



I IN BIO

INNOVACIÓN & BIOTECNOLOGÍA

“Estrategias de Identificación Molecular mediante
PCR en tiempo real”

¿Quiénes somos?

- ✦ Equipo INBIO:
 - ✦ Claudio Navarro: Bioquímico (PUC) y Dr. en Microbiología (USACH)
 - ✦ Cristóbal Martínez: Ing. en Biotecnología Molecular (UChile) y estudiante de Doctorado en Ing. Civil (PUC)
 - ✦ Diego von Bernath: Ing. en Biotecnología Molecular (UChile)

 - ✦ Misión de INBIO: Buscar soluciones simples a problemáticas industriales a través del uso de la biotecnología.

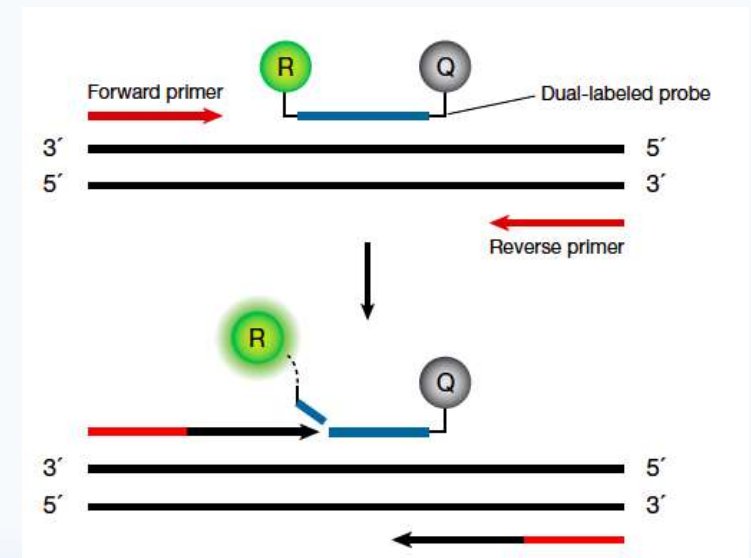
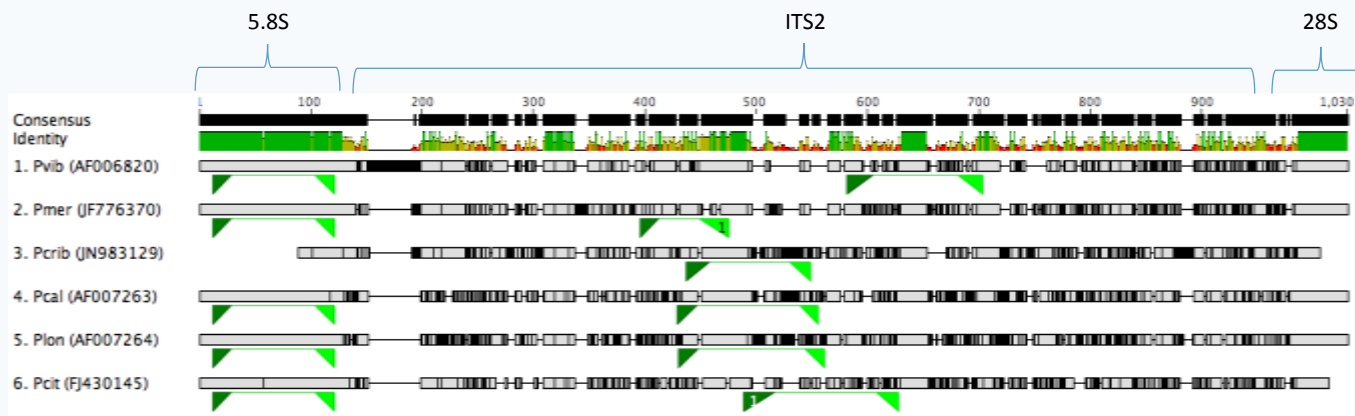
 - ✦ El SAG y el Comité de Cítricos nos plantea la tarea de identificar fallas en la técnica de identificación molecular de Pseudococcidos y de buscar posibles soluciones.
-

**Evaluación y producción de un kit de PCR en tiempo real para
identificación de estados inmaduros de Pseudocóccidos**

¿Cómo funciona el kit de identificación qPCR?

- La técnica de PCR en tiempo real se basa en sondas de hidrólisis (Fluoróforo/Quencher).

Esquema región ITS2 (ADN ribosomal, entre 5,8S y 28S)



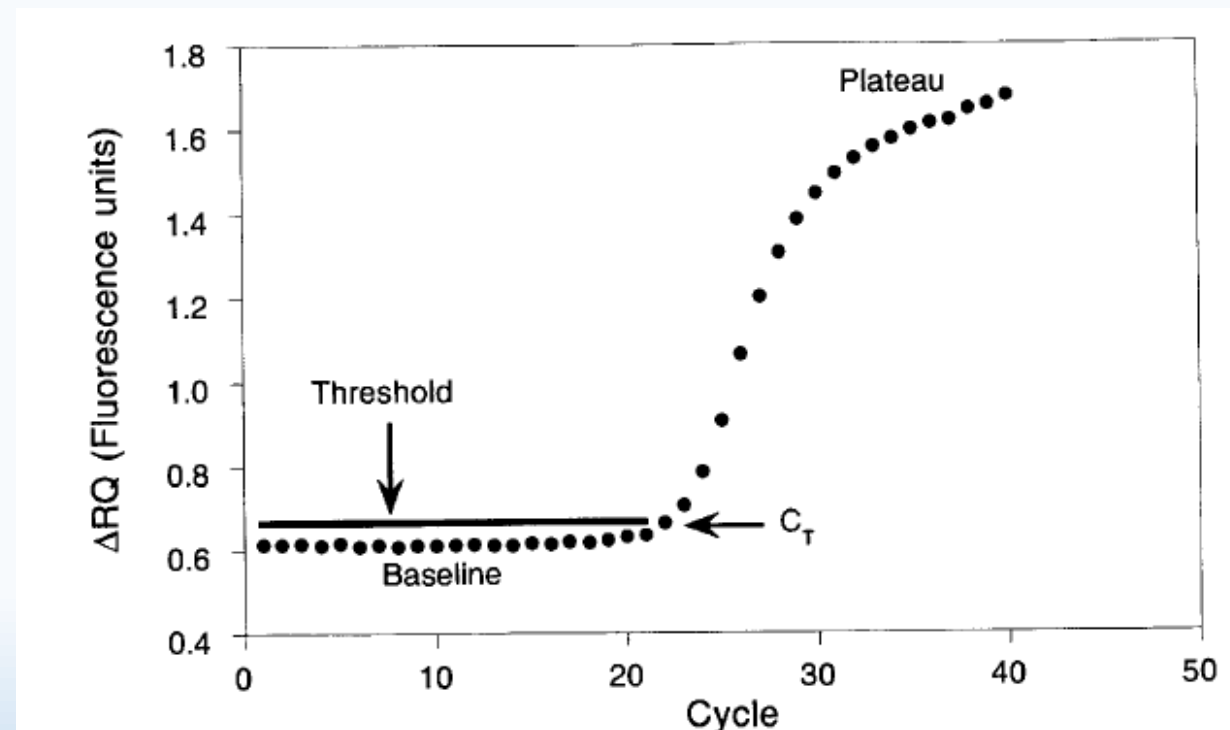
¿Cómo funciona el kit de identificación por qPCR?

✦ Kit de PCR en tiempo real

Insecto	Sondas en Mix A
<i>P. viburni</i>	TAMRA-CACCACACGCTCGCTTGCTC-BHQ2
<i>P. meridionalis</i>	FAM-CGACTCGCTCGTAAGCATTGA-BHQ1
<i>Pseudococcidae</i>	CY5-ATAACCGACCCTCAGACAGGC-BHQ2
Insecto	Sondas en Mix B
<i>P. calceolariae</i>	FAM-CACGCCCGAGTATGGTTCTCT-BHQ1
<i>Pl. citri</i>	TAMRA-TCTCTCTGGATGCCCGTTCA-BHQ2
Insecto	Sondas en Mix C
<i>P. longispinus</i>	TAMRA-TGCGAGTATGATTCTCTACCATTGC-BHQ2
<i>P. cribata</i>	FAM-TCACTCCGAGTACACAGCGAAG-BHQ1

¿Cómo funciona el kit de identificación por qPCR?

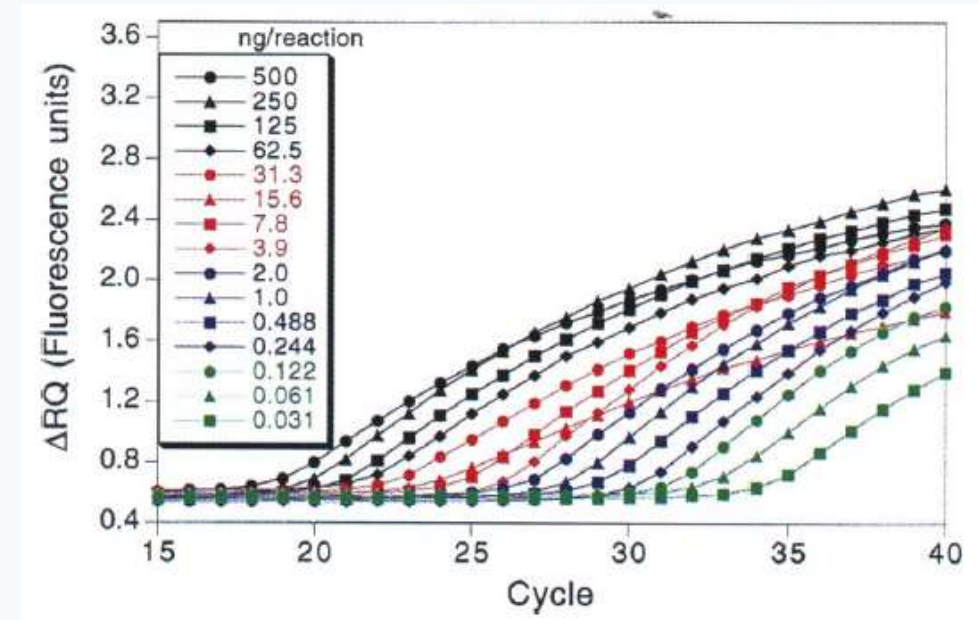
- ✦ Curva de amplificación (Fluorescencia vs Ciclo de PCR)



Problemas identificados:

- El protocolo aceptado tiene un rango de CT para los controles positivos muy ajustado para validar resultados.

Especie	Ct
<i>P. meridionalis</i>	21 ± 2
<i>P. cribata</i>	21 ± 2
<i>P. viburni</i>	24 ± 2
<i>P. longispinus</i>	26 ± 2
<i>P. calceolariae</i>	20 ± 2
<i>P. citri</i>	22 ± 2
Pseudococcidae	22 ± 2



- Errores en manipulación de soluciones y reactivos.

¿Cómo se solucionan estos problemas?

- ✕ Aumentando la concentración de controles positivos.
 - ✕ Prácticas de laboratorio adecuadas para evitar cualquier degradación o contaminación
 - ✕ Constante visitas para mantener un monitoreo en tiempo real del kit y detectar a tiempo posibles fallas.
-

Resultados obtenidos

Reconstrucción del kit: Obtención de controles positivos

1. *P. calciolariae* (120 pb)

```

5' GTTGGTCGTAAAGCATTGACAGTTTCGTCACGACACDEETTCGACGAAAACGTTGCCCGCTATAAGCGAAGGTTAGAGAAACATACTGGGCCCTGCTACGGCCASTABATAGCTGGCA 3'
3' CAACCACGATTCGTAACTGTCAAGGAAATGCTTTGTBBEACAAAGTCTGTTTGAACGGCCATATTGGCTTCGCATCTCTTGTATAGGCCCGGACGATGCBGCTEATCTATGGAGCGTT 5'
    
```

2. *P. citri* (96 pb)

```

5' BCGTATAGTGGTAGAGAGCGAAGGCGGTAGCTATCCTAGAGAGCGTCCGATGAACGGGCA7CCAGAGAGAGGTTGGTGGCCAGAAADATATACGGAGB 3'
3' CCGCATACCCATCTCTCGCTTCGCCATCGATAGCATCTCTCGCAGGCTACTTGGCCGTAGGTCCTCTCCACCCAGGCTCTTCTATATGCCCTCG 5'
    
```

3. *P. cribata* (127 pb)

```

5' BMBEAAAAGAAATCTCGTATTTCACTCCGARTACACAGCGAABRABGCGEOTBBEBBTAAATCCGCAATTTTTTGGCCGATACAGBTACBAGBAAAACCATATATTBBBAGBBA 3'
3' CTTGGTTTTCTTBBAGBAGATAAAATBAGGCTAATGTTCGCTTTTTCGCGBAGAGCGTCAATTTTAAAGGCTTAAAAAAGCGBBEATBTSCATGCTGGTTTTTBBATATAACTCGTCCGCT 5'
    
```

4. *P. longispinus* (127 pb)

```

5' BTCGTCGTAAGCATTGACAGTTTCGTTTACGAAACCCGTGTGAAEBAACCGTTGCCCGCTCTAAGCGACTCCCAATGATAGAGKATCATACTCCACBEGCCGTATTTTCTGTCABTAAETCC 3'
3' AAGCAGCATTCTAACTTTCAGGCAAGTBTBTGTGACCAAGTCTTTTBBAAAGCGGAGATTCBCTBAGCBTTACCATCTCTTARTATGAGGCTGCGGACATAAAAABAGBAGTATCTAEB 5'
    
```

5. *P. meridionalis* (71 pb)

```

5' GTGTGTACGTGAAAGTTTCGTCGAAATAGTACGACTCGCTCGTAAGCATTGACGAATACAAACGTTGTCGAC 3'
3' CACACATGCACCTTCAAGCAGCTTTATCATGCTGAGCGAGCATTGTAACGCTTATGTTTGCACAAGCTG 5'
    
```

6. *P. viburni* (98 pb)

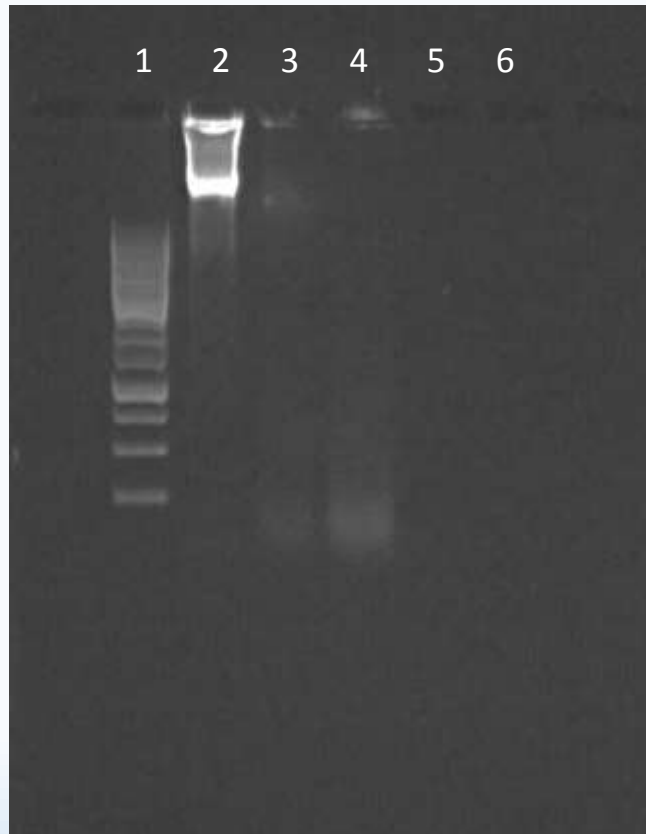
```

5' BCGTCGATAATTCTCCTCCGCTCCTBCTGCTGAAACGCGGCTGTTGTACBATTGCGGAGGCAAGCGAGCGTGTGGTGGAGCBAAGAAATAGACBAC 3'
3' CCGAGCTATTAAGAGGAGGCGAGGACBAGCGACTTGGCGGCAACAATGCTAGCGCGCTGTTGCTCGCACACCACCTCGCTTCTTATCTGCTG 5'
    
```

Secuencia nucleotídica de los controles positivos (Región del ADN genómico de cada insecto a identificar)

Resultados obtenidos

✦ Reconstrucción del kit: Obtención de controles positivos



Amplificación a partir de
ADN genómico

Carriles

1. Std 1 Kb Fermentas
2. 10 uL Genómico QA1
3. 10 uL SV-11
4. 10 uL SA-30
5. 10 uL SA-27
6. 10 uL SA-40

Resultados obtenidos

✦ Reconstrucción del kit: Obtención de controles positivos

Ej: *Planococcus citri*

Delta G: -192.77 kcal/mole Base Pairs96

```

5' GCGTATAGTGGTAGAGAGCGAAGGCCGGTAGCTATCGTAGAGAGCGTCCGATGAACGGGCATCCAGAGAGAGGTGGTGGCGAGAAGATATACGGAGG
|||||
3' CGCATATCACCATCTCTCGCTTCCGCCATCGATAGCATCTCTCGCAGGCTACTTGCCCGTAGGTCTCTCTCCACCACCGCTCTTCTATATGCCTCC

```

Delta G: -36.07 kcal/mole Base Pairs17

```

5' GCGTATAGTGGTAGAGAGCGAAGGCCGGTAGCTATCGTAGAGAGCGTCCGATGAACGG
|||||
3' CTGCGCAGGCTACTTGCCCGTAGGTCTCTCTCCACCACCGCTCTTCTATATGCCTCC

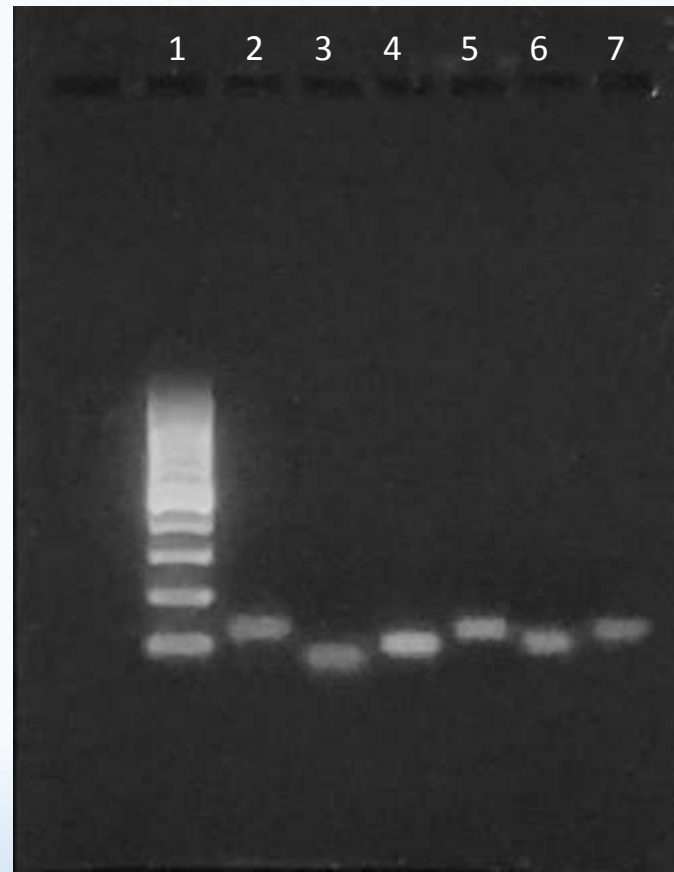
```

El programa PCR:
 95° C por 2 min
 95° C por 15 seg
 53° C por 15 seg
 68° C por 30 seg
 68° C por 2 min

10 ciclos

Resultados obtenidos

✦ Reconstrucción del kit: Obtención de controles positivos



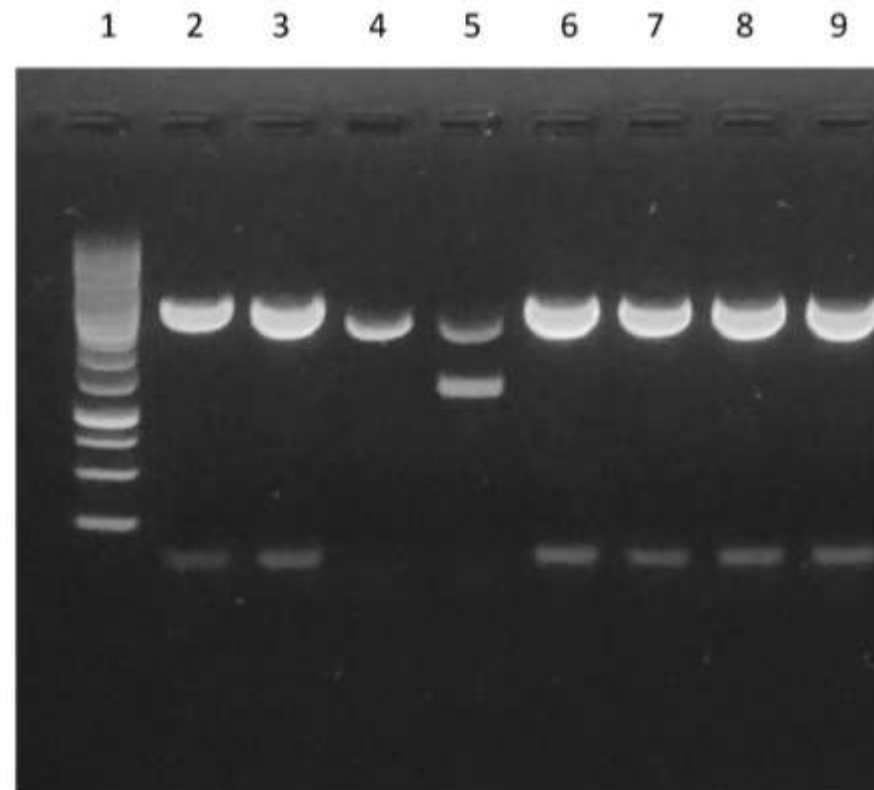
Resultados PCR:

Carriles

1. Std 100 pb
2. C+ *P. criбата*
3. C+ *P. meridionalis*
4. C+ *P. viburni*
5. C+ *P. longispinus*
6. C+ *P. citri*
7. C+ *P. calceolariae*

Resultados obtenidos

✦ Reconstrucción del kit: Obtención de controles positivos



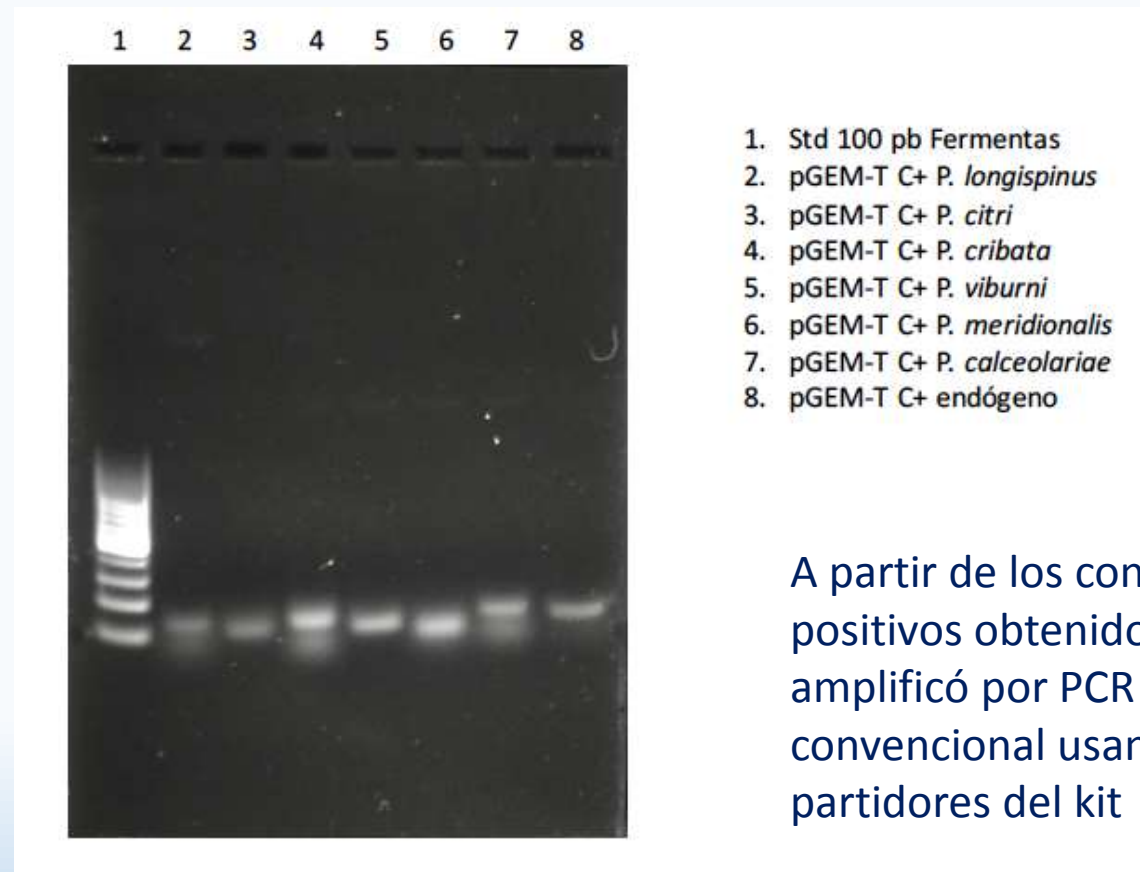
Carriles.

1. Std 1Kb Fermentas
2. pGEM-T C+ cribata EcoRI
3. pGEM-T C+ citri EcoRI
4. pGEM-T s/inserto EcoRI
5. pGEM-T s/inserto
6. pGEM-T C+ meridionalis EcoRI
7. pGEM-T C+ viburni EcoRI
8. pGEM-T C+ calciariae EcoRI
9. pGEM-T C+ longispinus EcoRI

Clonamiento de controles positivos en un vector comercial y posterior digestión con EcoRI

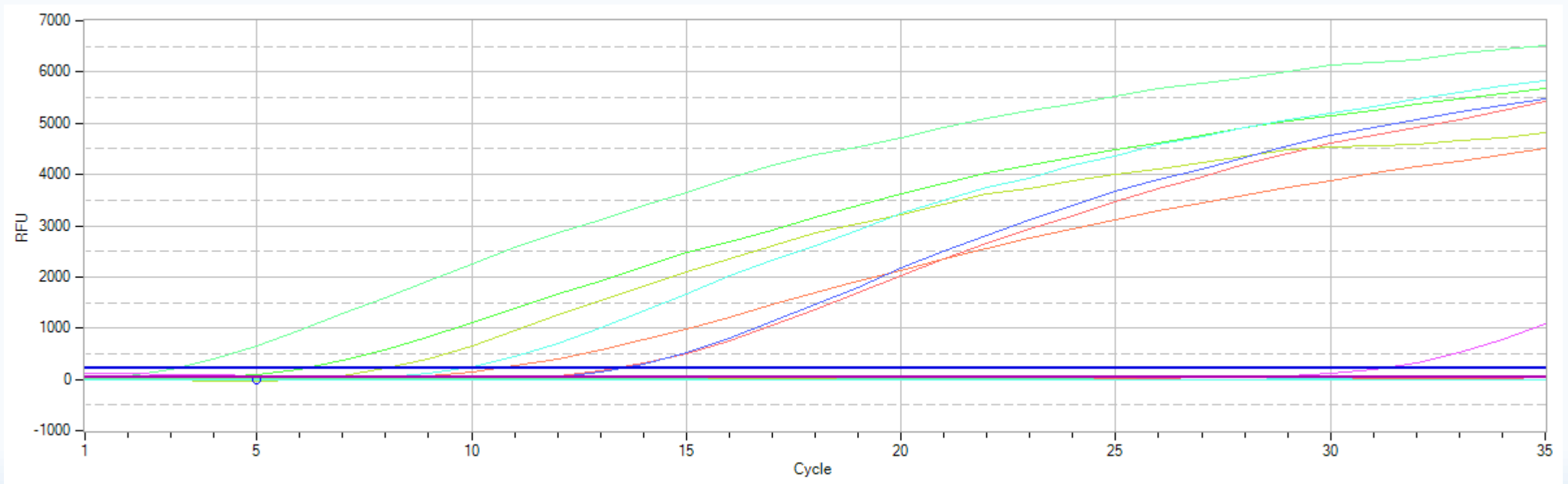
Resultados obtenidos

✦ Reconstrucción del kit: Obtención de controles positivos



Resultados obtenidos

- ✦ Reconstrucción del kit: Pruebas de PCR en tiempo real usando controles positivos obtenidos



Ej: *P. cribata* (FAM)

Objetivos siguientes

- ✦ Probar controles positivos en sitios de inspección (obtención de curva estándar para saber que concentración de ADN usar).
 - ✦ Probar kits para identificar estados inmaduros.
 - ✦ Entrega de Kits.
-

Ventajas y desventajas del kit actual

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Gran especificidad (partidores y sondas)	Sondas aumentan valor
Permite experimentos multiplex	Muchas partes (complica armado y duración)
	Técnica ha presentado muchas fallas
	Instrumento de PCR en tiempo real más caro

* Principal problema: Rango de Ct de controles positivos muy rígidos

“Desarrollo y validación de una técnica de HRM para la identificación de Pseudocóccidos cuarentenarios en la industria frutícola de exportación”

Propuesta: Kit de identificación mediante HRM

- ✦ El HRM (del inglés “High Resolution Melt”), es una técnica de PCR en tiempo real en presencia de un fluoroforo intercalante (Ej EvaGreen o LC Green).

La identificación se hace mediante el análisis de la curva de fusión. Luego del PCR, el ADN doble hebra se va denaturando mediante un gradiente de temperatura (de 50 a 90 °C) y se va midiendo la disminución en la fluorescencia.

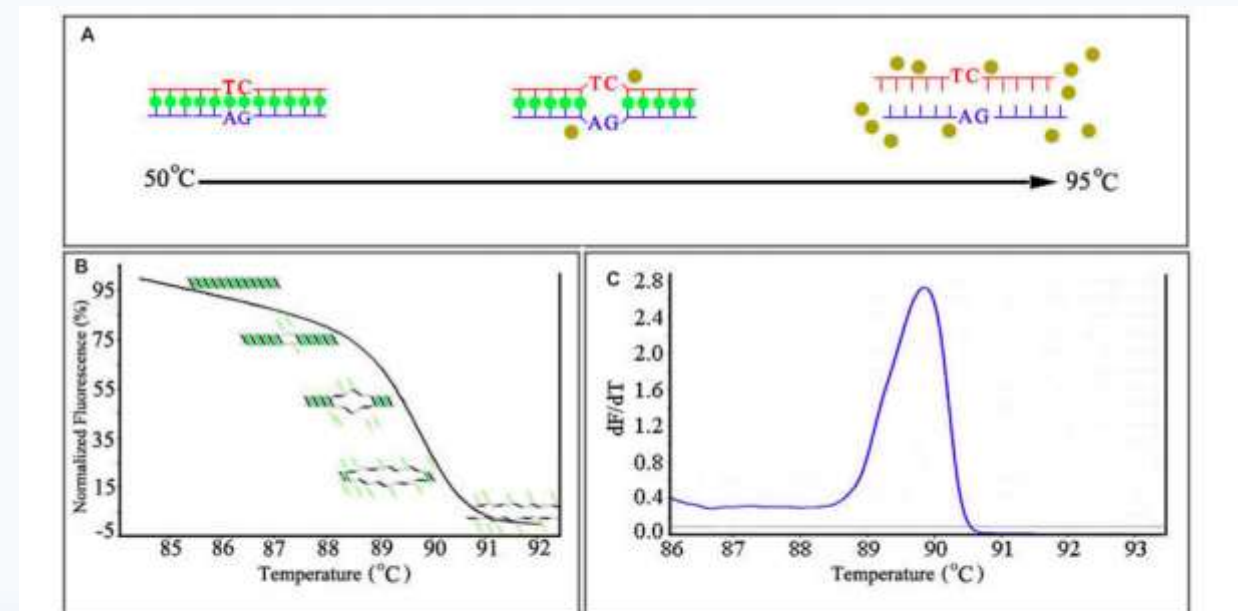
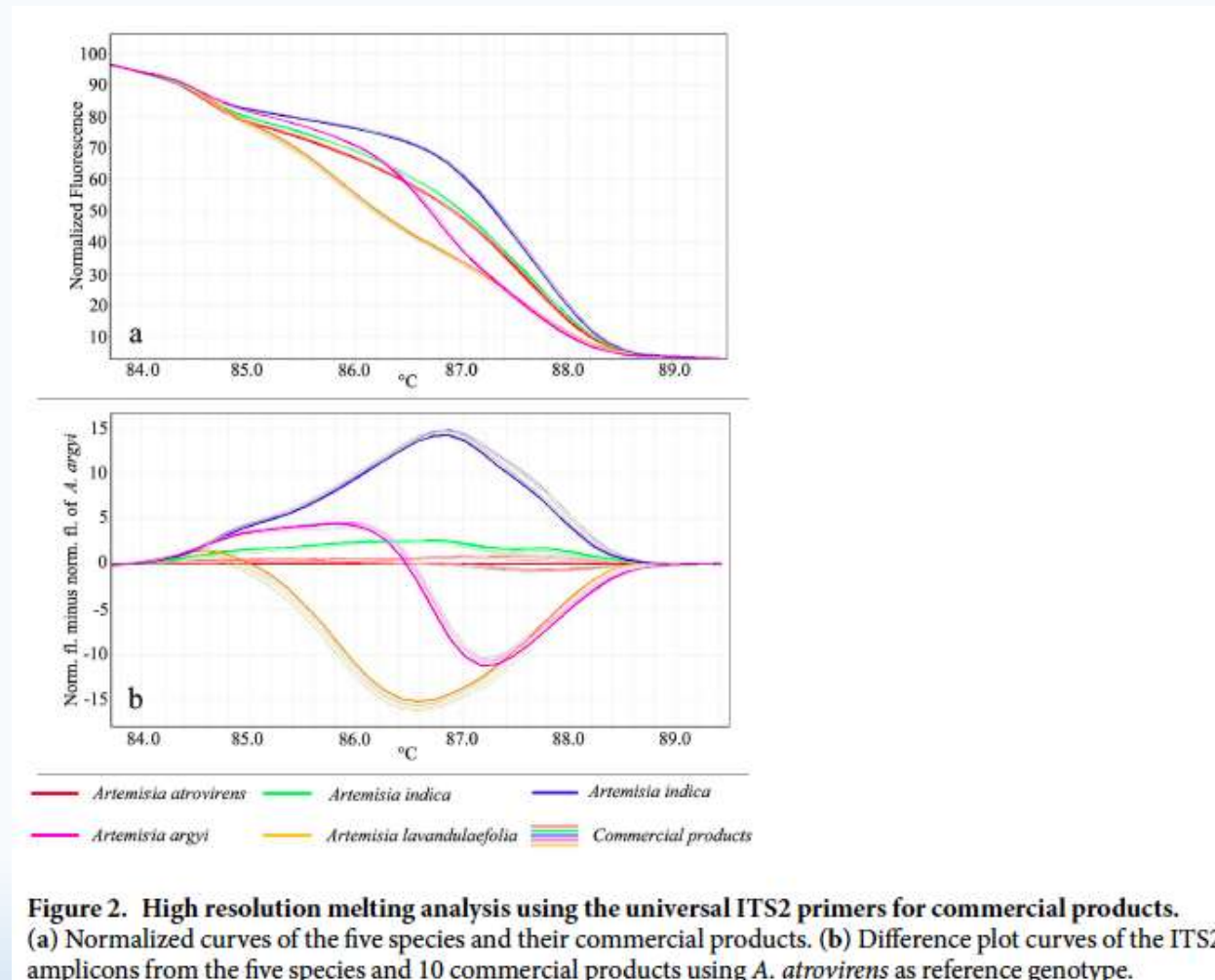


FIGURE 2 | The mechanism of real-time HRM system. (A) The dissociation-characteristics (Melting) of double-stranded DNA during heating. **(B)** The normalized plot generated by high resolution melting (HRM) analysis. High fluorescence when dye is bound to dsDNA. **(C)** The melting curves (derivative melt curves) of the amplicons, negative derivative of the fluorescence (F) over temperature (T) (-dF/dT) against the temperature (T).

Propuesta: Kit de identificación mediante HRM



Propuesta: Kit de identificación mediante HRM

✦ Objetivos específicos:

1. Selección de marcadores moleculares (28S-D2, ITS2 o COI).
 - i. Extracción de ADN y Secuenciación
 - ii. Alineamiento de secuencias
 - iii. Diseño y validación de partidores

 2. Experimentos y optimización de la técnica de HRM
 - i. Obtención de controles positivos
 - ii. Obtención de curvas de fusión
 - iii. Optimización de la técnica

 3. Validación de la técnica de identificación
-

Principales beneficios de la propuesta

- ✦ Económico (no requiere el uso de sondas de hidrólisis)
 - ✦ Podrían identificarse las seis especies en un solo tubo
 - ✦ El kit es más simple
 - ✦ Instrumento de PCR en tiempo real más barato
-

CURCULIONIDOS

- ✦ Técnica desarrollada en el proyecto: “Desarrollo, validación e implementación de un kit para la identificación de especies del género *Naupactus*, mediante herramientas moleculares (PCR en tiempo real), para la reducción de rechazos en la industria citrícola exportadora chilena” (PYT-2015-0027)

 - ✦ Etapas para armar el kit:
 - ✦ Obtención de controles positivos
 - ✦ Despacho de sondas para comenzar pruebas con controles positivos
 - ✦ Pruebas con ADN de insectos
 - ✦ Entrega de kits para pruebas iniciales en sitios de inspección (Mayo)
-



INBIO

INNOVACIÓN & BIOTECNOLOGÍA

CRISTÓBAL MARTÍNEZ BUSSENIUS
DIRECTOR EJECUTIVO

(569) 8443 7636
cmartinez@inbio.cl

DIEGO VON BERNATH PREECE
DIRECTOR DE PROYECTOS

(569) 9289 2600
dvonbernath@inbio.cl

CLAUDIO NAVARRO MARTÍNEZ
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO

(569) 9373 8904
cnavarro@inbio.cl

www.inbio.cl

*Américo Vespucio Norte
2700, Of. 901, Vitacura.*