






Electroporación de la microbiota de placas solares como búsqueda de nuevos chasis biotecnológicos

Mario Herrero Cervera

Trabajo de Fin de Grado – Grado en Biotecnología

13 julio 2018

Índice

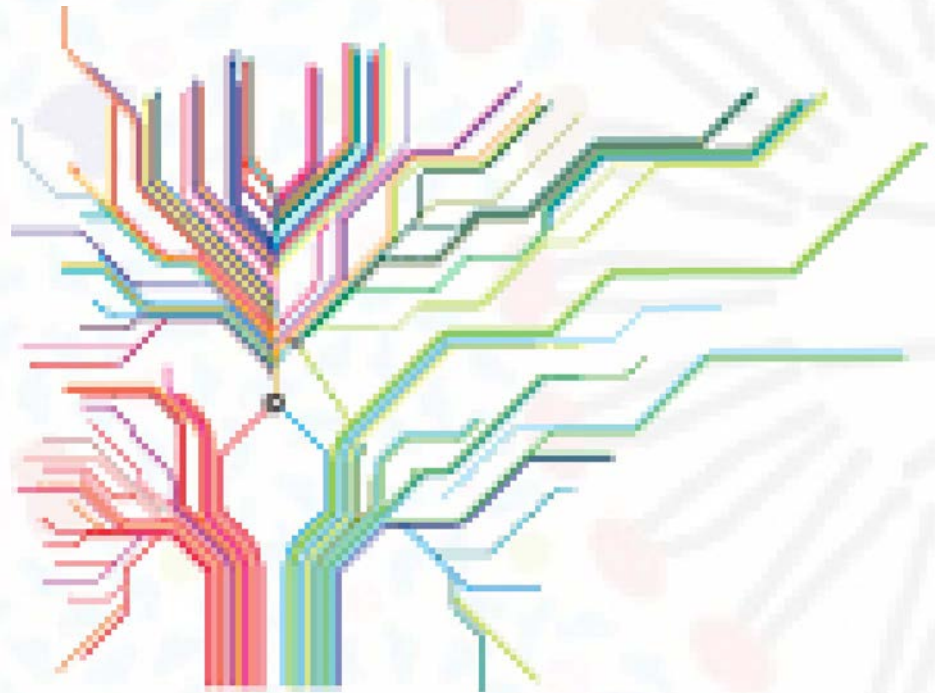
-  Introducción
-  Objetivo
-  Materiales y métodos
-  Resultados
-  Conclusiones

Introducción

The background of the slide features a festive pattern of colorful confetti in shades of blue, yellow, pink, and purple, interspersed with grey streamers that resemble party streamers.

Transformación bacteriana inducida por rayos

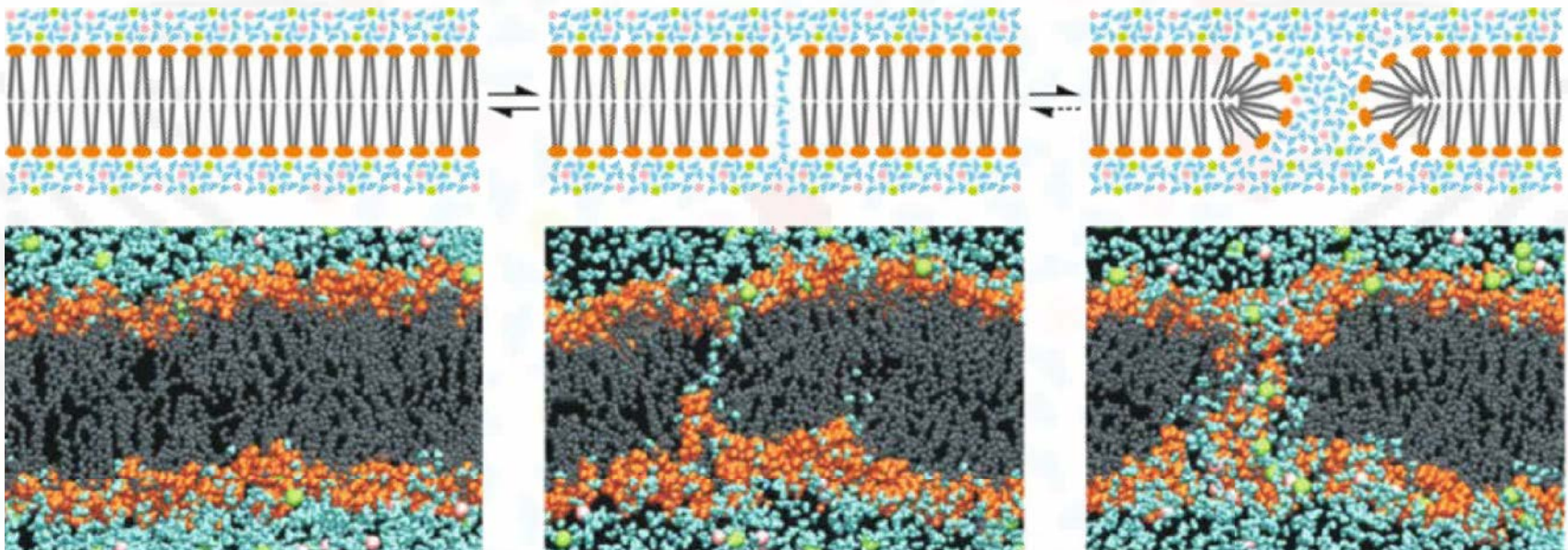
- Transferencia Horizontal de Genes (THG) → adquisición rápida de potenciales habilidades de adaptación
- Rayos como facilitadores de la transformación bacteriana



Modificado de <http://mcinerneylab.com>

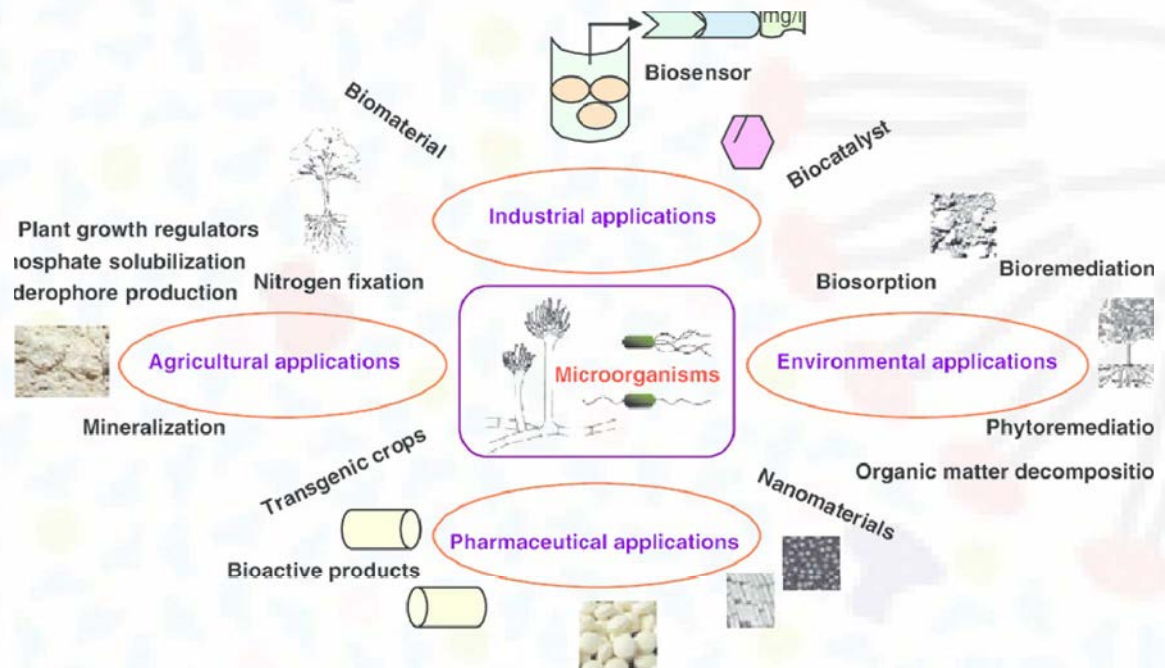
Electroporación

- Primeras aplicaciones: Jean Antoine Nollet (1754) y Louisville Water Company (1896) para la eliminación de microorganismos (electroporación irreversible)
- Década de 1980, electrotransformación de células de mamíferos: electroporación reversible - formación de poro acuoso metaestable



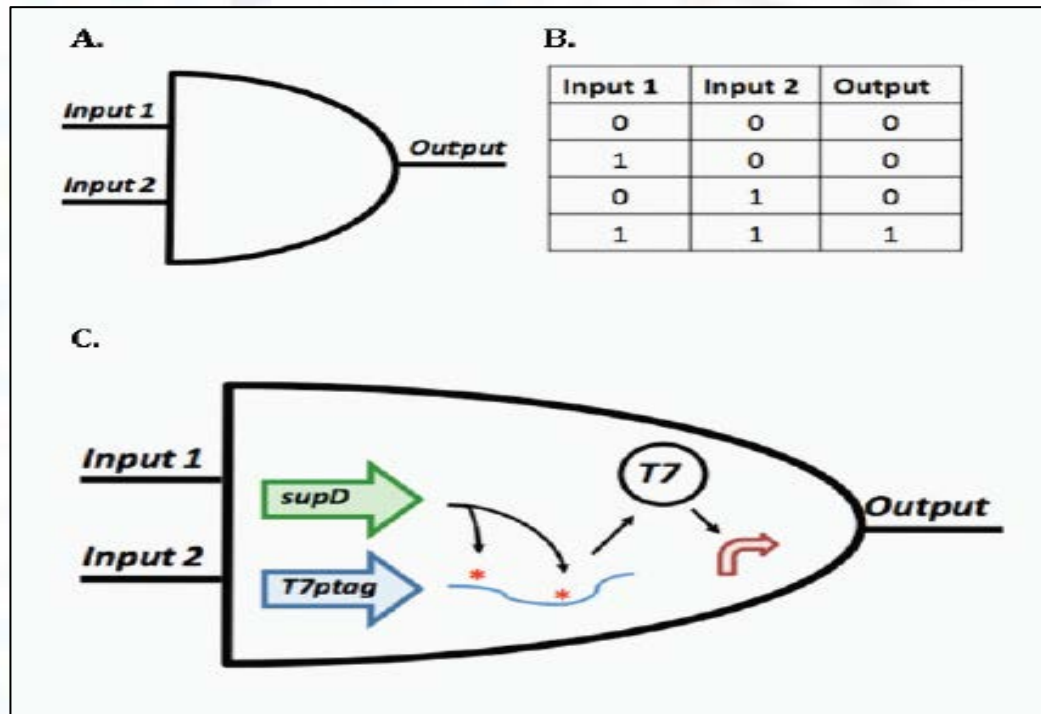
Microorganismos y biotecnología

- 1700 aC: poema sumerio, "Himno a Ninkasi", menciona la elaboración de cerveza.
- Hallazgo de un tarro de 7000 años con vino
- Robert Hooke y Antoni van Leeuwenhoek: descubrimiento de microorganismos
- La biotecnología utiliza microorganismos como fábricas vivientes para fabricar productos con facilidad y flexibilidad



Chasis en biología sintética y biotecnología

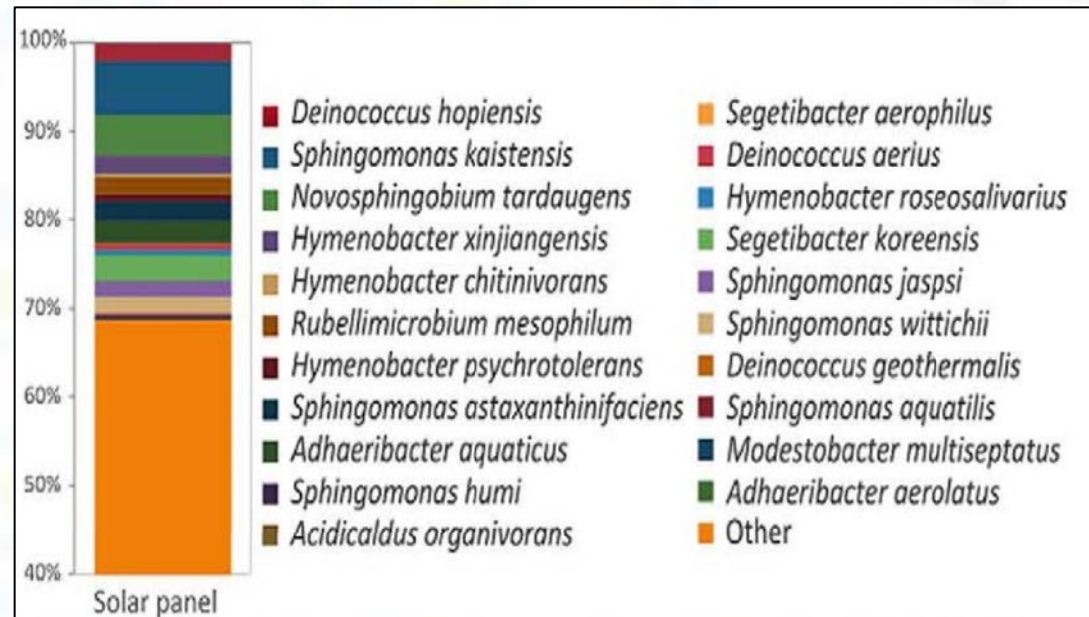
- *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* son los chasis de biología sintética y biotecnología más usados
- Evolución desde simples mutaciones genéticas a complejos circuitos sintéticos y de diseño
- Necesidad de nuevos y más flexibles chasis



Biodiversidad y microbiota de paneles solares

- Ambientes extremos: diversas estrategias de supervivencia y adaptación
- Paneles solares: más de 500 especies diferentes

- Explotación de la biodiversidad natural: necesidad del desarrollo de la biología sintética y biotecnología

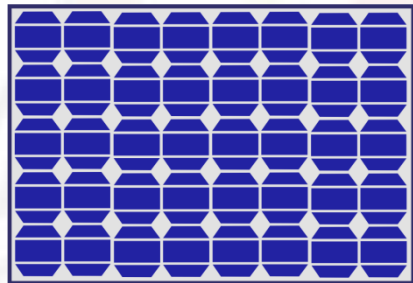


Modificado de Dorado-Morales et al. (2016)

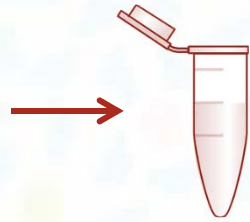
Objetivo

The background of the slide features a light cream-colored surface. It is decorated with a pattern of small, multi-colored confetti pieces in shades of blue, yellow, pink, and purple. Overlaid on this are faint, grey line-art illustrations of groups of people holding hands in a circle, creating a sense of community and connection.

Modificación genética mediante electroporación de microorganismos presentes en muestras de placas solares, muestra derivada de la naturaleza, con el objetivo de explotar su potencial y encontrar nuevos chasis en biología sintética y biotecnología



Placa solar

Muestra
placa solar

Caracterización

Elección resistencia

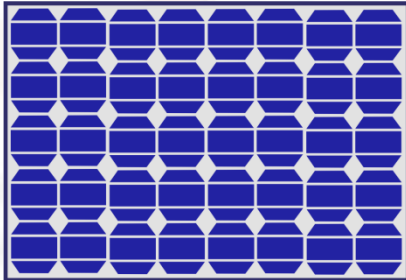
Protocolo
electrocompetencia

Esquema trabajo

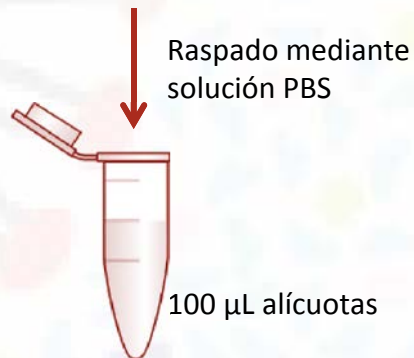
Análisis colonias
positivas e
identificación

Materiales y métodos

Muestras biológicas usadas



1.28 m² placa
solar



Muestra de
placa solar
(SP)

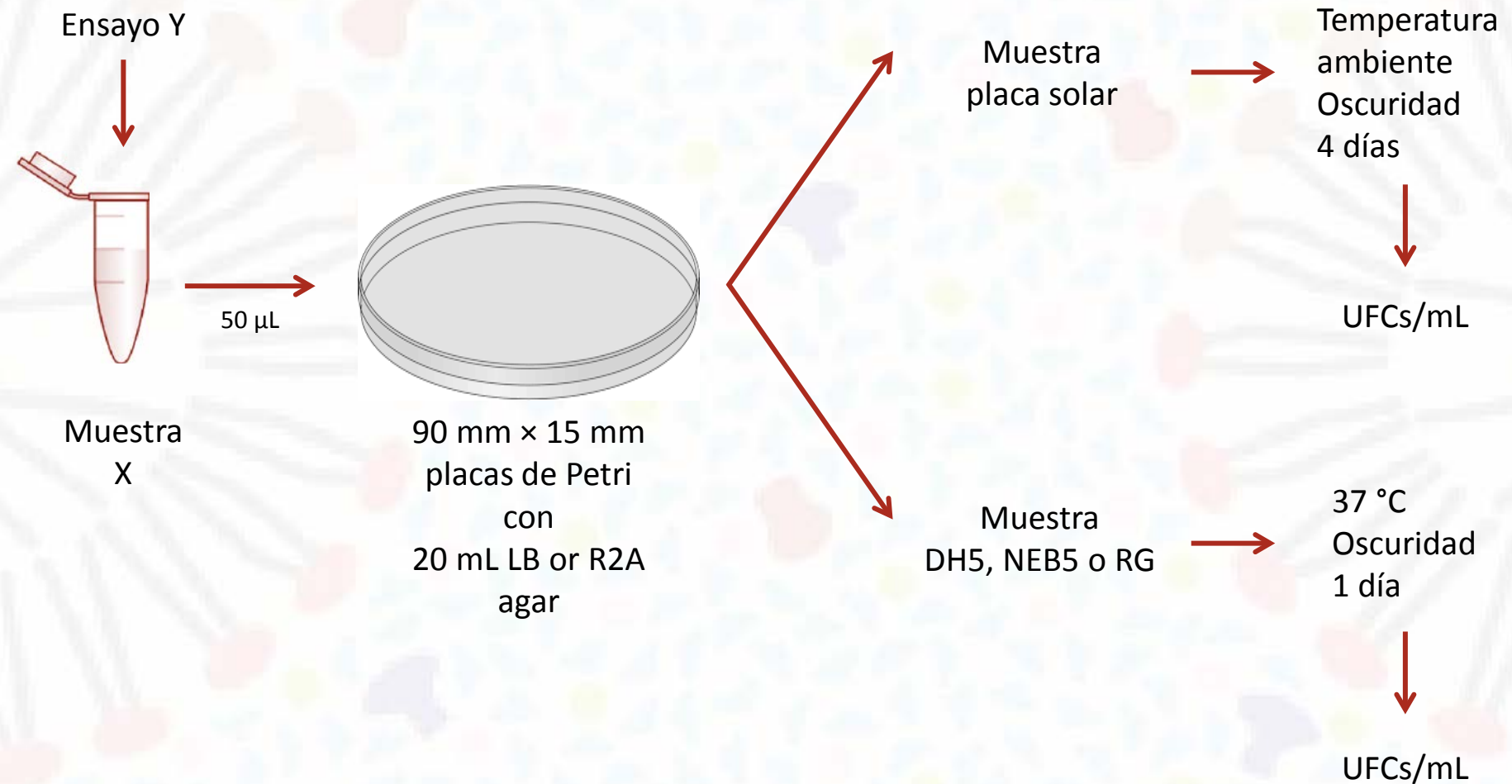
Escherichia coli DH5α
(DH5)

Escherichia coli electrocompetente
casera DH5α de Ron Geller (RG)

Escherichia coli electrocompetente
comercial NEB5
(NEB5)

E. coli

Cultivo en placa de medio sólido



Ensayo de inhibición crecimiento de muestra placa solar

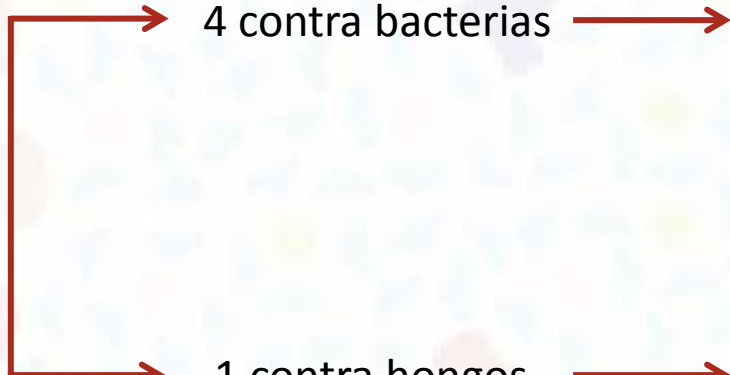
5 inhibidores
de crecimiento

4 contra bacterias

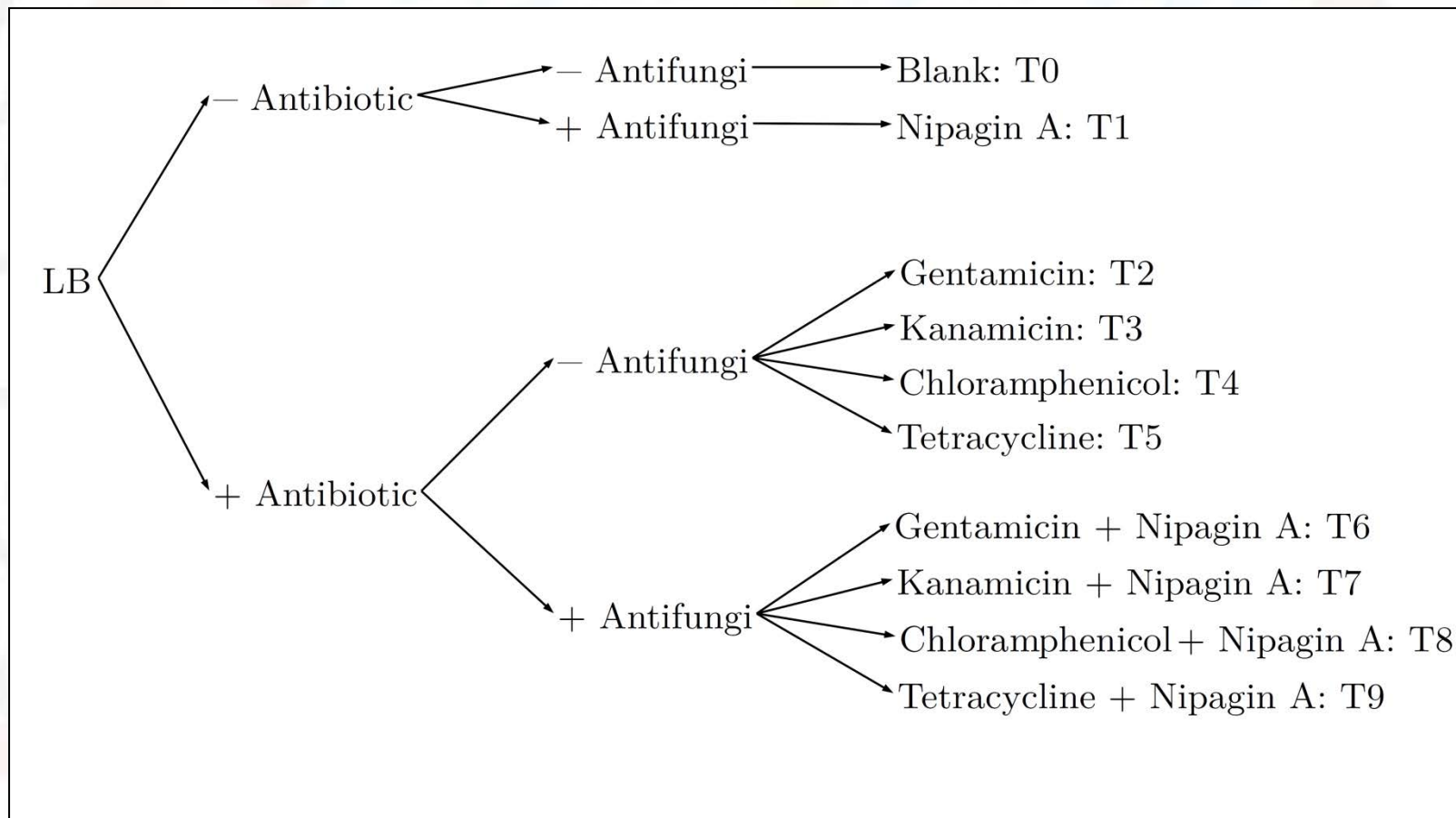
Gentamicina
Kanamicina
Cloranfenicol
Tetraciclina

1 contra hongos

Nipagina A

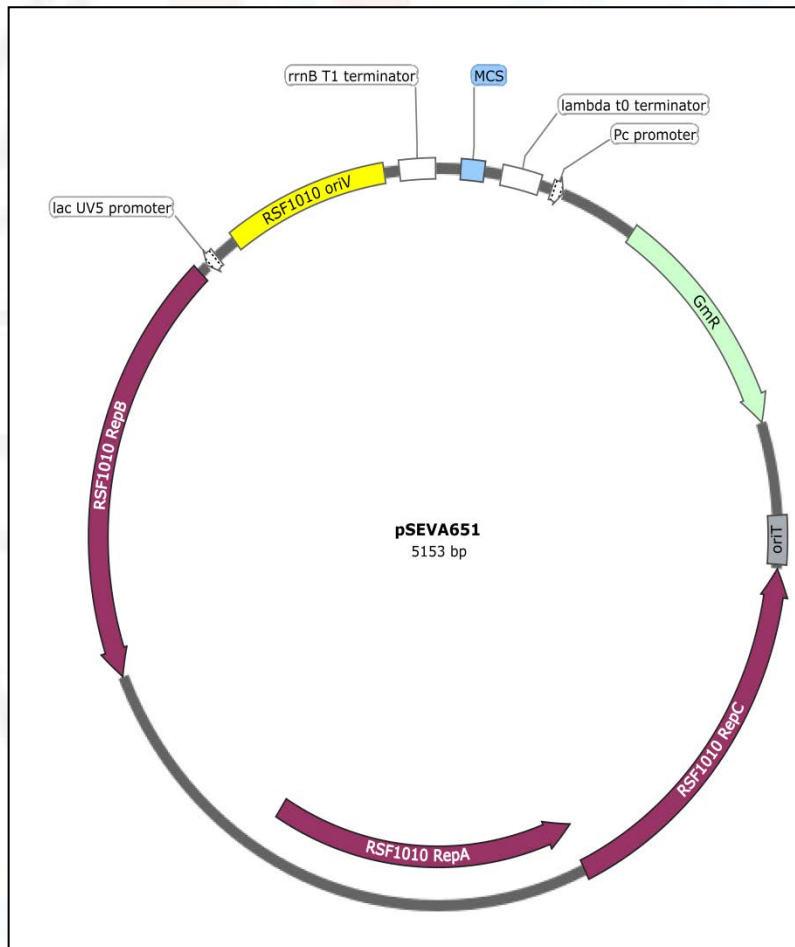


Ensayo de inhibición crecimiento de muestra placa solar



Esquema de evaluación de la sensibilidad de muestra del panel solar a antibióticos

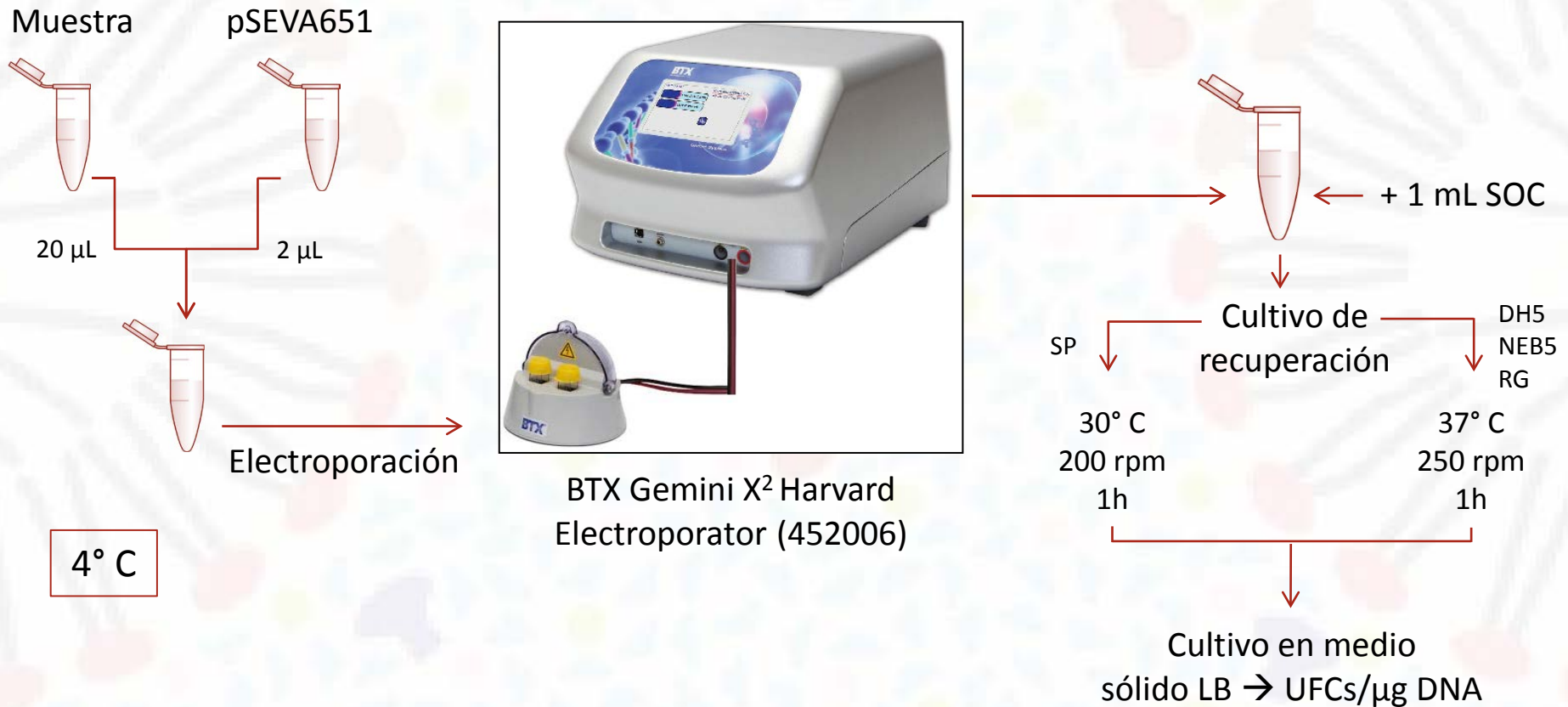
Plásmido pSEVA651 de resistencia a antibiótico



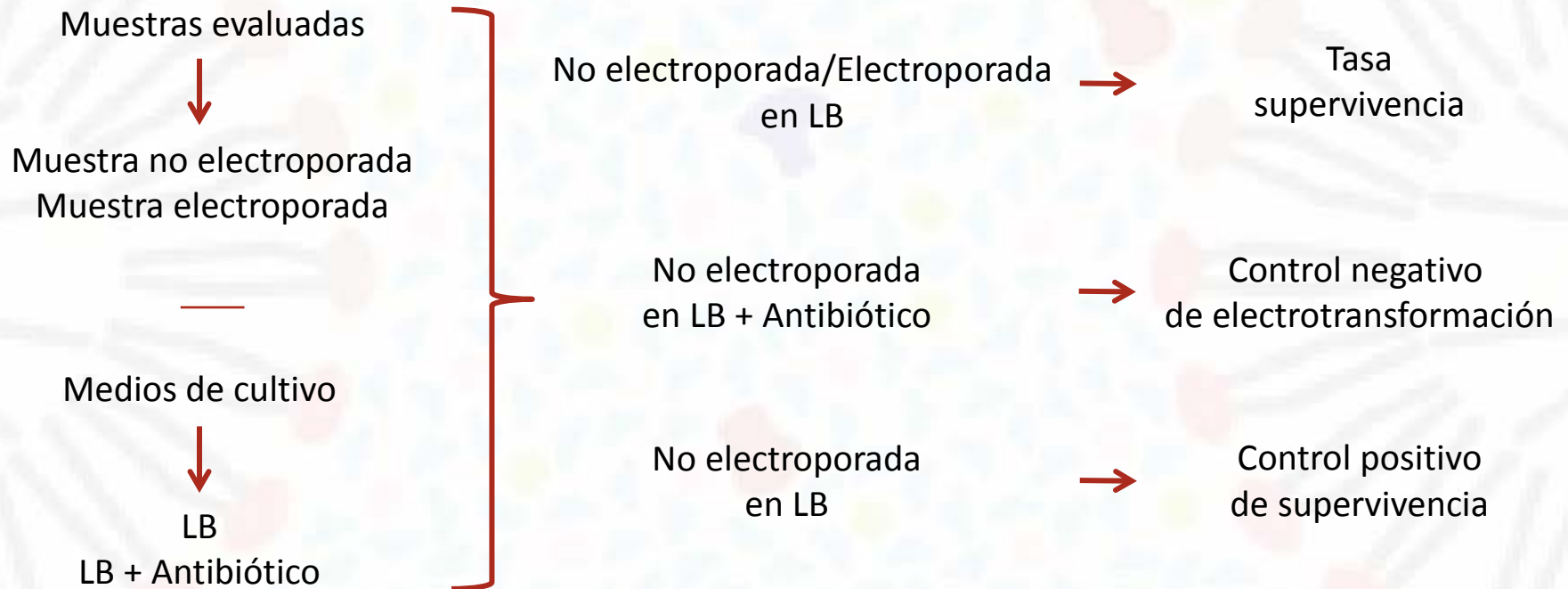
| Característica | Valor |
|----------------|--|
| Estructura | dsDNA circular |
| Tamaño | 5153 pb |
| Masa molecular | 1.89×10^{11} mol/ μ g DNA |

Información del plásmido generada mediante el software SnapGene (de GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

Electroporación y cultivo de recuperación



Electroporación y cultivo de recuperación



Efecto de la muestra de placa solar sobre electrotransformación de *E. coli*

| Muestra | μL NEB5 | μL SP (dilución) | % SP (v/v) |
|----------------------|--------------------|--------------------------------|------------|
| NEB5 | 20 | 0 | 0 |
| SP-D | 0 | 20 (Directa) | 100 |
| SP-10 ⁻¹ | 0 | 20 (10 ⁻¹) | 1 |
| SP-10 ⁻³ | 0 | 20 (10 ⁻³) | 0.1 |
| SP-10 ⁻⁵ | 0 | 20 (10 ⁻⁵) | 0.001 |
| Mix-D | 10 | 10 (Directa) | 50 |
| Mix-10 ⁻¹ | 10 | 10 (10 ⁻¹) | 0.5 |
| Mix-10 ⁻³ | 10 | 10 (10 ⁻³) | 0.05 |
| Mix-10 ⁻⁵ | 10 | 10 (10 ⁻⁵) | 0.0005 |

NEB5 → *E. coli*

SP → Muestra placa solar

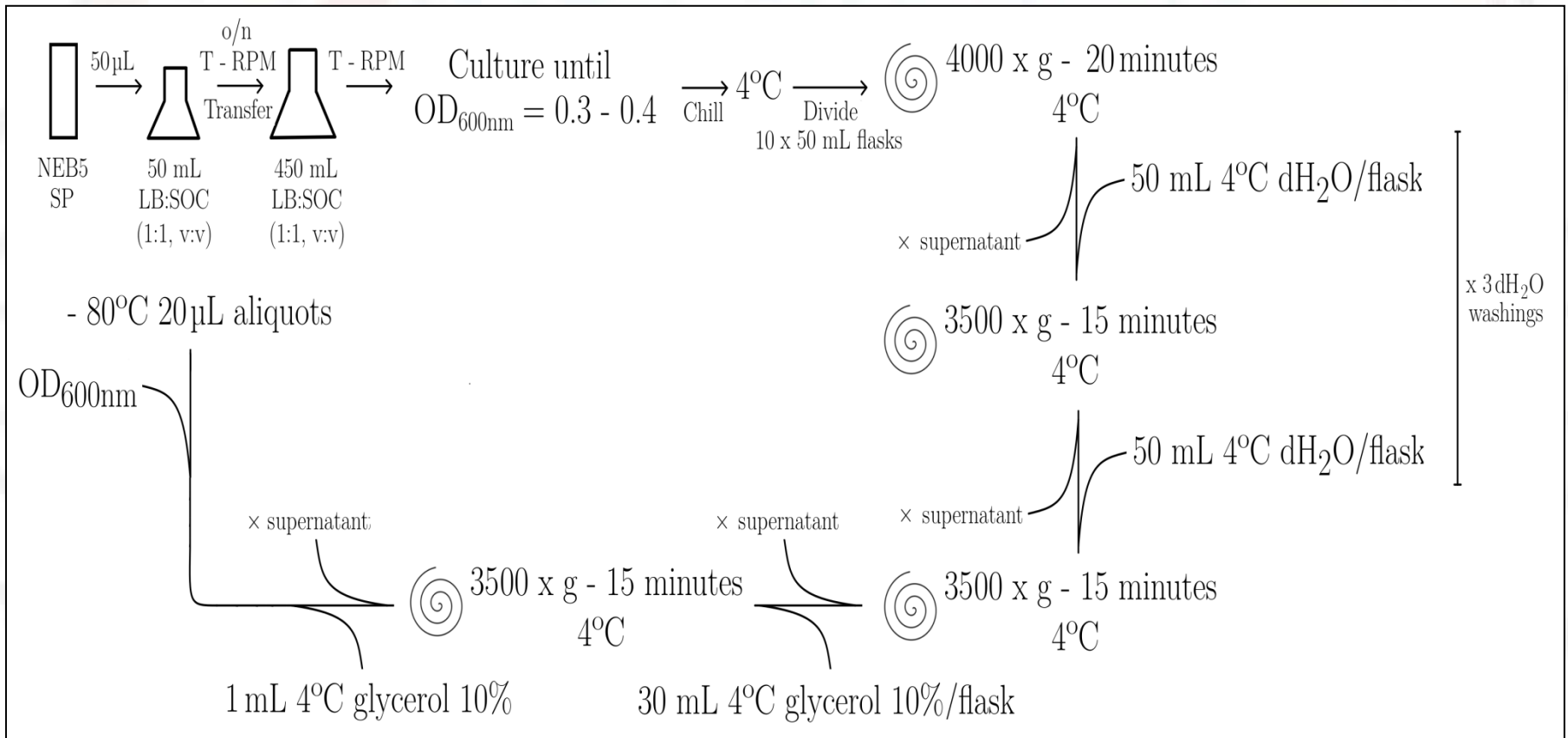
Mix → Mezcla NEB5 + SP

Esquema de la organización de ensayo

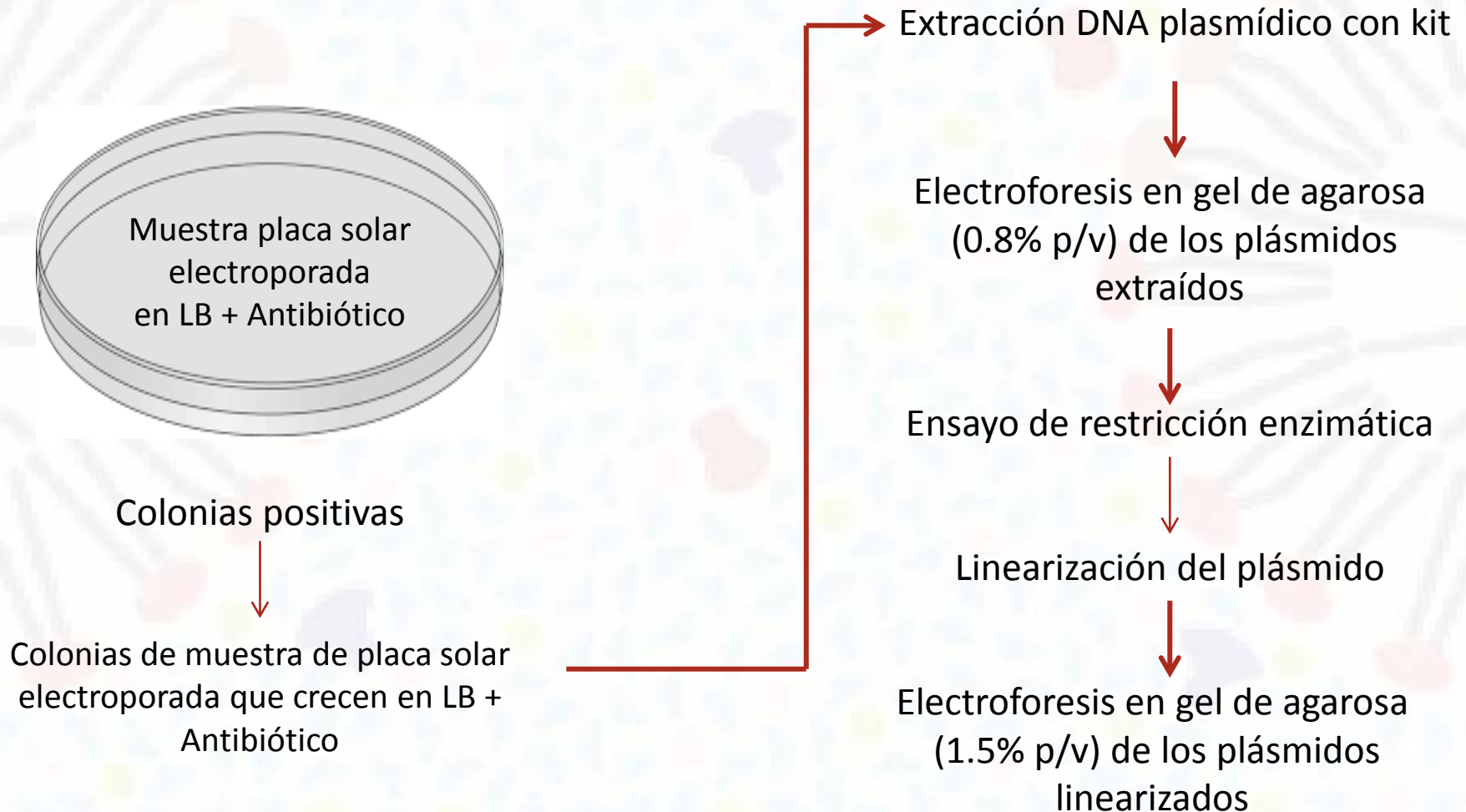


Cultivo en medio sólido LB → UFCs/ μg DNA

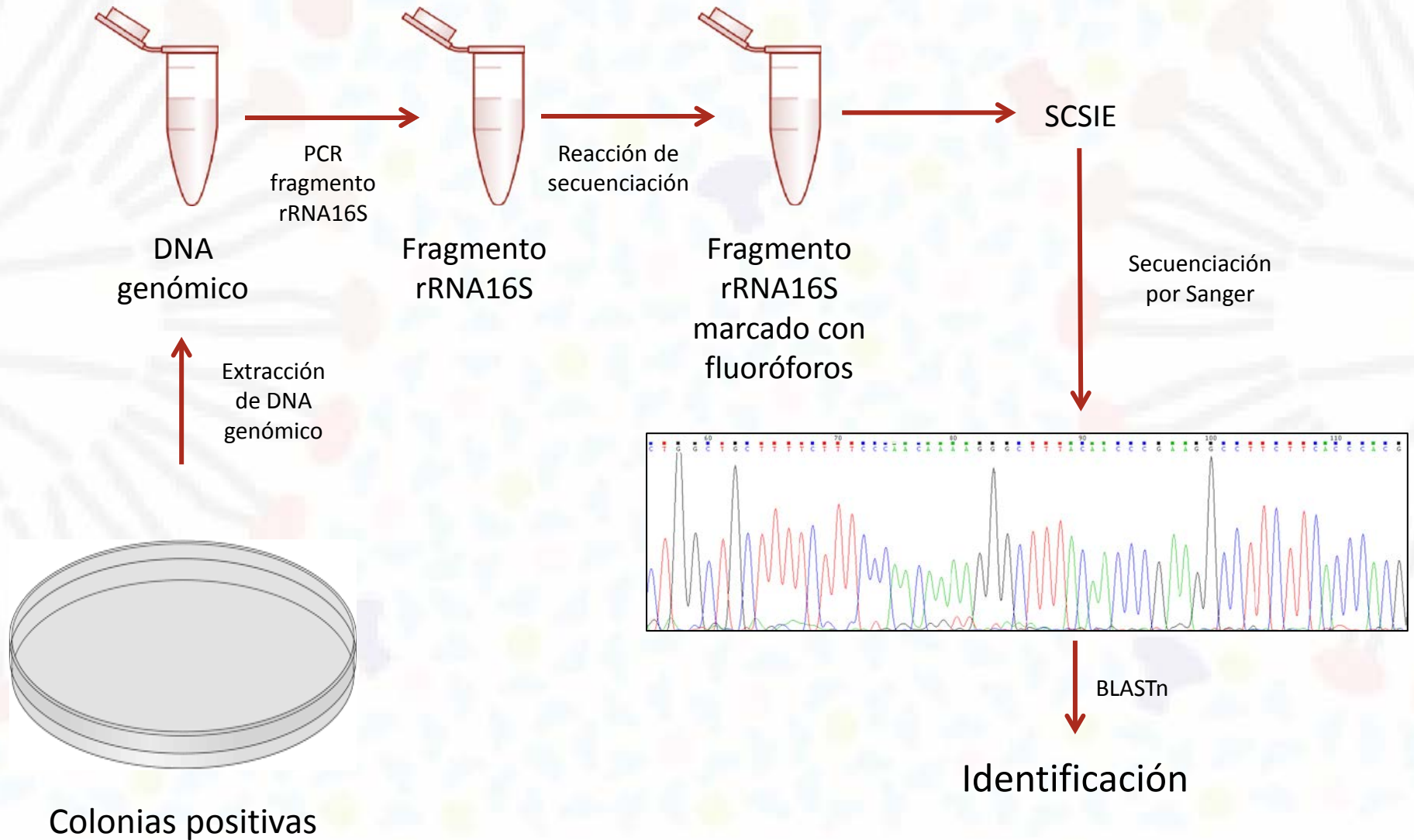
Protocolo de electrocompetencia



Confirmación de las colonias positivas en la electroporación



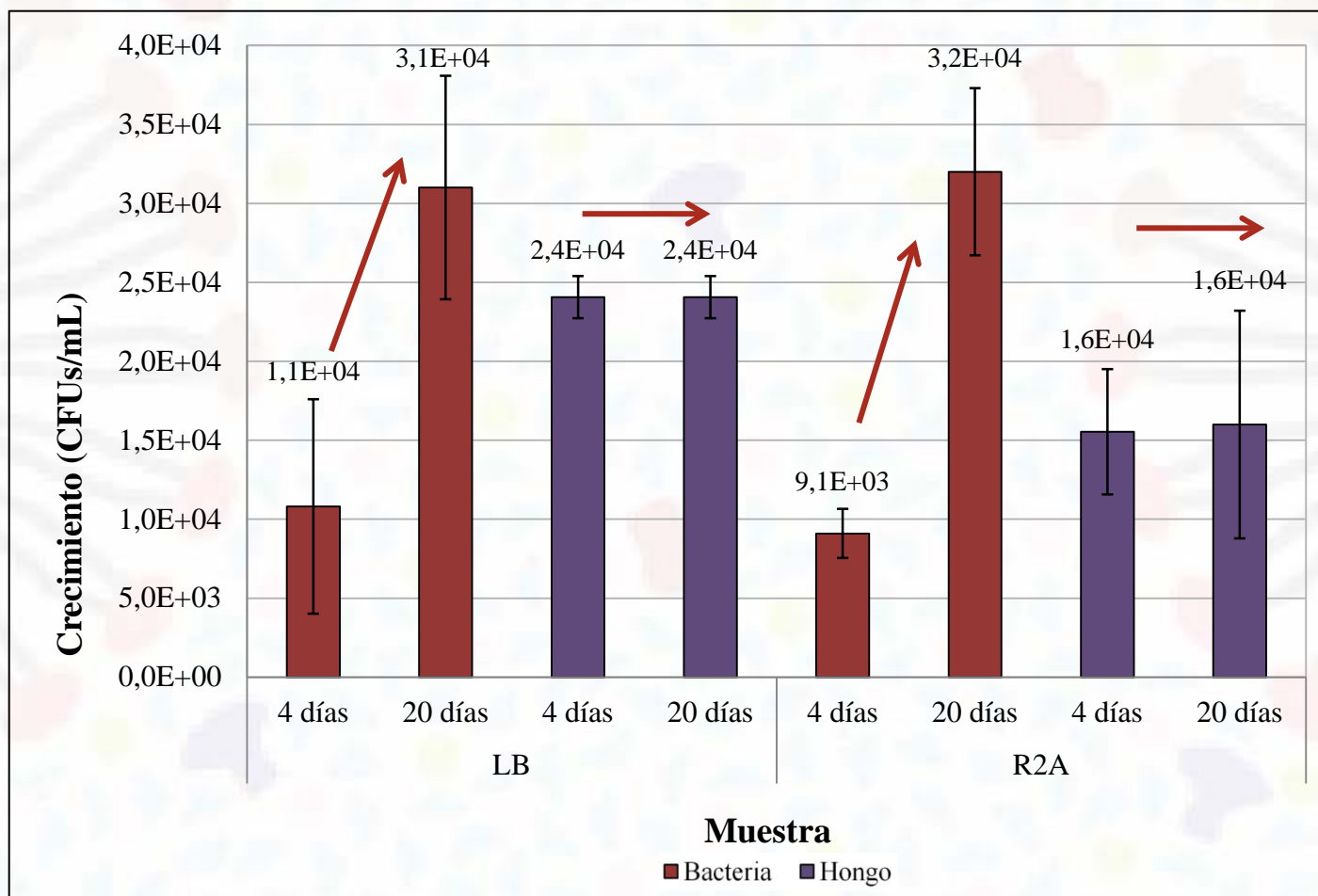
Identificación de las colonias electrotransformadas



Resultados

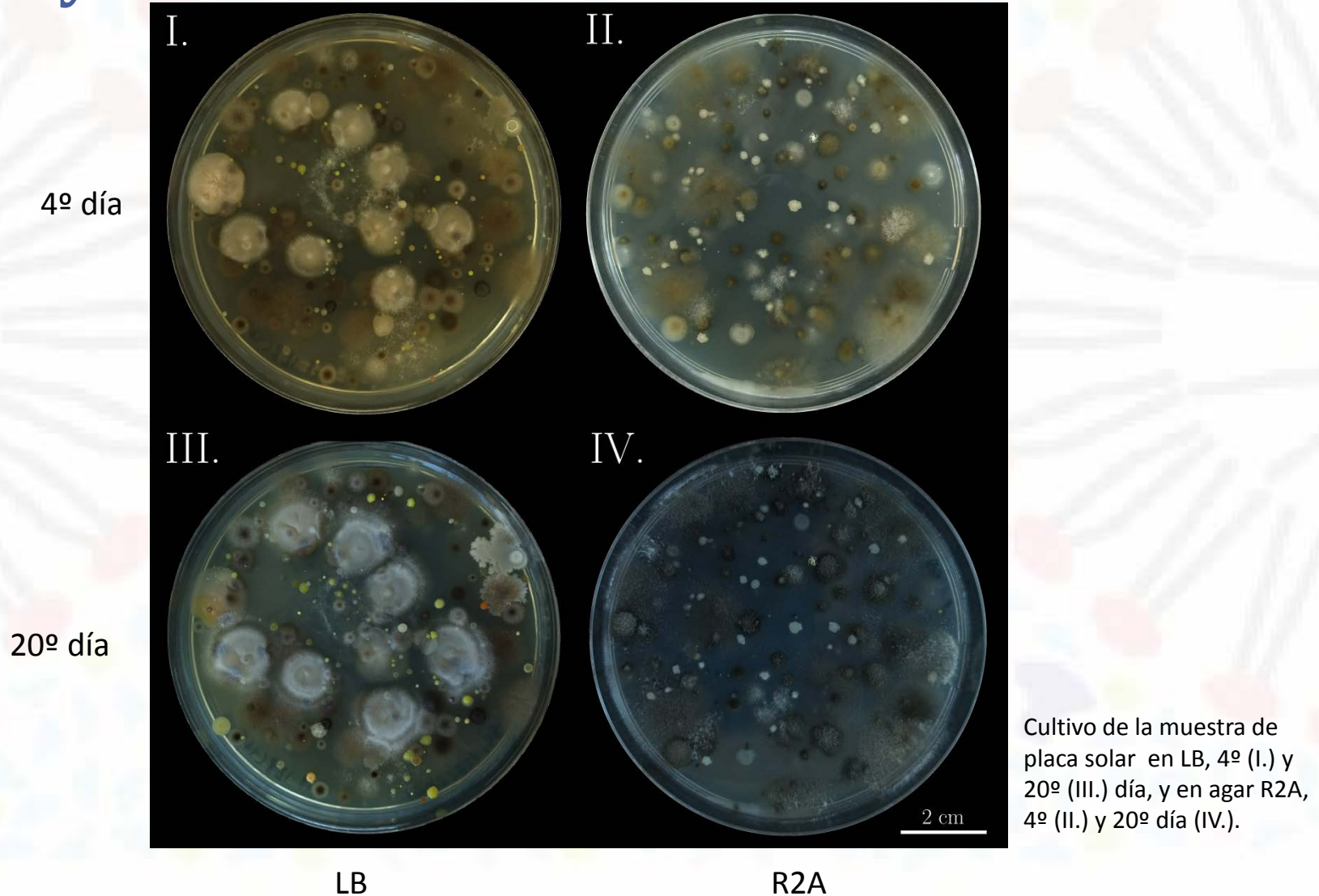
The background of the slide features a light cream color with a subtle pattern. It includes small, multi-colored confetti dots in shades of blue, yellow, pink, and purple. Overlaid on this are faint, grey line-art illustrations of groups of people holding hands in a circle, creating a sense of community or shared achievement.

Diferentes colonias según medio de cultivo y colonias más visibles al 20º día

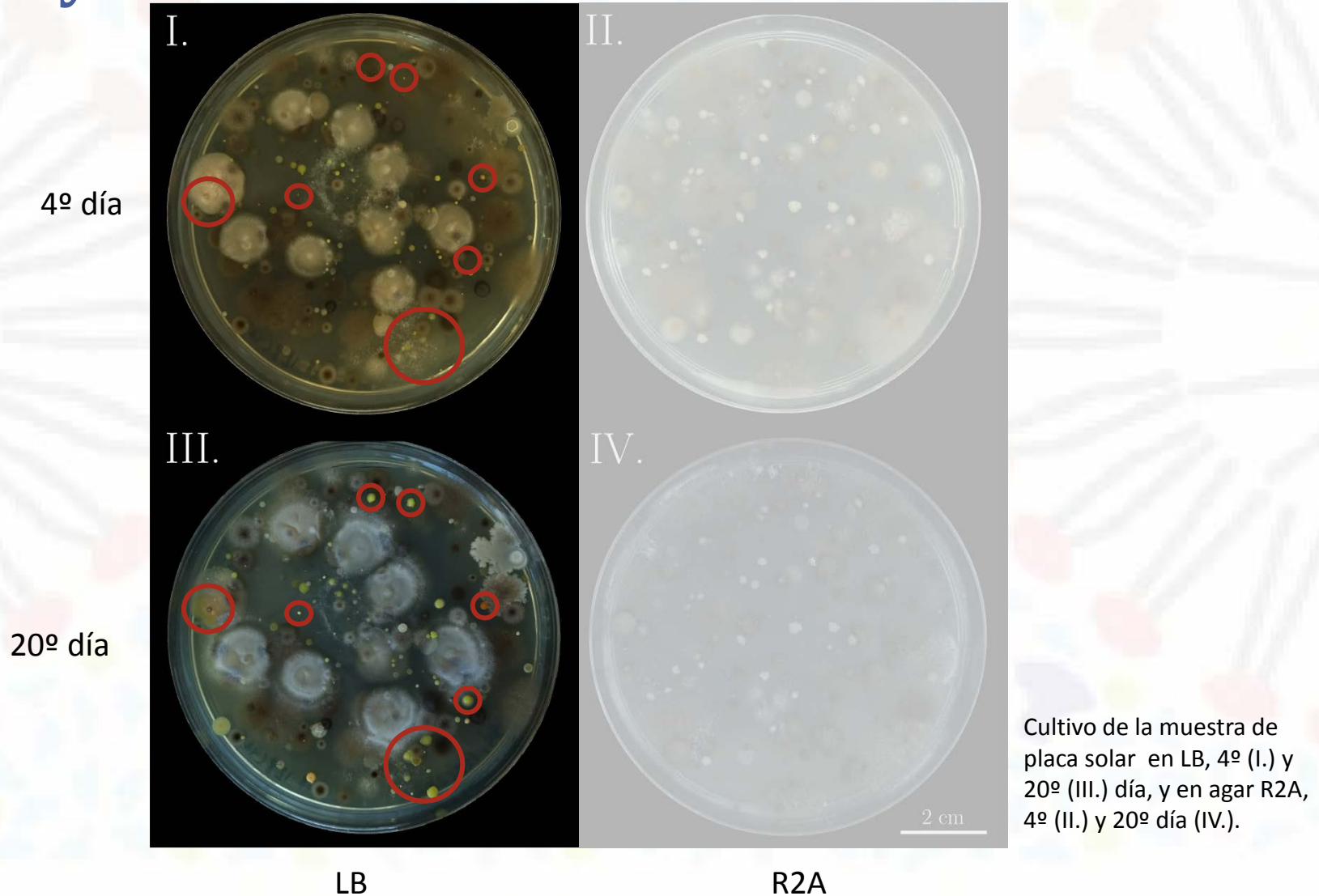


Caracterización del crecimiento de la muestra de panel solar en cultivo de medios sólidos, LB y R2A, en el cuarto y vigésimo día de cultivo.

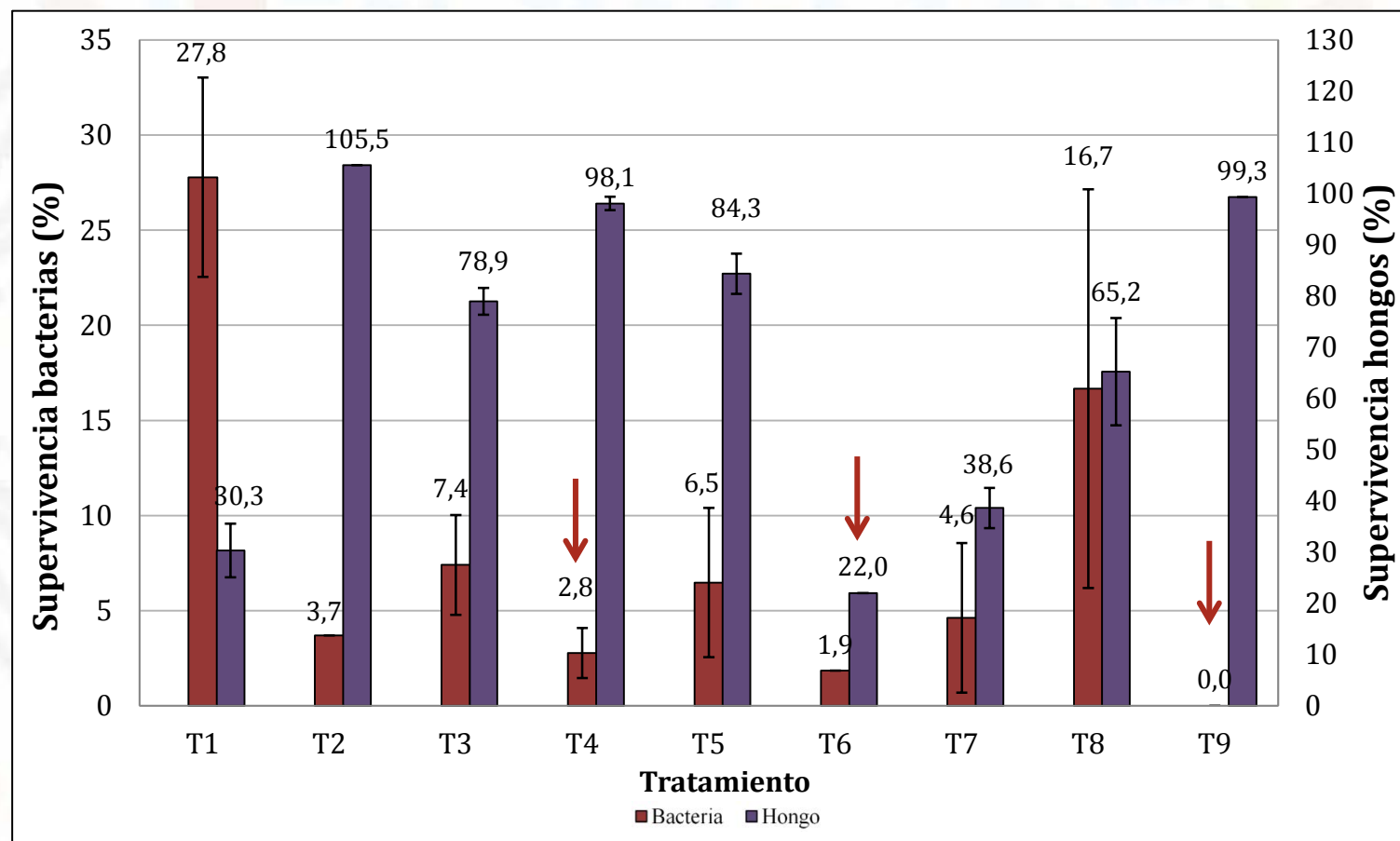
Diferentes colonias según medio de cultivo y colonias más visibles al 20º día



Diferentes colonias según medio de cultivo y colonias más visibles al 20º día



Gentamicina y Nipagin A como inhibidores de crecimiento de la muestra de la placa solar



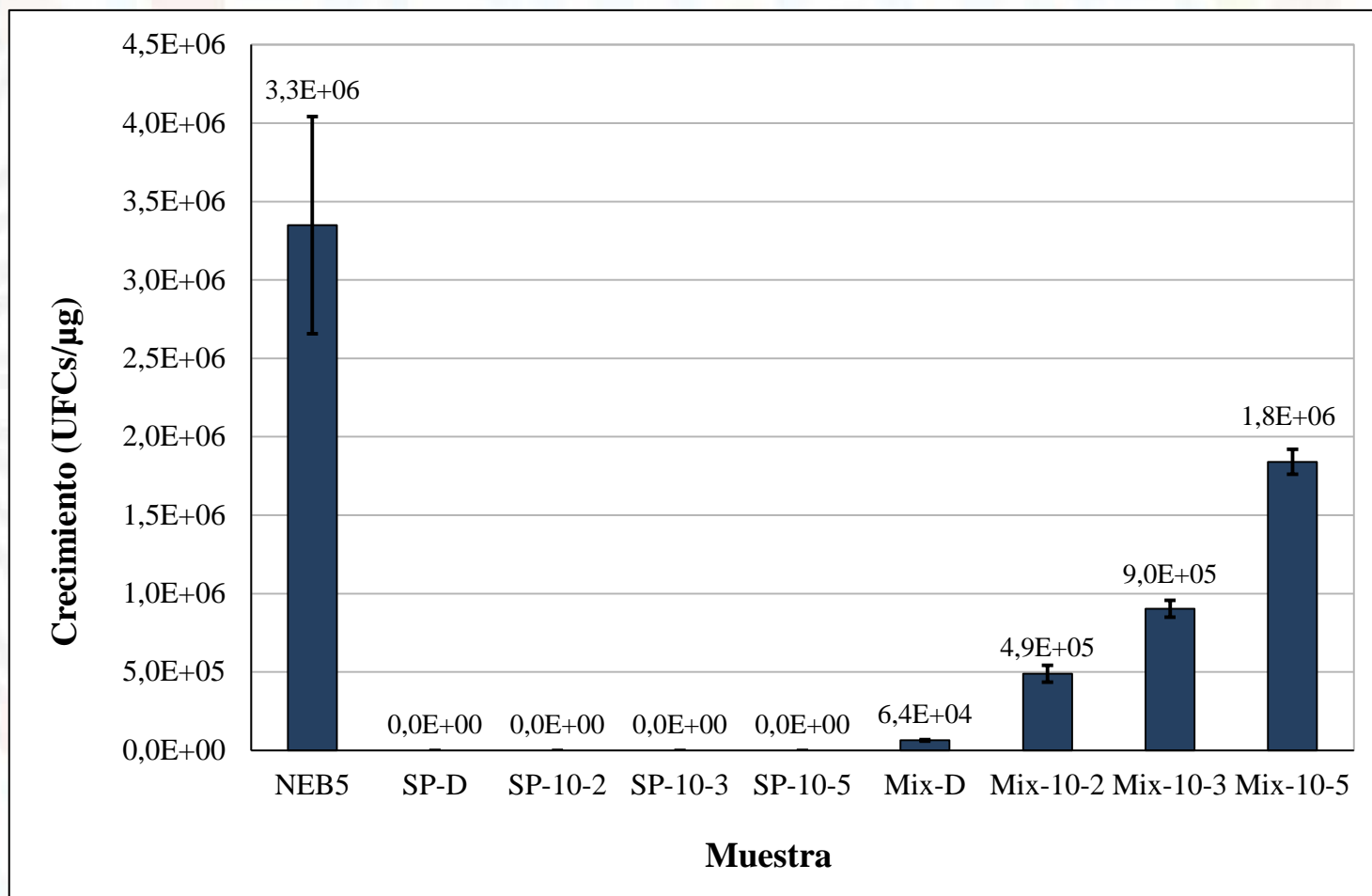
Crecimiento del panel solar en ensayos de inhibidores microbianos.

Extracción satisfactoria pSEVA651

| Concentración (ng/ μ L) | Rendimiento (μ g) | A_{260}/A_{230} | A_{260}/A_{280} |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|
| 27.16 +/- 0.40 | 2.72 +/- 0.04 | 1.79 +/- 0.01 | 1.38 +/- 0.08 |

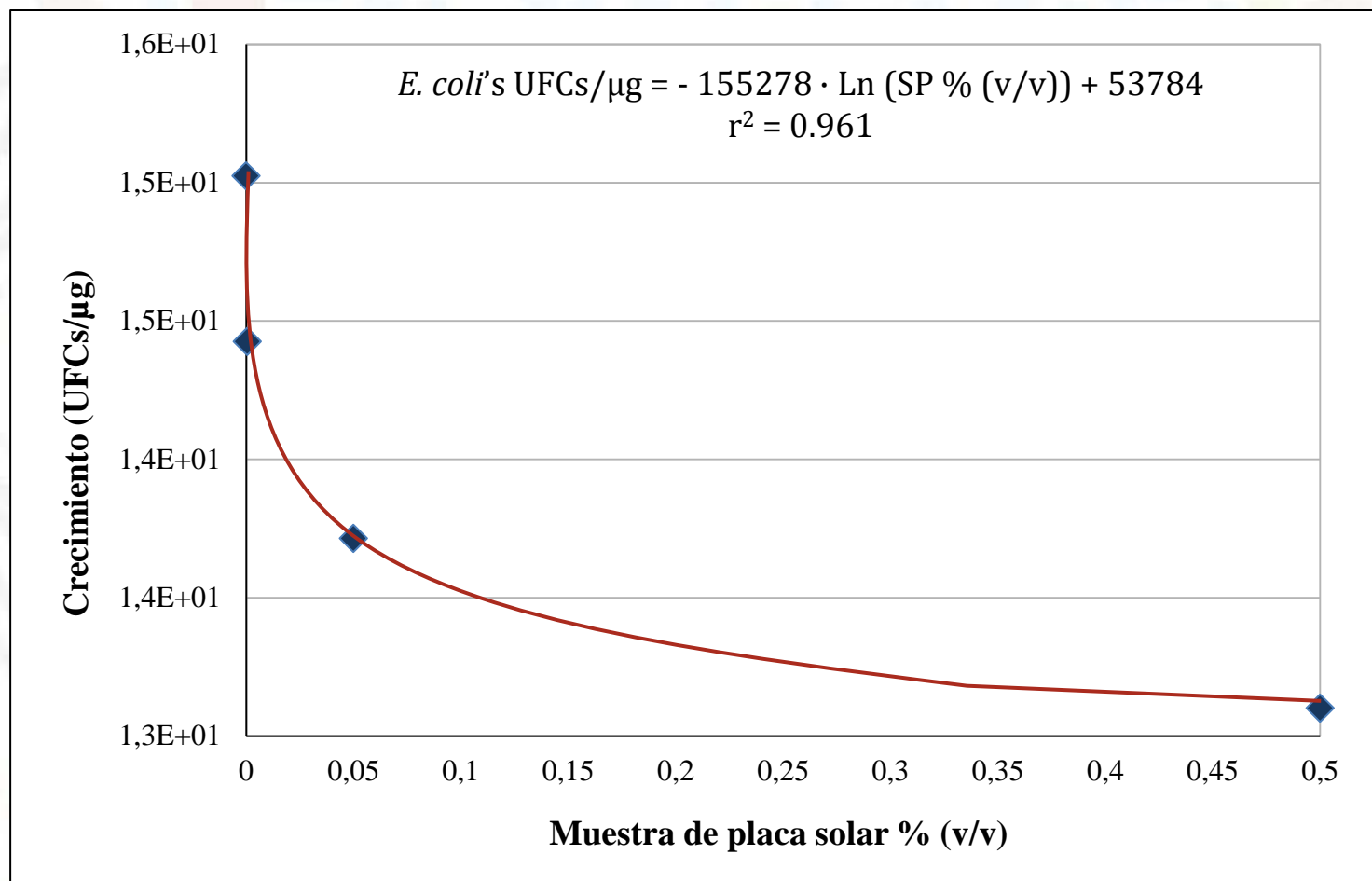
Cuantificación del pSEVA651 extraído

La muestra de placa solar tiene un efecto negativo sobre electroporación de *E. coli*



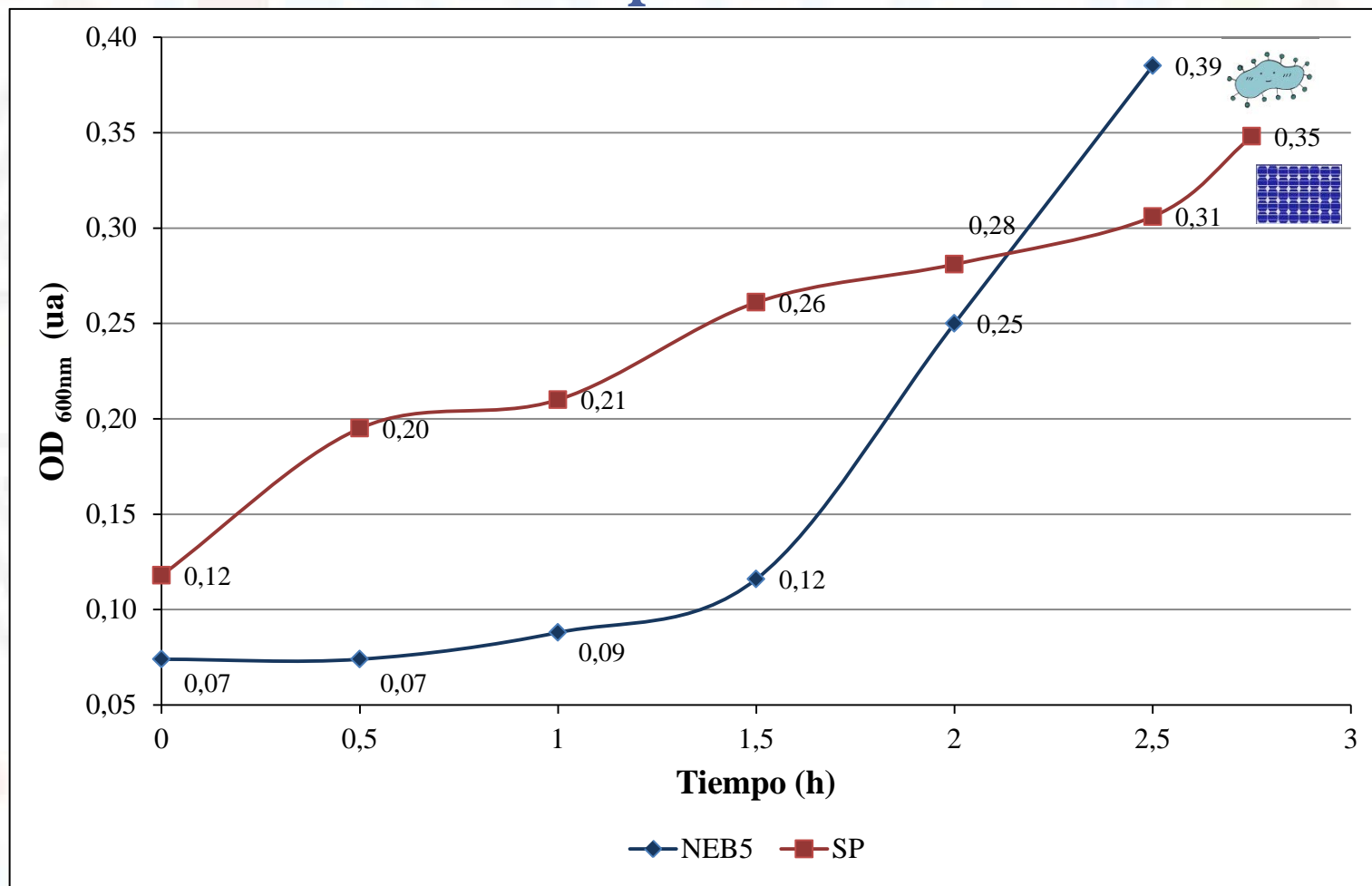
Efecto inhibitor de la muestra de la placa solar sobre la electrotransformación de NEB5.

La muestra de placa solar tiene un efecto negativo sobre electroporación de *E. coli*



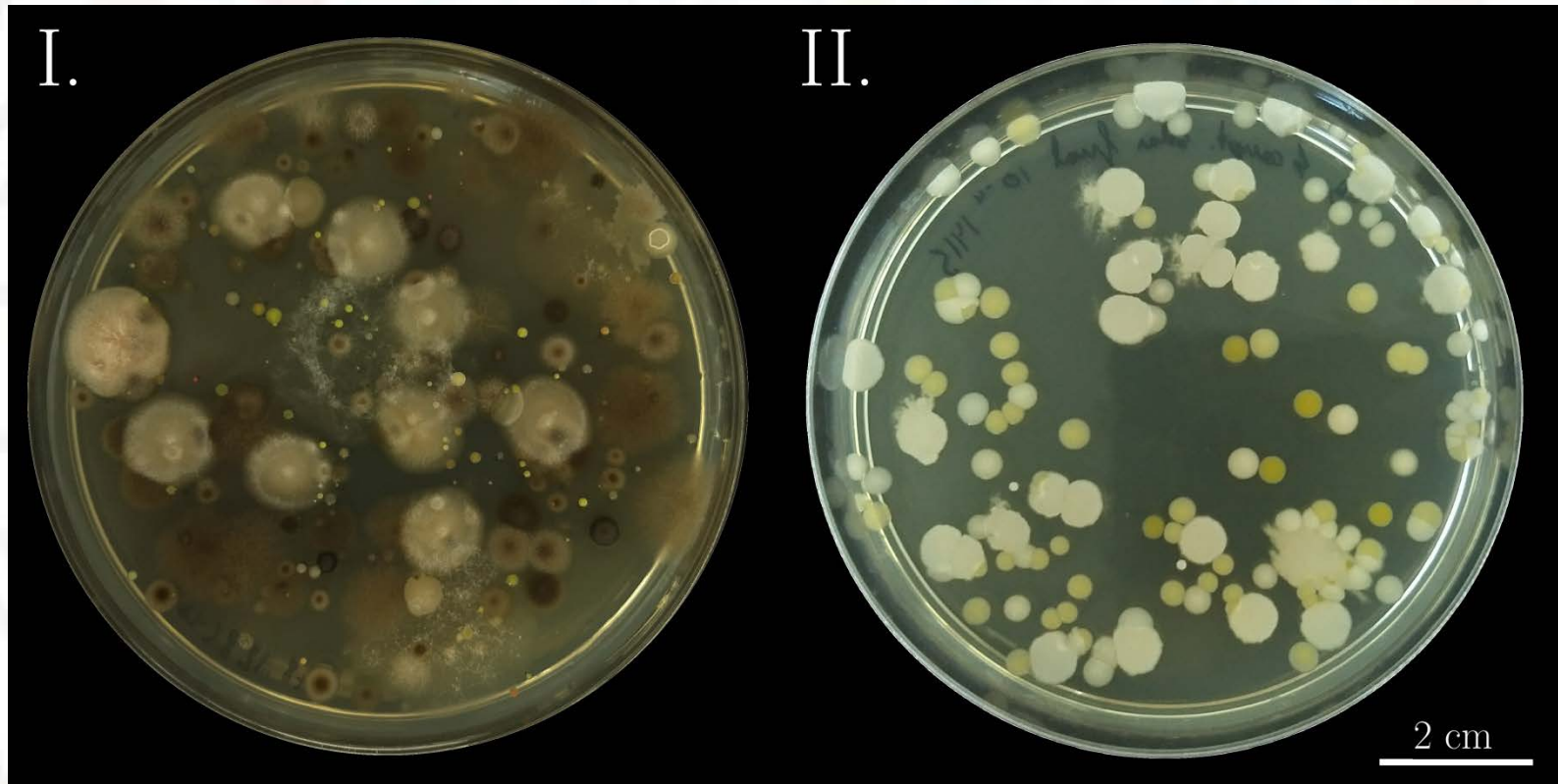
Relación gráfica entre la eficiencia de electrotransformación de NEB5 y concentración de muestra del panel solar.

Electrocompetencia: crecimiento lento de la muestra de la placa solar vs. *E. coli*



Cambio de OD_{600nm} de NEB5 y de la muestra de la placa solar durante el cultivo en caldo LB: SOC (1: 1, v: v)

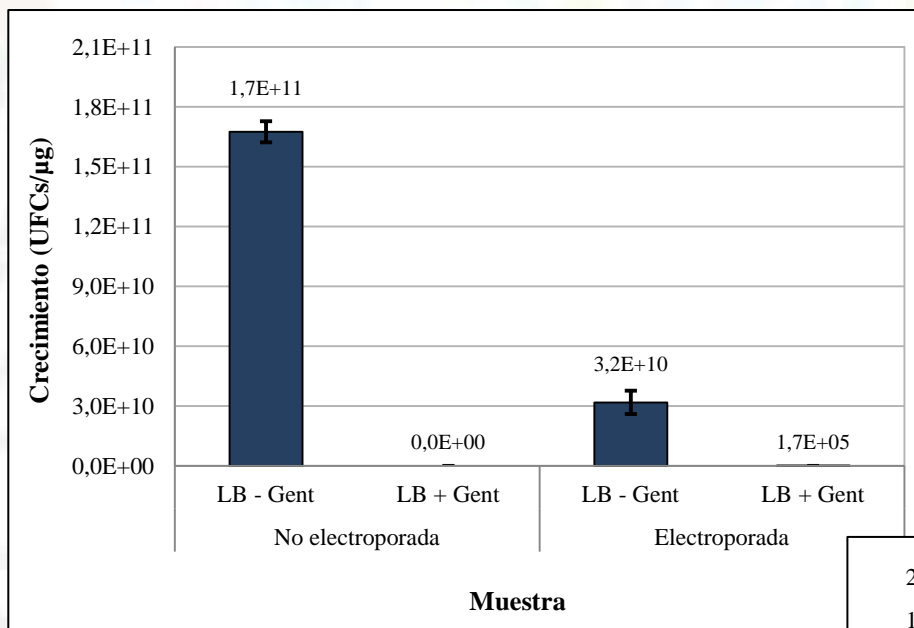
Electrocompetencia: disminución biodiversidad de la muestra de la placa solar



Cambio en la biodiversidad de la muestra de placa solar debido al protocolo de electrocompetencia: I., antes; II., después.

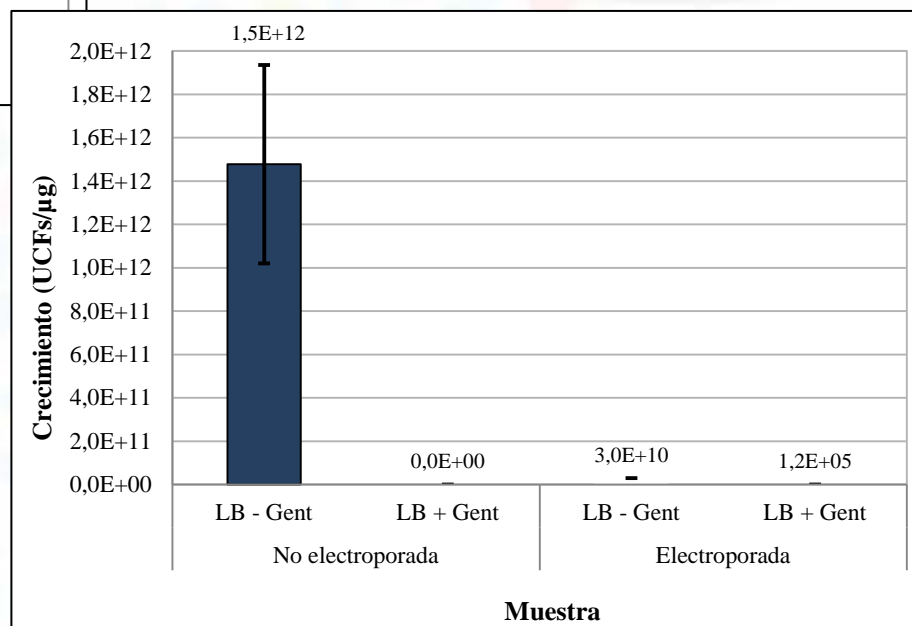
Eliminación de hongos → Nipagina A no es necesaria

✓ Control electrocompetencia y electroporación

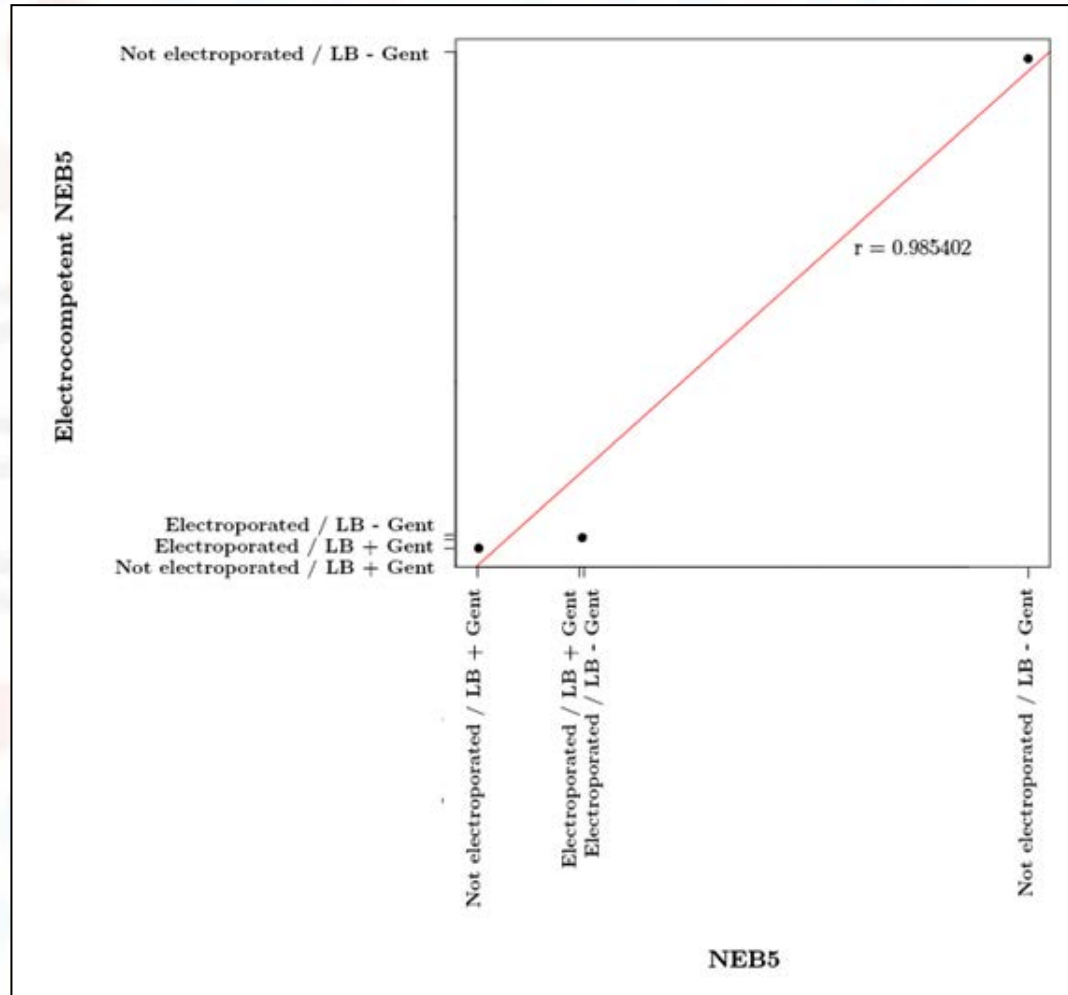


Electroporación de *E. coli*

Electroporación de *E. coli*
tras protocolo de electrocompetencia

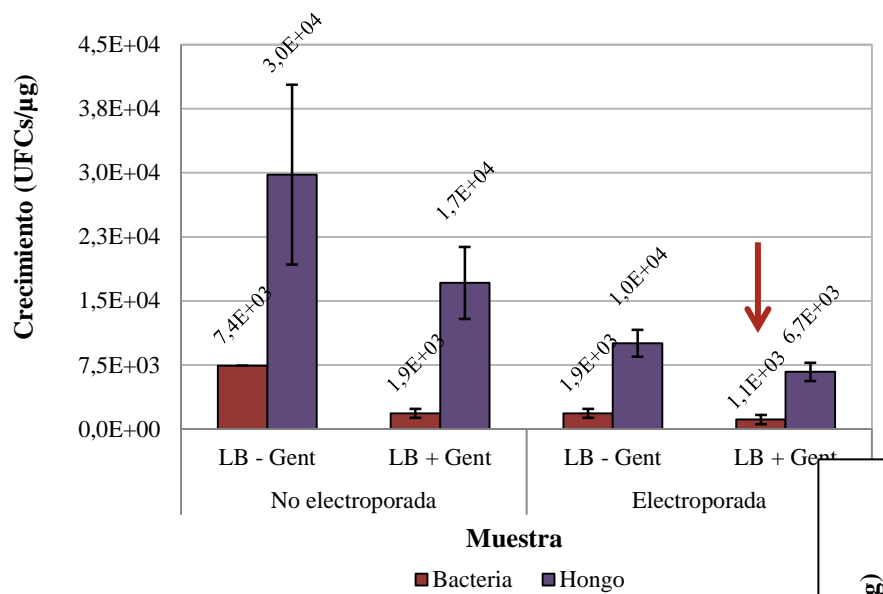


✓ Control electrocompetencia y electroporación



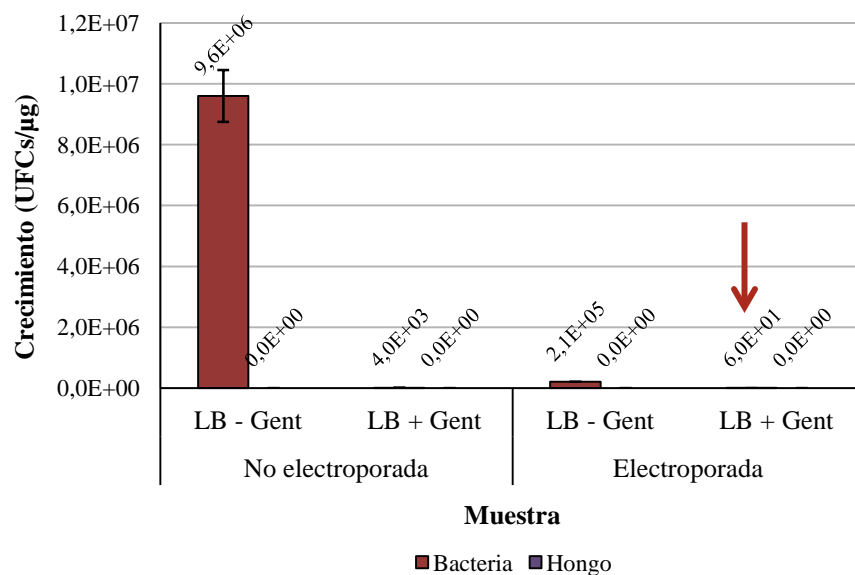
"Scatter plot" del crecimiento de NEB5 y NEB5 tras protocolo de electrocompetencia, después de la electroporación

Colonias positivas en electroporación muestra placa solar

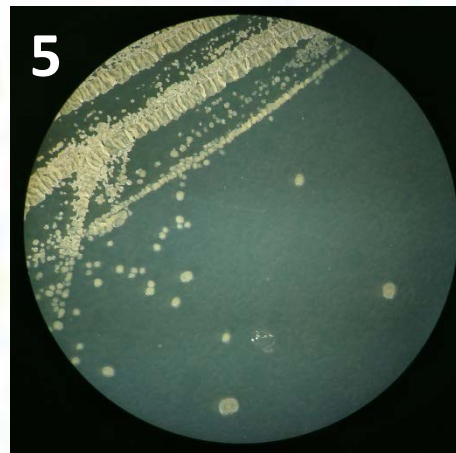
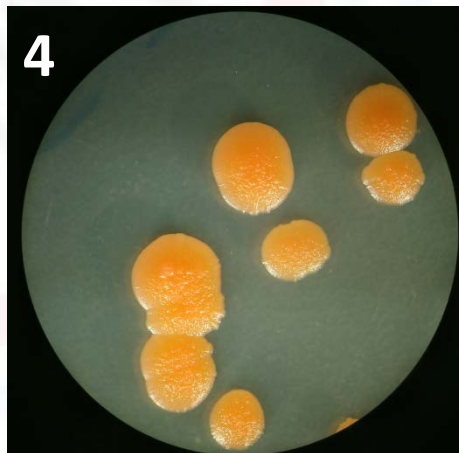
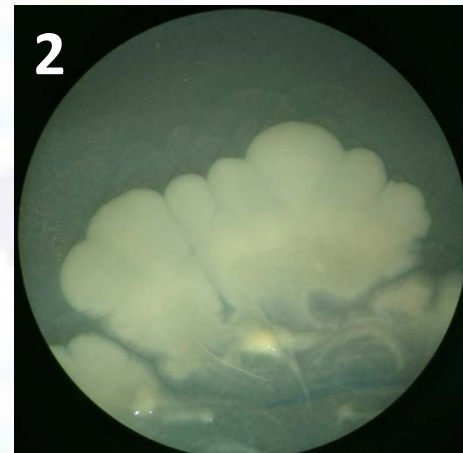
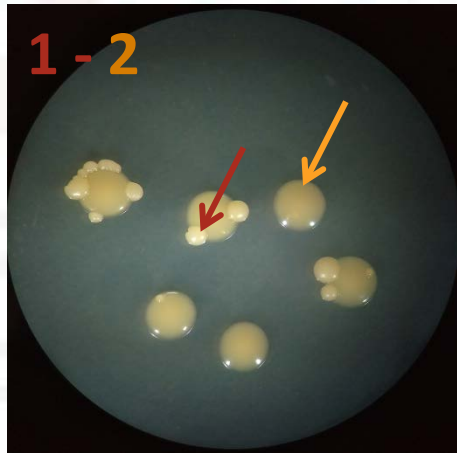


Electroporación de la muestra
de placa solar

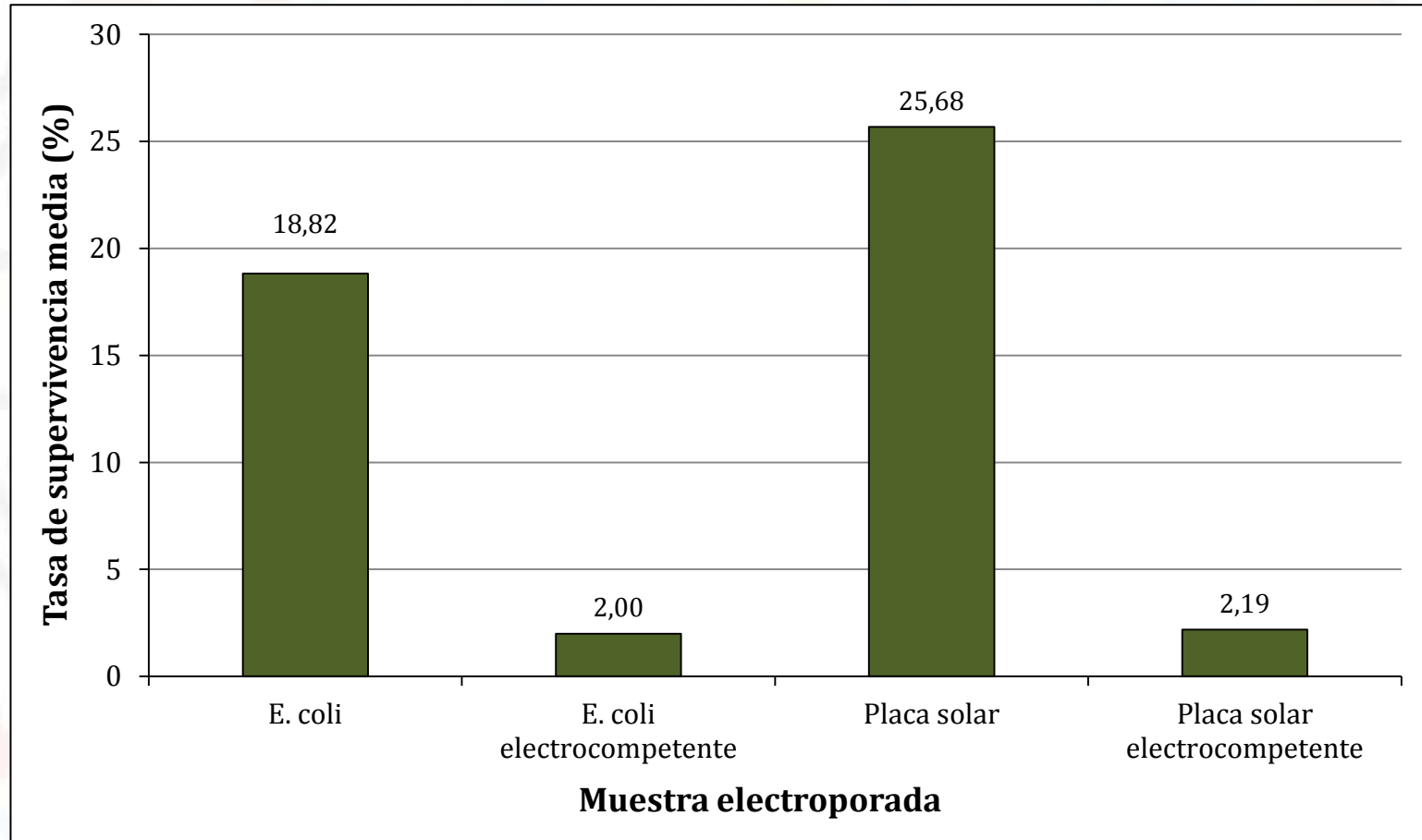
Electroporación de la muestra de la placa solar
tras protocolo de electrocompetencia



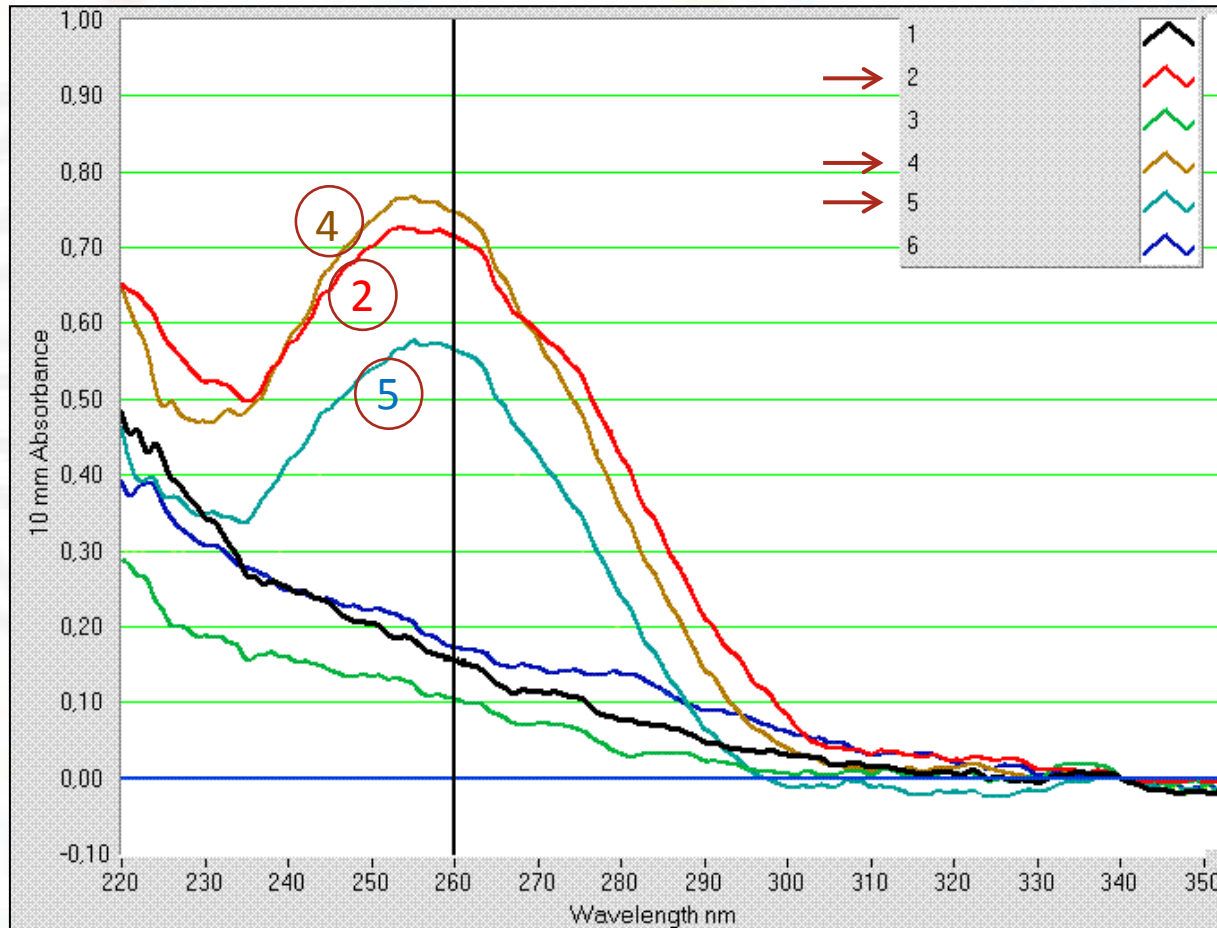
Colonias positivas en electroporación muestra placa solar



Mayor supervivencia a electroporación en muestras no electrocompetentes

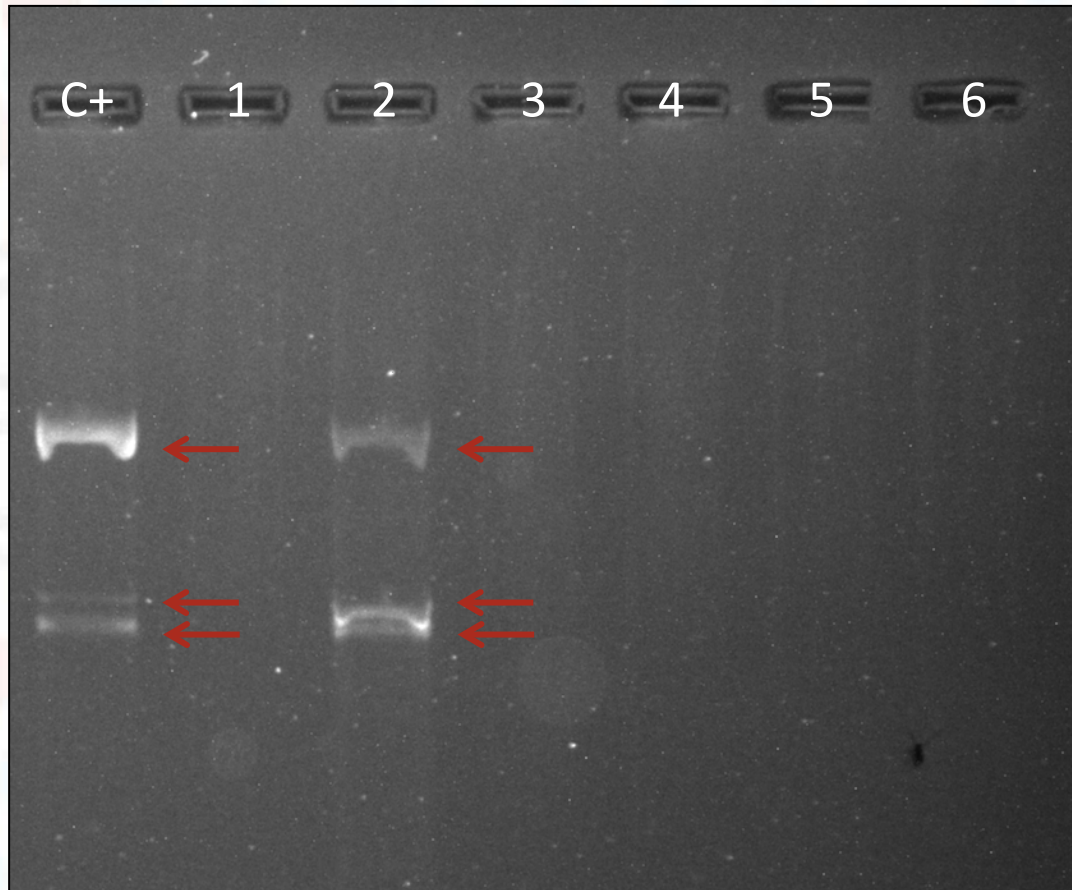


Colonias 2, 4 y 5 dieron buena extracción DNA



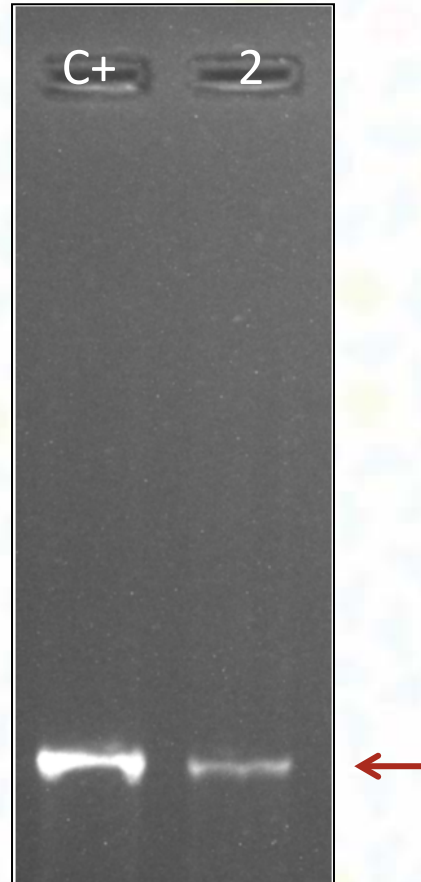
Espectro de absorbancia del plásmido extraído de colonias positivas.

Colonia 2 mostraba DNA plasmídico



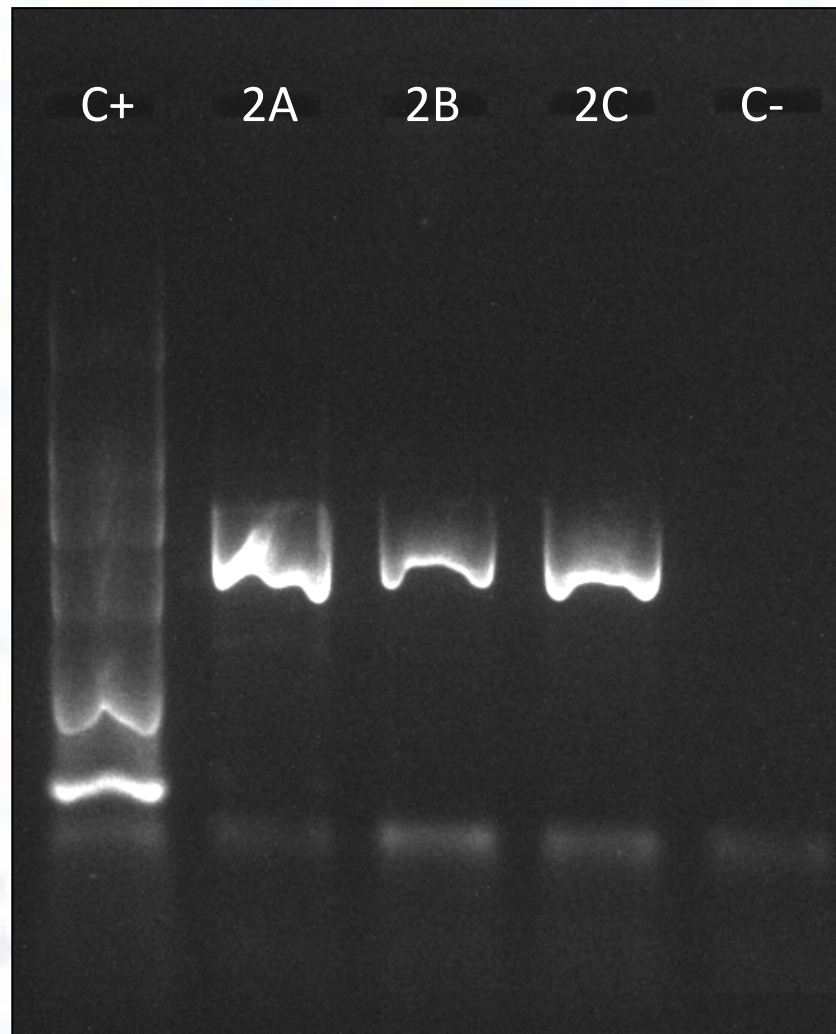
Gel de electroforesis de agarosa (0.8% p / v) de DNA plasmídico de las colonias positivas.

Colonia 2 electrotransformada con pSEVA651



Gel de electroforesis de agarosa (1.5% p / v) de ADN de plásmido de linealización.

Correcta amplificación rRNA 16S de gDNA



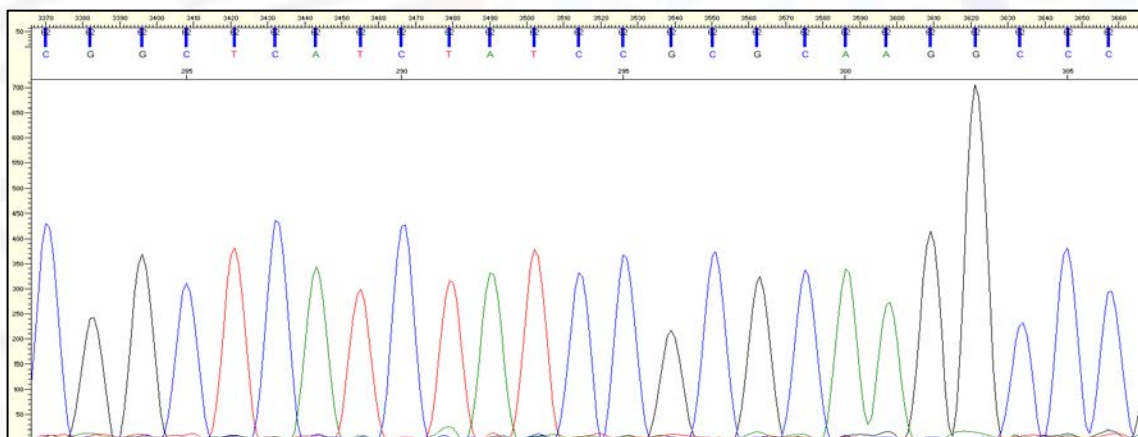
Gel de electroforesis en agarosa (1.5% p / v) del fragmento rRNA 16S amplificado de la colonia 2 (tres repeticiones).

Stenotrophomonas sp. como género de la muestra placa solar electrotransformado

Fragmento rRNA 16S (2B)

```

1 AGTTACTATTGACGTCGACGCTCTCTGAGGTTGTGATCAGACAACCAGGTATTAAGTGGCTGCTTTTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGC 100
101 CTTCTTCACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCA 200
201 GTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCCTTGGTGGGCCTTTACCCGCCAAGTACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATCTATCCGCGCA 300
301 AGGCCCGAAGTCCCTGCTTTCACCCGAAGTCTGATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCACGAAAAGGTAGATTCCGATGTATTCC 400
401 TCACCCGTCGCCCACTCGCCACCCAGAGAGCAAGCTCTCCTGTGCTGCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTACCGCCAGCGTTCACTCTGAGCCACGA 500
501 TCAAACATCATCAGGGGTTGTAAA 523
  
```



$$QV = -10 \cdot \log_{10}(\text{Probabilidad de error})$$

| Muestra | % QV ≥ 20 |
|----------------|----------------|
| 2A | 68 |
| 2B | 91 |
| 2C | 90 |
| Media \pm DE | 83 \pm 13 |

Stenotrophomonas sp. como género de la muestra placa solar electrotransformado

Sequences producing significant alignments: BLASTn

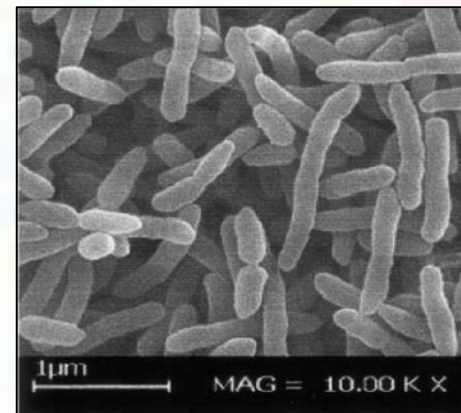
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. CanS-106 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 867 | 867 | 61% | 0.0 | 99% | KT580638.1 |
| <input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone HelTree3-126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 867 | 867 | 61% | 0.0 | 99% | JN052693.1 |
| <input type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. bB2(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 867 | 867 | 61% | 0.0 | 99% | JF772547.1 |
| <input type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. bB21(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 867 | 867 | 61% | 0.0 | 99% | JF772546.1 |
| <input type="checkbox"/> Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone HH3_01 | 867 | 867 | 61% | 0.0 | 99% | FN401252.1 |
| <input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 1091090601250 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 865 | 865 | 61% | 0.0 | 99% | JN200113.1 |
| <input type="checkbox"/> Uncultured Stenotrophomonas sp. clone 45_b11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 865 | 865 | 61% | 0.0 | 99% | GU929358.1 |
| <input type="checkbox"/> Uncultured Stenotrophomonas sp. clone W5S17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 863 | 863 | 61% | 0.0 | 99% | GU560180.1 |
| <input type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. AHB15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 861 | 861 | 61% | 0.0 | 99% | KF241528.1 |
| <input type="checkbox"/> Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone Acic4, isolated from Apis cerana japonica out | 861 | 861 | 61% | 0.0 | 99% | AB688072.1 |
| <input type="checkbox"/> Stenotrophomonas sp. bB9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 861 | 861 | 61% | 0.0 | 99% | JF772542.1 |
| <input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 109109G06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 859 | 859 | 61% | 0.0 | 99% | JN200121.1 |

Stenotrophomonas sp.

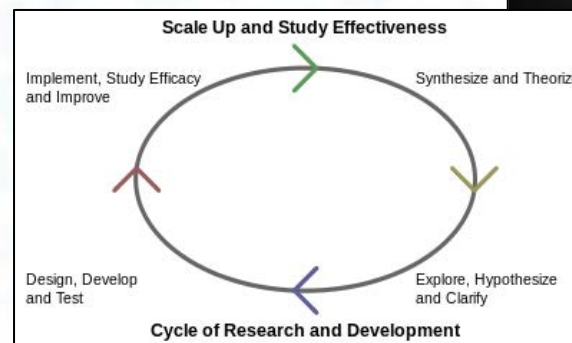
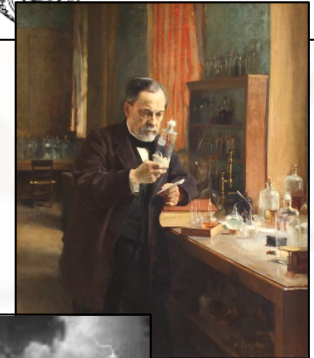
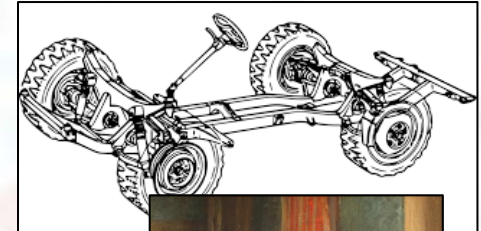
% Identity: 99% — E-value: 0
Accession number: KT580638.1



Extraído de
Kye-Heon *et al.* (2004)

Conclusiones

- Necesidad de un nuevos chasis de biología sintética y biotecnología
- Biodiversidad y aplicabilidad de los microorganismos
- Electroporación como técnica para buscar chasis de biología sintética novedosos y derivados de la naturaleza
- Prospectivas de futuro



“No hay ninguna ley natural que prohíba el intercambio de material genético entre especies. La naturaleza no tiene la costumbre de incumplir sus propias leyes.”

Los productos naturales ¡vaya timo! (2011, *J. M. Mullet*)

Nota legal:

Queda expresamente prohibida la reproducción total o parcial de este trabajo por cualquier medio o procedimiento sin el permiso expreso y por escrito del autor, que deberá ser citado en las referencias que se hacen a este trabajo.

Legal note:

It is expressly forbidden the total or partial reproduction of this work by any means or procedure without the express and written permission of the author, which must be cited in the references that are made to this work.