

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

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

“Ensamblaje del plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen *Velvet* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).”

AUTOR: PÁRRAGA ZAMBRANO, JEFFERSON ANTONIO

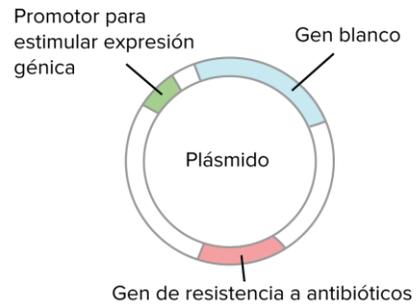
DIRECTOR: Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

SANGOLQUÍ , Septiembre de 2022

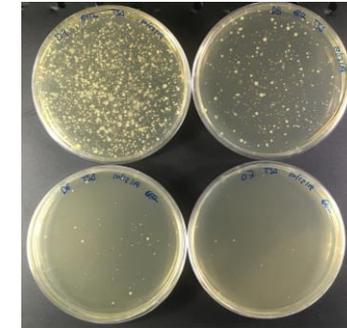




Introducción



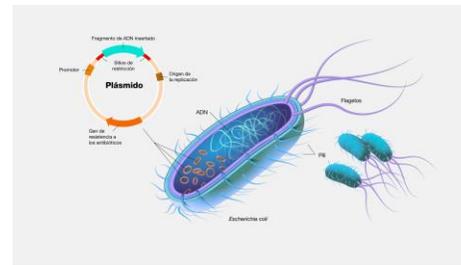
Objetivos



Hipótesis



**Materiales y
Métodos**



**Resultados y
Discusión**



**Conclusiones y
Recomendaciones**



Musa spp. & Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 1



Las exportaciones de banano le dan a Ecuador más de **USD 3 mil millones**, esta cifra representa las exportaciones en conjunto de Bélgica, Costa Rica y Colombia.

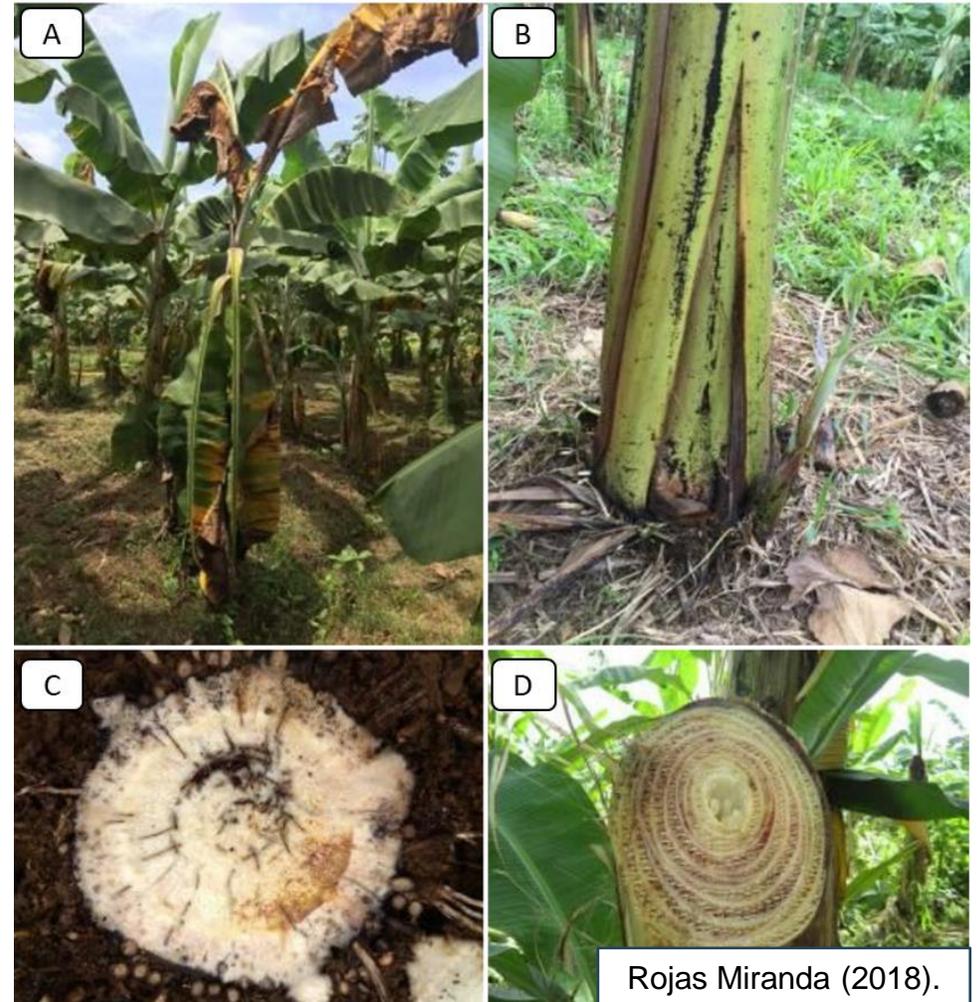
Revista Ekos, (2019)

Banano Gros Michel

60`s
Foc R1

Banano Cavendish

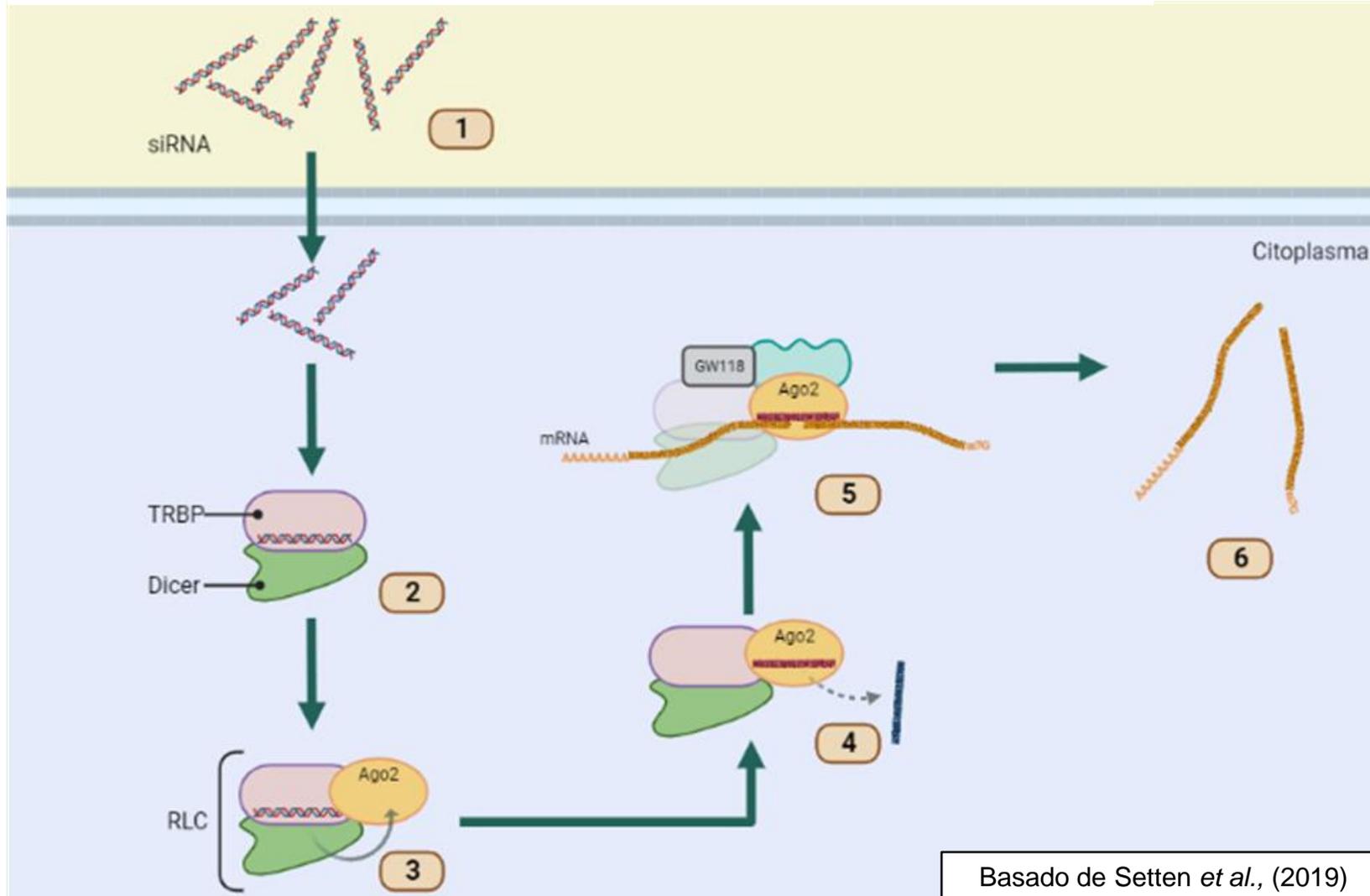
Figura 1. síntomas de la fusariosis.



Rojas Miranda (2018).

RNA de interferencia

Figura 2. Mecanismo de acción del RNAi.



Basado de Setten *et al.*, (2019)

1. siRNA ingresan al citosol a través de endocitosis

2. El siRNA interactúa con la proteína Dicer y TRBP.

3. Se induce la formación del complejo de carga (Ago 2).

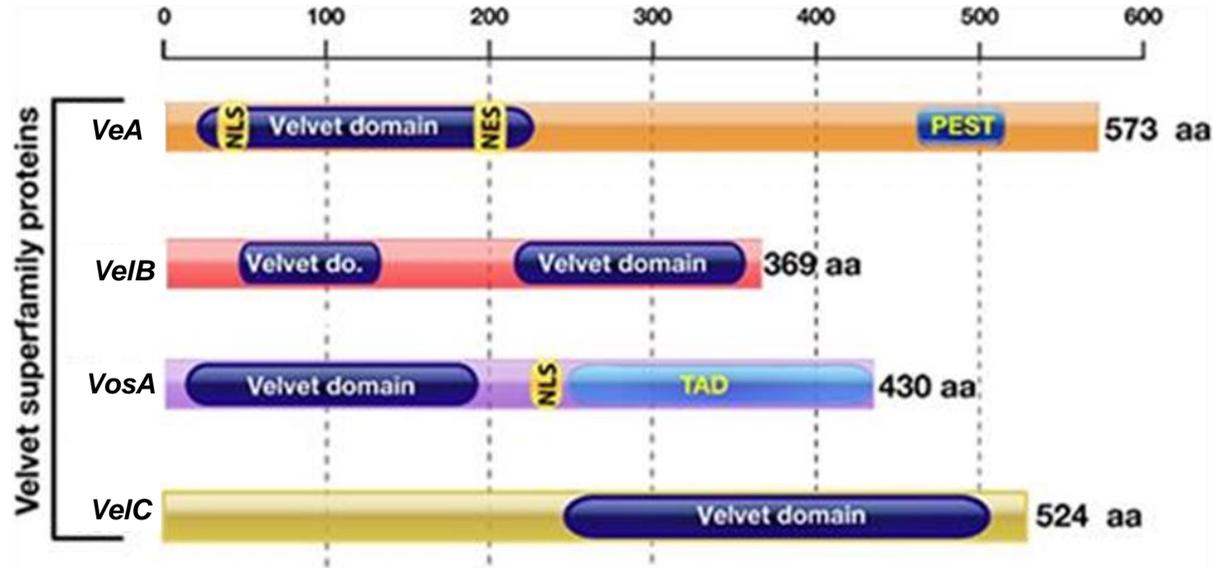
4. Hebra guía para producir RISC maduro.

5. Se silencia el mRNA que se complementa.

6. Ago2 escinde eficientemente el mRNA objetivo

Gen y proteína Velvet

Figura 3. Familia de la proteína Velvet.



Bayram & Braus, (2012).

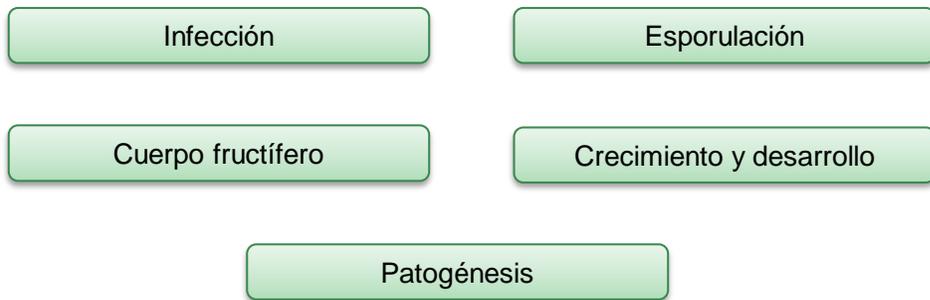
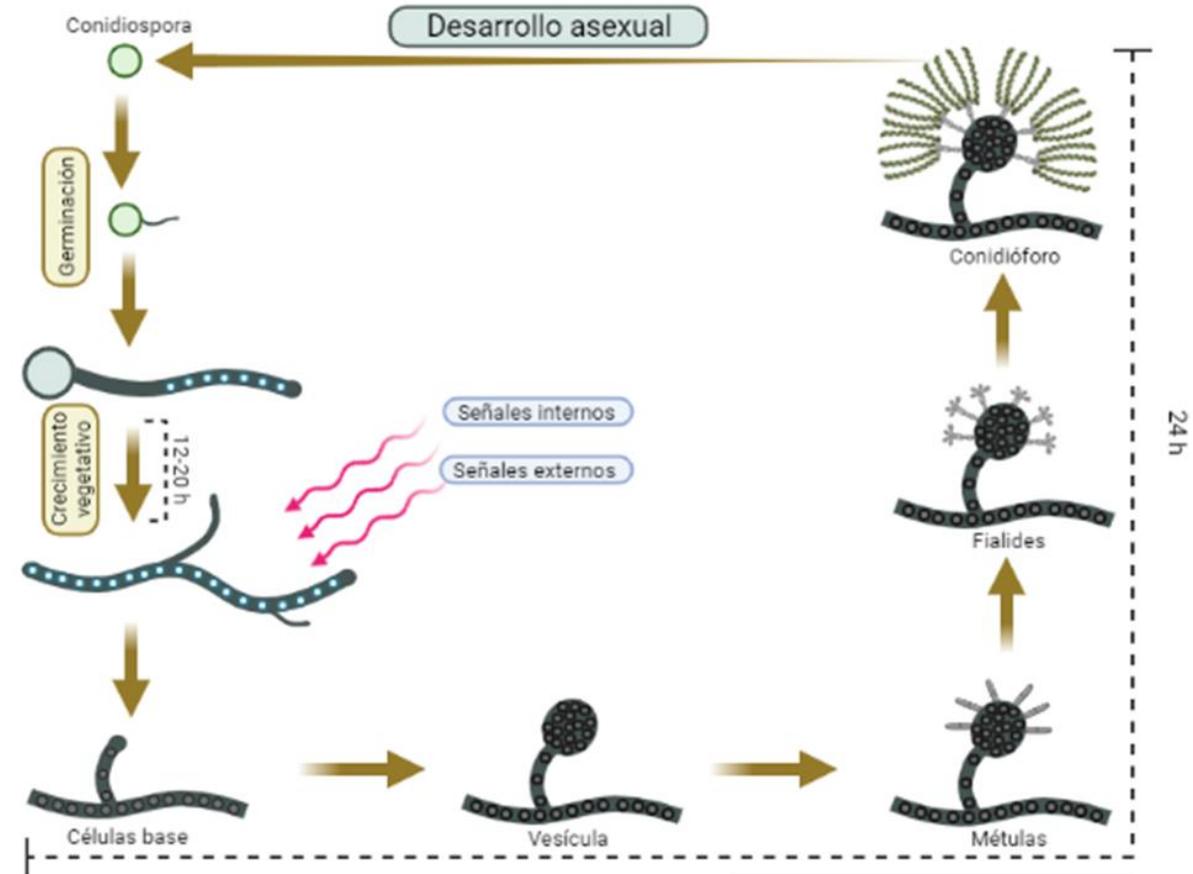


Figura 4. Crecimiento y desarrollo de *Foc*.

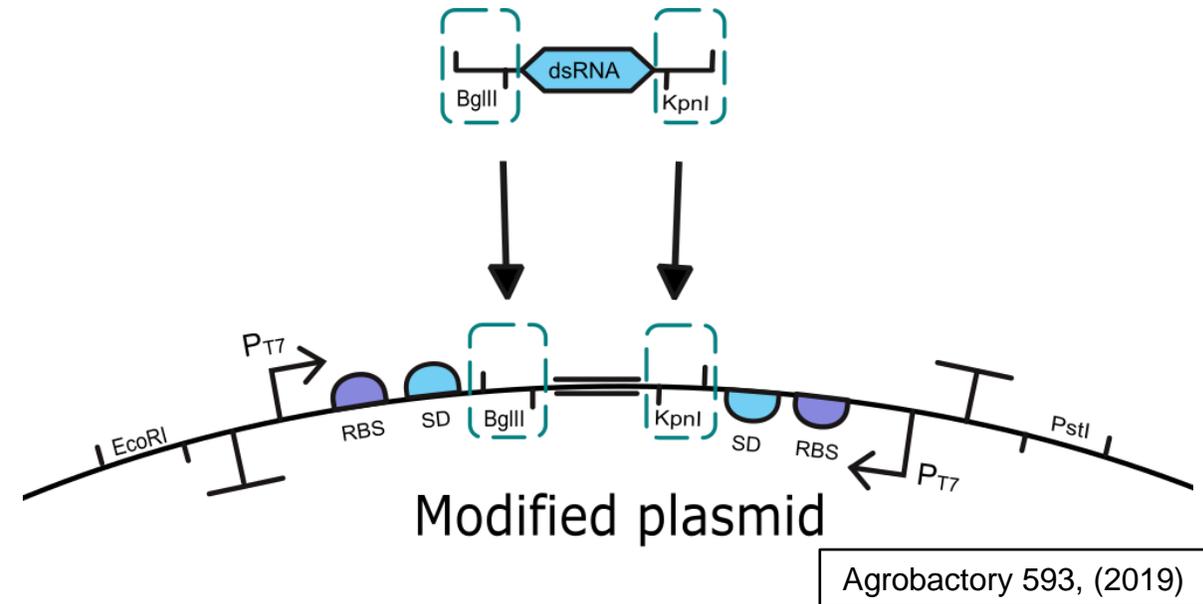


Rojas Miranda, (2018)

Tabla 1: Partes del plásmido usado para producir dsRNA de Agrobactory 593.

Partes/módulos	Colección Agrobactory 593	Descripción	Base de datos iGEM
Backbone	pSB1C3_A593	Plásmido pSB1C3 con partes diseñadas por Agrobactory 593.	pSB1C3 iGEM/Part
Sitios de restricción	Bgl II Kpn I	Bgl II (5' AGATCT 3') Kpn I (5' GGTACC3')	
CDS	dsRNA destinado al gen <i>Velvet</i>	dsRNA destinado a silenciar el gen diana <i>Velvet</i> a través de RNAi.	BBa_K3893001
Promotor	Promoter T7	El promotor T7 es el sitio específico para la RNA polimerasa T7.	BBa_I712074
RBS	RBS2	RBS basado en el represor elowitz.	BBa_B0034
SD	Shine-Dalgarno for <i>E. coli</i>	Secuencia corta de 9 pb que facilita la interacción del ribosoma con el mRNA.	BBa_K3893000
Terminador	rpoC rnpB_T1	Unión de dos terminadores para evitar RNA inespecíficos	BBa_K3893006 BBa_K3893007
Primers	Forward Reverse	Primers enfocados a identificar la unión de CDS al backbone.	BBa_G00100 BBa_G00101
Resistencia	CmR	Cloranfenicol	

Figura 5. Plataforma modular Agrobactory 593.



Objetivo General

Ensamblar un plásmido para la producción de RNA de interferencia para el silenciamiento del gen *Velvet* en *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc R1).



Objetivos Específicos

Obtener un BioBrick del gen *Velvet* compatible con ensamblaje de restricción y ligación.

Ensamblar el plásmido para la producción de dsRNA mediante técnicas de restricción y ligación.

Transformar *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido ensamblado para producir dsRNA objetivo.

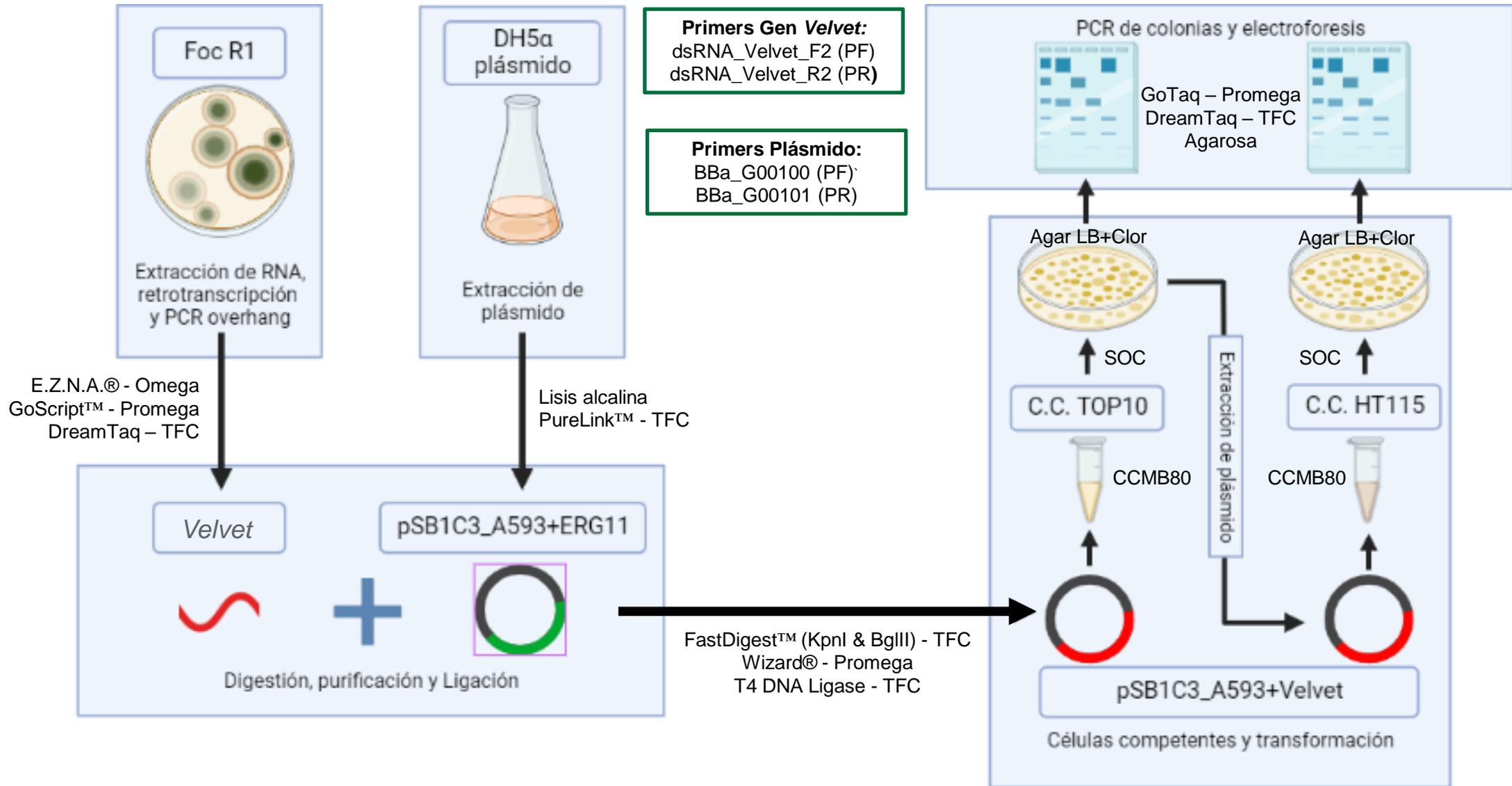


H_0 : La variación en el tiempo de shock térmico en el protocolo de transformación de células competentes no influye significativamente en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido ensamblado.

H_i : La variación en el tiempo de shock térmico en el protocolo de transformación de células competentes si influye significativamente en la eficiencia de transformación de *Escherichia coli* cepa HT115 con el plásmido ensamblado.



MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

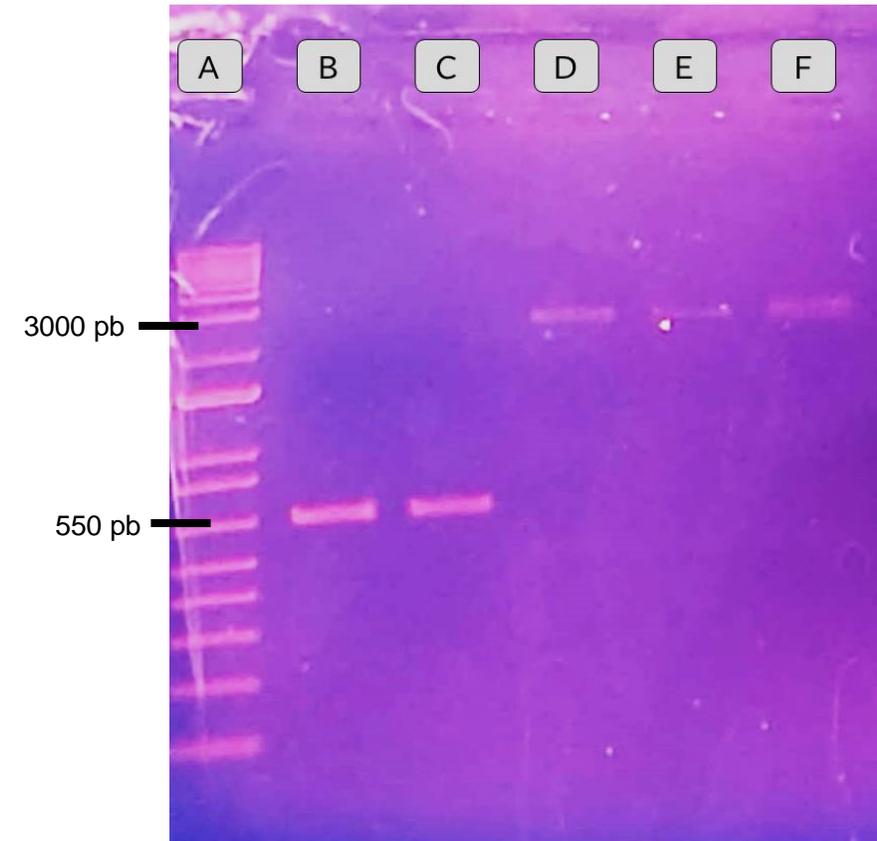
Extracción de RNA, cDNA, PCR overhang, Extracción de plásmido



Tabla 2: Partes del plásmido usado para producir dsRNA de *Agrobacterium* 593.

Proceso	Muestra	Resultados	Observaciones
Siembra en PDB	Foc R1	Crecimiento del hongo	1 contaminación
Extracción de RNA	Foc R1 en PDA	8 ng/μL	A260/230 = 1,86 A260/280= 1,64
Retrotranscripción	RNA total	863,3 ng/μL	A260/230= 1,96 A260/280= 1,62
PCR overhang	cDNA	Amplicón del gen Velvet	dsRNA_Velvet_F_2 dsRNA_Velvet_R_2
Extracción de plásmido	HD5α con plásmido	27 ng/μL	

Figura 6. Gel de electroforesis con el amplicón Velvet y el pSB1C3_A593+ERG11.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Digestión, Purificación, Ligación

Figura 7. Restricción con *KpnI* y *BglII* del plásmido pSB1C3_A593+ERG11 y del amplicón del gen *Velvet*.

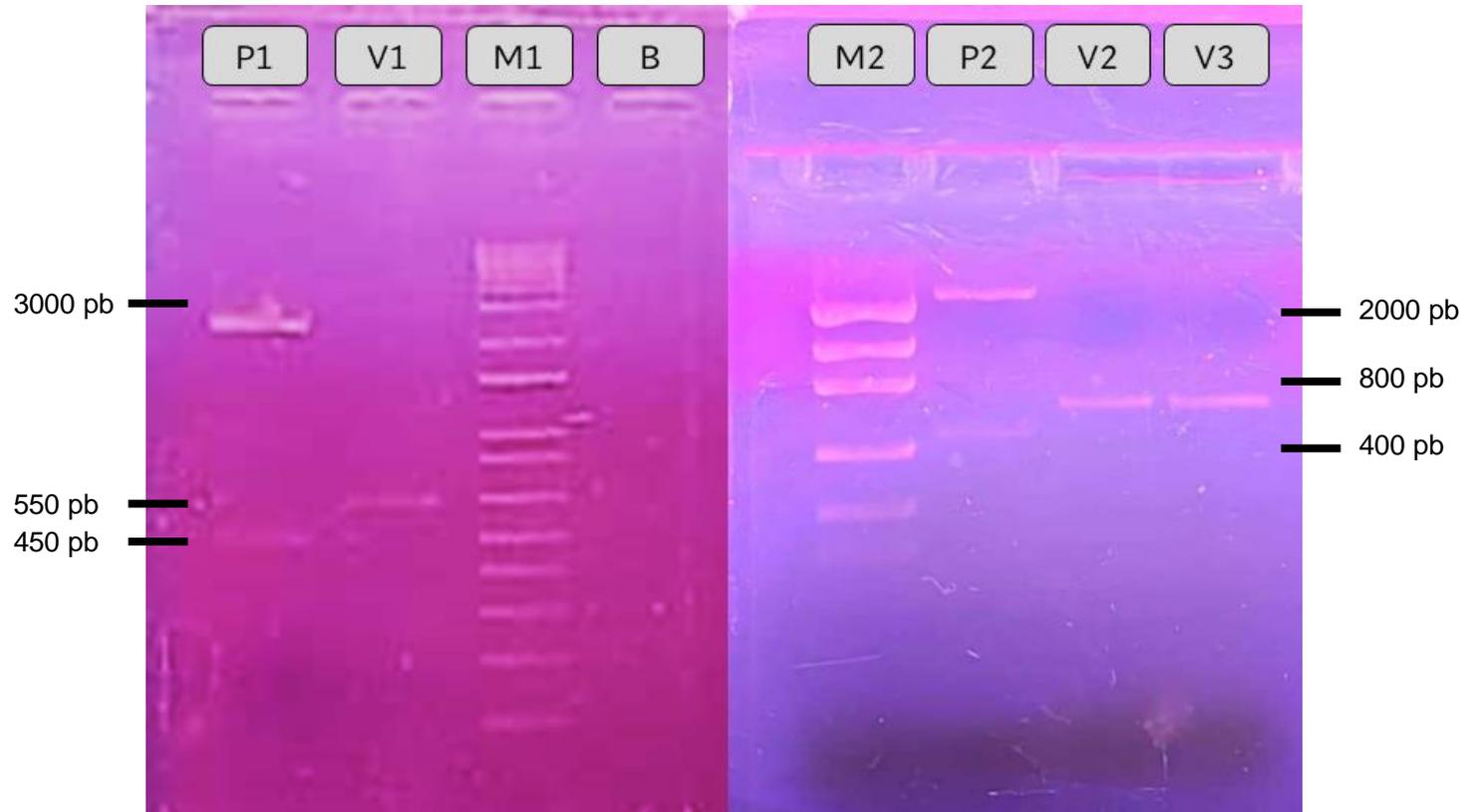
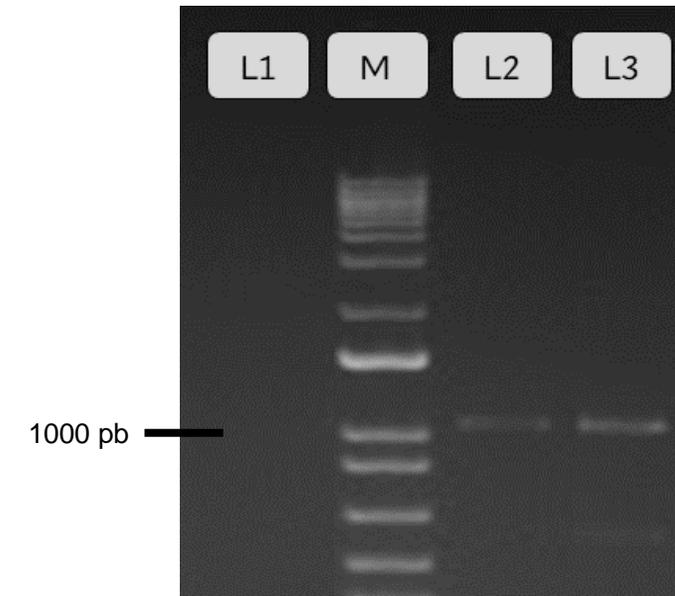


Tabla 3: Digestión, purificación y ligación.

Secuencia	pb
pSB1C3_A593+ERG11	2857
pSB1C3_A593 digerido con <i>KpnI</i> y <i>BglII</i>	2386 471
Gen <i>Velvet</i>	1221
Amplicón del gen <i>Velvet</i>	548
Amplicón del gen <i>Velvet</i> digerido con <i>KpnI</i> y <i>BglII</i>	540

Figura 8: PCR de Ligados y Electroforesis.



Células Competentes, Transformación, PCR de colonias

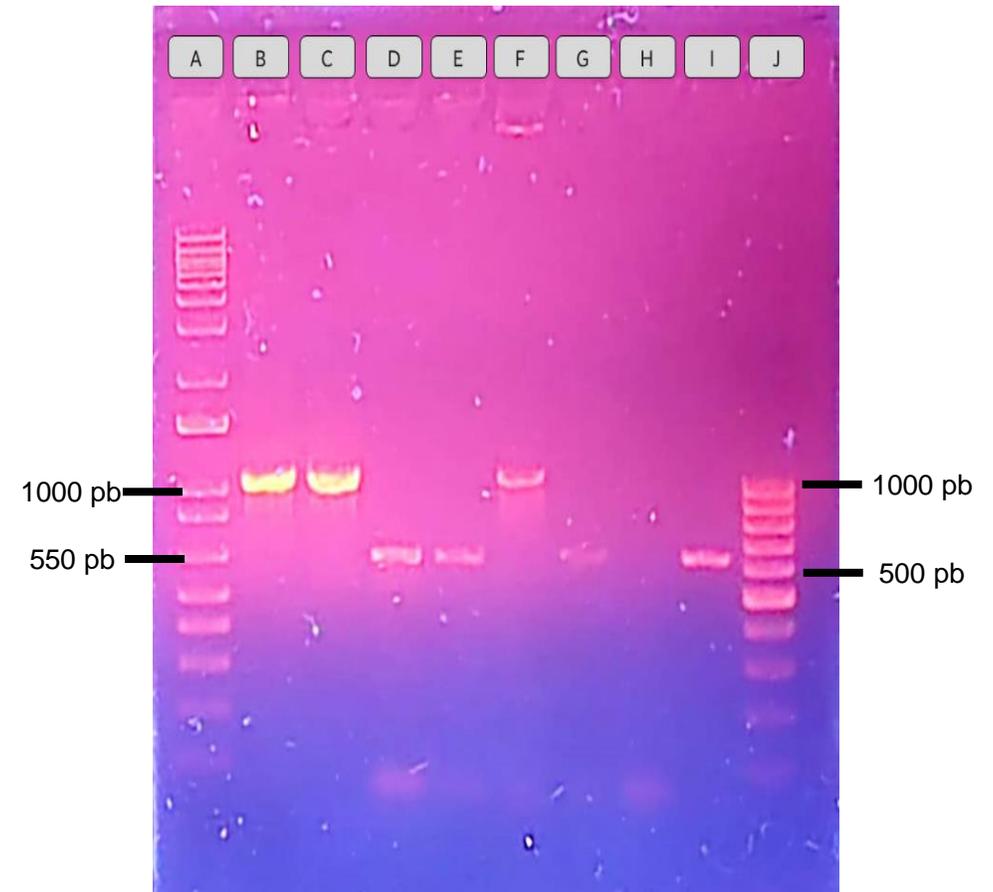
Tabla 4: Células competentes, transformación y PCR de colonias.

Proceso	Muestra	Resultados
Células competentes	<i>E. Coli</i> One Shot TOP10 y HT115	Se obtuvo células competentes
Transformación	C.C. TOP10, L3	ET: $6,8 \times 10^4$ UFC/ μ g
Extracción de Plásmido	CT0, CT3	34,0 ng/ μ l
Transformación H1	C.C. HT115, pSB1C3_A593+Velvet	ET: $2,5 \times 10^4$ UFC/ μ g

Tabla 5: PCR de colonias y primers usados.

Proceso	Muestra	Resultados	
		TOP 10	HT115
PCR de colonias	BBa_G00100 BBa_G00101	B & C	F
PCR de colonias	dsRNA_Velvet_F_2 dsRNA_Velvet_R_2	D & E	G
Control -	dsRNA_Velvet_F_2 dsRNA_Velvet_R_2		H
Control +	dsRNA_Velvet_F_2 dsRNA_Velvet_R_2		I

Figura 9. PCR de colonias.



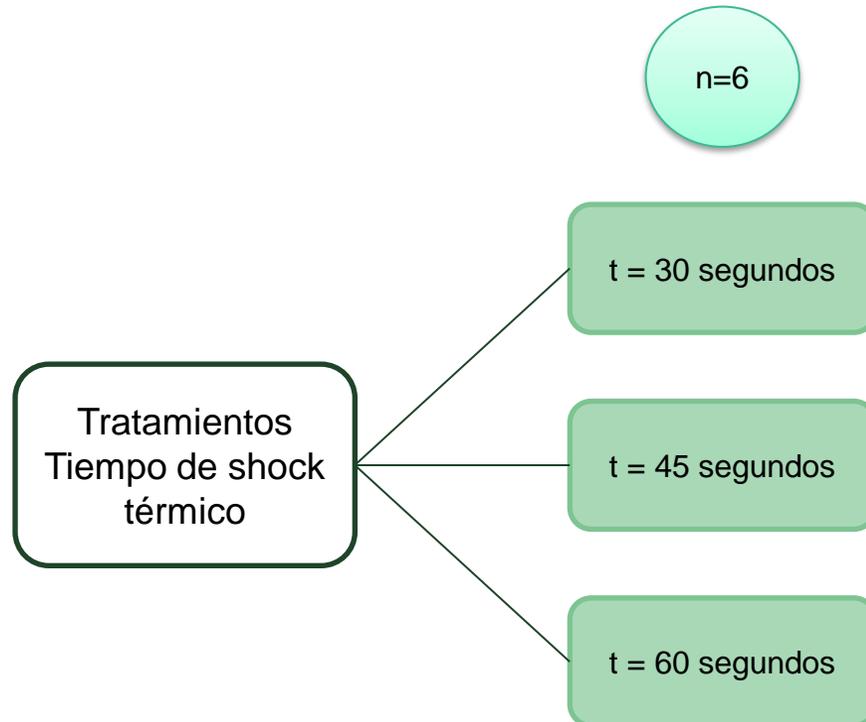


Tabla 9. Eficiencia de transformación de *E. coli* cepa HT115.

	nº	Tratamientos, tiempo de shock térmico (t)		
		30s (UFC/µg)	45s (UFC/µg)	60s (UFC/µg)
Eficiencia de transformación (ET)	1	0,0	15735,3	5735,3
	2	147,1	11911,8	6470,6
	3	6470,6	16617,6	3382,4
	4	0,0	20735,3	9117,6
	5	0,0	9264,7	6176,5
	6	0,0	4705,9	147,1
Control (-)		0	0	0
Promedio		1102,9	13161,8	5171,6

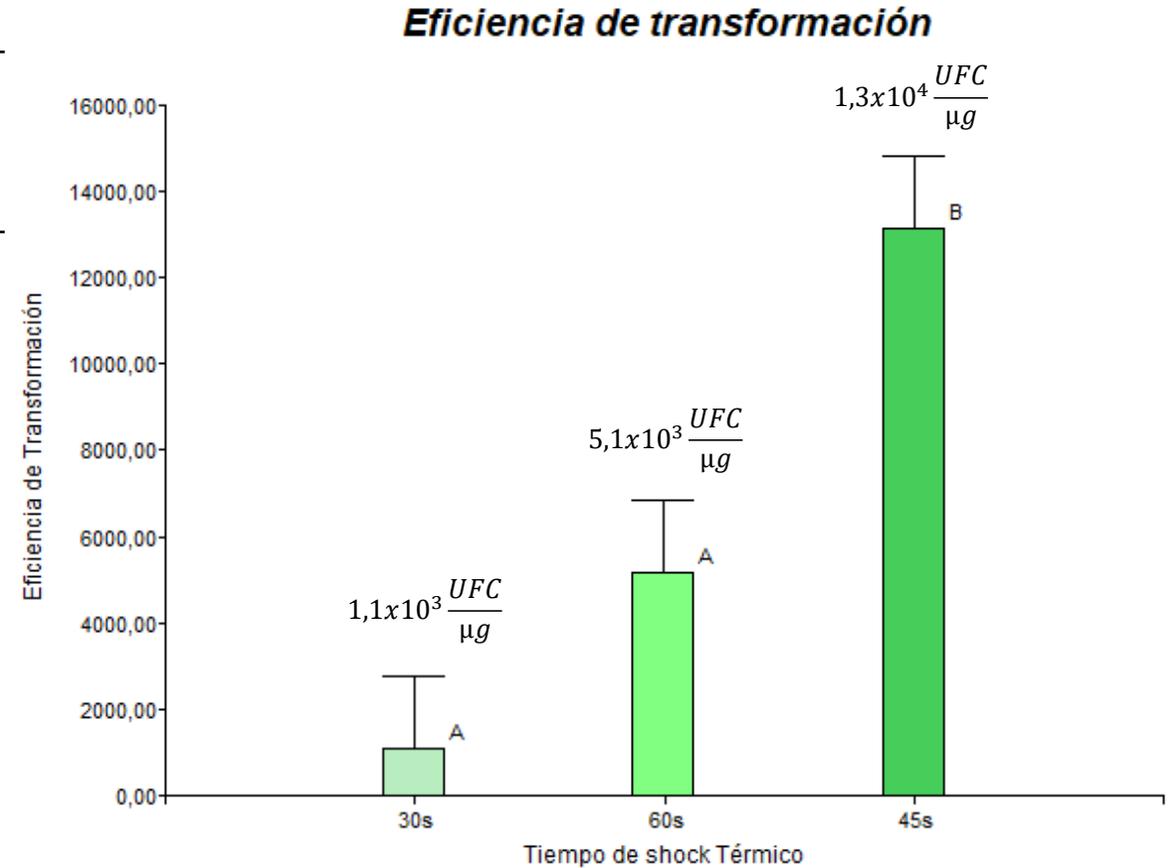
Tabla 7: ANOVA de la eficiencia de transformación de células *E. coli* HT115.

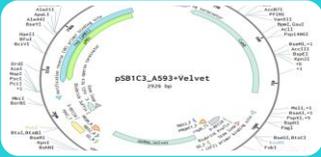
F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	F α	p-valor
TRATAMIENTO	2	451624375,24	225812187,62	13,78	3,68	0,0004
ERROR	15	245800893,89	16386726,26			
Total	17	697425269,13				

Tabla 8: Test de Duncan de los tratamientos.

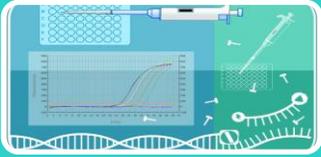
Tratamiento	Medias	N	E.E.	
30s	1102,94	6	1652,61	A
60s	5171,57	6	1652,61	A
45s	13161,76	6	1652,61	B

Figura 10. Gráfica de barras del promedio de la eficiencia de transformación por tratamiento.

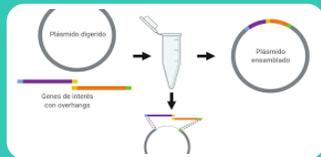




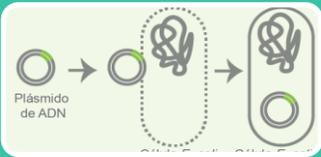
Se obtuvo el ensamblaje del plásmido pSB1C3_A593 con el amplicón del gen *Velvet* mediante técnicas de restricción-ligación.



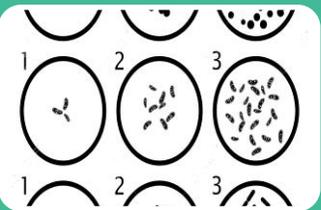
Mediante técnica de PCR overhang, el cDNA obtenido a partir de mRNA de Foc R1, amplificó un segmento del gen *Velvet* compatible con técnicas de restricción-ligación.



Se ensambló el plásmido pSB1C3_A593 con el amplicón del gen *Velvet*, mediante la restricción del plásmido y del amplicón con las enzimas BglIII y KpnI durante 4 horas a 37 °C, y ligando con T4 DNA ligasa durante 80 min a 22 °C.



Por medio del método de choque térmico se transformó *Escherichia coli* cepa One Shot TOP10 y cepa HT115 con el plásmido ensamblado. La PCR de colonias comprobó la presencia del plásmido.



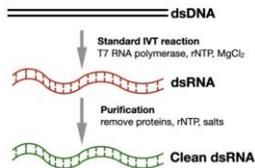
De acuerdo con el análisis de varianza la variación del tiempo de shock térmico genera diferencia significativa en la eficiencia de transformación (valor - $p = 0,0004$). Además, mediante test de Duncan se determina que el tratamientos con shock térmico de 45 segundos es significativamente diferente a los otros tratamientos y posee la mejor eficiencia de transformación $\left(1,3 \times 10^4 \frac{UFC}{\mu g}\right)$.



Evaluar otras variables en la transformación de células competentes para maximizar la eficiencia de transformación.



Verificar la secuencia del amplicón ensamblado mediante secuenciación.



Analizar la producción del dsRNA del plásmido ensamblado.

AGRADECIMIENTOS



Flores Flor, Francisco Ph.D
Director del Proyecto



Granda, Silvana M. Sc.
Laboratorista



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Familia y amigos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Gracias



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA