico para la edición genética del promotor del gen RIN4 asociado a la resistencia de fusariosis en banano.

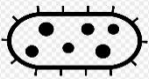
Objetivos Específicos



Diseñar un ARN guía dirigido a los promotores putativos del gen RIN4 de banano, mediante la identificación de sitios conservados de las posibles zonas promotoras utilizando herramientas bioinformáticas.



Ensamblar un plásmido que contenga la secuencia del ARN guía diseñado, una nucleasa y un promotor para monocotiledóneas utilizando clonación modular (MoClo), basada en el método Golden Gate (GG).



Transformar químicamente las cepas Top10, DH5α y JM109 de *Escherichia coli* con el plásmido ensamblado.

Hipótesis

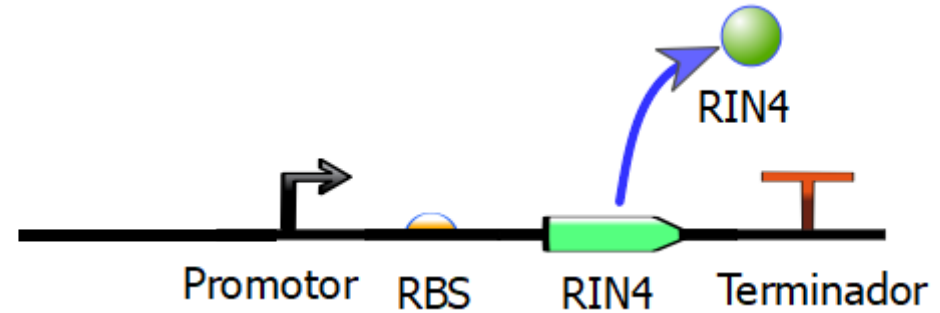
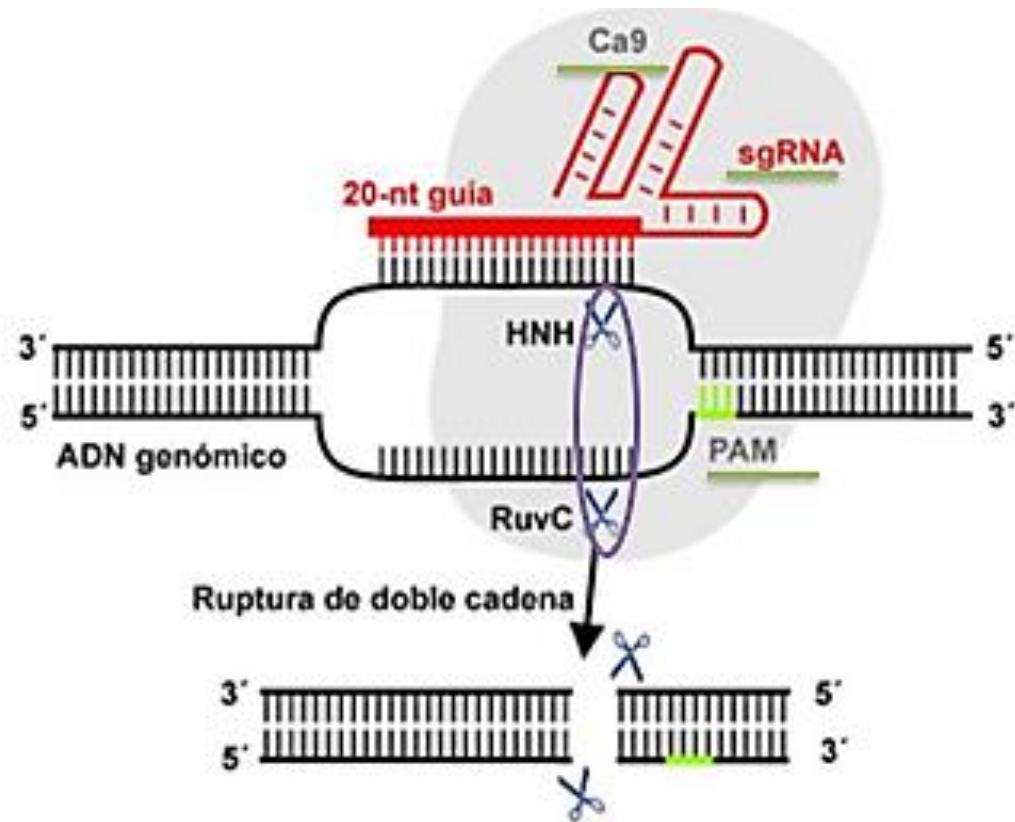


Existen diferencias significativas en la eficiencia de transformación del plásmido ensamblado conteniendo al ARN guía complementario a la región promotora del gen RIN4, en diferentes cepas de *Escherichia coli*.

- H0: Las eficiencias de transformación en las tres cepas evaluadas son similares.
- H1: Las eficiencias de transformación en las tres cepas evaluadas no son similares.



CRISPR Cas9



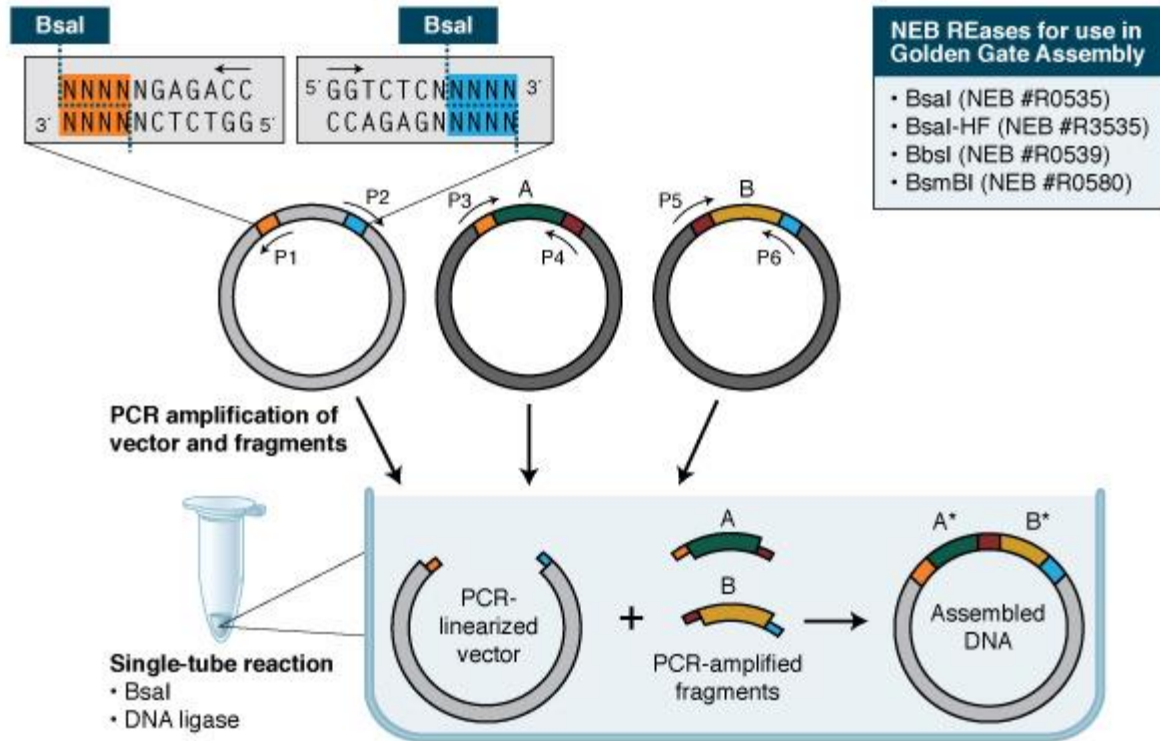
Promotor

- Distancia
- %CG
- Cajas TATA
- TSS

sgRNA

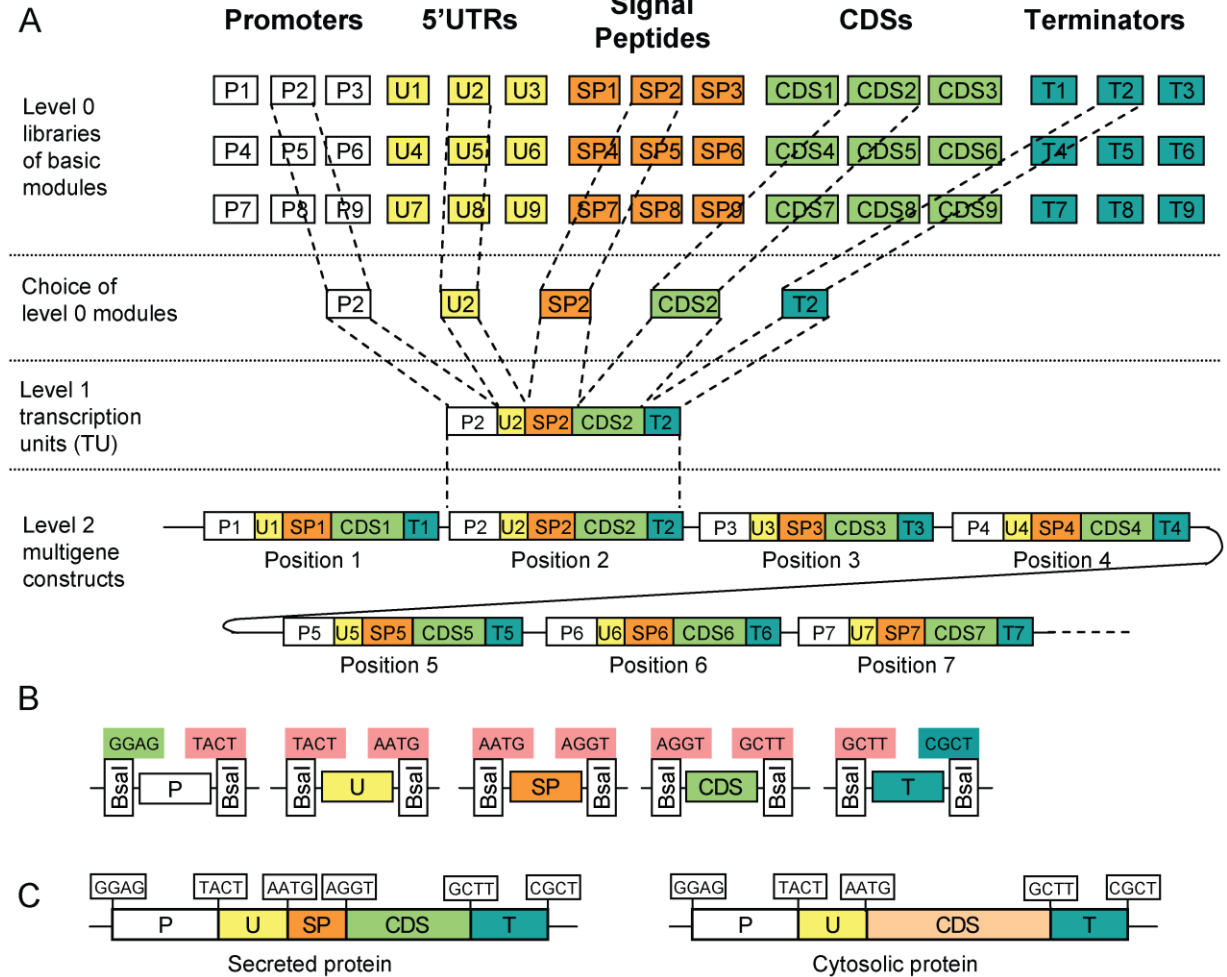
- Longitud
- Especificidad
- Eficiencia
- PAM

Ensamblaje Golden Gate



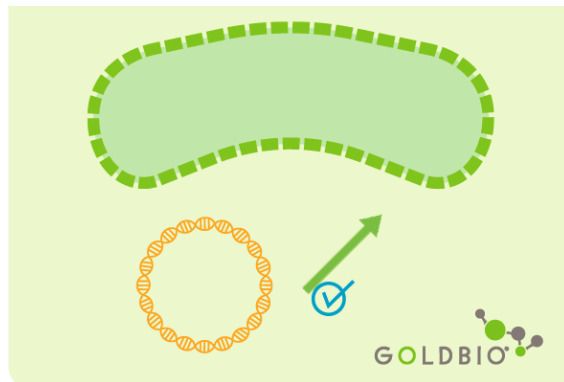
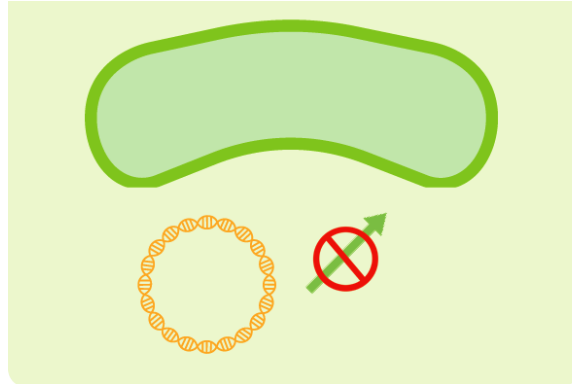
* While A and B insert sequences involved in 4-base overlaps are shown in separate colors for clarity, the actual assembly is seamless; 4-base overlaps are insert derived.

Clonación Modular



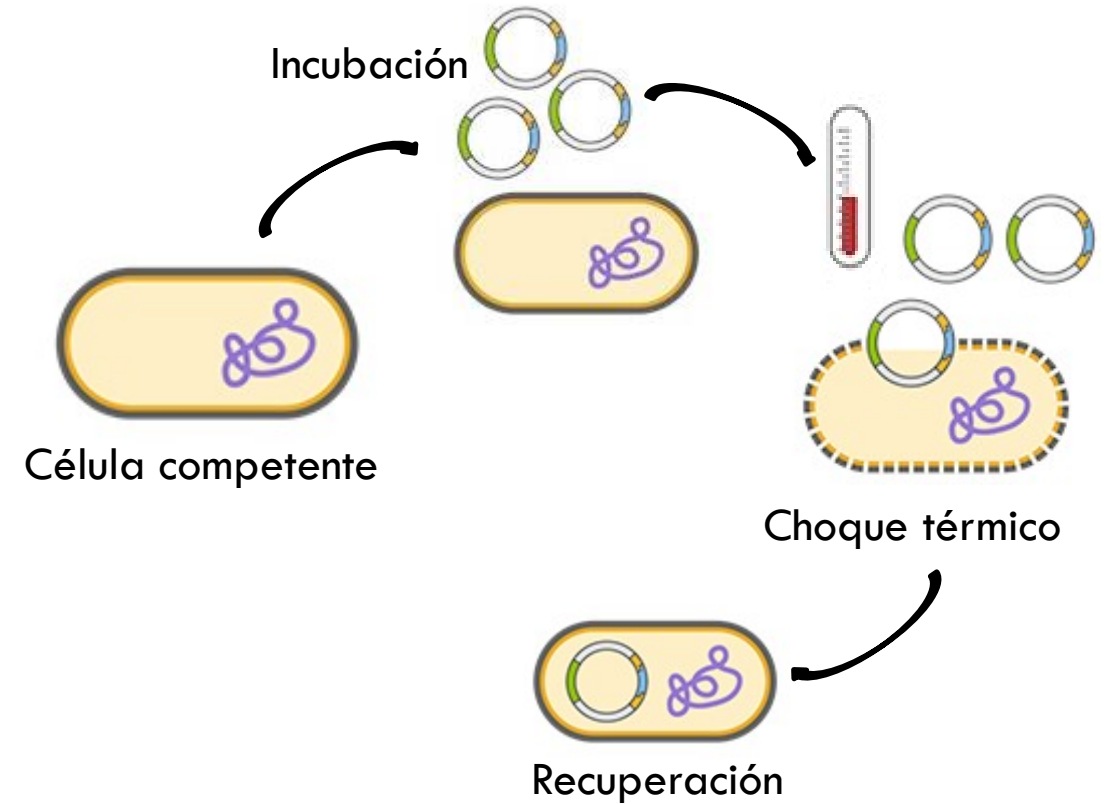
Células competentes

Escherichia coli no competente



Escherichia coli competente

Transformación química

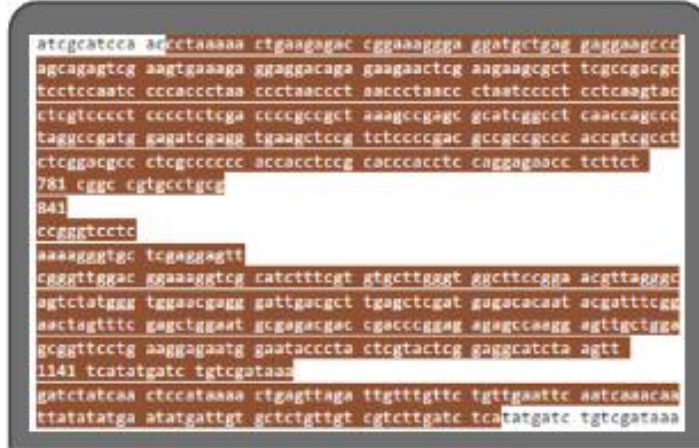


1. Búsqueda del promotor

New Place

NNPP

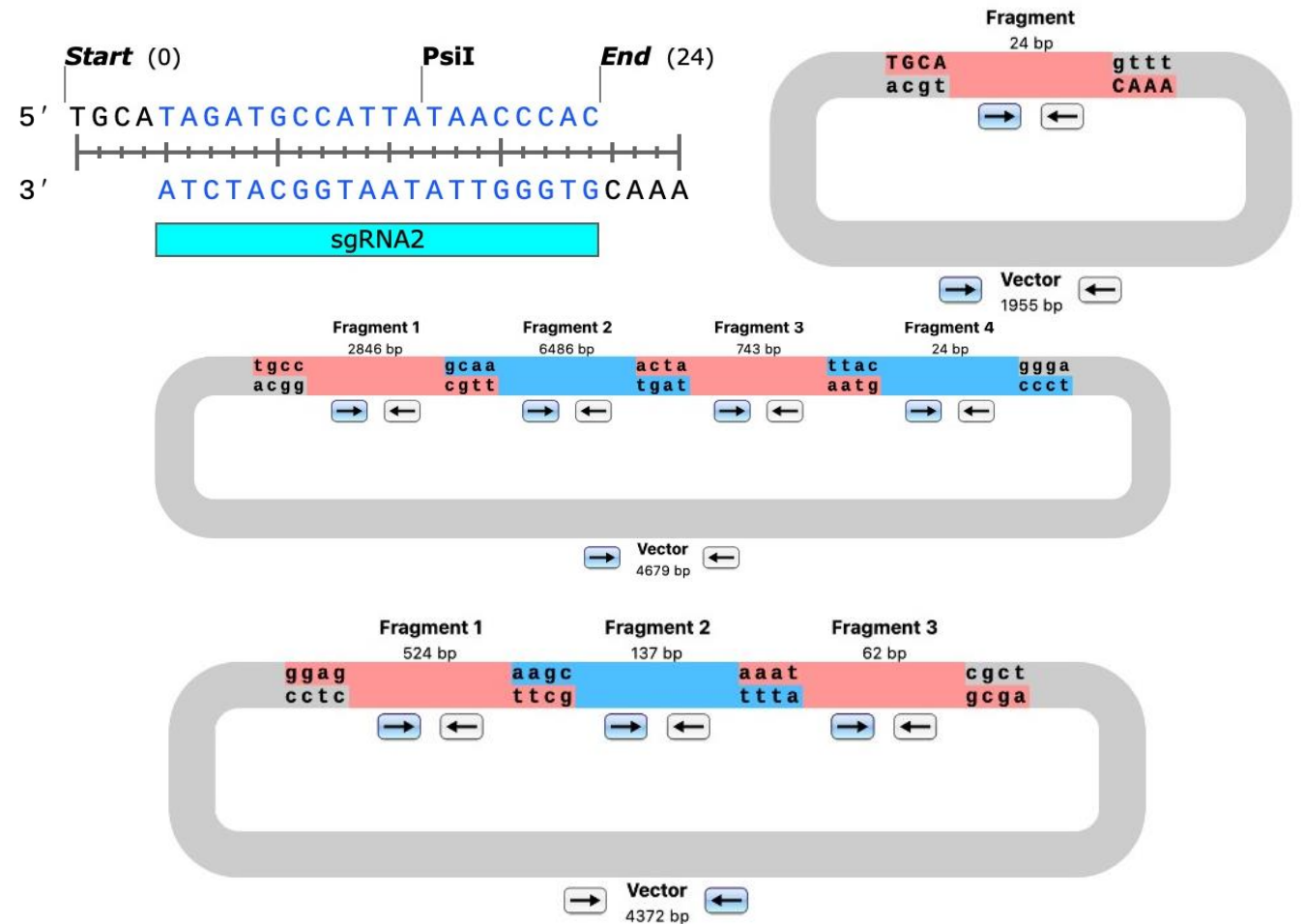
TSS



2. Diseño del sgRNA

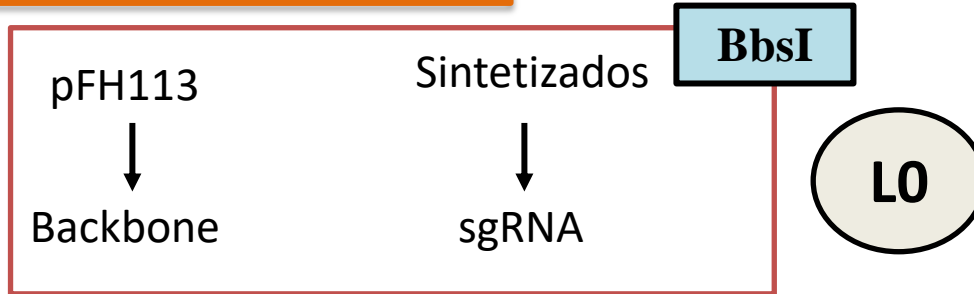
| Posición/ Hilo | Secuencia Guía + PAM + Enzimas de Restricción <input type="checkbox"/> solo g- <input type="checkbox"/> Solo GG- <input type="checkbox"/> Solo A- | Puntuación de especificidad del MIT | Especificidad CFD. puntaje | Eficiencia prevista Mostrar todas las puntuaciones | Resultado | Fuera de objetivos para 0-1-2-3-4 discrepancias + junto a PAM | | |
|-------------------|---|--|----------------------------------|---|---------------------------|---|----|---|
| | | | | Doench *16 Mor.-Mateos | Fuera de cuadro lindel | | | |
| 1 / vuelta | GTTGGTTATAATGGCATCTA AGG Enzimas: LweI, BstDEI Cebadores de clonación/PCR | 99 | 99 | 40 | 72 | 63 | 74 | 0-0-0-1-0 0-0-0-0-0 7 fuera de los objetivos |
| 10 / vuelta | TGTAGTTTCGTGGTTATAA TGG Enzimas: LweI, AanI Cebadores de clonación/PCR | 97 | 98 | 30 | 39 | 64 | 71 | 0-0-0-3-1 0-0-0-0-0 13 fuera de objetivos |

3. Ensamblaje *in silico*



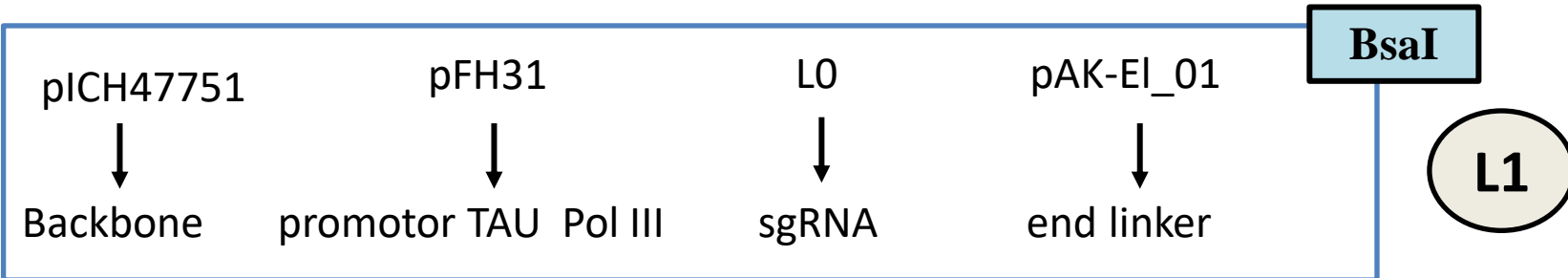
2. Construcción de plásmidos nivel L0, L1, L2

Procedencia



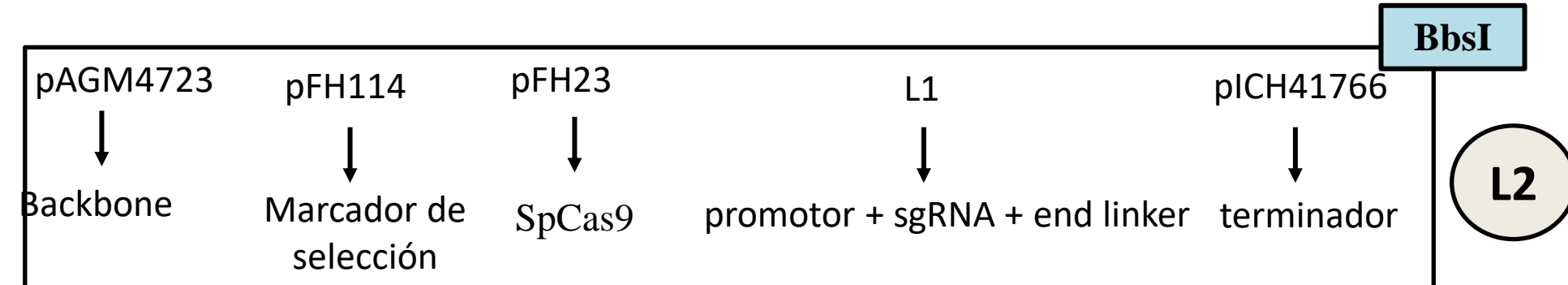
Parte

Procedencia



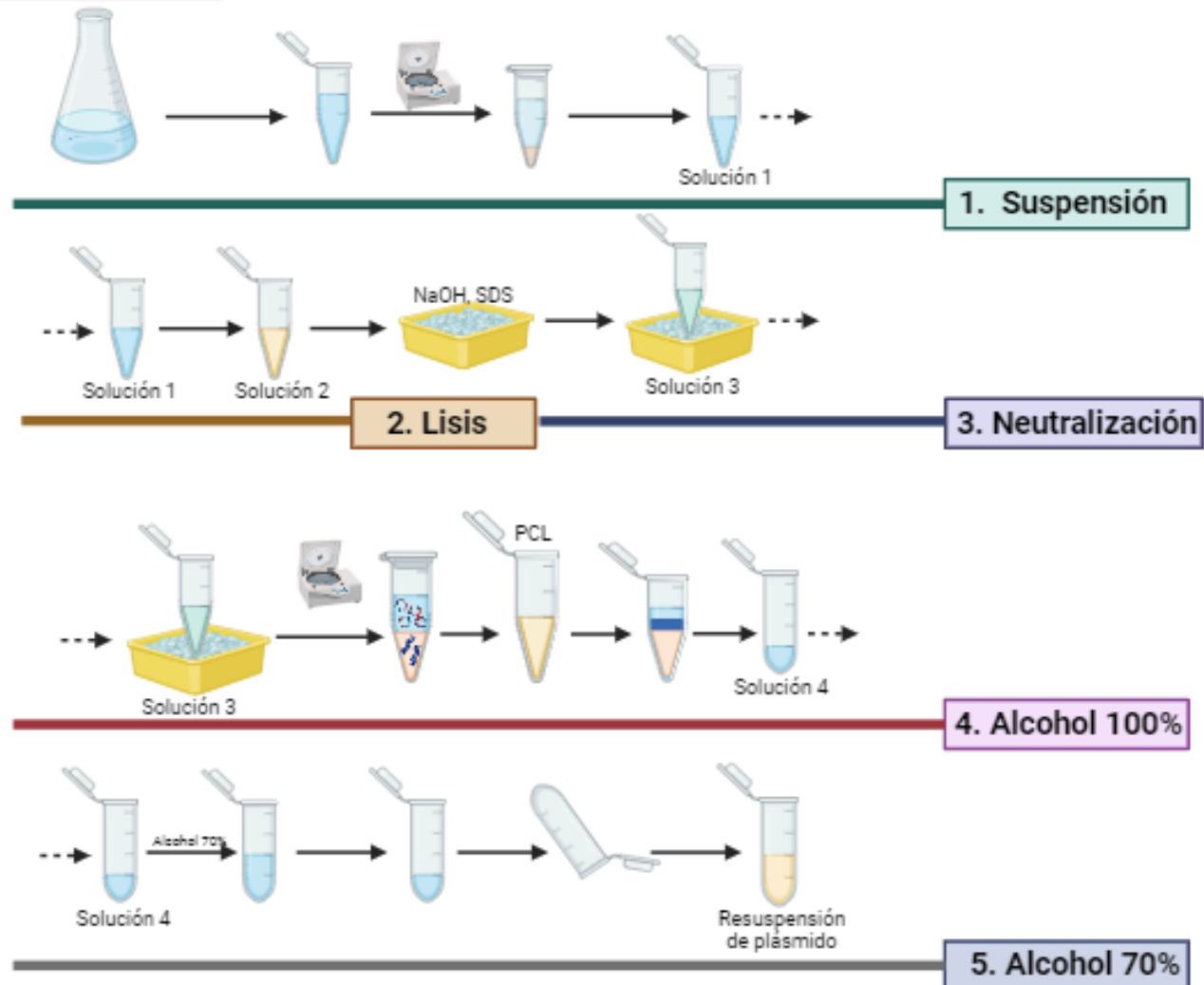
Parte

Procedencia



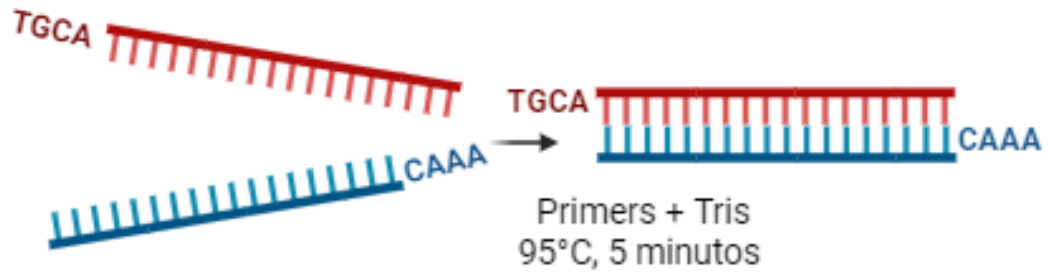
Parte

1. Extracción de ADN plasmídico



2. Construcción de plásmidos nivel L0, L1, L2

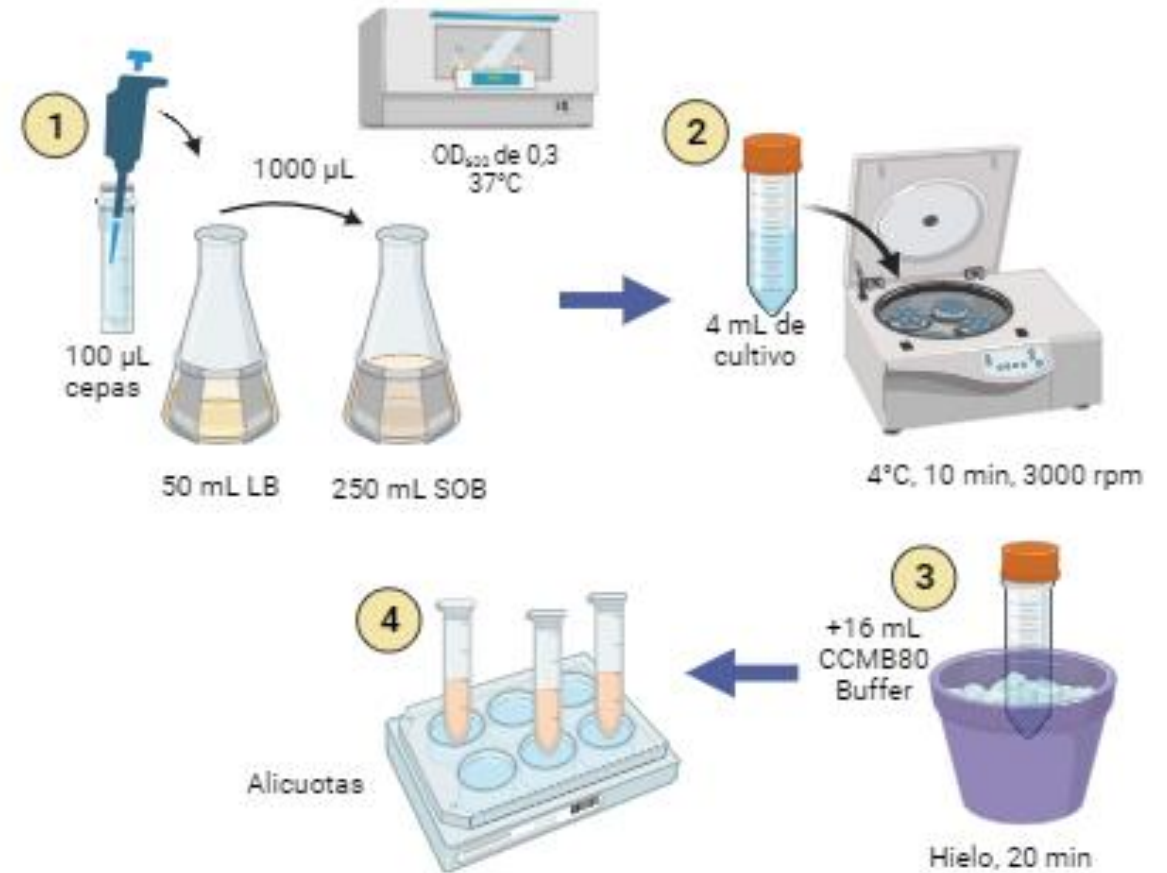
Hibridación de oligos



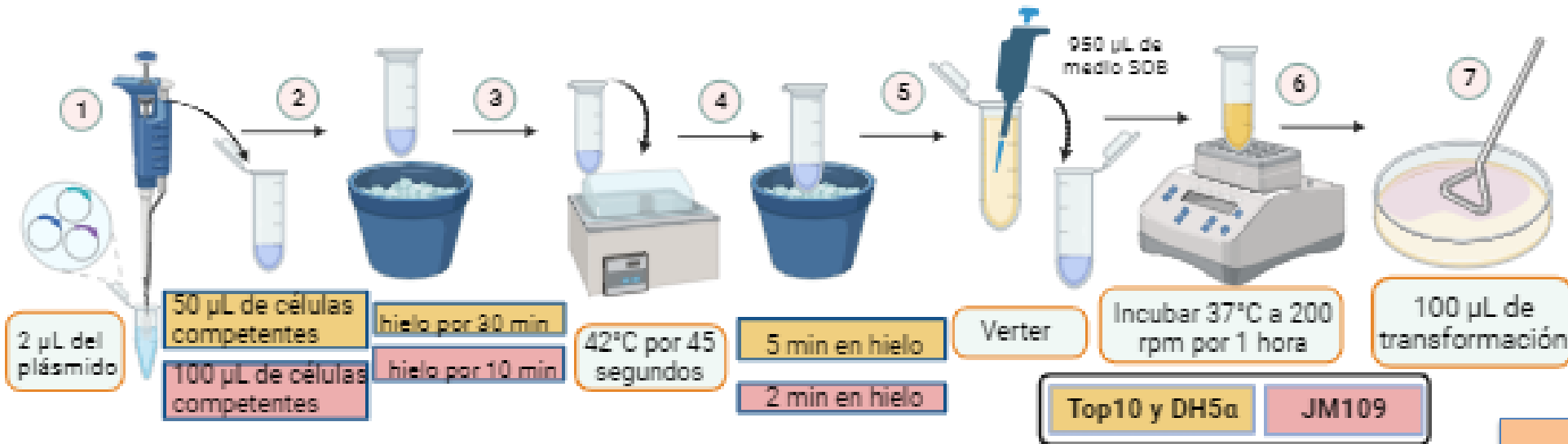
Reacción de digestión y ligación



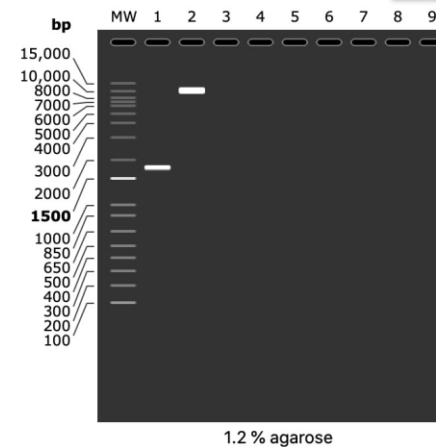
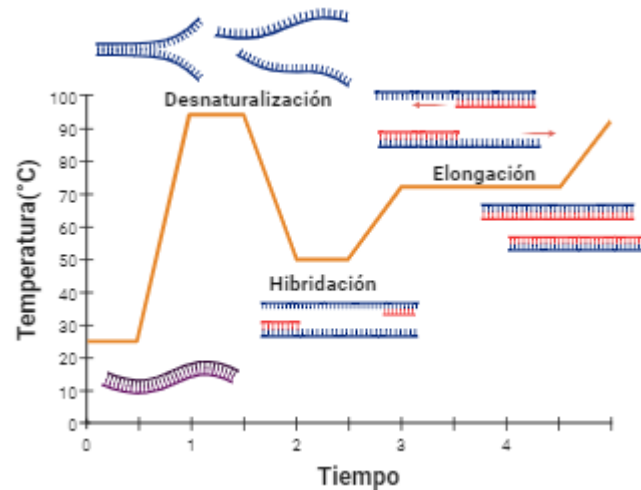
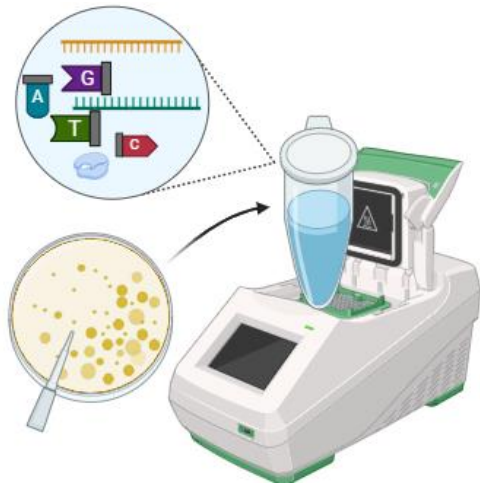
Preparación de células competentes



Transformación y siembra



PCR colony



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del promotor

| Nº | Secuencia promotora | Programa | %GC | Posición aguas arriba |
|----|--|------------------|------|-----------------------|
| 1 | AACTGACTTGT ATATATGATTA GGAACATCTG ACTCTTTCTTG ATCGCGT | NNPP | 36 | 300 pb |
| 2 | CCTTAGATGCCAT TATAACCCACGAA ACTACATGAAATT ATCGAACTATG | New Place | 36 | 500 pb |
| 3 | CTTGATATATGAT TAGGAACATCTGA CTCTTTCTTGATCG CGTATGGGC | NNPP y New place | 40 | 495 pb |
| 4 | AATACTGGTATTT AAAATTAGACTTG ATGTTGGTAGATT CAAATGTAGGT | TSPP y NNPP | 28 | 1300 pb |
| 5 | GTGGTATACATGA TAATGCCNAACAG CAATTTGCCAATC TACAAGTGGAA | New Place | 38,8 | 2450 pb |
| 6 | GGTCTCAAATCTT CATATAATTCTTCC AGATTTTCTTGTT CTCTCTTAC | New Place | 32 | 2350 pb |

ORF Finder

| Label | Strand | Frame | Start | Stop | Length (nt aa) |
|-------|--------|-------|-------|------|------------------|
| ORF1 | + | 1 | <1 | 681 | 681 226 |

Selección del sgRNA

| RNA guía | Especificidad (>90%) | Eficiencia (>40%) | Efectos off target | %GC | PAM |
|----------|----------------------|-------------------|--------------------|-----|-----|
| sgRNA 1 | 98 | 39 | 0-0-0-3-10 | 35% | TGG |
| sgRNA 2 | 99 | 72 | 0-0-0-1-6 | 40% | AGG |
| sgRNA 3 | 99 | 47 | 0-0-1-0-6 | 40% | GGG |
| sgRNA 4 | 98 | 35 | 0-0-0-2-10 | 45% | TGG |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADN plasmídico

Kit Comercial

| Plásmido | Concentración (µg/mL) | A 260/280 | A 260/230 |
|------------|-----------------------|-----------|-----------|
| Blanco | 0 | 0 | 0 |
| PAGMA4723 | 8,67 | 2,297 | 0,759 |
| pFH31 | 2,959 | 1,318 | 1,933 |
| PAK-E2-01 | 1,897 | 1,87 | 1,234 |
| pICH 47751 | 6,327 | 2,067 | 1,771 |
| pICH 41766 | 12,45 | 1,649 | 2,346 |
| pFH113 | 384,2 | 1,801 | 2,183 |
| pFH23 | 37,65 | 1,873 | 1,708 |
| pFH114 | 434,4 | 1,753 | 1,505 |

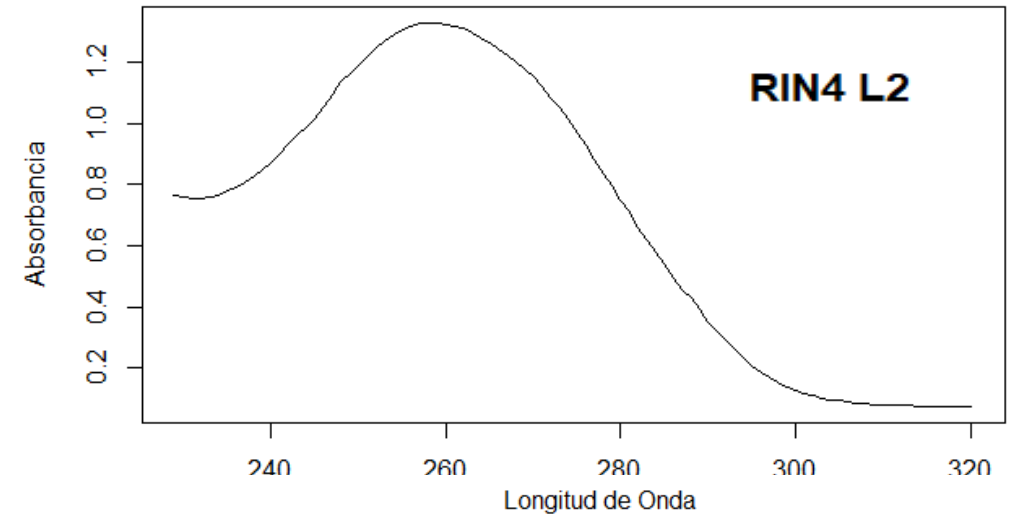
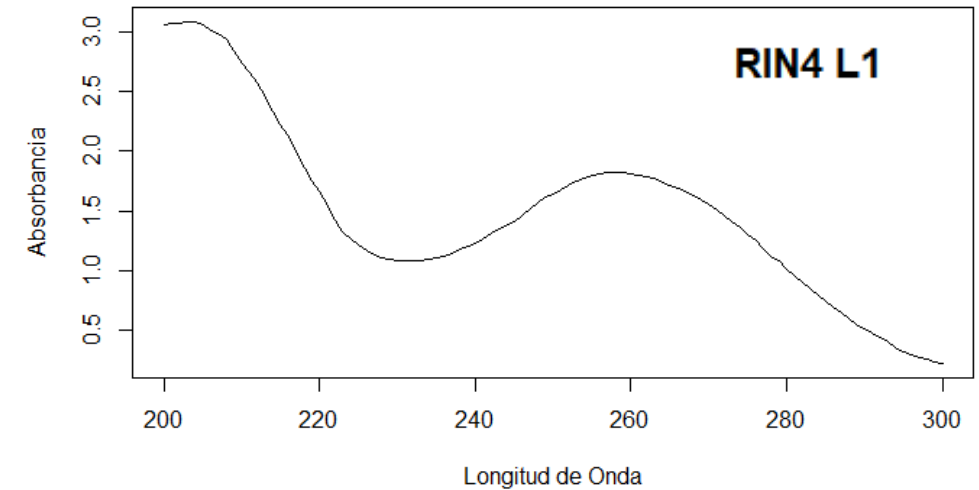
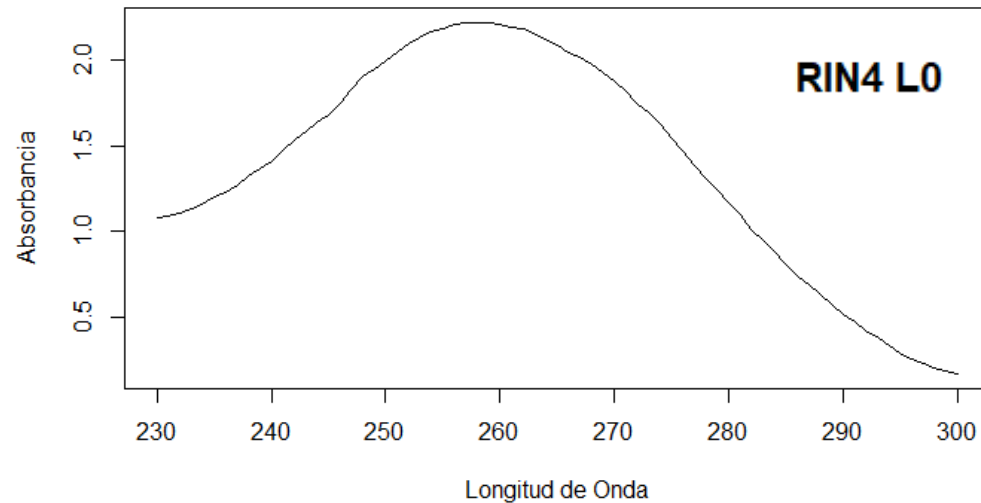
Lisis Alcalina

| Plásmido | Concentración (µg/mL) | A 260/280 | A 260/230 |
|------------|-----------------------|-----------|-----------|
| Blanco | 0 | 0 | 0 |
| PAGMA4723 | 2933 | 2,015 | 1,949 |
| pFH31 | 3014 | 2,4 | 2,2 |
| PAK-E2-01 | 3407 | 1,7 | 1,7 |
| pICH 47751 | 2816 | 2 | 1,9 |
| pICH 41766 | 2902 | 2,008 | 2,029 |
| pFH113 | 2789 | 1,97 | 2,13 |
| pFH23 | 2805 | 1,952 | 1,887 |
| pFH114 | 3125 | 1,87 | 2,19 |

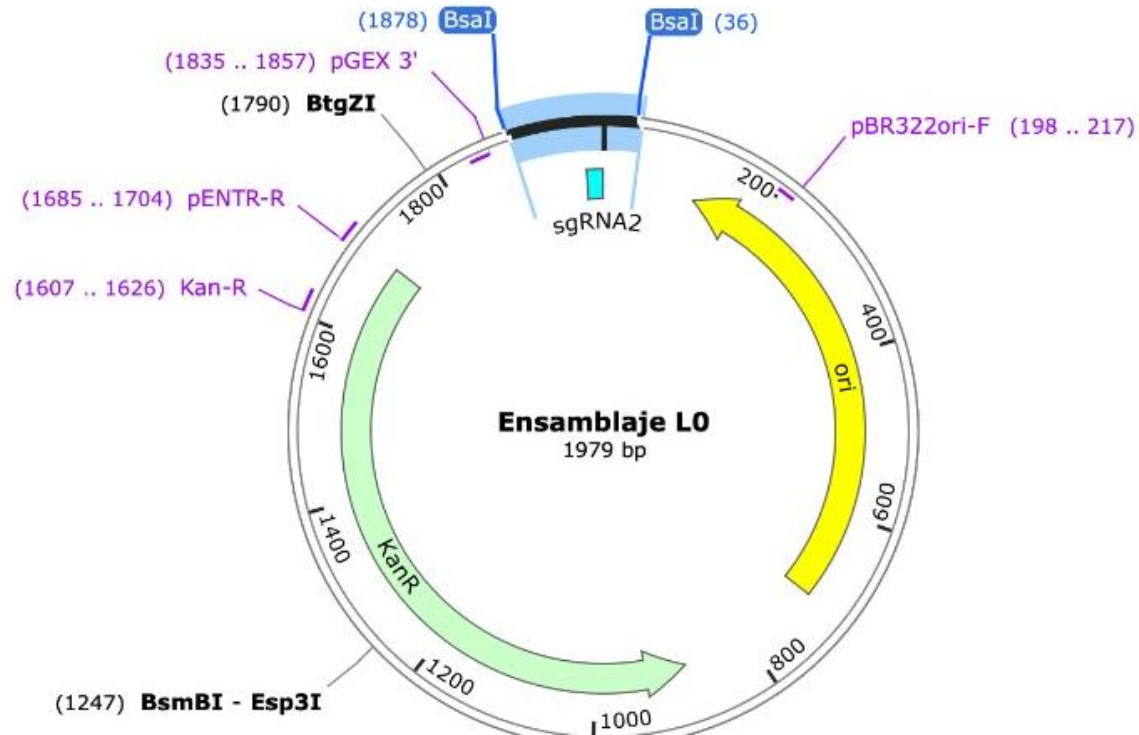
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADN plasmídico

| Nivel | Concentración (µg/mL) | A 260/280 | A 260/230 |
|-------|-----------------------|-----------|-----------|
| L0 | 3252 | 1,907 | 2,162 |
| L1 | 1648 | 1,993 | 2,109 |
| L2 | 823 | 1,975 | 2,035 |

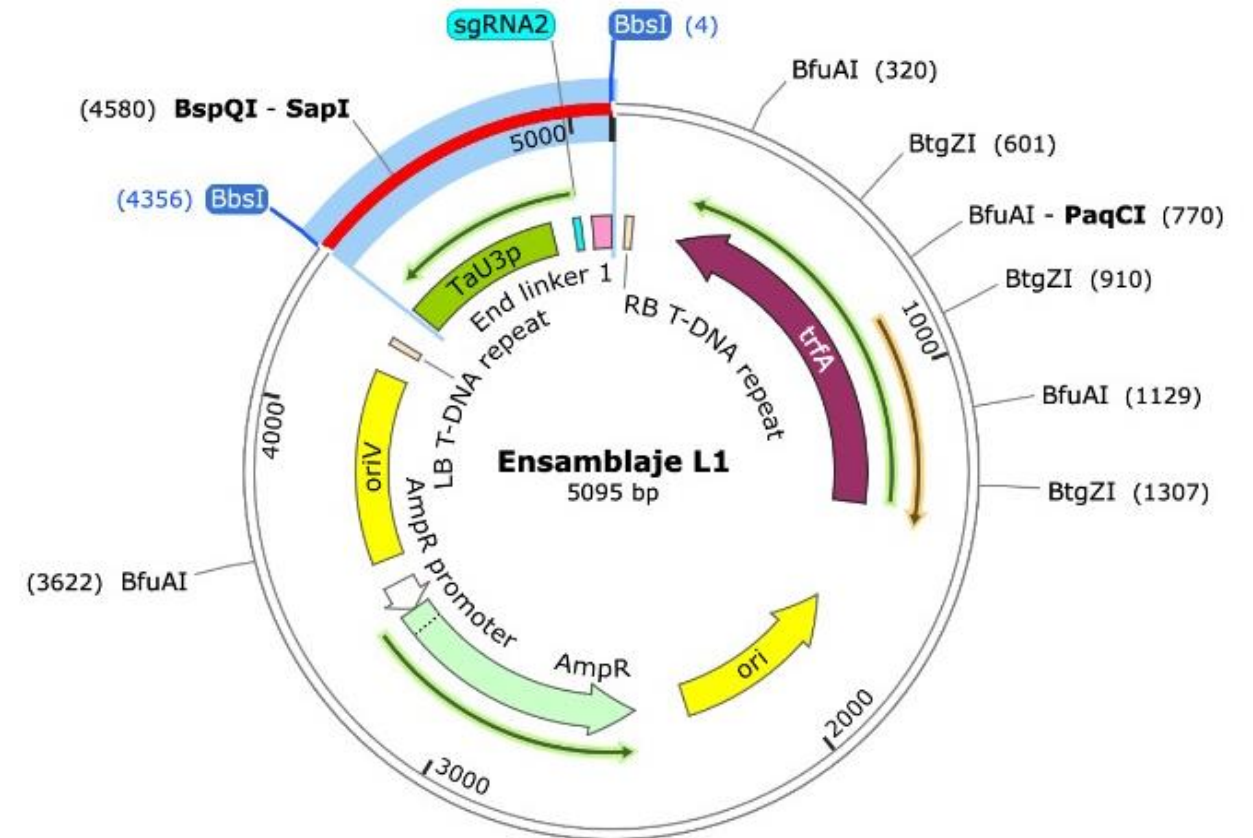


Construcción del nivel L0



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción del nivel L1



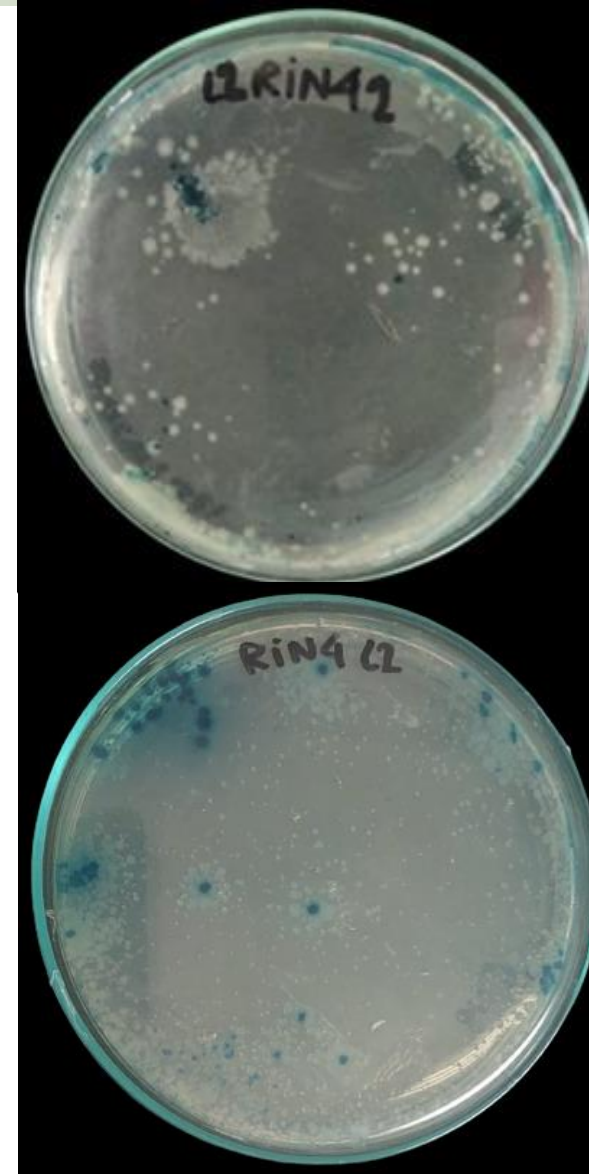
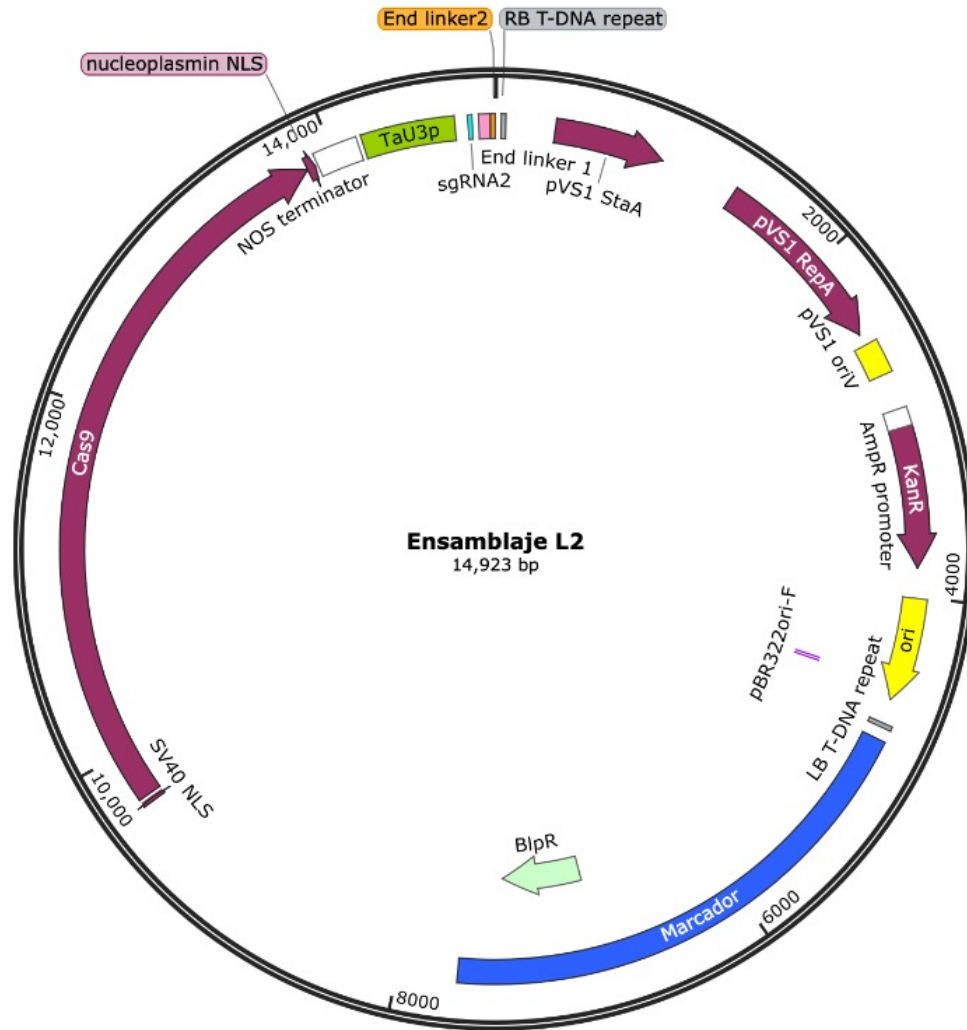
(Hottes et al., 2013)



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA

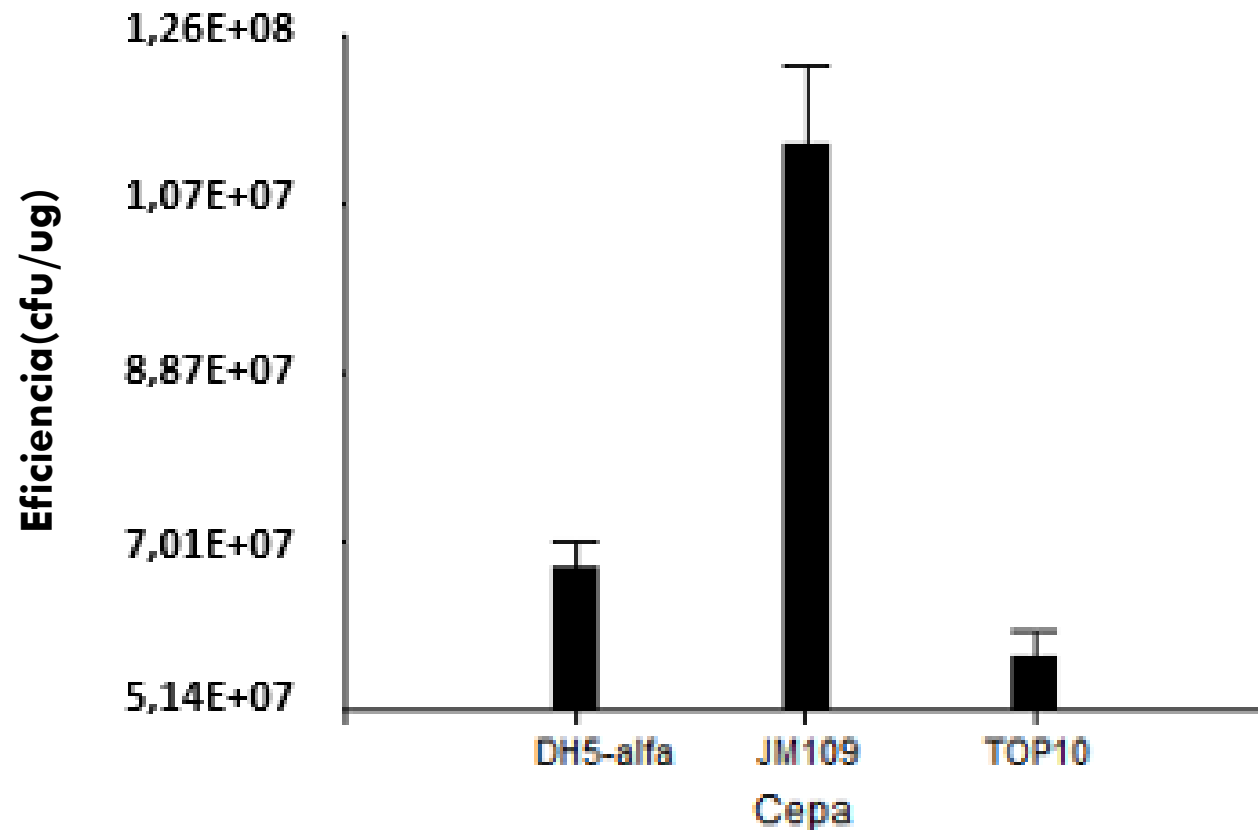
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción del nivel L2



Construcción del nivel L2

Gráfico de barras de la eficiencia de transformación en L2



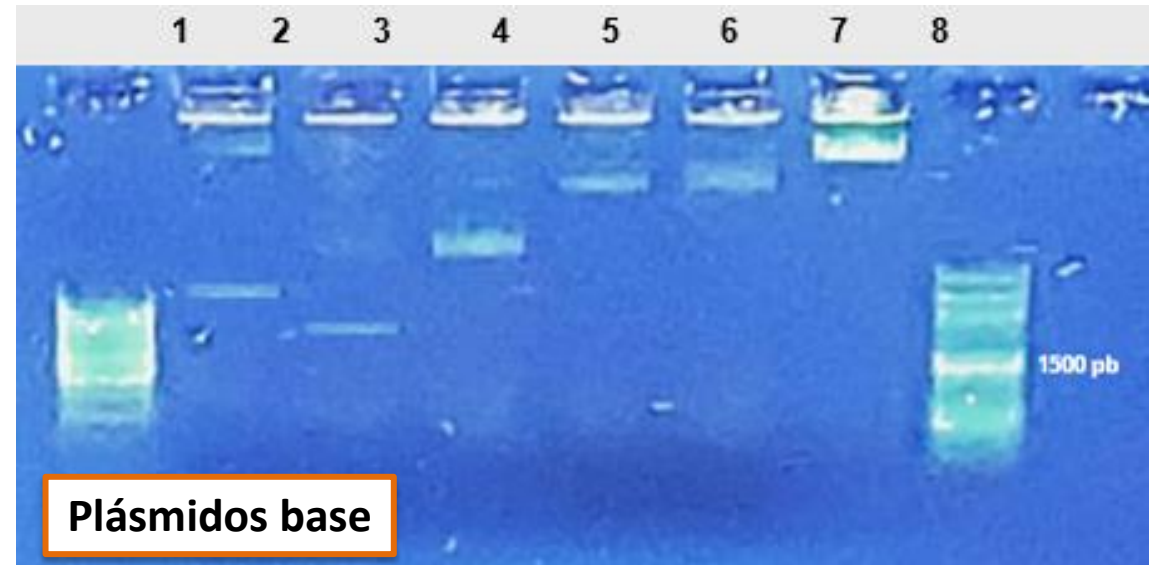
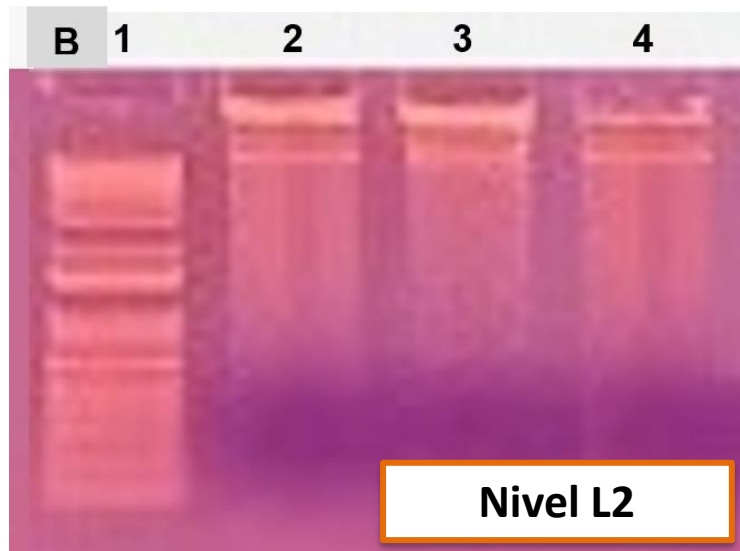
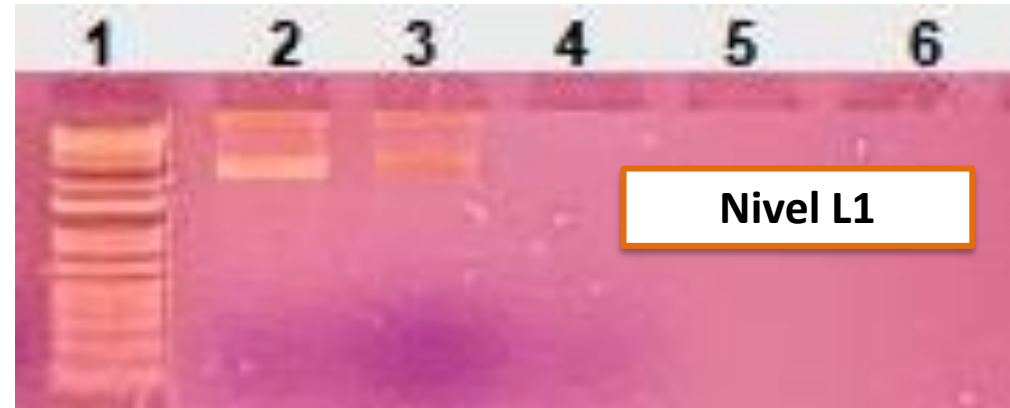
| Cepa | Eficiencia (cfu/ug) | |
|--------------|---------------------|---|
| Top10 | 5,75E+07 | A |
| DH5 α | 6,71E+07 | A |
| JM109 | 1,14E+08 | B |

($p < \alpha$) = (0,0007 < 0,05)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación del tamaño del constructo



Se seleccionó al sgRNA2 como el modelo óptimo para la construcción del vector plasmídico debido a su especificidad >90, eficiencia de corte >45 y buena composición estructural.

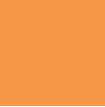
El estándar MoClo de Golden Gate fue eficaz para ensamblar múltiples fragmentos en una sola reacción. El perfil electroforético y la amplificación de PCR de colonias validó la buena calidad y alta fidelidad de las construcciones génicas obtenidas


El método casero de lisis alcalina demostró ser más efectivo, incluso en costos y tiempo.


La transformación bacteriana mediada por shock térmico demostró ser exitosa en introducir y expresar ADN exógeno en las cepas analizadas

La cepa JM109 demuestra ser altamente eficaz en la transformación mediante shock térmico para la construcción del vector plasmídico destinado a la edición genética del promotor del gen RIN4, el cual está relacionado con la resistencia a la fusariosis en el banano ($(0,0007 < 0,05)$).



 Se recomienda mejorar el diseño de primers y la elección de la polimerasa para maximizar la especificidad y amplificar eficazmente regiones insertadas en todos los niveles de construcción plasmídica.

 Explorar sobre la optimización de los niveles de IPTG y Xgal para evaluar la expresión génica y la presencia de plásmidos transformados como medida de una detección más precisa.

 Se propone evaluar factores como la concentración de ADN, el tiempo de incubación y las condiciones de choque térmico para maximizar la eficiencia en cada cepa.



AGRADECIMIENTOS



Universidad de las
Fuerzas Armadas ESPE
IEEE Student Branch



INIAP DE PICHILINGUE

FRANCISCO FLORES, Ph.D

Director del Proyecto de Investigación

TESISTAS

Laboratorio de Microbiología

FAMILIA

AMIGOS



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA