

Título Biosensor de Mercurio

Tipo de Producto Informe técnico

Autores Cámara, María de los Milagros

Código del Proyecto y Título del Proyecto

A16T01 - Desarrollo de un biosensor para detección de contaminaciones con plomo en aguas

Responsable del Proyecto

Cámara, María de los Milagros

Línea

Biociencias

Área Temática

ABI

Fecha

2016

Biosensor de Mercurio

Se pudo poner a punto el Biobrick que expresa GFP para el Biosensor de Mercurio para corroborar el buen funcionamiento del promotor, de mientras que se esperan los primers para levantar el fragmento de interés (promotor bidireccional sensible a mercurio) y poder unirlo a la proteína roja mRFP.

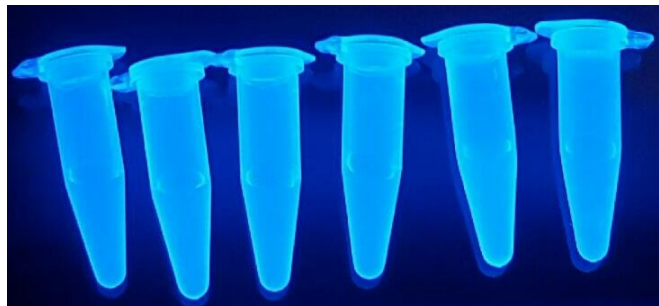
BioBrick puesto a punto: **BBa_K1355002**



El experimento inicial del Biosensor de Mercurio fue el siguiente:

- Pre incubar una colonia en LB-cloranfenicol a 37°C ON en shaker
- Transferir 1ml de suspensión bacteriana a 50ml de LM (LB con menor cantidad de NaCl) sin cloranfenicol
- Incubar a 37°C en shaker hasta que la OD sea 0,4-0,6
- Tomar 500µl de bacterias en 6 tubos
- Agregar cantidad apropiada de HgCl₂:
 - 1 µg/ml
 - 0,2 µg/ml
 - 0,1 µg/ml
 - 0,02 µg/ml
 - 0,01 µg/ml
 - 0 µg/ml
- Incubar a 37°C en shaker
- A cada tiempo (0hs, 1hs 30min, 3hs, 4hs 30 min)
- Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos, descartar sobrenadante y lavar con 1ml de buffer TN. Resuspender
- Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos, descartar sobrenadante y lavar con 500µl de buffer TN. Resuspender

Observar el eppendorf mediante UV. Los resultados no fueron buenos:



Luego, se intentó el mismo experimento pero con falcons y a penas se veía algo:



Luego sólo hicimos la concentración de $1\mu\text{g/ml}$ de sal de mercurio partiendo de más cantidad de bacterias (50 ml de bacterias pelleteadas y llevadas a 10 ml de LB):

→ Control tubo vacío

→ Bacterias con el constructo



→ Control tubo con agua

Luego de todo esto se pudo poner bien a punto el experimento, como se mostró en las primeras hojas dando un muy buen resultado visible.

El experimento que dio buen resultado, fue el siguiente:

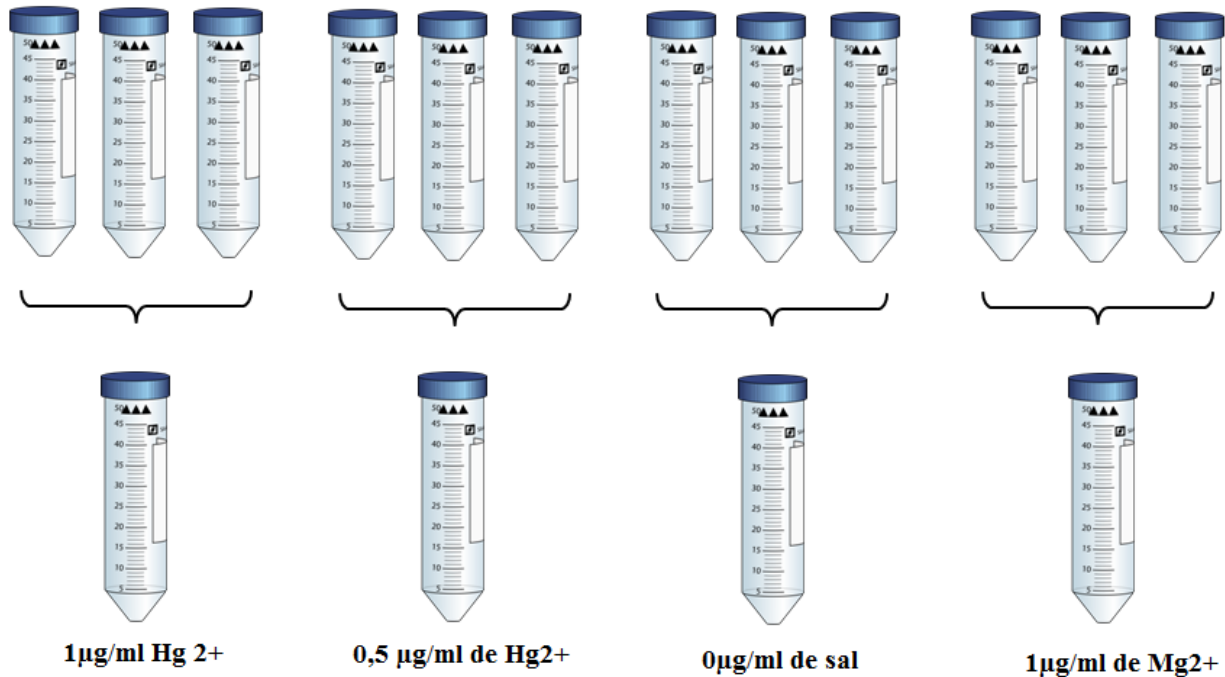
Se larga un cultivo de bacterias en 12 falcons con 30ml (se pica una colonia para cada falcon).
Se incuba ON a 37°C en shaker.

Se centrifuga a 3500rpm por 10 minutos. Se descarta el sobrenadante

Se agrega a cada falcon 2,5ml de LB caldo. Resuspendo.

El volumen de 3 falcons los uno en uno nuevo, quedando así 4 falcons.

Rotulo los falcons de la siguiente manera: **1µg/ml** de sal de Mercurio, **0,5 µg/ml** de sal de Mercurio, **0 µg/ml** de sal y **1 µg/ml** de sal de Magnesio. Se muestra a continuación:



Como sal de Mercurio, se usó HgCl₂ y como sal control se usó MgCl₂. Las sales se llevaron a una concentración de 30µg/ml para llevar a cabo el experimento.

El siguiente cuadro indica cómo se llevó a cabo el experimento:

	CULTIVO	RESISTENCIA (cloranfenicol)	SAL
1ug/ml	<i>2ml</i>	<i>2.07ul</i>	<i>68.9ul</i>
0.5ug/ml	<i>2ml</i>	<i>2.07ul</i>	<i>67.8ul</i>
0.2ug/ml	<i>2ml</i>	<i>2.07ul</i>	<i>67ul</i>
0.01ug/ml	<i>2ml</i>	<i>2.07ul</i>	<i>66ul</i>
0ug/ml	<i>2ml</i>	<i>2ul</i>	<i>0ul</i>

**Lo que se marca en color, son las concentraciones que se usaron en el ensayo.*

Por ahora se estuvo un buen resultado incubando las bacterias ON (24hs).

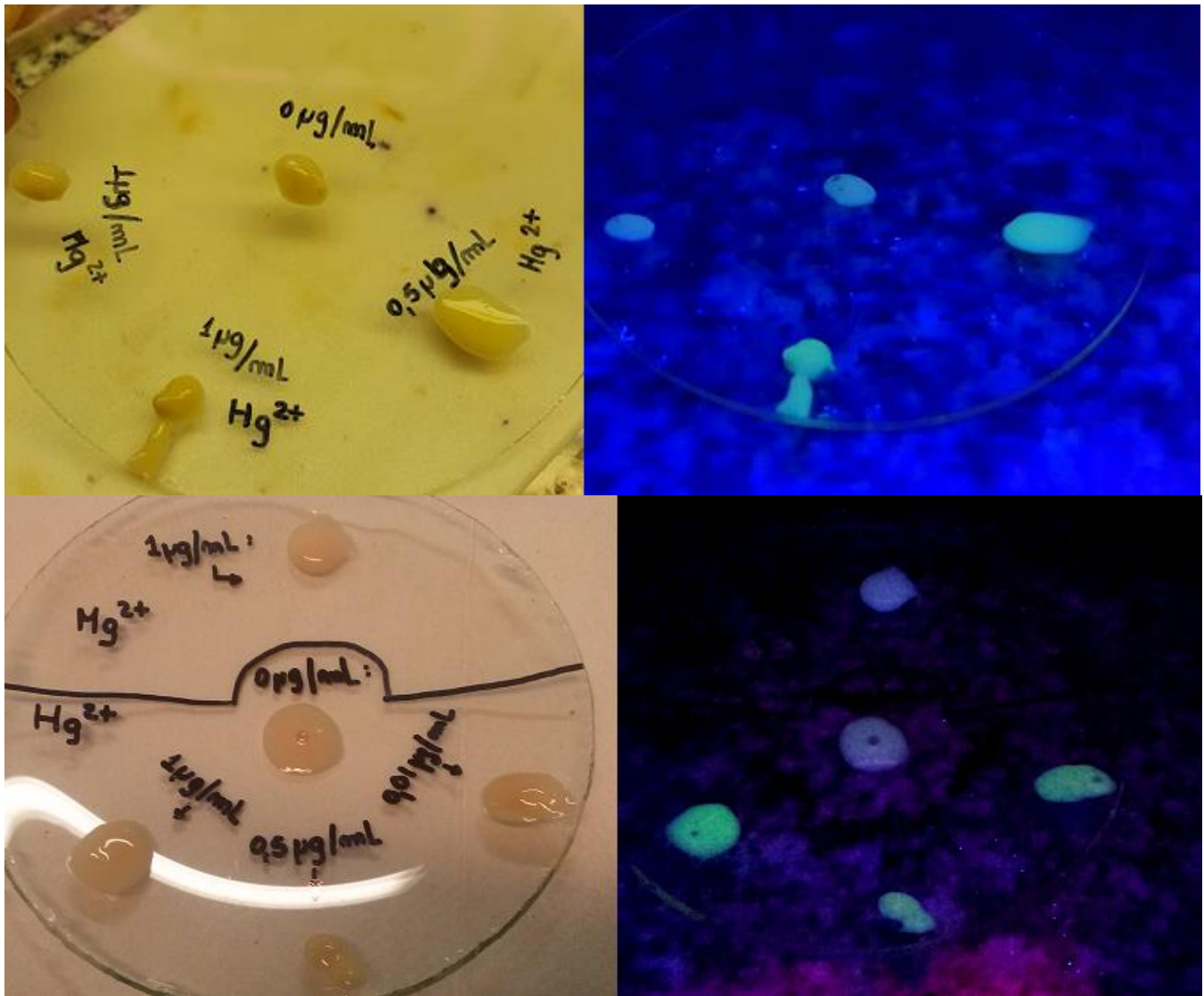
Centrifugo a máxima velocidad durante 10 minutos. Descartar sobrenadante.

Lavar el pellet con Buffer TN para eliminar por completo el LB porque tiene fluorescencia.

- Agregar **3ml** de buffer TN. Resuspender. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad. Descartar sobrenadante.
- Agregar **1ml** de buffer TN. Resuspender. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad. Descartar sobrenadante.

El resultado se puede observar bien si se colocan a las bacterias sobre un soporte vidrio ya que la expresión de GFP se puede ver con UV y el plástico del falcon interfiere en la visualización de resultados.

Resultados:



El experimento del Biosensor de flúor, siempre da un resultado positivo. Por lo que se concluye que es constitutivo. Hasta el momento no pudimos hacer que de un resultado cuantitativo.

Creímos que podía haber un problema en la secuencia del Riboswitch, entonces se mandó a secuenciar utilizando los siguientes primers:

Forward primer for sequencing/amplifying BioBrick parts (VF2)

Reverse primer for sequencing/amplifying BioBrick parts (VR)

Los resultados de la secuenciación revelaron que la secuencia se encuentra en perfectas condiciones.

Con el fin de probar nuevas alternativas realizamos nuevamente el experimento de la siguiente forma:

Sales que se usaron: NaF 20mM y NaCl 20mM.

Se parte de 2 cultivos líquidos crecidos ON a 37°C en shaker (5 falcons con 30ml de cultivo bacteriano).

Se centrifuga a 3500rpm por 10 minutos. Se descarta el sobrenadante

Se agrega a cada falcon 10ml de LB caldo y se resuspende el pellet.

Se continúa de la siguiente forma:

```

tgccacctga cgtctaagaa
acggtaggact gcagattctt
    
```

VF2

```

attaccgcct ttgagtgagc
taatggcgga aactcactcg
    
```

VR

NaF 20mM	CULTIVO	RESISTENCIA (cloranfenicol)	SAL
0ppm	4ml	4ul	0ul
0.5ppm	4ml	4.002 ul	2.4 ul
1ppm	4ml	4.004 ul	4.8 ul
1.5ppm	4ml	4.007 ul	7.2 ul
2ppm	4ml	4.01 ul	9.6 ul

NaCl 20mM	CULTIVO	RESISTENCIA (cloranfenicol)	SAL
-----------	---------	--------------------------------	-----



0ppm	<i>4ml</i>	<i>4 ul</i>	<i>0 ul</i>
0.5ppm	<i>4ml</i>	<i>4.002 ul</i>	<i>1.7 ul</i>
1ppm	<i>4ml</i>	<i>4.003 ul</i>	<i>3.4 ul</i>
1.5ppm	<i>4ml</i>	<i>4.005 ul</i>	<i>5.21 ul</i>
2ppm	<i>4ml</i>	<i>4.007 ul</i>	<i>6.81 ul</i>

La construcción del Biosensor de Flúor que se utilizó para realizar el experimento, fue la construcción del clon positivo 12 que ya se había hecho para TecnoX.

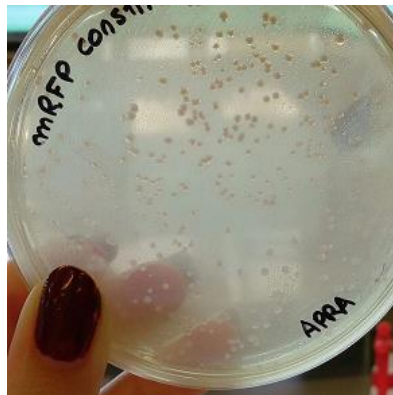
En todas las condiciones, el pellet da azul.



Se pensó que podría ser un problema estérico, entonces se trató de unir al Riboswitch con el LacZ → En paralelo se quiso unir el mRFP al Riboswitch para ver si se expresa bien el mRFP con un promotor regulado y por si llega a funcionar bien el experimento con Flúor. Para esto se transformó la parte **BBa_K516030** (RBS+mRFP+T+T) en la cepa bacteriana competente *NovaBlue*. Figura

Como se ve, no da color. Solo expresa color si se une a un promotor. Por las dudas, se hizo estrió en una placa LB-cloranfenicol y se dejó invertida en estufa a 37°C por dos días. El resultado fue el siguiente:

mRFP:



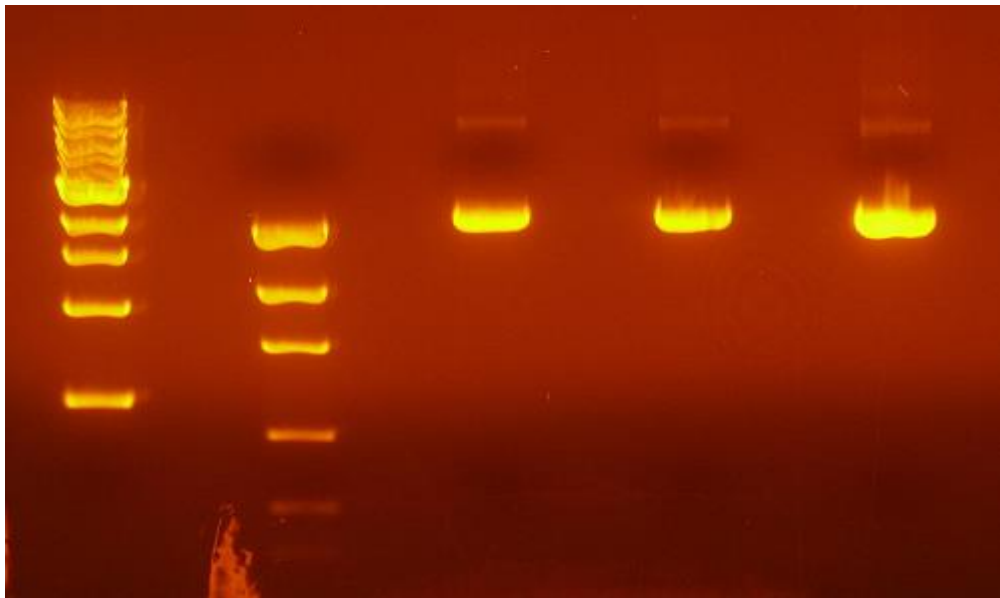
Se picaron colonias en Promega mediante el

LB-cloranfenicol y se hizo Miniprep por kit siguiente protocolo:

- Centrifugar de 1 a 10ml de cultivo a máxima potencia durante 5 minutos
- Descartar sobrenadante. Resuspender el pellet con 250ml de la solución de Resuspención.
- Agregar 250 de Solución de Lisis. Mezclar con cuidado.
- Agregar 10µl de solución alcalina de Proteasa. Invertir 4 veces
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos
- Agregar 350µl de Solución de Neutralización. Invertir 4 veces.
- Centrifugar a máxima velocidad a temperatura ambiente por 10 minutos
- Unir la columna al tubo colector
- Colocar el lisado en la columna (sobrenadante)
- Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente
- Descartar lo que queda en el tubo colector
- Agregar 750µl de Solución Wash (con etanol añadido)
- Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto
- Descartar lo que queda en el tubo colector
- Agregar otros 250µl de Solución Wash
- Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos
- Transferir la columna a un eppendorf estéril de 1,5ml
- Agregar 40µl de agua sin nucleasa a la columna
- Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente
- Descartar la columna y guardar el DNA a 20°C o menos

Se corrió en gel de agarosa 1X a 120V durante 40 minutos. El orden de corrida fue:

- 1kb
- Low mass
- Miniprep
- Miniprep
- Miniprep
-



Como

dio bien, se realizó una digestión ON a

37°C de la siguiente forma:

Vector: BBa_K911003 – Riboswitch (se corta con: SpeI y PstI)

Inserto: BBa_K516030 – mRFP (Se corta con: XbaI y PstI)

	Inserto	Vector 1	Vector 2
Agua Roux	16.1µl	21.1µl	16.1µl
DNA	10µl	5µl	10µl

Buffer 2	3µl	3µl	3µl
BSA	0.3µl	0.3µl	0.3µl
Enzima	0.3µl	0.3µl	0.3µl
Enzima	0.3µl	0.3µl	0.3µl

Inserto: Dos bandas - 2070 pb y 864 pb

Vector: Una banda de 2229 pb

Las bandas que se cortaron son:

- **864pb**
- Las dos bandas de **2229pb**

Las bandas cortadas, se purificaron mediante kit Invitrogen y luego se realizó una ligación mediante el siguiente protocolo:

Inserto	10µl
Vector	5µl
Buffer	4µl
Ligasa	1µl
Total →	20µl

Se deja dos horas a temperatura ambiente y se transforma la ligación en *NovaBlue*.

- Crecieron solo 10 colonias. Se picaron todas y se incubaron en LB-cloranfenicol ON a 37°C en shaker. Algunas de los cultivos crecidos al otro día tenían color, otros no:



Se realizó **Miniprep casera** con el siguiente protocolo:

Centrifugar 3ml de cultivo a máxima velocidad por 5 minutos

Descartar el sobrenadante. Agregar 100µl de P1 y 5µl de RNAsa

Agregar 400µl de P2. Invertir 4 veces.

Agregar 150µl de P3. Invertir 4 veces. Incubar 15 minutos en frío.

Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C.

Pasar el sobrenadante a eppendorf nuevo.

Agregar 500µl de cloroformo-isoamílico. Vortex y Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a 4°C.

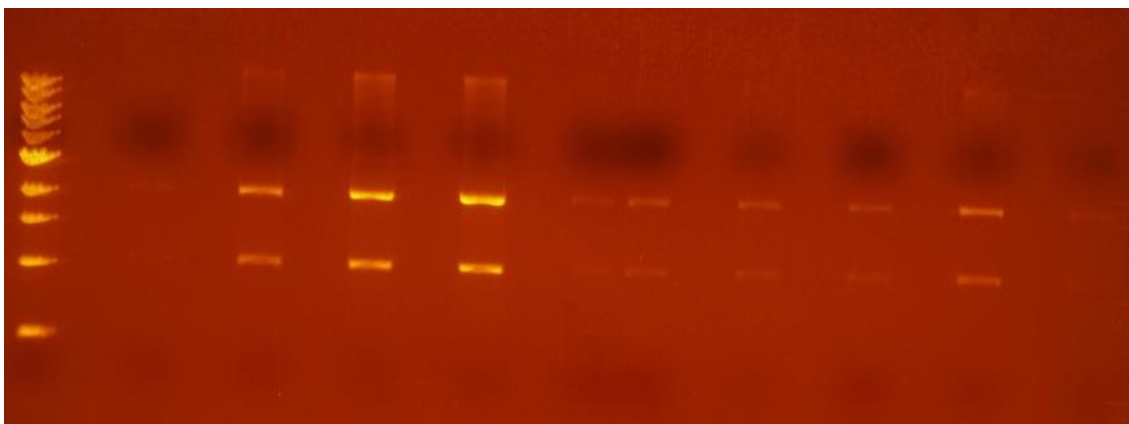
Pasar la fase acuosa (arriba) a eppendorf nuevo.

Agregar 700µl de isopropanol. Vortex y centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C.

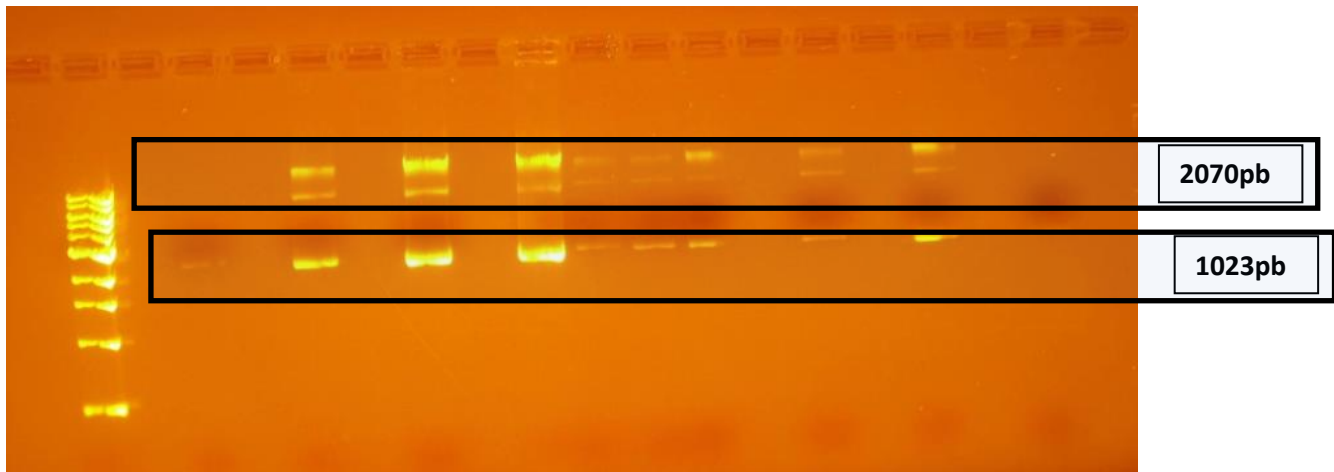
Agregar 500µl de EtOH al 70%. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad.

Secar el EtOH y resuspender en 40µl de agua Roux.

Se corre en gel de agarosa 1% a 120V en 45 minutos. El resultado fue el siguiente:

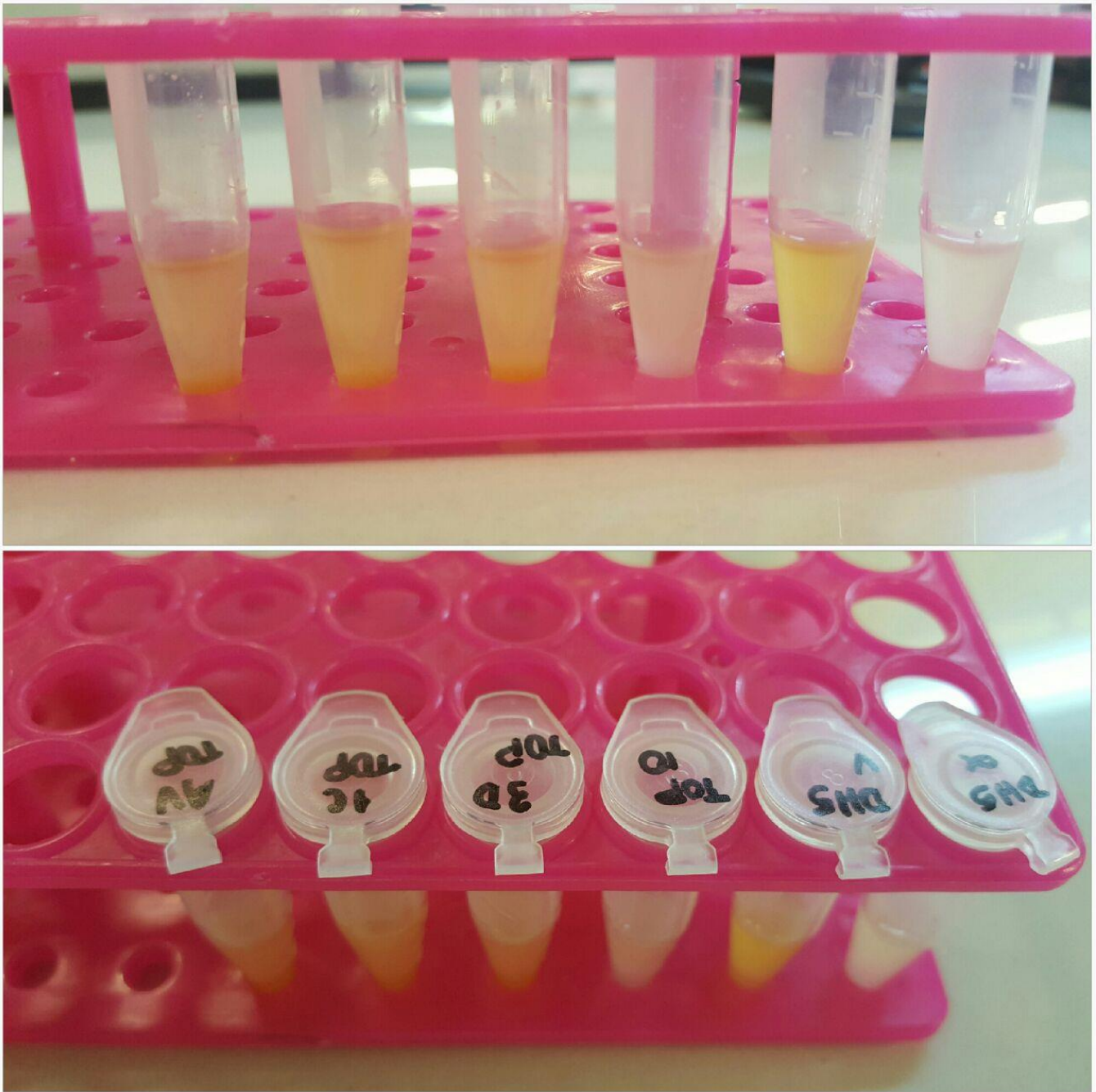


Luego se realizó un chequeo de los clones mediante digestión enzimática con XbaI y PstI:



Todos los clones picados de la colonia de transformación dieron positivos al dar una banda correspondiente al plásmido liberado (**2070pb**) y otra banda con el peso correspondiente de la unión del Riboswitch + mRFP ($159\text{pb} + 864\text{pb} = \mathbf{1023\text{pb}}$).

De manera similar se armo un biosensor en el cual se reemplazo el *amiCP* por el *lacZ*, obteniéndose resultados similares. Como se puede observar en la figura las bacterias que no portan la construcción no presentan actividad *lacZ* mientras que las bacterias que contienen el biosensor presentan actividad *lacZ* en ausencia del agregado de la sal de Fluor



En paralelo se crecieron las bacterias del biosensor inicial en medio TSA con el fin de evaluar si en otro medio se lograba una expresion cuantitativa. Nuevamente en condiciones basales se obtiene coloración azul. Los mismos resultados se obtuvieron en medio M9, agua peptonada y buffer PBS.

