

sys bto

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

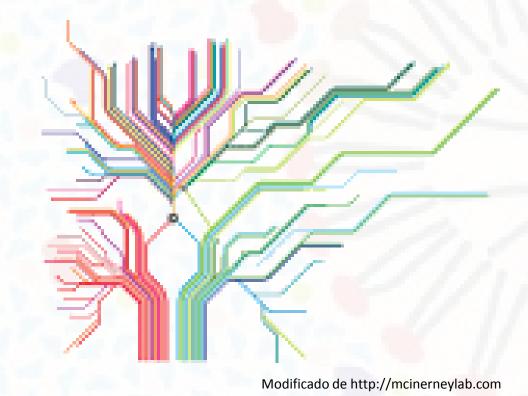
- Introducción
- Objetivo
- Materiales y métodos
- Resultados
- Conclusiones

Introducción

Transformación bacteriana inducida por rayos

Transferencia Horizontal de Genes (THG) → adquisición rápida de potenciales habilidades de adaptación

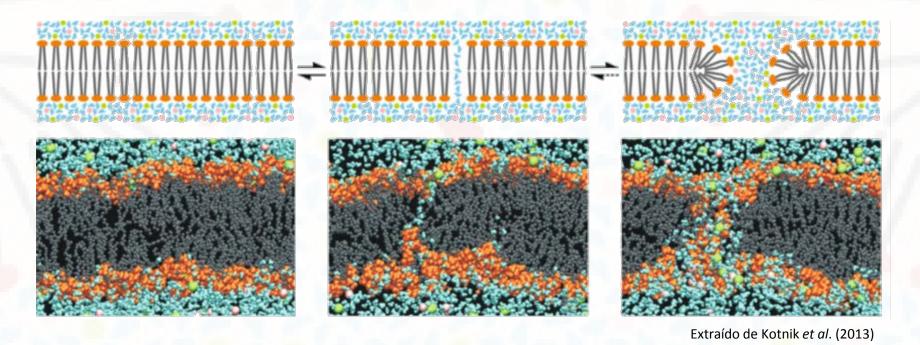
Rayos como facilitadores de la transformación bacteriana





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



Introducción

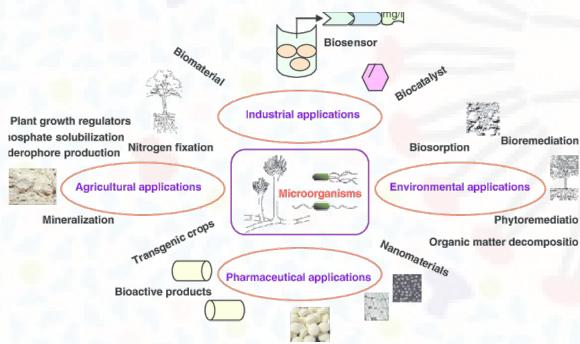
Microorganismos y biotecnología

- 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

microorganismos

biotecnología utiliza microorganismos fábricas como vivientes para fabricar productos facilidad con flexibilidad





Introducción

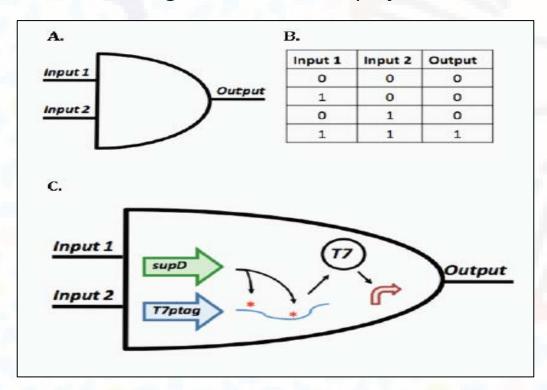
Chasis en biología sintética y biotecnología

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

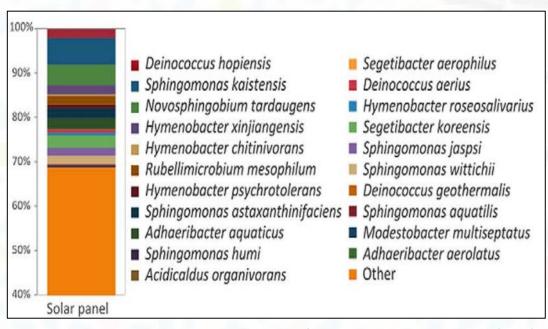


Biodiversidad y microbiota de paneles solares

Biodiversidad y microbiota de paneles solares

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

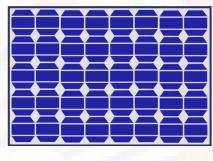
 Explotación de la biodiversidad natural: necesidad del desarrollo de la biología sintética y biotecnología





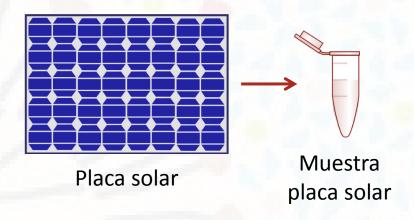
Modificación genética mediante electroporación de microorganismos presentes en muestras de placas solares, muestra derivada de la naturaleza, con el objetivo de explotar su potencial y encontrar nuevos chasis en biología sintética y biotecnología



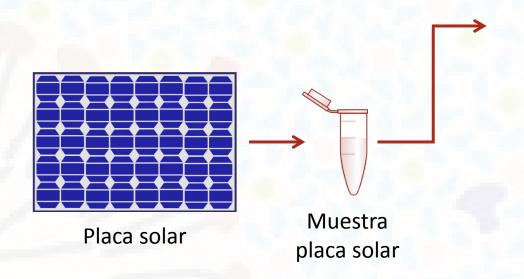


Placa solar

Esquema trabajo

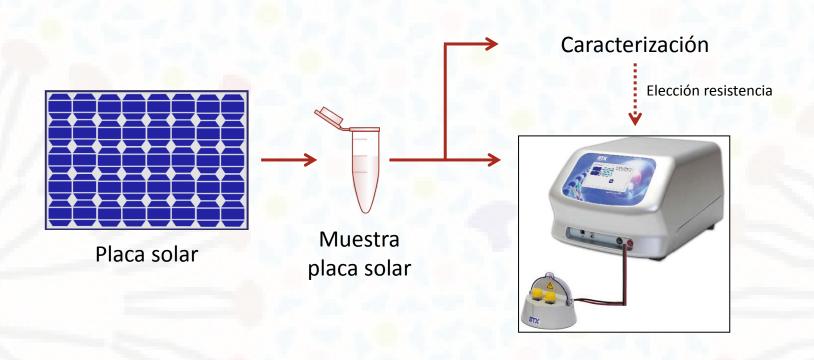


Esquema trabajo



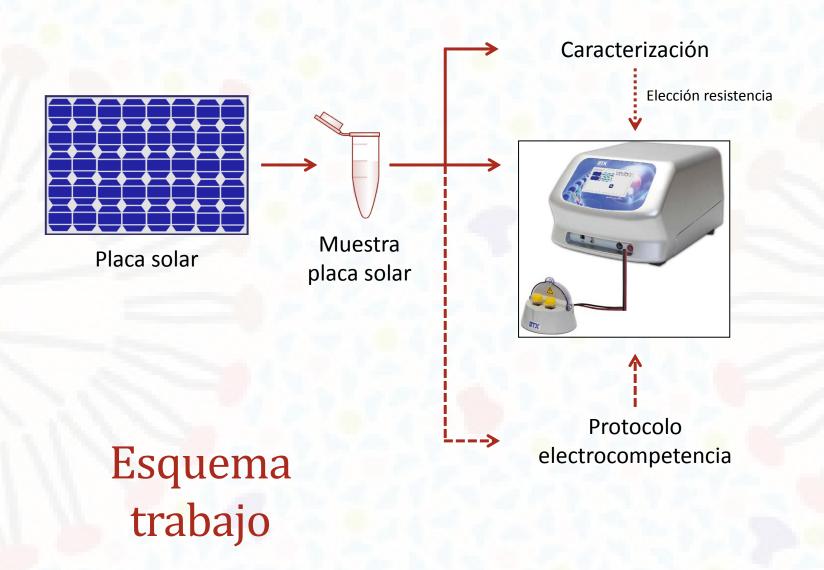
Caracterización

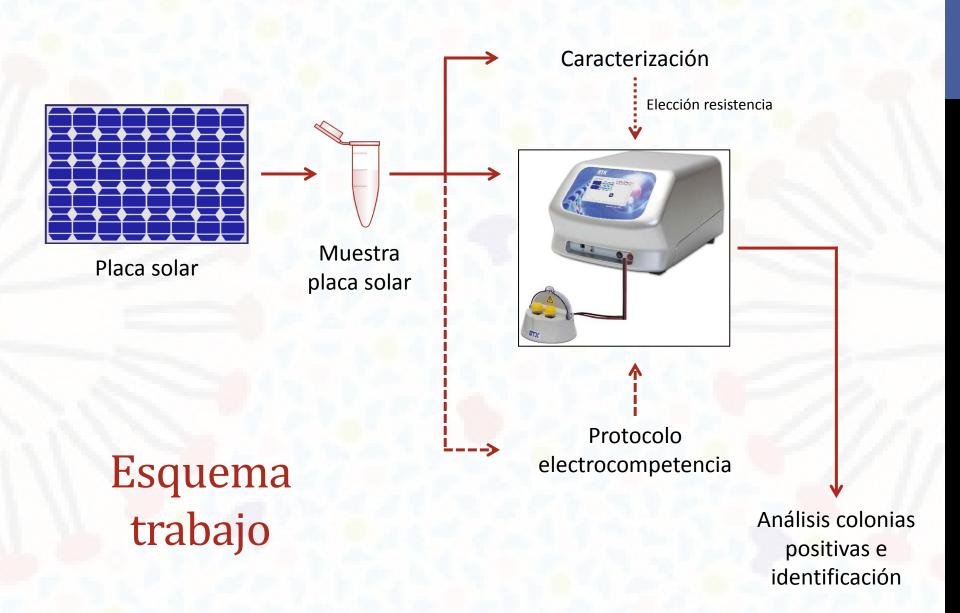
Esquema trabajo



Esquema trabajo

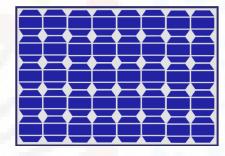
Conclusiones



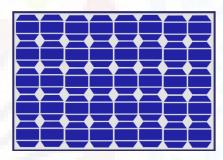


Materiales y métodos



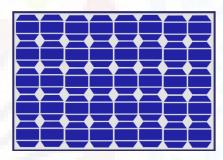


1.28 m² placa solar



1.28 m² placa solar



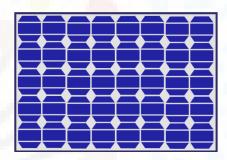


1.28 m² placa solar



Conclusiones

Muestras biológicas usadas



Objetivo

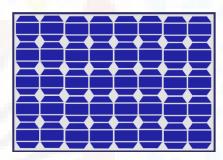
1.28 m² placa solar



Escherichia coli DH5a (DH5)

Escherichia coli electrocompetente casera DH5α de Ron Geller (RG)

Escherichia coli electrocompetente comercial NEB5 (NEB5)



1.28 m² placa solar



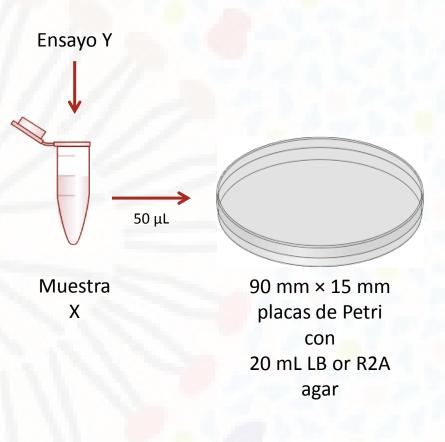
Esche<mark>richia coli</mark> DH5α (DH5)

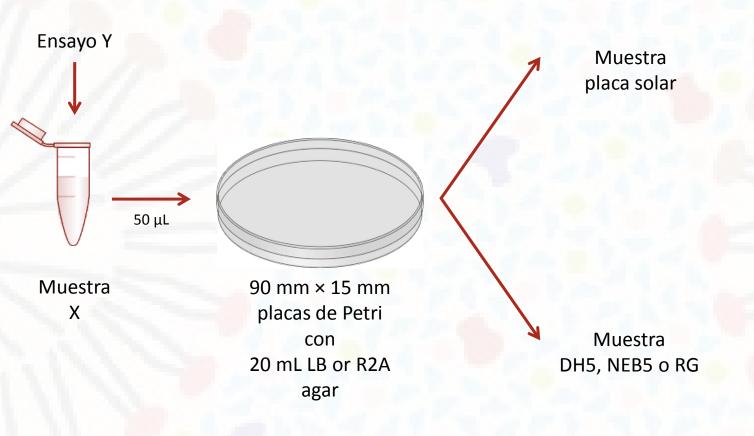
Escherichia coli electrocompetente casera DH5α de Ron Geller (RG)

comercial NEB5
(NEB5)

E. coli







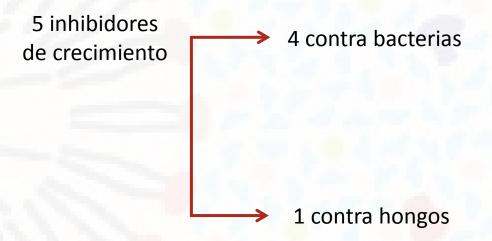


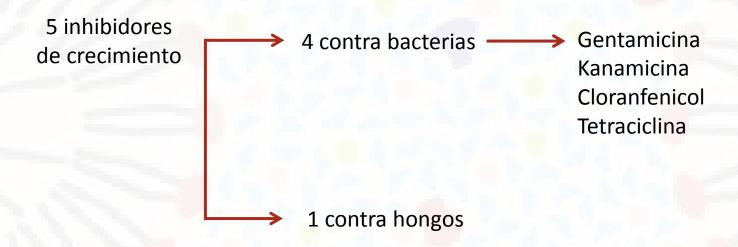


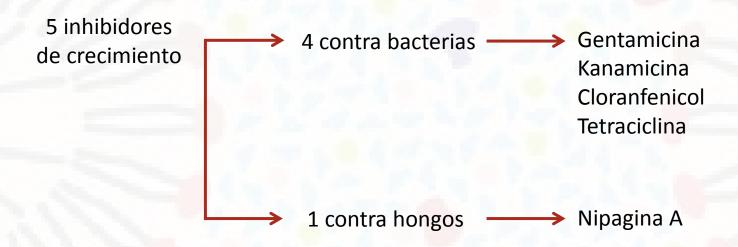
Ensayo de inhibición crecimiento de muestra placa solar

5 inhibidores de crecimiento

5 inhibidores de crecimiento 4 contra bacterias

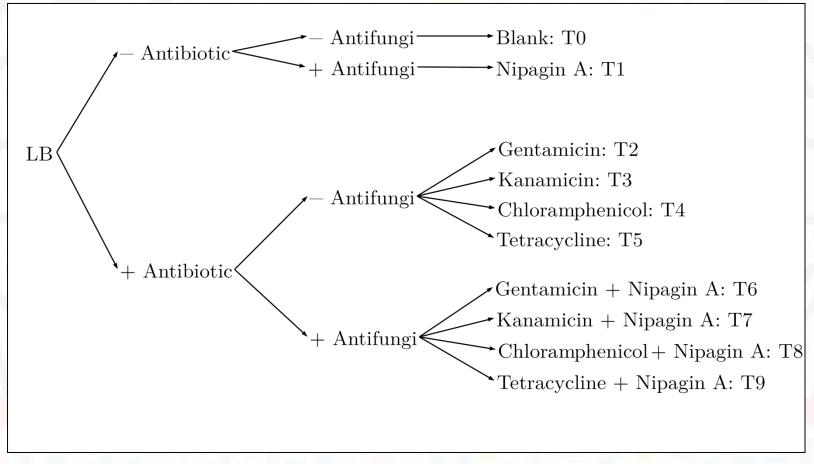






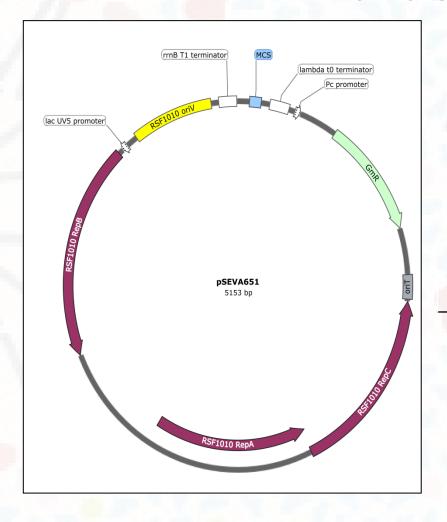
Introducción

Ensayo de inhibición crecimiento de muestra placa solar



Plásmido pSEVA651 de resistencia a antibiótico

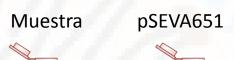
Plásmido pSEVA651 de resistencia a antibiótico

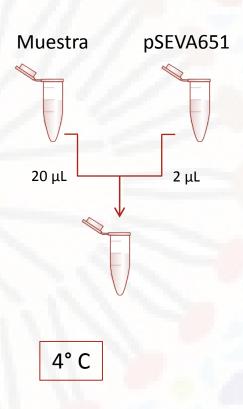


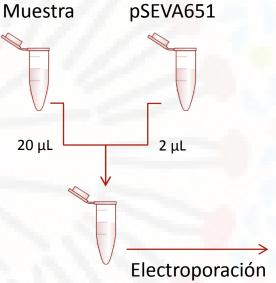


Característica	Valor
Estructura	dsDNA circular
Tamaó	5153 pb
Masa molecular	1.89 x 10 ¹¹ mol/μg DNA

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



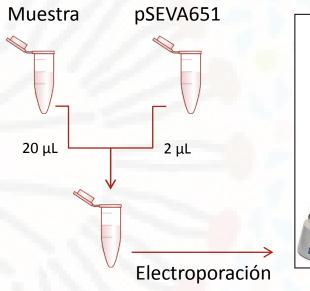




4° C



BTX Gemini X² Harvard Electroporator (452006)

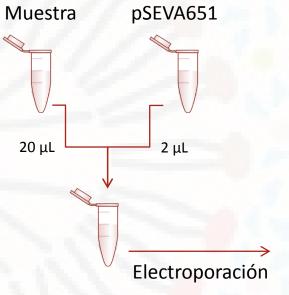


4° C



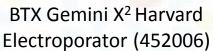
1 mL SOC

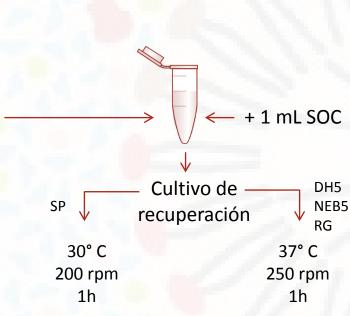
BTX Gemini X² Harvard Electroporator (452006)

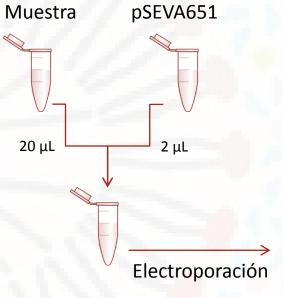


4°C





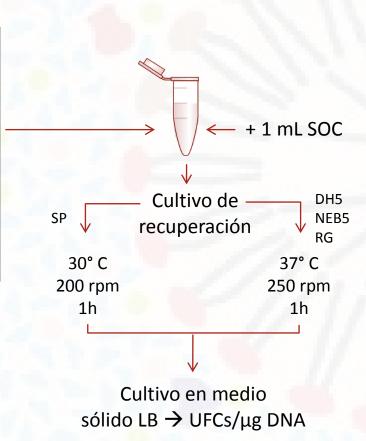




4°C



BTX Gemini X² Harvard Electroporator (452006)



Muestras evaluadas

Muestra no electroporada Muestra electroporada

Muestras evaluadas

Muestra no electroporada Muestra electroporada

Medios de cultivo



LB + Antibiótico

Muestras evaluadas

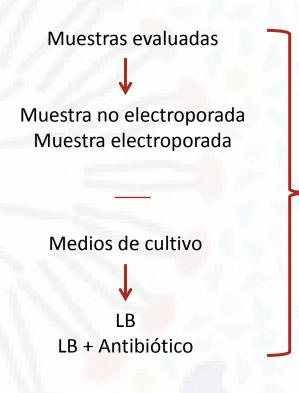
Muestra no electroporada

Muestra electroporada

Medios de cultivo

LB

LB + Antibiótico



No electroporada en LB

Tasa supervivencia

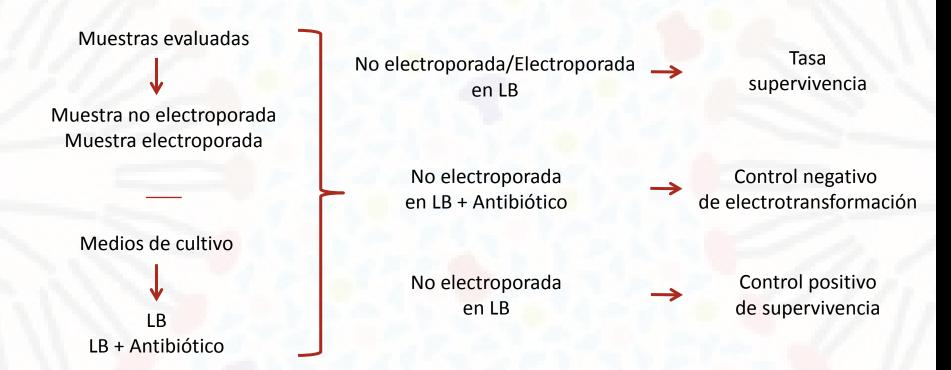


No electroporada en LB

No electroporada en LB + Antibiótico

Tasa supervivencia

Control negativo de electrotransformación



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

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

NEB5 \rightarrow E. coli

SP → Muestra placa solar

Mix → Mezcla NEB5 + SP

Introducción

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

Muestra	μL NE <mark>B5</mark>	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 \rightarrow E. coli

SP → Muestra placa solar

Mix → Mezcla NEB5 + SP

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

Muestra	μL NE <mark>B5</mark>	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

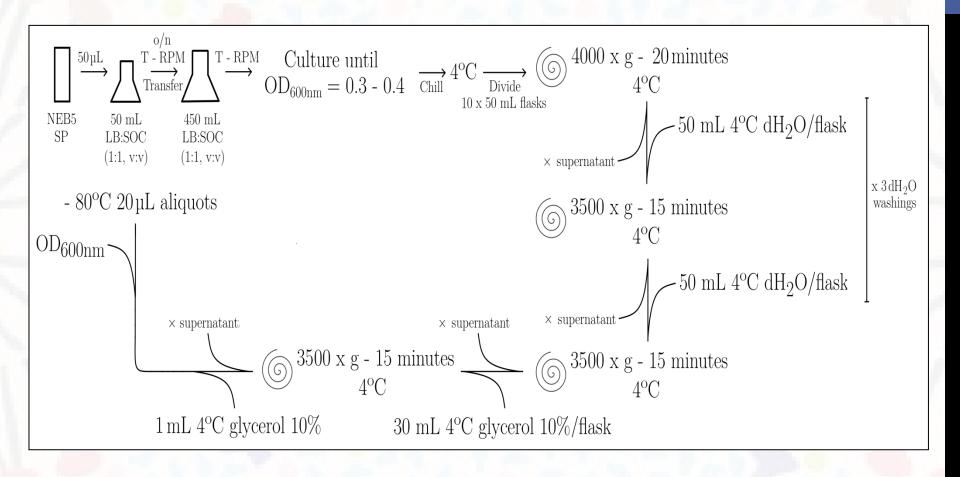
NEB5 → E. coli

SP → Muestra placa solar

Mix → Mezcla NEB5 + SP

Esquema de la organización de ensayo

Protocolo de electrocompetencia



Muestra placa solar electroporada en LB + Antibiótico

Muestra placa solar electroporada en LB + Antibiótico

Colonias positivas

Colonias de muestra de placa solar electroporada que crecen en LB + Antibiótico

Muestra placa solar electroporada en LB + Antibiótico

Colonias positivas

Colonias de muestra de placa solar electroporada que crecen en LB + Antibiótico

> Extracción DNA plasmídico con kit

Muestra placa solar electroporada en LB + Antibiótico

Colonias positivas

Colonias de muestra de placa solar electroporada que crecen en LB + Antibiótico

> Extracción DNA plasmídico con kit

Electroforesis en gel de agarosa (0.8% p/v) de los plásmidos extraídos

Muestra placa solar electroporada en LB + Antibiótico

Colonias positivas

Colonias de muestra de placa solar electroporada que crecen en LB + Antibiótico



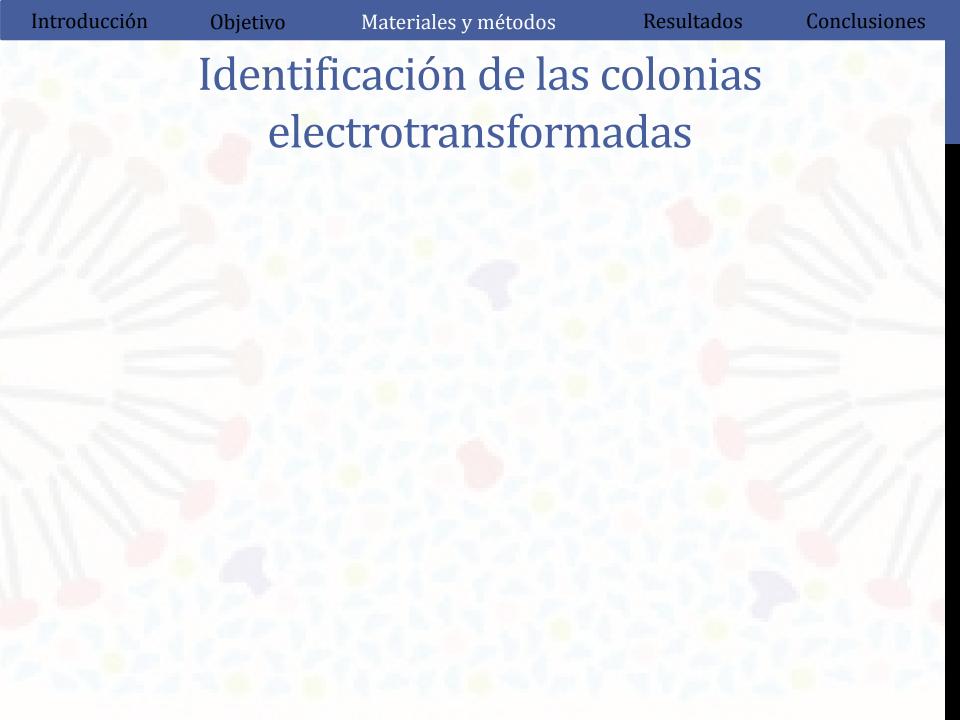
Muestra placa solar electroporada en LB + Antibiótico

Colonias positivas

Colonias de muestra de placa solar electroporada que crecen en LB + Antibiótico

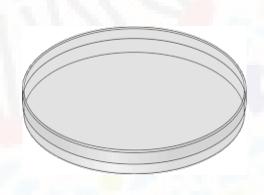
Extracción DNA plasmídico con kit Electroforesis en gel de agarosa (0.8% p/v) de los plásmidos extraídos Ensayo de restricción enzimática Linearización del plásmido Electroforesis en gel de agarosa (1.5% p/v) de los plásmidos

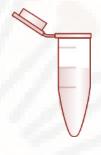
linearizados



Identificación de las colonias electrotransformadas

Conclusiones

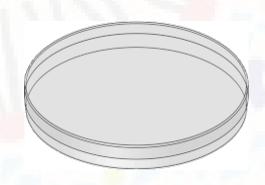




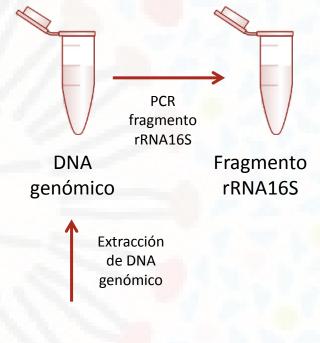
Introducción

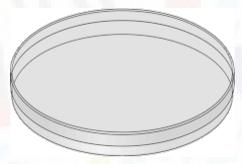
DNA genómico





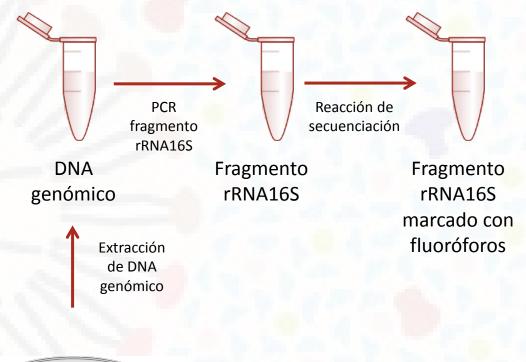
Colonias positivas

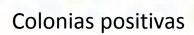




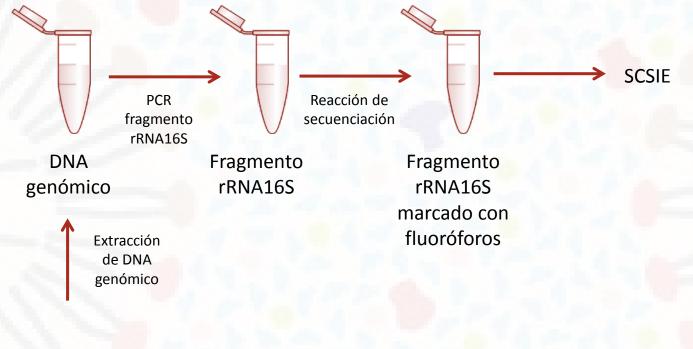
Introducción

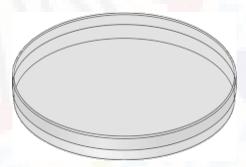
Colonias positivas





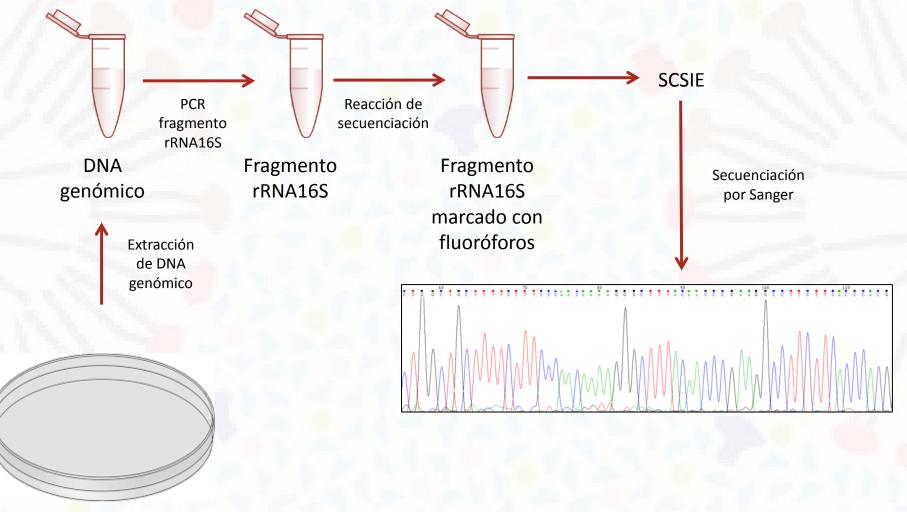
Introducción



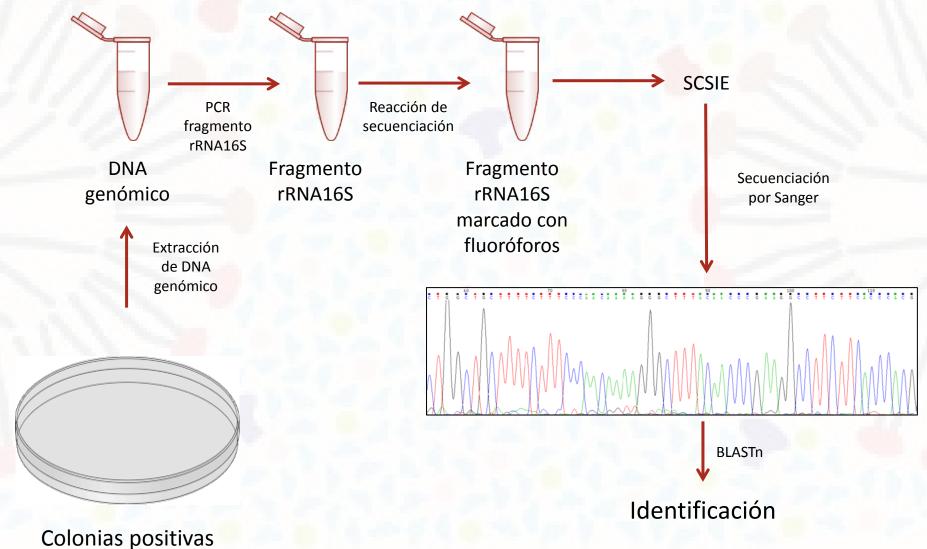


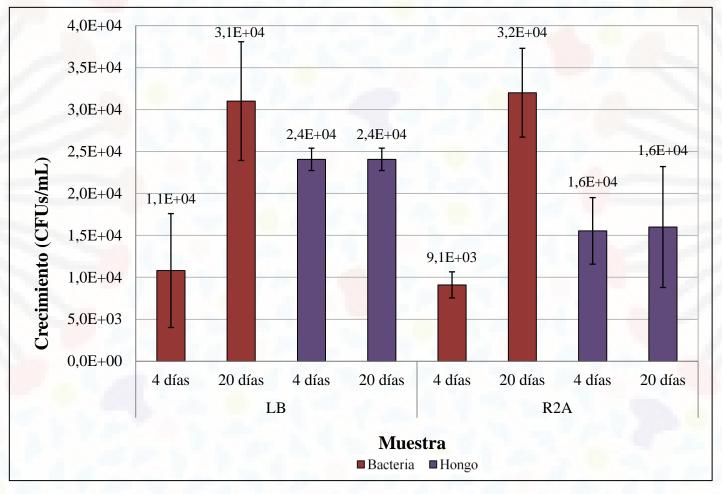
Introducción

Colonias positivas

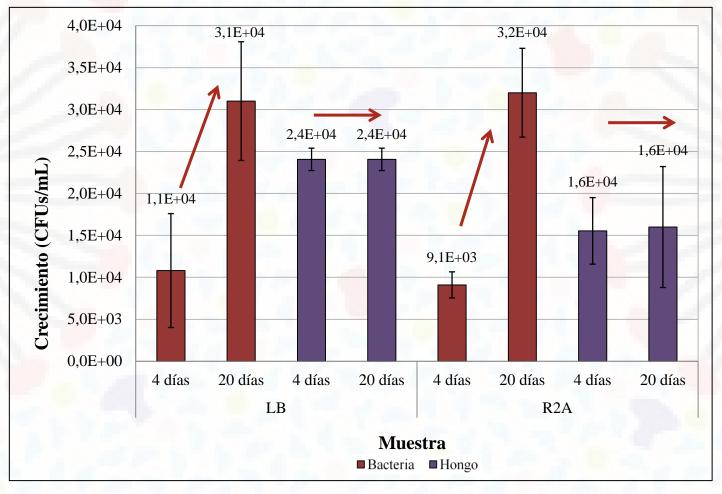


Colonias positivas

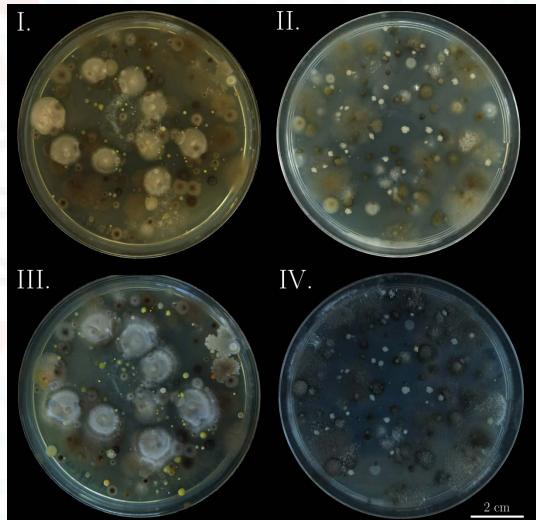




Caracterización del crecimiento de la muestra de panel solar en cultivo de medios sólidos, LB y R2A, en el cuarto y vigésimo día de cultivo.



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.

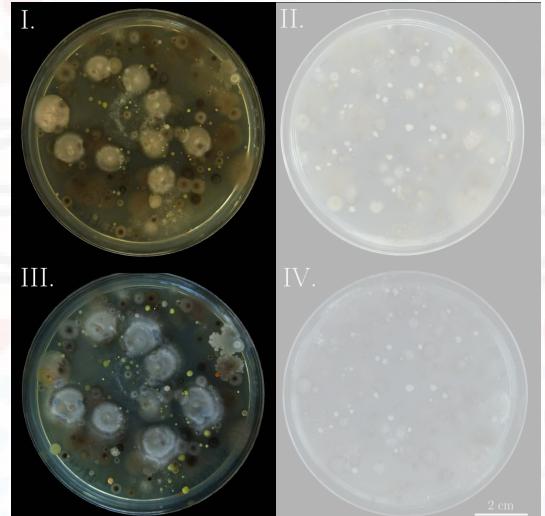


20º día

4º día

Cultivo de la muestra de placa solar en LB, 4º (I.) y 20º (III.) día, y en agar R2A, 4º (II.) y 20º día (IV.).

LB R2A

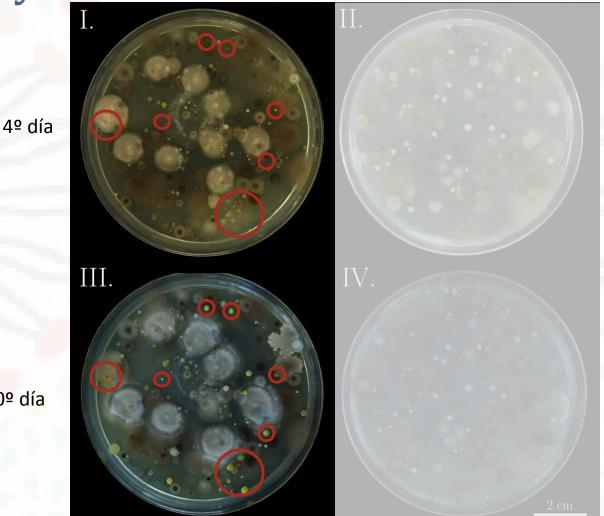


20º día

4º día

Cultivo de la muestra de placa solar en LB, 4º (I.) y 20º (III.) día, y en agar R2A, 4º (II.) y 20º día (IV.).

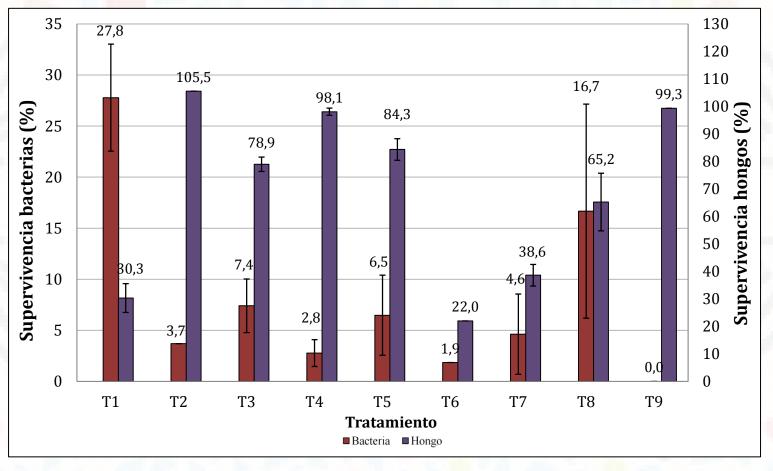
LB R2A



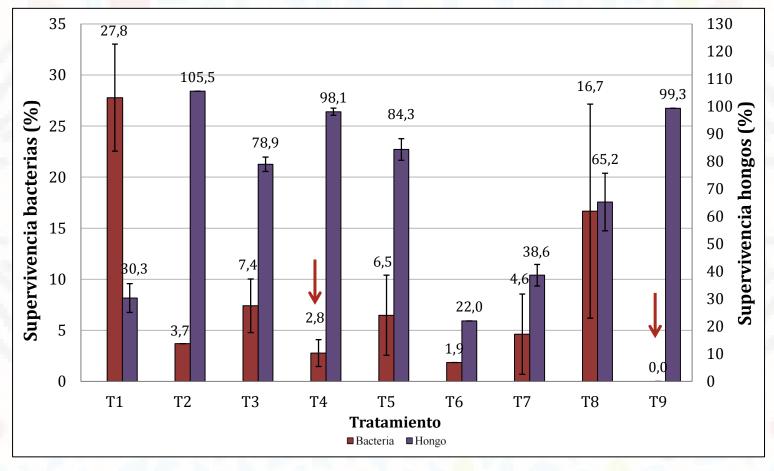
20º día

Cultivo de la muestra de placa solar en LB, 4º (I.) y 20º (III.) día, y en agar R2A, 4º (II.) y 20º día (IV.).

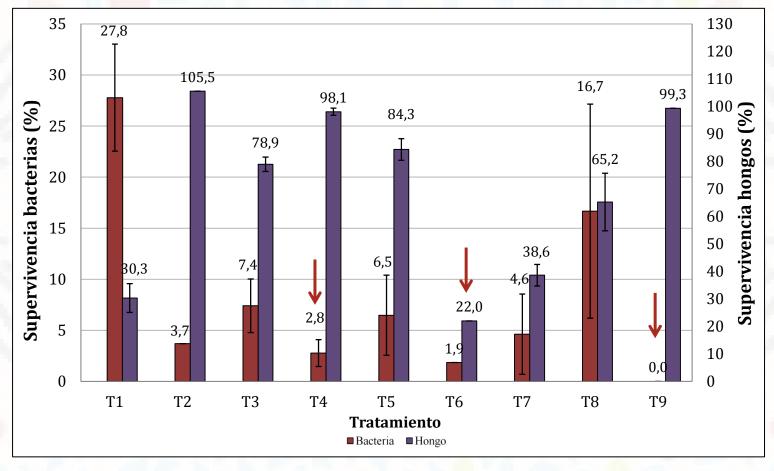
LB R₂A



Crecimiento del panel solar en ensayos de inhibidores microbianos.



Crecimiento del panel solar en ensayos de inhibidores microbianos.

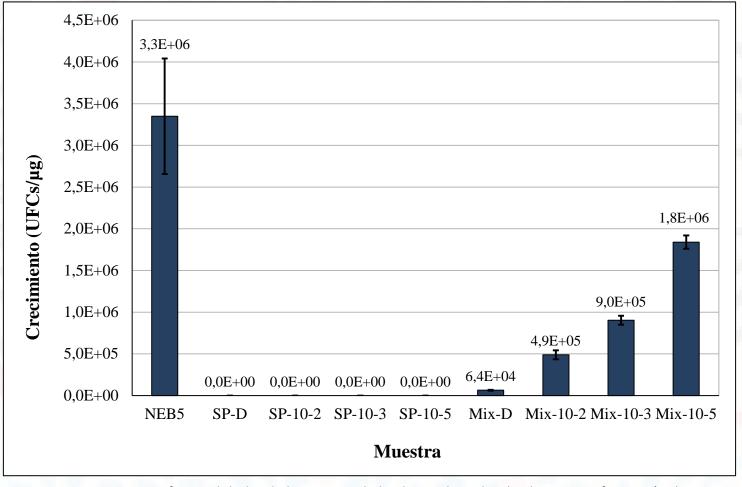


Crecimiento del panel solar en ensayos de inhibidores microbianos.

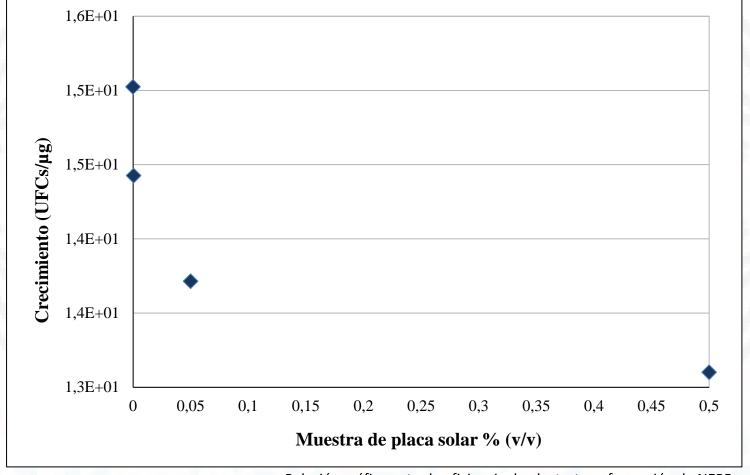
Extracción satisfactoria pSEVA651

Con <mark>ce</mark> ntración (ng/μL)	Rendimiento (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
27.16 +/- 0.40	2 <mark>.72</mark> +/- 0.04	1.79 +/- 0.01	1.38 +/- 0.08

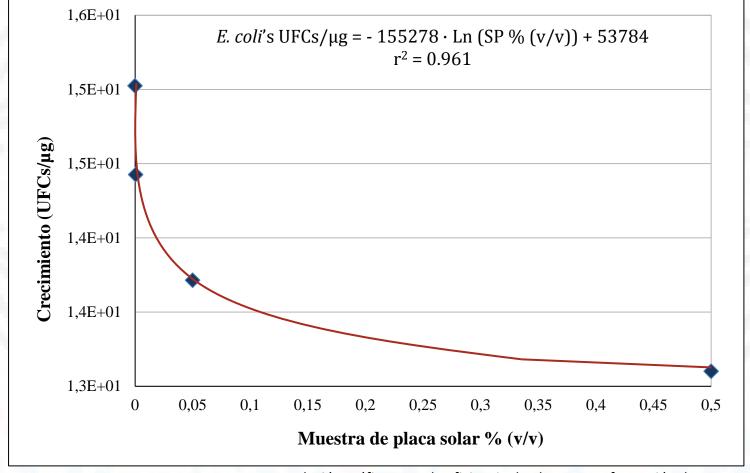
Cuantificación del pSEVA651 extraído



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



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

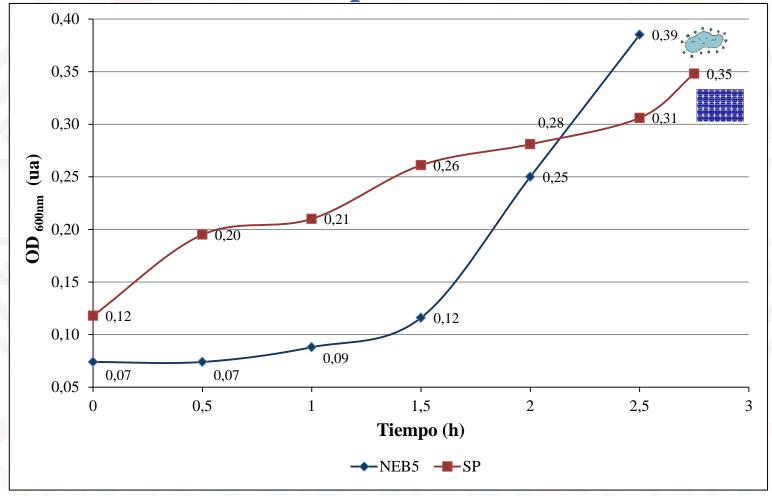


Relación gráfica entre la eficiencia de electrotransformación de NEB5 y concentración de muestra del panel solar.

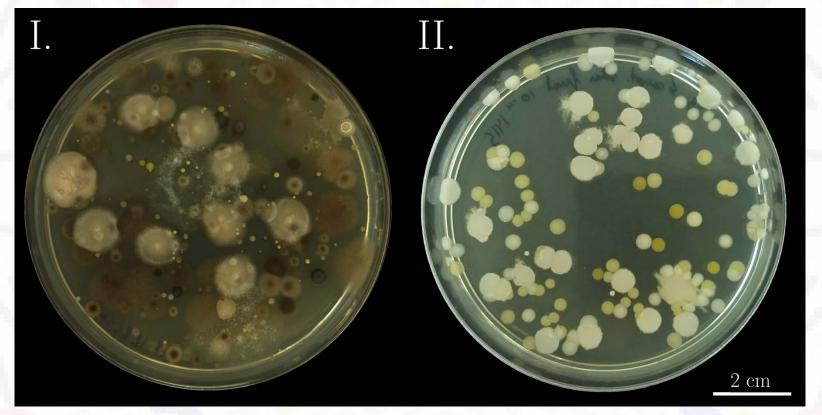
Electrocompetencia: crecimiento lento de la muestra de la placa solar vs. *E. coli*

Introducción

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

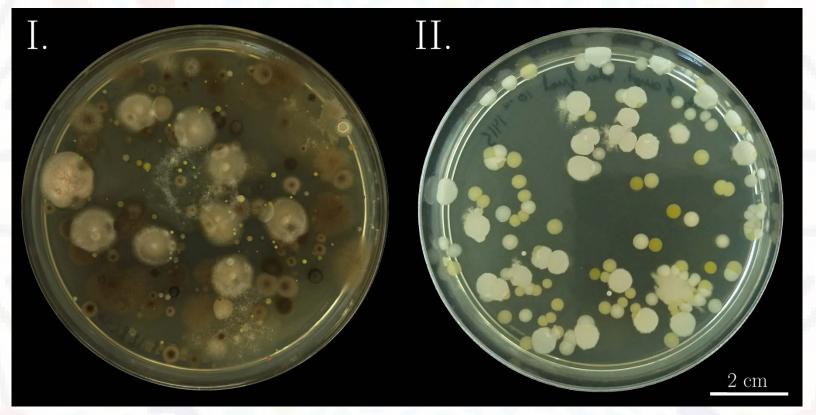


Electrocompetencia: disminución biodiversidad de la muestra de la placa solar



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

Electrocompetencia: disminución biodiversidad de la muestra de la placa solar

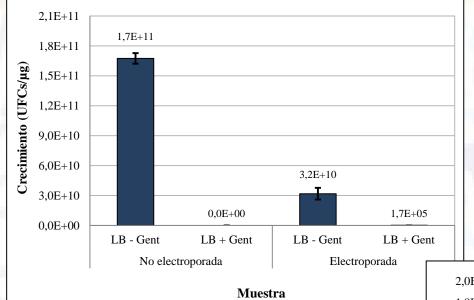


Cambio en la biodiversidad de la muestra de placa solar debido al protocolo de electrocompetencia: I., antes; II., después.

√ Control electrocompetencia y electroporación

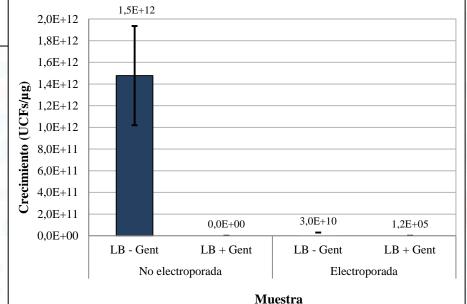


√ Control electrocompetencia y electroporación

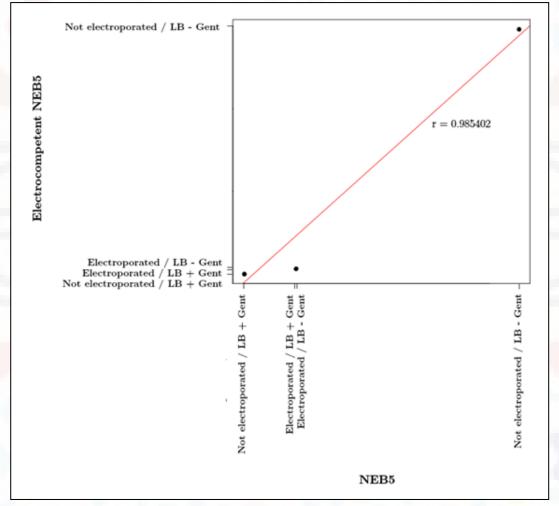


Electroporación de E. coli

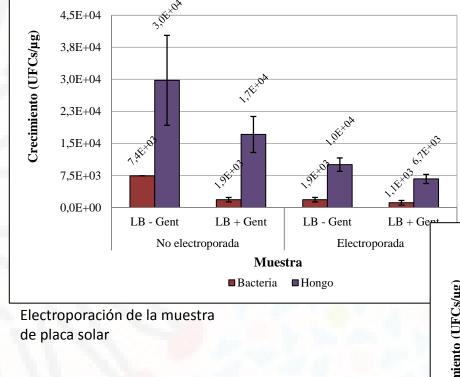
Electroporación de *E. coli* tras proc<mark>oto</mark>lo de electrocompetencia



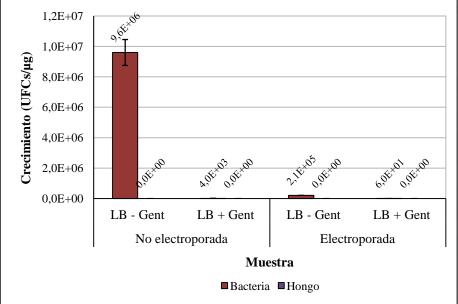
√ Control electrocompetencia y electroporación

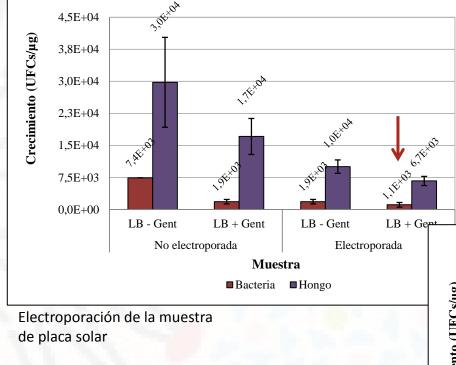


"Scatter plot" del crecimiento de NEB5 y NEB5 tras protocolo de electrocompetencia, después de la electroporación

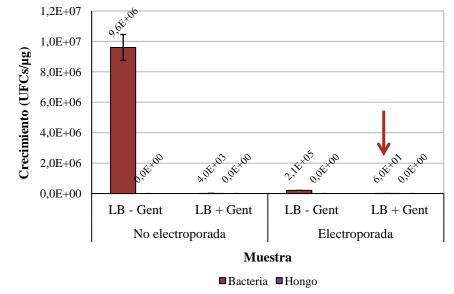


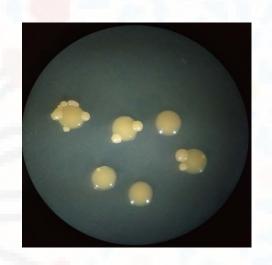
Electroporación de la muestra de la placa solar tras procotolo de electrocompetencia



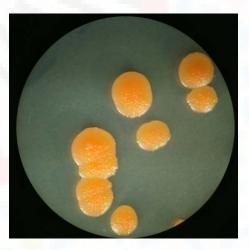


Electroporación de la muestra de la placa solar tras procotolo de electrocompetencia

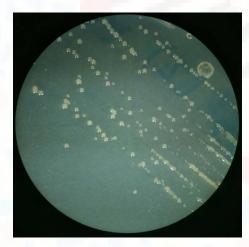


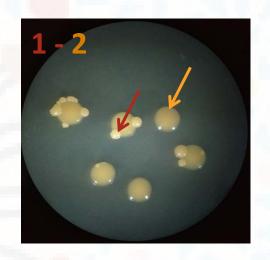


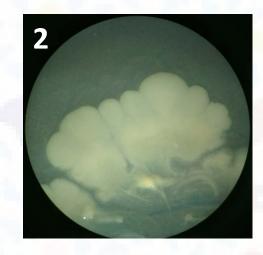


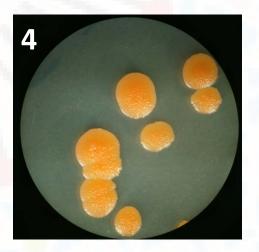


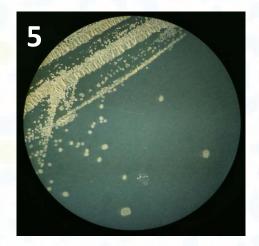


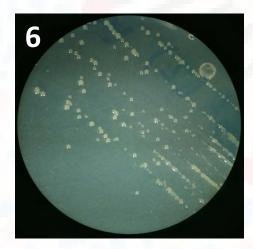






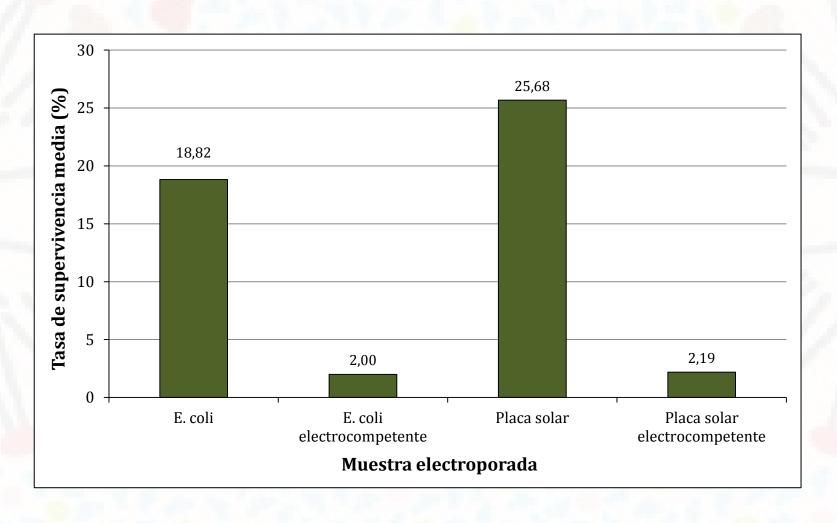




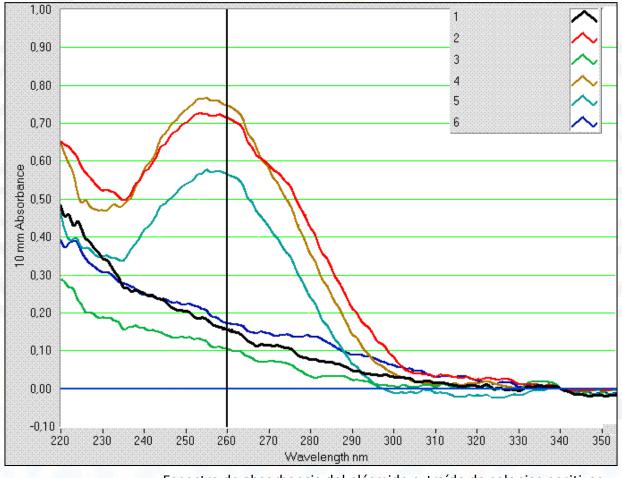


Mayor supervivencia a electroporación en muestras no electrocompetentes

Mayor supervivencia a electroporación en muestras no electrocompetentes

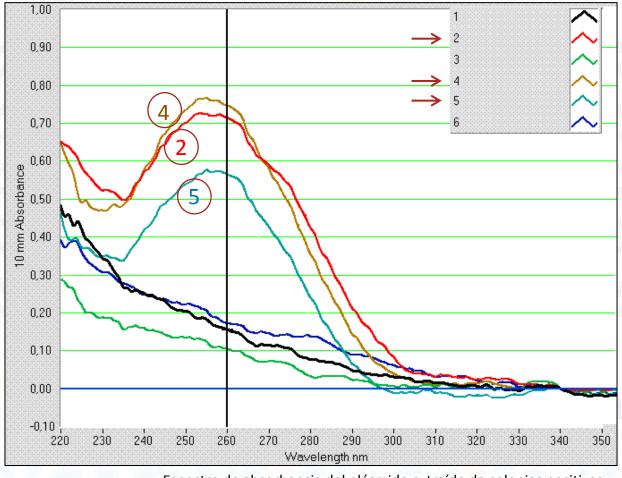


Colonias 2, 4 y 5 dieron buena extracción DNA

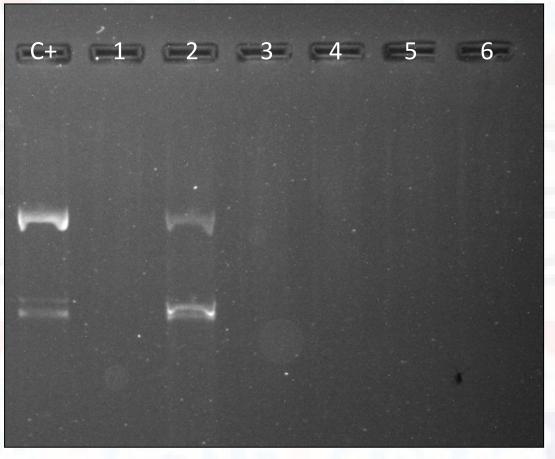


Espectro de absorbancia del plásmido extraído de colonias positivas.

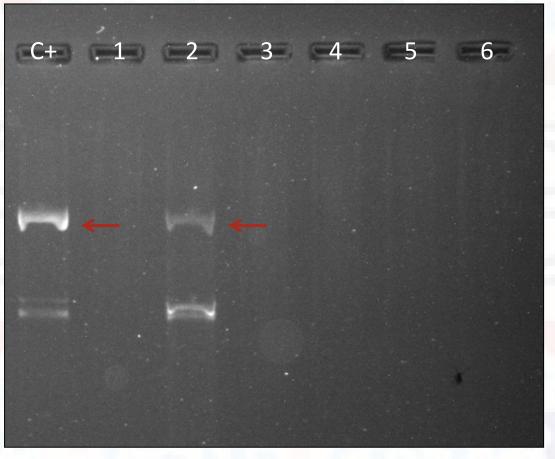
Colonias 2, 4 y 5 dieron buena extracción DNA



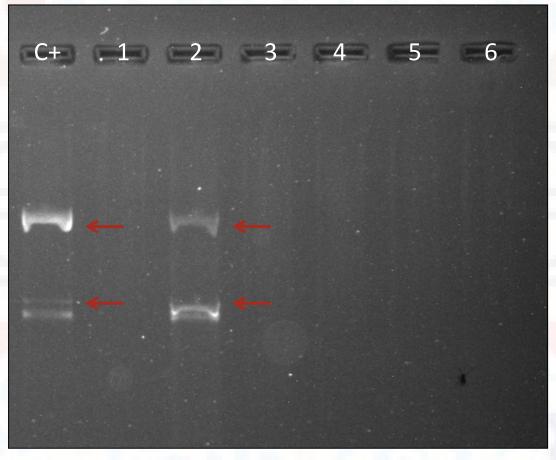
Espectro de absorbancia del plásmido extraído de colonias positivas.



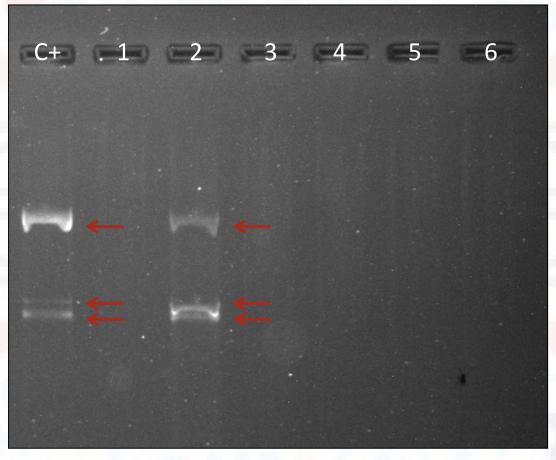
Gel de electroforesis de agarosa (0.8% p / v) de DNA plasmídico de las colonias positivas.



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

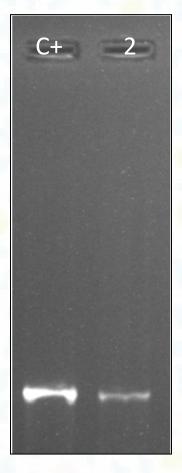


Gel de electroforesis de agarosa (0.8% p / v) de DNA plasmídico de las colonias positivas.



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.

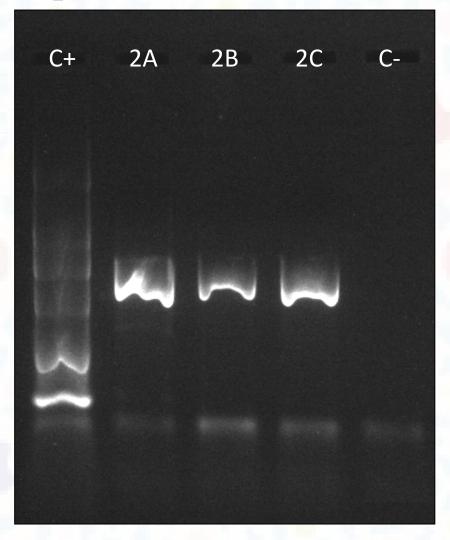
Colonia 2 electrotransformada con pSEVA651



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

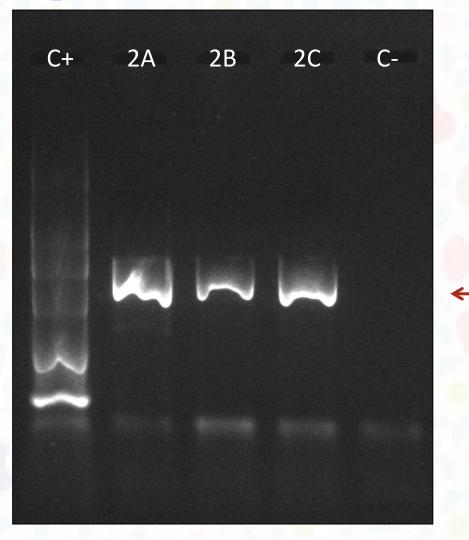


Correcta amplificación rRNA 16S de gDNA



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

Correcta amplificación rRNA 16S de gDNA

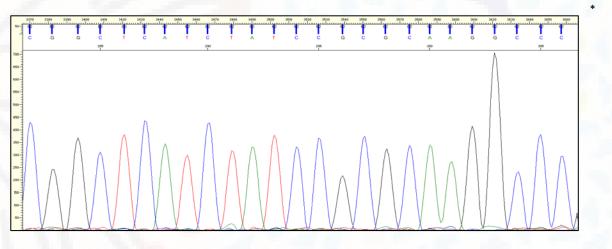


Gel de electroforesis en agarosa (1.5% p / v) del fragmento rRNA 16S amplificado de la colonia 2 (tres repeticiones).

TCAAACTCATCAGGGGTTGTAAA 523

Fragmento rRNA 16S (2B)

101 CTTCTTCACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCA 200
201 GTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTTACCCCGCCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATCTATCCGCGCA 300
301 AGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCACCCGAAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCCACGAAAAGGTAGATTCCGATGTATTCC 400



Fragmento rRNA 16S (2B)

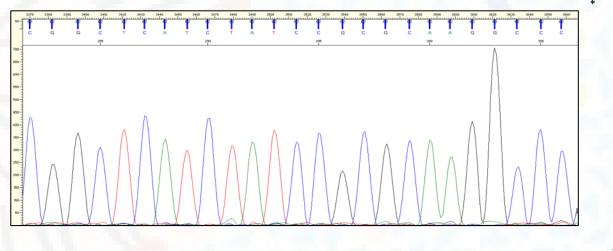
101 CTTCTTCACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCA 200

201 GTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGGGCCTTTACCCCGCCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATCTATCCGCGCA 300

11 AGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCACCCGAAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACGTTATCCCCCACGAAAAGGTAGATTCCGATGTATTCC 400

01 TCACCCGTCCGCCACTCGCCACCCAGAGAGCAAGCTCTCCTGTGCTGCCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTACCGCCAGCGTTCACTCTGAGCCACGA 50

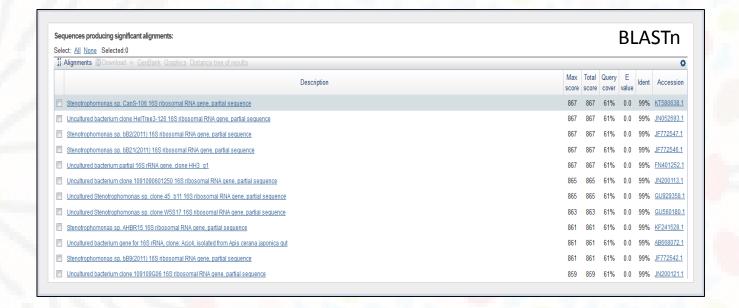
501 TCAAACTCATCAGGGGTTGTAAA 523

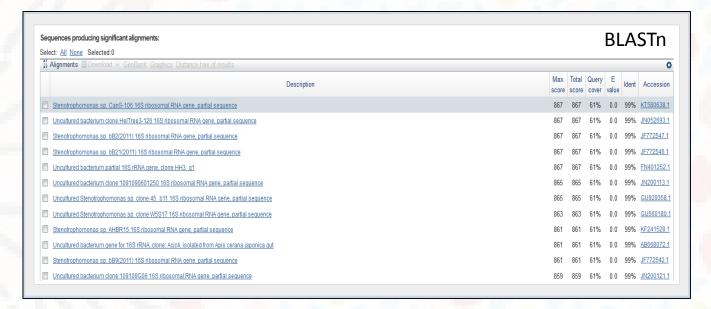


 $QV = -10 \cdot \log_{10} \cdot (Probabilidad de error)$

Muestra	% QV ≥ 20
2A	68
2B	91
2C	90
Media ± DE	83 ± 13

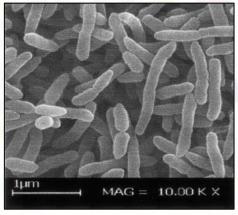
^{*} Extraído de Sequence Scanner Software 2





Stenotrophomonas sp.

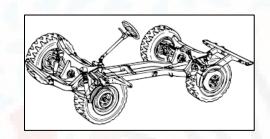
% Identity: 99% — E-value: 0 Accession number: KT580638.1



Extraído de Kye-Heon *et al.* (2004)

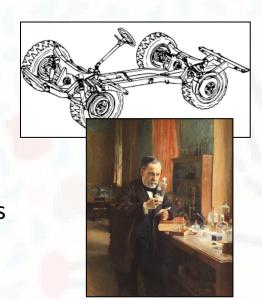
Conclusiones

Necesidad de un nuevos chasis de biología sintética y biotecnología



 Necesidad de un nuevos chasis de biología sintética y biotecnología

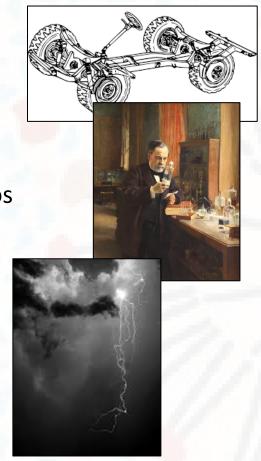
Biodiversidad y aplicabilidad de los microorganismos



 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



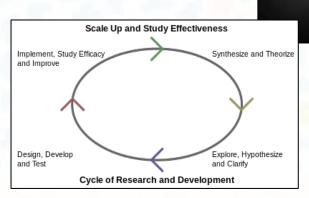
Necesidad de un nuevos chasis de biología sintética y biotecnología

Materiales y métodos

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 įvaya timo! (2011, J. M. Mullet)

