

Ingeniería Genética II

Trabajos prácticos

1. *Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas sobre un baculovirus*
2. *RNA de interferencia en *Caenorhabditis elegans**

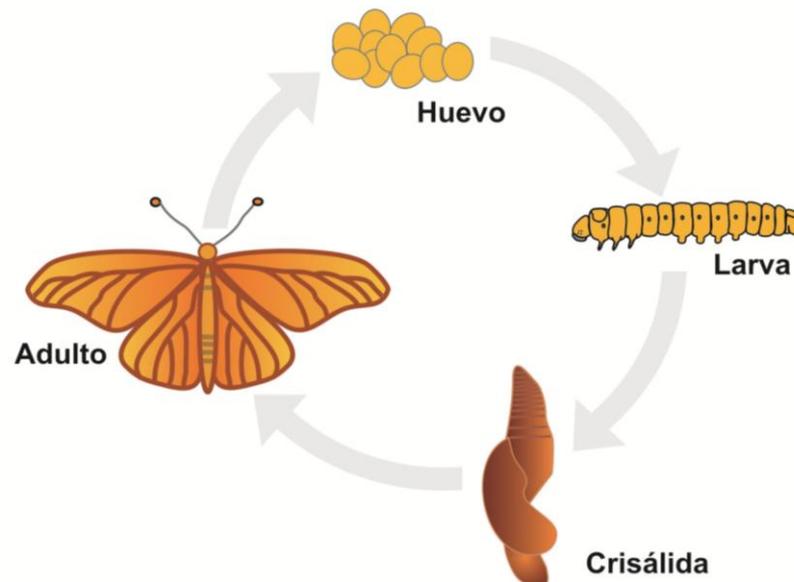
Ingeniería Genética II

Trabajos prácticos

1. *Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas sobre un baculovirus*
2. *RNA de interferencia en Caenorhabditis elegans*

Biología de *los baculovirus*

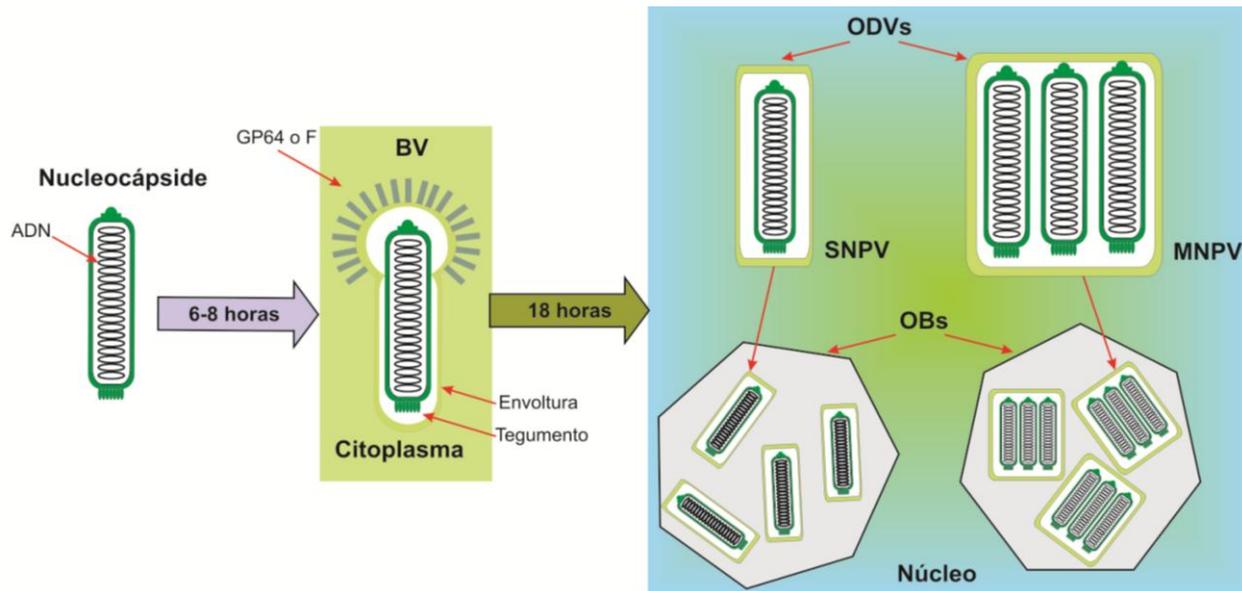
- Los baculovirus son una familia de virus que infectan principalmente lepidópteros, himenópteros y dípteros en su estadio larval.
- El rango de hospedador es muy estrecho (un baculovirus infecta una especie de insectos específica).



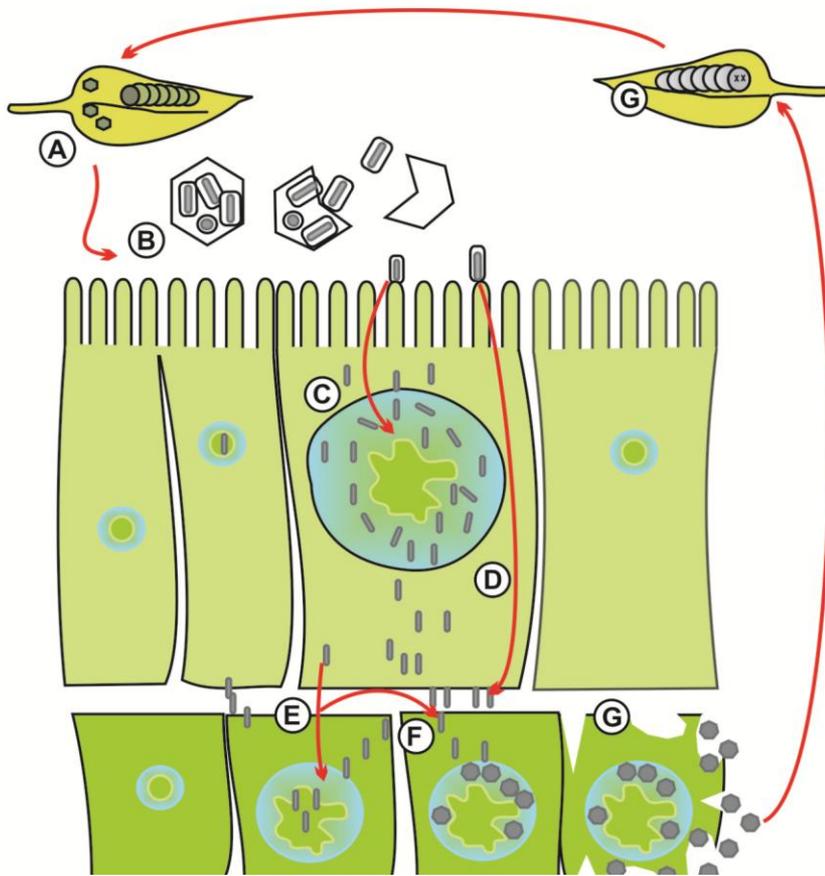
Ciclo del hospedador

Biología de *los baculovirus*

- Estos virus poseen genomas de cccdsDNA de entre 80-180 kpb, conteniendo entre 80-200 genes.
- El virus presenta dos fenotipos a lo largo de su ciclo de multiplicación:
Viriones Brotantes y Viriones Ocluidos.



Sistema baculovirus/insectos: ciclo en la naturaleza



- A. Ingreso de viriones ocluidos en el intestino de la larva por ingesta de hojas.
- B. Disolución del poliedro y liberación de los ODVs, pH 9-10.
- C. Ingreso de los viriones a las células de la pared del intestino, transporte de nucleocápsides al núcleo y transcripción de genes tempranos.
- D. Generación de formas brotantes (replicación).
- E. Infección sistémica.
- F. Generación de formas ocluidas.
- G. Muerte de la larva.

Aplicaciones de *los baculovirus*

- Bioinsecticidas para el control de diferentes plagas de importancia agrícola (proteger al máximo las cosechas, menor costo y mínimo riesgo para el hombre, animales y el ecosistema).
- Vectores de expresión de proteínas en entornos eucariotas (las células de insecto pueden realizar modificaciones *post* traduccionales adecuadas, se pueden expresar genes de gran tamaño, son seguros y se obtienen grandes niveles de proteínas).
- Vectores para terapia génica.

Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas sobre un baculovirus

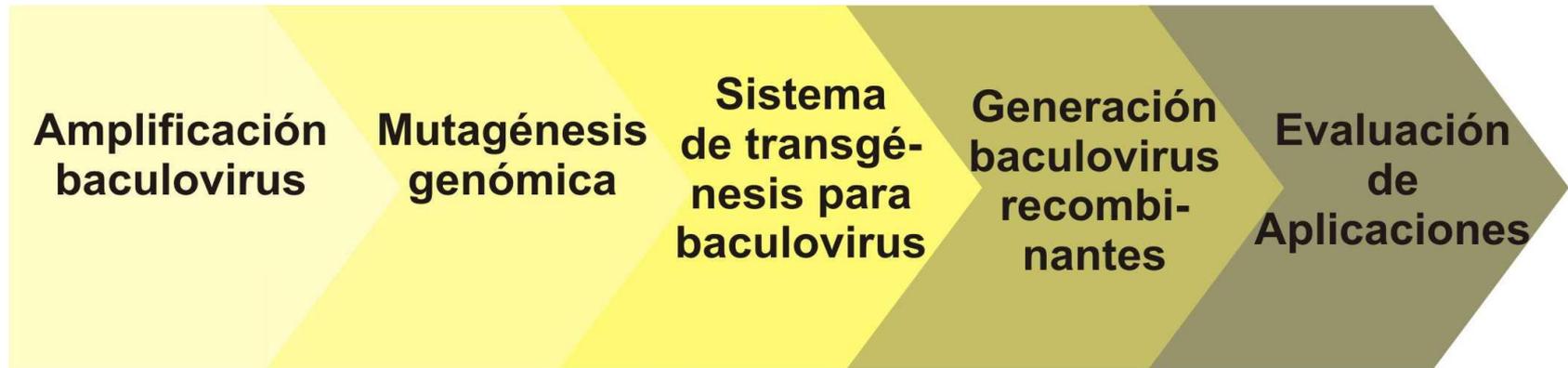
OBJETIVO GENERAL

Desarrollo de un plataforma viral para la expresión de proteínas en contextos eucariotas, vehiculización de genes terapéuticos en animales y la formulación de biocontroladores de plagas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar un baculovirus con capacidad de replicación y modificación en *Escherichia coli* (Bácmido).
2. Evaluar la expresión de proteínas en entornos eucariotas utilizando el Bácmido.
3. Evaluar la actividad bioinsecticida del Bácmido en hospedadores susceptibles.
4. Evaluar la capacidad del Bácmido para transducir animales no susceptibles.

Esquema general del trabajo práctico



Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas sobre un baculovirus

OBJETIVO GENERAL

Desarrollo de un plataforma viral para la expresión de proteínas en contextos eucariotas, vehiculización de genes terapéuticos en animales y la formulación de biocontroladores de plagas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

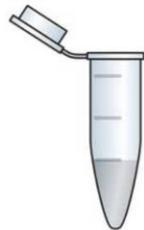
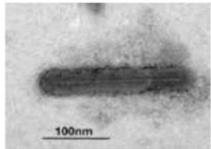
1. Generar un baculovirus con capacidad de replicación y modificación en *Escherichia coli* (Bácmido).
2. Evaluar la expresión de proteínas en entornos eucariotas utilizando el Bácmido.
3. Evaluar la actividad bioinsecticida del Bácmido en hospedadores susceptibles.
4. Evaluar la capacidad del Bácmido para transducir animales no susceptibles.

Amplificación del virus

HOSPEDADOR

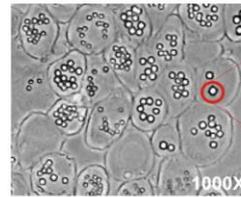
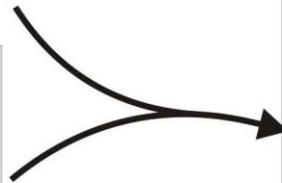


Línea celular de insecto

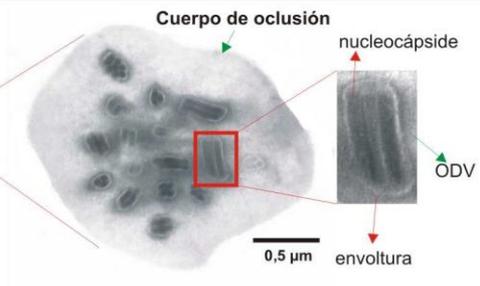


Baculovirus

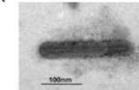
VIRUS BROTANTE



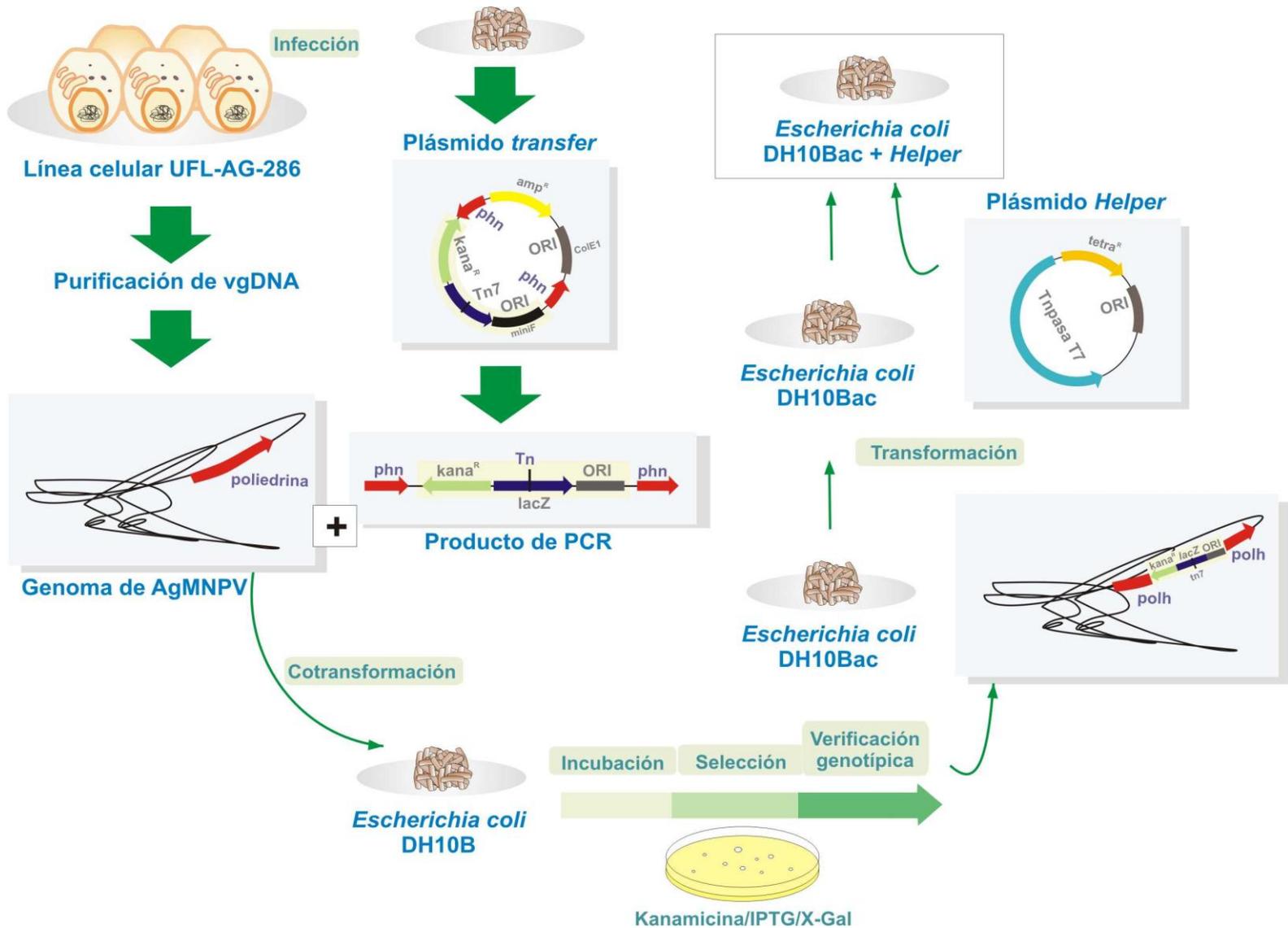
Células infectadas



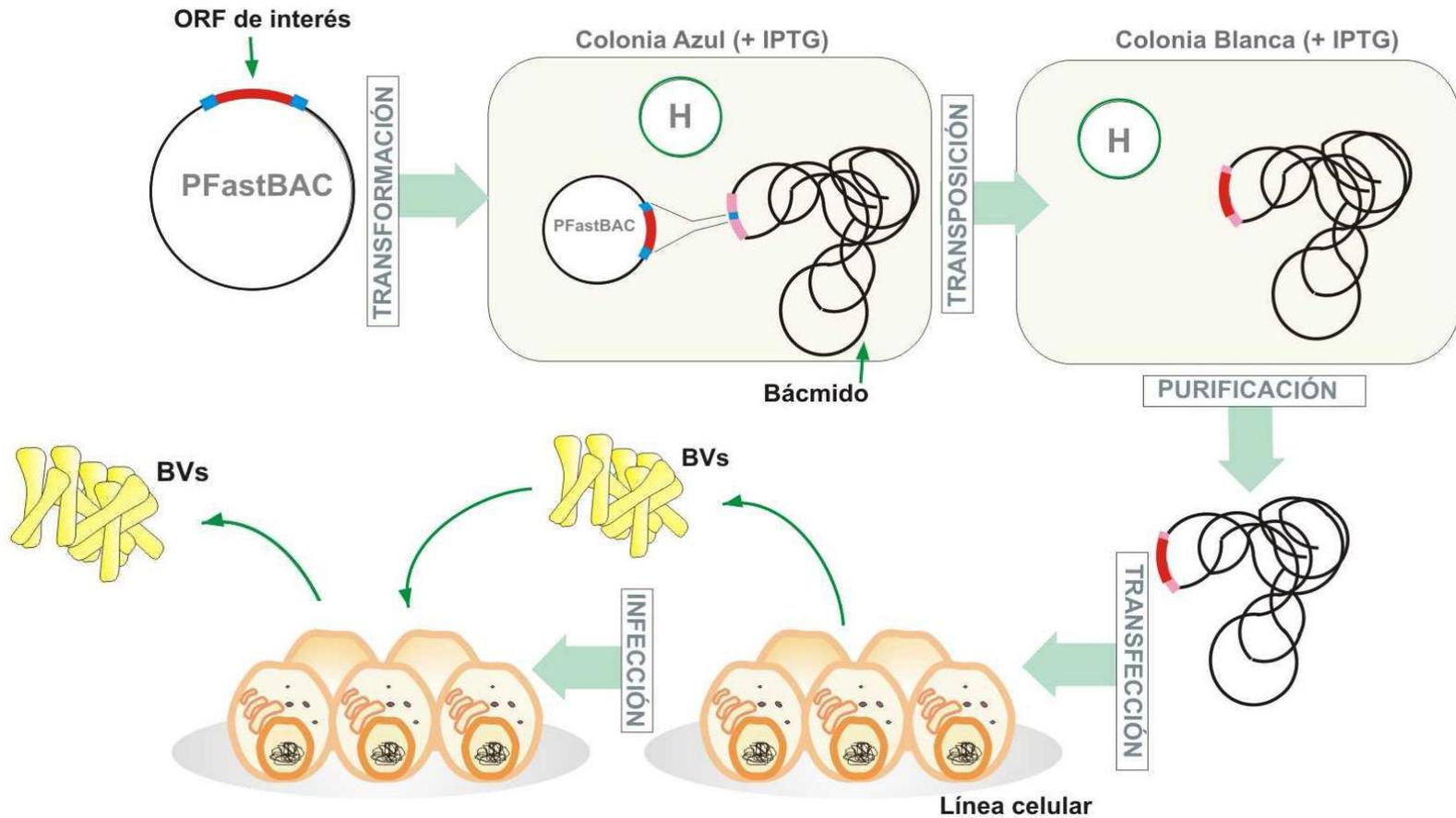
Sobrenadante de cultivo (medio condicionado) conteniendo Virus Brotantes.



Generación del Bácmido



Sistema *Bac to Bac*



Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas sobre un baculovirus

OBJETIVO GENERAL

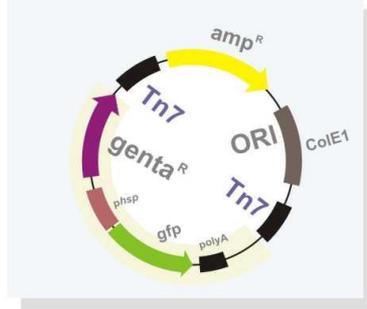
Desarrollo de un plataforma viral para la expresión de proteínas en contextos eucariotas, vehiculización de genes terapéuticos en animales y la formulación de biocontroladores de plagas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

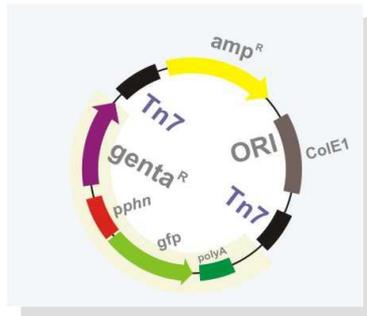
1. Generar un baculovirus con capacidad de replicación y modificación en *Escherichia coli* (Bácmido).
2. Evaluar la expresión de proteínas en entornos eucariotas utilizando el Bácmido.
3. Evaluar la actividad bioinsecticida del Bácmido en hospedadores susceptibles.
4. Evalular la capacidad del Bácmido para transducir animales no susceptibles.

pFastBAC

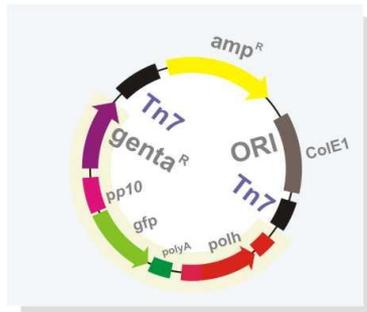
Plásmido Donores



Para evaluar transducción en animales

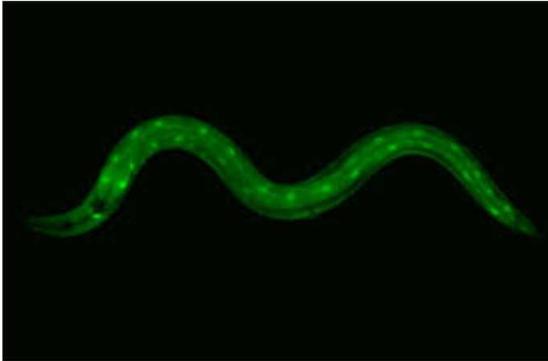


Para expresión de proteínas recombinantes

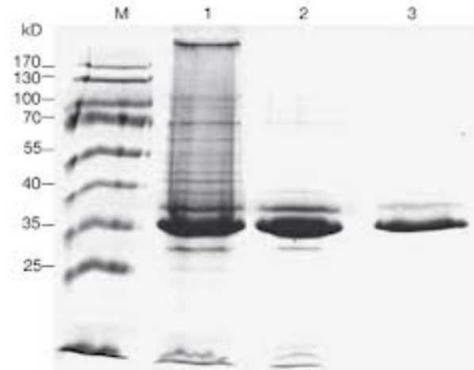


Para biocontrol de plagas

Aplicaciones biotecnológicas



**Vector para
terapia génica**



**Sistema de
expresión**



**Control
biológico**

Ingeniería Genética II

Trabajos prácticos

1. *Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas sobre un baculovirus*
2. *RNA de interferencia en *Caenorhabditis elegans**

Clasificación científica

REINO: *Animalia*

FILO: *Nematoda*

CLASE: *Secernentea*

ORDEN: *Rabdítida*

FAMILIA: *Rhabditidae*

GÉNERO: *Caenorhabditis*

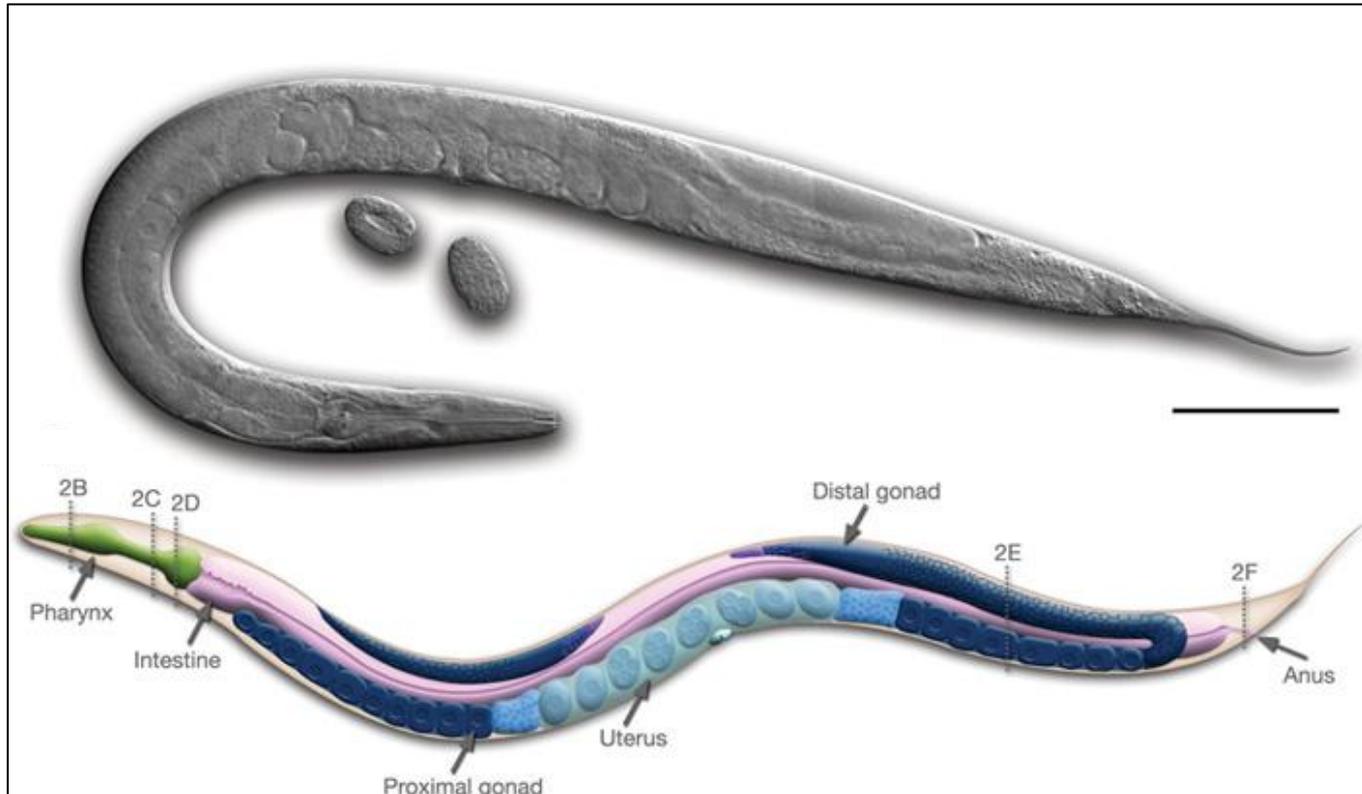
ESPECIE: *Caenorhabditis elegans*



Biología de *Caenorhabditis elegans*

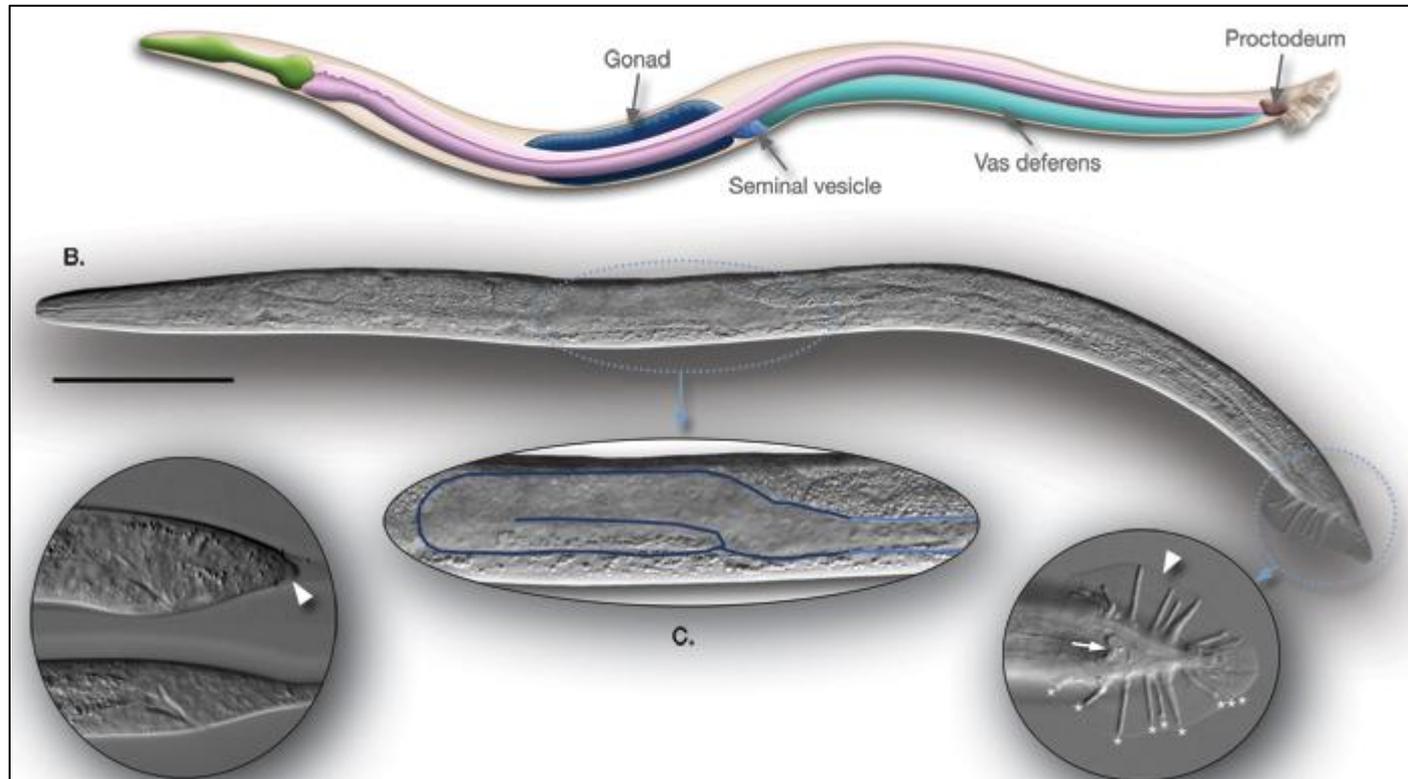
- Nematodo de vida libre.
- Posee dos sexos: hermafroditas y machos (solo el 0,05% de la población).
- Tiene un total de 959 células (300 son neuronas).
- Mide aproximadamente 1 milímetro de longitud.
- Posee 6 pares de cromosomas. Los hermafroditas poseen un par de cromosomas sexuales (XX), mientras que los machos sólo tienen un cromosoma sexual(X0).
- Su genoma codifica para más de 19.000 genes.

Anatomía de un hermafrodita adulto



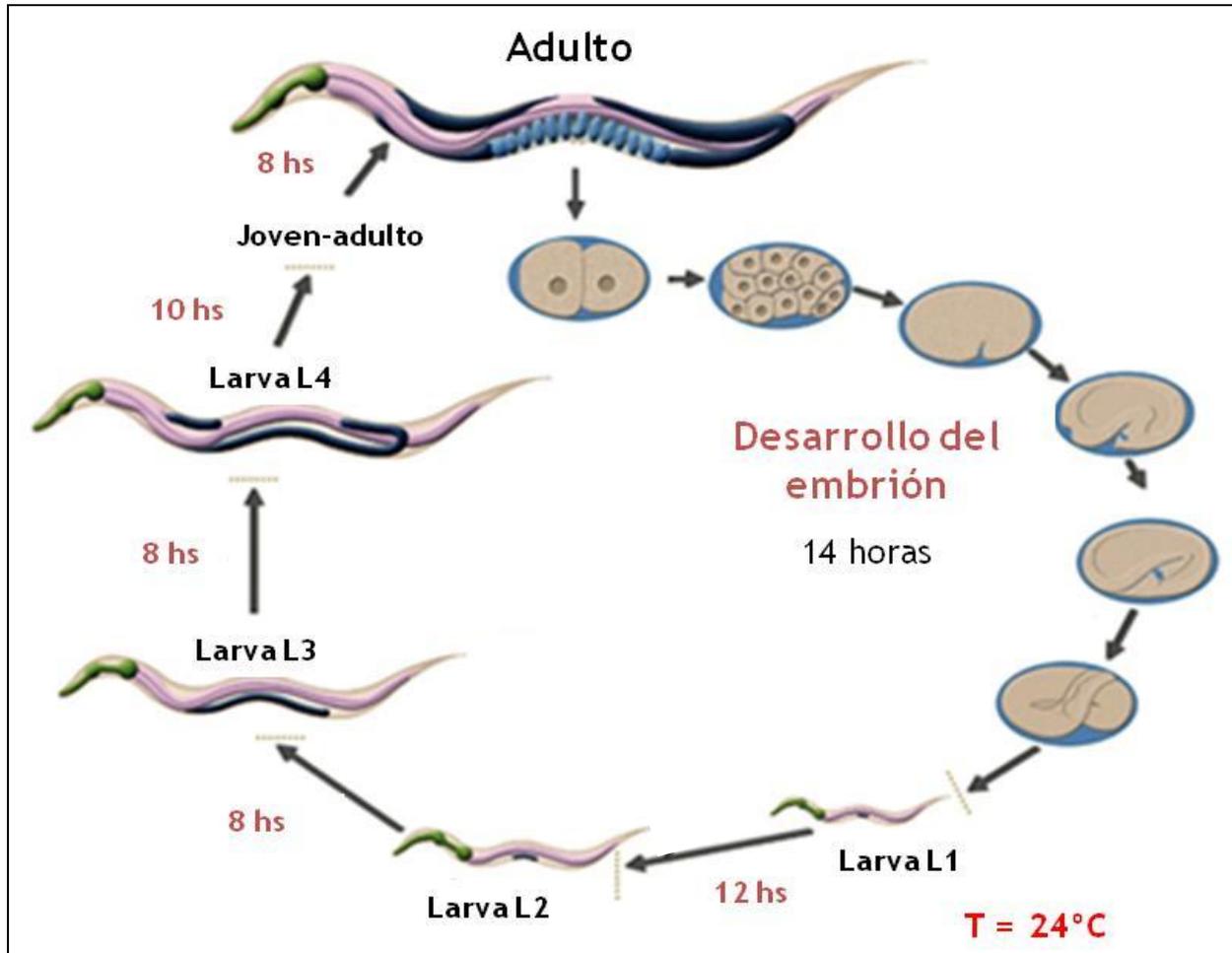
<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>

Anatomía de un *C. elegans* macho adulto

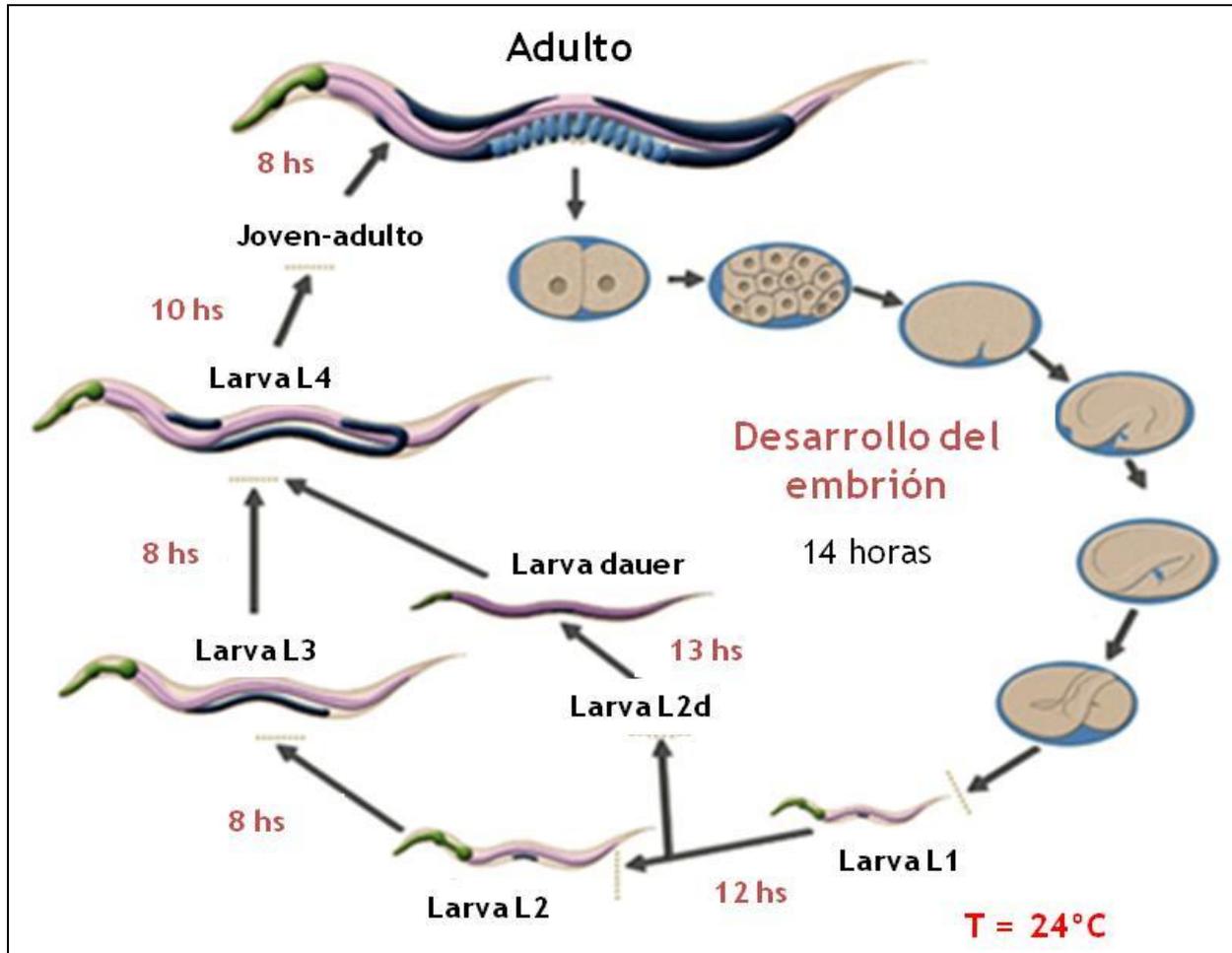


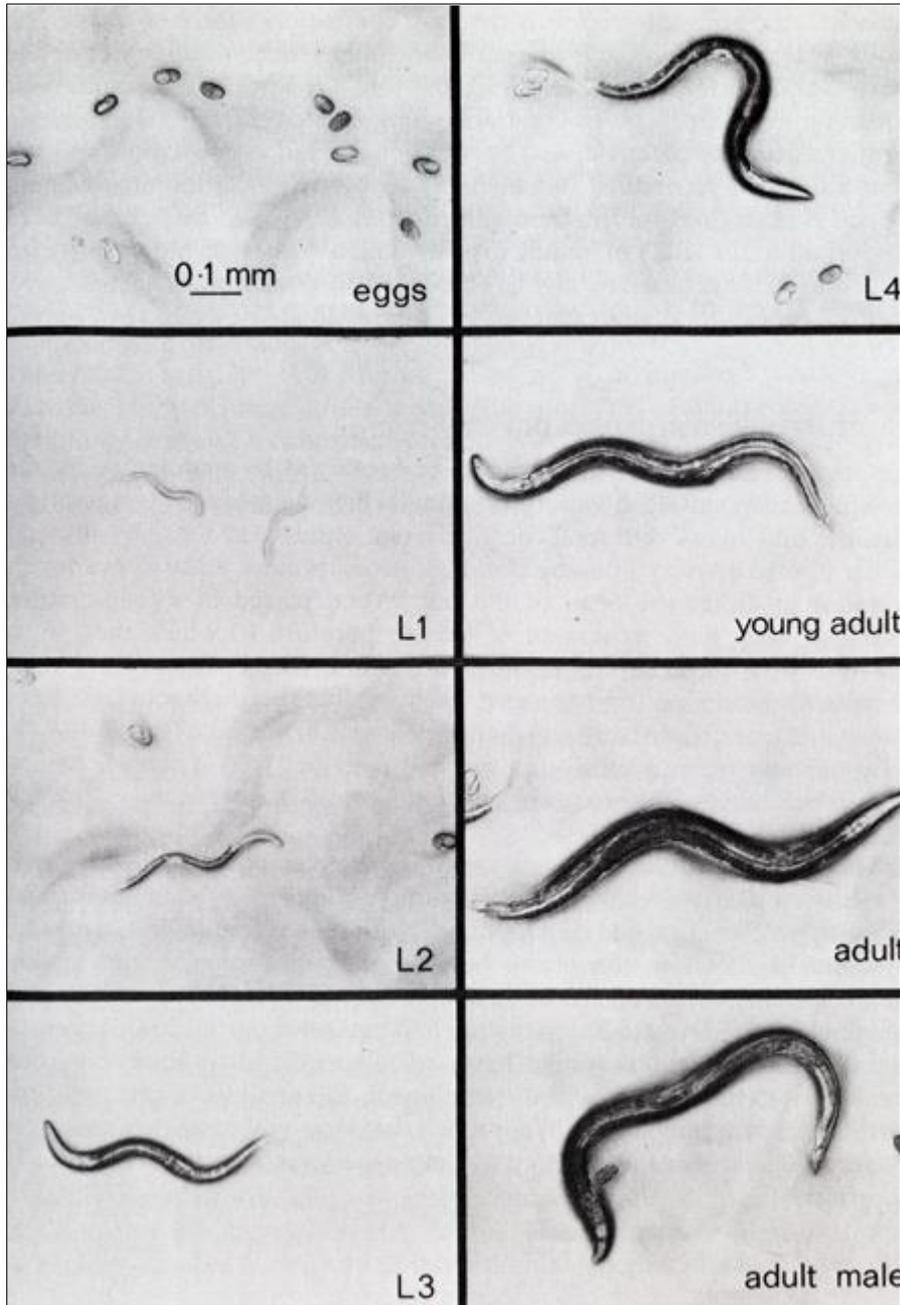
<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>

Ciclo de vida: reproductivo

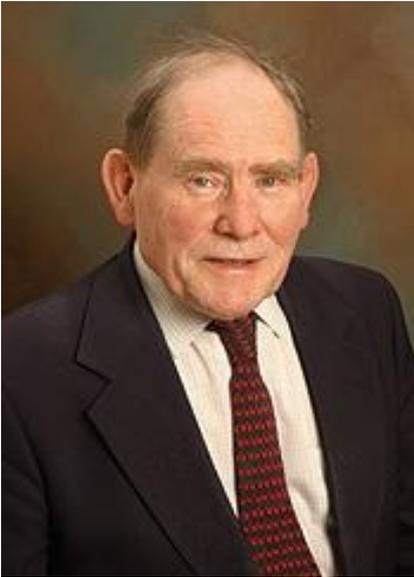


Ciclo de vida: formación de dauer





Organismo modelo



Sydney Brenner

- Organismo multicelular simple.
- Ciclo de vida corto.
- Fácil de crecer en el laboratorio.
- Presenta un número pequeño de células.
- Numerosa descendencia.
- Es transparente.

Crecimiento en el laboratorio

- Medio sólido

- NGM (*Nematode Growth Medium*)
- *Escherichia coli* (cepa OP50) como fuente de alimento



- Medio líquido

- Medio S
- *Escherichia coli* (cepa OP50) como fuente de alimento
- Agitación suave



TEMPERATURA DE CRECIMIENTO: entre 16°C y 25°C

Mantenimiento en el laboratorio

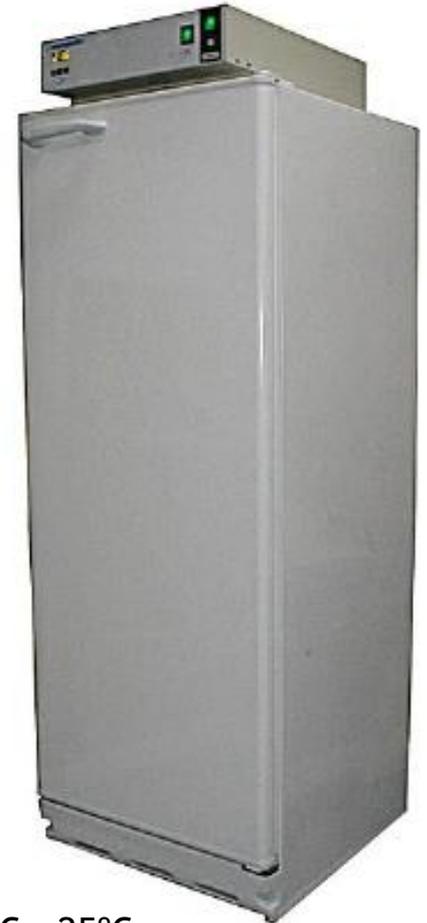


Congelado de gusanos en
freezing solution:

- 1- Lavar con 1ml de *Freezing solution* cada placa de agar mediano con muchos L1.
- 2- Alicuotar 500ul en criotubos.
Congelar a -80°C.l.



$T = 16^{\circ}\text{C}$



$T = 18^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$

Observación de los gusanos



Lupa



Microscopio de fluorescencia

RNA de interferencia en Caenorhabditis elegans

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad del silenciamiento génico posttranscripcional en el modelo animal *C. elegans* (cepa *wild type*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Disponer de una población sincronizada de *C. elegans*.
2. Describir el fenotipo de nematodos adultos alimentados con bacterias modificadas mediante ingeniería genética (cepa HT115(DE3)) que expresan los dsRNA.

RNA de interferencia en Caenorhabditis elegans

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad del silenciamiento génico posttranscripcional en el modelo animal *C. elegans* (cepa wild type).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Disponer de una población sincronizada de *C. elegans*.
2. Describir el fenotipo de nematodos adultos alimentados con bacterias modificadas mediante ingeniería genética (cepa HT115(DE3)) que expresan los dsRNA.

Sincronización:

1. Levantar los gusanos de la placa con 3ml de buffer M9, aspirando y botando con pipeta (P1000) para despegar los gusanos. Transferir el producto lavado a un tubo de 15 ml (no más de dos placas por tubo).
2. Centrifugar a 2.000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
3. Agregar 5 ml de una solución de NaOH/Cl₂ y agitar con la mano por 4 minutos. Con este tratamiento se rompen los gusanos y se liberan los embriones.
4. Agregar 2 volúmenes de M9 estéril para diluir la solución de cloro/NaOH.
5. Centrifugar a 2.000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
6. Realizar dos lavados con 15ml de buffer M9 estéril. Centrifugar a 2.000 rpm durante 20 segundos entre cada lavado. Descartar el sobrenadante.
7. Resuspender los embriones en 3,5ml de buffer M9 estéril. Incubar durante toda la noche a 18°C, en agitación.

RNA de interferencia en Caenorhabditis elegans

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad del silenciamiento génico posttranscripcional en el modelo animal *C. elegans* (cepa wild type).

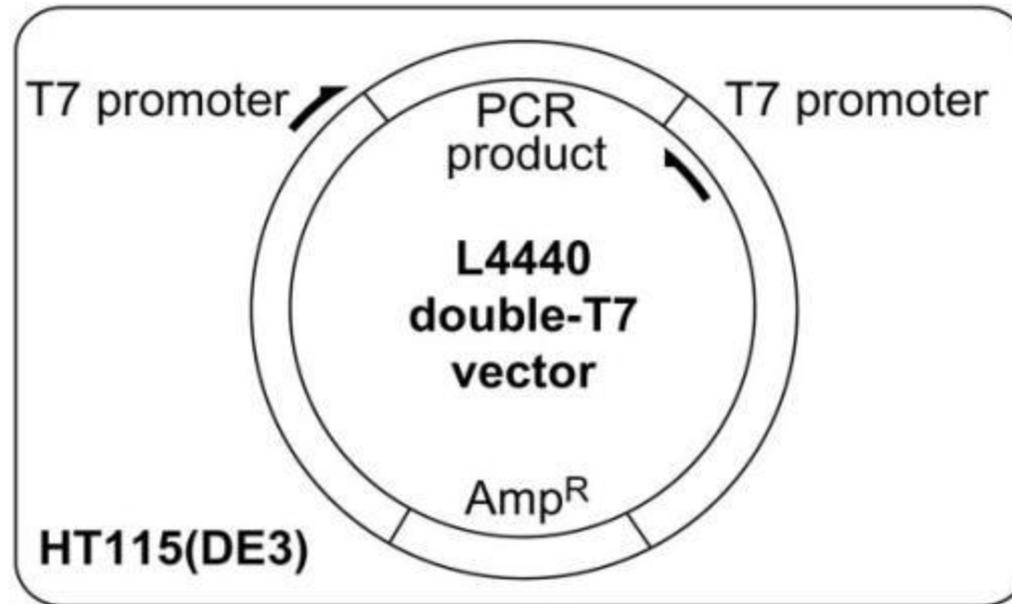
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Disponer de una población sincronizada de *C. elegans*.
2. Describir el fenotipo de nematodos adultos alimentados con bacterias modificadas mediante ingeniería genética (cepa HT115(DE3)) que expresan los dsRNA.

RNA de interferencia en Caenorhabditis elegans: protocolo

1. Verificar que los genes estén en las librerías de RNAi : **Marc Vidal** o **Julie Ahringer**.
2. Seleccionar el clon de la librería.
3. Estriar en placa de LB-agar suplementadas con Amp (50 ug/ml) y dejar crecer ON a 37°C.
4. Seleccionar al azar 3 colonias y chequear que el clon sea el correcto: a) PCR (con *primers* que hibridan en el plásmido), b)Secuenciar.
5. Largar un cultivo líquido suplementado con Amp (50 ug/ml) de la colonia correcta y dejar crecer ON a 37°C en agitación. Controles: gfp, L4440 (vector de entrada sin inserto).
6. Sembrar las placas de RNAi: NGM + Amp (50 ug/ml) + Tet (12.5 ug/ml) + IPTG (1 mM).
7. Dejar las placas a temperatura ambiente ON, o 4 hs a 37°C, para inducir el RNAi.
8. Las placas se pueden guardar durante 2 semanas cubiertas con papel aluminio en la cámara fría o a 4°C.

RNA de interferencia en Caenorhabditis elegans: protocolo



El plásmido recombinante es transformado en una cepa de bacterias, HT115(DE3), que expresa la polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible (lac). Esta cepa de bacteria es RNAasaIII-