



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNO-
LOGÍA Y MATERIALES

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLICÉTIDOS CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA A PARTIR DE BACTERIAS DEL GÉNERO STREPTOMYCES
PERTENECIENTES AL DESIERTO DE ATACAMA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E INGENIERO CIVIL QUÍMICO

CRISTIAN ANDRÉS MARDONES SALGADO

PROFESOR GUÍA:
BARBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE
ALVARO OLIVERA NAPPA

SANTIAGO DE CHILE

2020

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E INGENIERO CIVIL QUÍMICO
POR: CRISTIAN ANDRÉS MARDONES SALGADO
FECHA: 2020
PROF. GUÍA: BARBARA ANDREWS FARROW

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLICÉTIDOS CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA A PARTIR DE BACTERIAS DEL GÉNERO STREPTOMYCES
PERTENECIENTES AL DESIERTO DE ATACAMA

Las enfermedades en plantas representan un problema a escala global que afecta particularmente a la industria agrícola, en donde estudios indican una incidencia cercana al 50% en pérdidas en la producción de frutas y verduras en países en desarrollo. Dentro de ese porcentaje, al menos un tercio corresponde a pérdidas atribuidas a enfermedades de carácter fúngico. La utilización de agentes químicos para controlar estas enfermedades ha probado tener efectos nocivos para el medio ambiente ya que, debido a su alta toxicidad, actúan como contaminadores de suelos, cuerpos de agua, e incluso de la atmósfera debido a su alta vida media. En consecuencia, se introducen en las cadenas tróficas afectando la salud de un sinnúmero de seres vivos, incluidos los seres humanos.

Recientemente, se han reportado alzas en la aparición de cepas resistentes a fungicidas químicos, producto de su uso indiscriminado. El control de enfermedades fúngicas en plantas por medio de la utilización de otros microorganismos no-fitopatógenos nace como una alternativa promisoriosa al uso de fungicidas de carácter químico, de la mano del estudio de los “actinomicetos”, bacterias capaces de producir metabolitos con propiedades antibacteriales, antifúngicas, entre otras.

Desde el Desierto de Atacama, en Chile, se ha aislado la cepa M145 de *Streptomyces coelicolor*, capaz de producir Actinorodina, un antibiótico que podría ser la respuesta a la problemática planteada. Sin embargo, la expresión genética de este metabolito está supeditada a condiciones ambientales especiales, por lo que utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 se busca realizar una escisión del *cluster* genético responsable de la producción de Actinorodina, con el fin de insertarlo en un organismo blanco capaz de expresarlo en condiciones menos exigentes.

Para lograr el proceso antes mencionado, se han encapsulado células de *S. coelicolor* M145 en *plugs* de agarosa, los cuales fueron tratados para dejar intacto sólo su ADN. Comprobada la integridad del ADN genómico, se realizó una digestión con una enzima de restricción para comprobar la posibilidad de cortar el ADN. Posteriormente, se sintetizó sgRNA para la enzima Cas9, se validaron ambos reactivos por medio de cortes de fragmentos de tamaño 1[kb] y se realizaron digestiones con el objetivo de cortar el *cluster* de Actinorodina, para luego separar el fragmento a través de una electroforesis de campo pulsado (PFGE). Sin embargo, no fue posible observar el corte de forma clara, debido a la presencia de *smearing*. Las condiciones y tratamientos post-digestión con Cas9 necesitan estudios más exhaustivos.

Agradecimientos

Agradezco al Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales por todas las enseñanzas que me brindaron en esta etapa de mi vida. Al CeBiB, por permitirme realizar mis experimentos en sus dependencias. A Gina Madariaga, por tenerme paciencia. A Diego Lagos, por guiarme en este arduo proceso.

Agradezco a mis padres, Daniel y Ximena, y a mis hermanas, Cherie y Daniela, por quererme, aconsejarme y apoyarme. Por hacerme sentir que soy capaz, sobre todo en los momentos donde más lo dudé.

También le doy gracias a mis grandes amigos: Mariana, Constanza, Pedro, Pablo, Ann, Tania, Christofer y Camila, por estar siempre ahí cuando los necesité. A Bcrystals, por aceptarme y ayudarme a explorar mis horizontes artísticos, y por su incondicional amistad.

Y por último, agradezco a Sebastián, por ser simplemente el mejor. Por aguantarme, quererme y apoyarme incluso en los momentos más difíciles.

Sin ustedes, no podría haber logrado esto. De verdad, se los agradezco de corazón.

Tabla de Contenido

Introducción	1
Antecedentes	1
<i>Streptomyces</i> como agente de control biológico	2
Concepto de policétido y “PKS”	2
Expresión heteróloga	3
CRISPR-Cas9	3
Objetivos	3
Materiales y métodos	4
Materiales	4
Metodología	4
Preparación de <i>plugs</i> de agarosa	4
Digestión con enzima de restricción	6
Digestión CRISPR-Cas9	6
Resultados	7
Integridad del ADN Genómico	7
Digestión enzimática con EcoRI	8
Síntesis de Oligos y sgRNA	9
Validación de Cas9: Digestión de 1kb	10
Digestión de ADN genómico con CRISPR-Cas9	11
Discusión	16
Conclusión	20
Bibliografía	21
Anexos	23
Anexo I: Preparación del medio de cultivo ISP2	23
Anexo II: Preparación de <i>buffers</i>	23
Anexo III: Preparación de soluciones	25
Anexo IV: Digestión CRISPR-Cas9	26
Anexo V: Síntesis de sgRNA	27

Índice de Tablas

1.	Detalle de volúmenes de reactivos para lavados post reacción con Cas9	13
2.	Detalle de volúmenes para reacción con Cas9 y lavados posteriores, para PFGE	14
3.	Proporción de reactivos para preparación de medio ISP2	23
4.	<i>Mix</i> base para digestión con Cas9	26
5.	<i>Mix</i> escalado para digestión de <i>plugs</i> con Cas9	26
6.	<i>Mix</i> final para pruebas de digestión de <i>plugs</i> con Cas9	26
7.	<i>Mix</i> de reacción para <i>Oligo joining</i>	27
8.	Secuencia de temperaturas para <i>Oligo joining</i>	27
9.	Mix de reacción para producción de sgRNA a partir de ADN templado (oligo) de hebra doble.	28

Índice de Ilustraciones

1.	Comprobación de la integridad del ADN en <i>plugs</i> de agarosa, mediante electroforesis	7
2.	Visualización de una digestión enzimática utilizando EcoRI en un gel de agarosa, mediante electroforesis	8
3.	Electroforesis de oligonucleótidos de doble hebra sintetizados para posterior síntesis de sgRNA	9
4.	Digestión de fragmentos de 1kb para validación de Cas9 y sgRNA	10
5.	Digestión de <i>plugs</i> de OD = 0.3 con Cas9, sin inactivación de RNAse A . . .	11
6.	Digestión de <i>plugs</i> de OD = 0.3 con Cas9, con lavado adicional usando <i>buffer</i> TE + 1% SDS	12
7.	Electroforesis común aplicada a controles negativos lavados con distintas soluciones	13
8.	PFGE aplicado a controles negativos lavados con distintas soluciones	14
9.	Integridad del ADN en <i>plugs</i> de OD = 8.0	18

Introducción

Antecedentes

En biología, el término “fitopatología” hace referencia al estudio, tanto de plagas como de enfermedades, que afectan a cultivos de plantas, frutas y verduras. En particular, este campo de estudio encuentra dos vertientes: la Entomología Vegetal, que se preocupa de las enfermedades causadas por insectos, y la Patología Vegetal, que hace referencia a enfermedades causadas por hongos y bacterias[1]. Esta última constituye la causa de pérdidas de hasta un 50 % en la industria agrícola [2], lo que ha motivado el uso constante de productos fitosanitarios con el objetivo de eliminar o prevenir estas enfermedades [3].

Existen diversas especies de hongos con características fitopatógenas. Entre los más importantes, desde una perspectiva científica y económica, se puede encontrar especímenes como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum spp.*, especies del género *Fusarium*, entre otros [4]. Las enfermedades producidas por estas especies de hongo suelen ser controladas mediante pesticidas químicos y de amplio espectro, los cuales pueden tener efectos nocivos a nivel medioambiental, además de causar efectos adversos en otros organismos. Se ha llegado a postular incluso que los pesticidas químicos podrían tener efectos graves en la salud de las personas, debido a la presencia de agentes cancerígenos en su composición. Por otro lado, se ha observado que algunos de estos microorganismos patógenos han adquirido resistencias a los distintos productos químicos que se utilizan actualmente, lo que sugiere una necesidad por desarrollar nuevos productos para controlar las enfermedades que producen, y al mismo tiempo, minimizar las pérdidas en el sector agrícola[5].

Sin embargo, el desarrollo de nuevos pesticidas químicos sólo conseguiría solucionar el problema de forma parcial, por cuanto sería necesario el desarrollo constante de nuevos productos para combatir las nuevas resistencias adquiridas por los microorganismos patógenos. De este modo, surge la idea del control biológico de estas enfermedades, en oposición al control químico en base a pesticidas. Se entiende por “control biológico” la inhibición del crecimiento, infección o reproducción de un organismo, con ayuda de un organismo distinto. Esto permitiría reducir los efectos mencionados con anterioridad: al tratarse de un sistema de control biológico, se podría mitigar en un alto porcentaje los efectos nocivos sobre el medio ambiente y otras especies, y al mismo tiempo se controlaría la aparición de resistencias al no utilizar compuestos químicos. Es por este motivo que, con miras al cuidado del ecosistema nativo, la utilización de sistemas de control biológico surge como una idea viable [5].

Streptomyces como agente de control biológico

Dentro de los microorganismos que se pueden utilizar para el control biológico de hongos fitopatógenos se encuentran las bacterias del grupo de los “actinomicetos”, particularmente aquellas pertenecientes al género *Streptomyces* [6]. En diversos estudios, se ha analizado la capacidad de este género bacteriano para inhibir el crecimiento de una amplia variedad de hongos fitopatógenos, lo cual los postula actualmente como un prometedor agente de control biológico [7]. Actualmente, se estima que su incidencia en la producción de antibióticos para uso agrícola asciende a cerca de un 60 % [8].

La habilidad de las bacterias del género *Streptomyces* para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos radica en su capacidad para producir ciertos metabolitos extracelulares, los cuales han sido ampliamente estudiados debido a sus propiedades antifúngicas, antibióticas, entre otras. Estos metabolitos corresponden a productos del metabolismo secundario de estos microorganismos, es decir, que no son esenciales en su crecimiento, sino que son producidos bajo condiciones especiales, particularmente de estrés. Cada metabolito de carácter secundario suele ser característico de un género, especie o cepa, y cuenta con vías metabólicas especializadas para su formación, de modo que su producción no suele ser producto del azar. Muchas veces, estos metabolitos presentan algún tipo de actividad de interés biológico, lo cual los convierte en objetos de estudio para un sinnúmero de trabajos de investigación, particularmente en las áreas farmacéutica y agrícola. En el caso del género *Streptomyces*, los metabolitos secundarios de importancia para este estudio son conocidos bajo el nombre de “policétidos”, el que corresponde a su vez a una de varias clasificaciones posibles para metabolitos secundarios en un organismo [9].

Concepto de policétido y “PKS”

Ahora bien, ¿Qué es un “policétido” exactamente? Los policétidos corresponden a cadenas poli- β -ceto, sintetizadas por complejos de enzimas llamadas “policétido sintasas”, también conocidas como “PKS”. La vía de expresión de estos policétidos está relacionada con *clusters* genéticos (de aproximadamente 30[kb] [10]) especializados en la codificación de PKS. Con el estudio de estas vías metabólicas se ha demostrado su capacidad antibiótica, anticancerígena, antiparasitaria e incluso inmunosupresora, lo cual convierte a estos metabolitos en grandes candidatos para la producción de nuevos fármacos y tratamientos médicos[11].

Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, los policétidos en bacterias del género *Streptomyces* son producidos bajo condiciones de estrés, particularmente difíciles de observar bajo condiciones de laboratorio. Esto sucede debido a que los *clusters* que codifican para policétido sintasas (PKS) son de carácter “críptico”, es decir, que se expresan bajo estímulos ecológicos especiales, muy difíciles de replicar [12]. Sin embargo, con técnicas de minado de genes (*genome mining*) es posible predecir cuáles genes en específico, en un determinado rango de pares de bases, son los encargados de sintetizar un metabolito en particular. La utilidad del minado de genomas para el caso de *clusters* crípticos es que facilitaría el uso de técnicas de escisión genética, con el objetivo de lograr la expresión del *cluster* de forma heteróloga.

Expresión heteróloga

Se entiende por “expresión heteróloga” a la expresión de un gen (o parte de un gen) en un organismo huésped distinto al original. La inserción del gen suele hacerse mediante técnicas recombinantes de edición genética, y para la selección del huésped de expresión (en adelante, el “*host*” de expresión) se debe considerar la utilización de organismos con genomas conocidos tal que la expresión del gen esté supeditada a una vía metabólica específica y que se pueda estudiar *a posteriori*.

Es importante notar que, para poder expresar el gen en el huésped seleccionado, es necesario utilizar técnicas de clonación de secuencias de ADN. La opción más utilizada, y la más común, corresponde a realizar un PCR tradicional. El uso de otro tipo de técnicas de clonación como la digestión con enzimas de restricción, o el método TAR, han sido postulados como posibilidades, pero la opción de utilizar la técnica de PCR sigue prevaleciendo como método de clonación genética [13]. Al mismo tiempo, la aplicación de endonucleasas para la edición genética, particularmente la técnica de Crispr-CAS9, ha permitido desarrollar tecnologías efectivas y de bajo costo para encontrar, editar, modificar y regular locaciones genéticas en un amplio espectro de organismos [14].

Objetivos

Objetivo general

- Estudiar la factibilidad de expresar un *cluster* críptico de forma heteróloga utilizando la tecnología CRISPR-Cas9.

Objetivos específicos

- Encapsular el ADN genómico de *S. coelicolor* M145 en *plugs* de agarosa.
- Sintetizar sgRNA específicos para los sitios de corte del *cluster* de Actinorodina con la enzima Cas9.
- Realizar una escisión del *cluster* de Actinorodina utilizando CRISPR-Cas9 para su expresión heteróloga.

Materiales y métodos

Materiales

- Pre-inóculo de *Streptomyces coelicolor* M145, conservado en glicerol a -80°C
- Campana de flujo laminar
- Medio de cultivo ISP2 líquido (Ver Anexo I: Preparación del medio de cultivo ISP2)
- Perlas de vidrio
- Centrífuga
- Incubadora
- Jeringas de 1[ml]
- Buffer TE (Ver Anexo II: Preparación de *buffers*)
- Buffer TE25-S (Ver Anexo II: Preparación de *buffers*)
- Buffer NDS (Ver Anexo II: Preparación de *buffers*)
- Espectrofotómetro
- Termo-*shaker*
- Agitador magnético
- Baño termostático
- Agarosa de bajo punto de fusión (*Low melting point*)
- Agarosa común
- Solución de Lisozima (Ver Anexo III: Preparación de soluciones)
- Solución de Proteinasa K (Ver Anexo III: Preparación de soluciones)
- Solución de PMSF 100[mM] (Ver Anexo III: Preparación de soluciones)
- Cámara y fuente de electroforesis.
- *Ladder* 1kb
- *Ladder* de alto rango (*High Range DNA Ladder*)

Metodología

Preparación de *plugs* de agarosa

1. Preparar medio de cultivo ISP2 (ver Anexo I: Preparación del medio de cultivo ISP2) y autoclavar 25 [ml] en un matraz de 250 [ml] con aproximadamente 10 perlas de vidrio. Se recomienda autoclavar más medio de cultivo, en caso de ser necesario.
2. Inocular el medio de cultivo con *S. coelicolor* desde el pre-inóculo, bajo una campana de flujo laminar.
3. Cultivar en una incubadora, a 30°C y 200 RPM, entre 12 y 24 horas. El cultivo debe verse opaco y uniforme, idealmente sin material particulado visible.
4. Traspasar el cultivo desde un matraz a un tubo falcón de 50 [ml], y centrifugar a 1000g.

5. Retirar el sobrenadante y resuspender en buffer TE25-S.
6. Centrifugar nuevamente a 1000g, retirar el sobrenadante y resuspender en buffer TE25-S.
7. Ajustar densidad óptica a 600[nm] hasta alcanzar un valor máximo de 2.0.
8. Mezclar el cultivo con agarosa L.M.P. al 2% en partes iguales, y extraer en jeringas de 1[ml].
9. Esperar que la agarosa cuaje, y luego retirar el émbolo y el cultivo solidificado por la misma abertura del émbolo.
10. Cortar el cilindro de agar en cilindros de 2[mm] de ancho (en adelante, los *plugs*), aproximadamente.
11. Preparar una solución de Lisozima en concentración 2 [mg/ml] en *buffer* TE25-S (Ver Anexo III: Preparación de soluciones). Depositar los *plugs* en ella e incubar por 2 horas a 37°C.
12. Preparar una solución de Proteinasa K en concentración 1 [mg/ml] en *buffer* NDS (Ver Anexo III: Preparación de soluciones). Preincubar por al menos 30 minutos a 50°C. Depositar los *plugs* en esta solución e incubar a 50°C en baño termorregulado por entre 12 y 24 horas, hasta que los *plugs* se vuelvan transparentes.
13. Retirar la solución de Proteinasa K y realizar cuatro lavados con *buffer* TE de 1 hora cada uno. El primer lavado debe llevar solución de PMSF a concentración 0.1 [mM]. **Importante: los lavados deben ser muy suaves. Se recomienda evitar usar equipos que muevan constantemente el medio.**
14. Comprobar la integridad del ADN realizando una electroforesis común, utilizando un gel al 1% de agarosa, 60[V] y *ladder* 1kb.
15. Realizar un ensayo con una enzima de restricción cualquiera sin olvidar preparar un control negativo, para comprobar que el ADN se puede cortar con una enzima cualquiera.
16. Realizar una electroforesis a 3 [V/cm] en un gel de 0.4% de agarosa, utilizando el *ladder High Range*, entre 2 y 3 horas.
17. Si en el paso anterior se muestran bandas (o al menos se aprecia un control negativo intacto y una digestión diferente a dicho control), continuar al paso siguiente. Si no, realizar una nueva digestión o volver a comenzar desde cero. **Importante: Resultados negativos pueden surgir por problemas en el tratamiento con proteinasa K, o la inactivación de la misma con PMSF. Revisar ambos escenarios antes de volver a comenzar desde cero.**
18. Guardar en buffer TE por hasta un mes. Si es necesario guardarlos por más tiempo, se recomienda guardarlos en una solución de EDTA 0.5M.

Digestión con enzima de restricción

Para realizar una digestión con enzimas de restricción se realizó la siguiente sucesión de pasos:

1. **Importante:** Mantener el *stock* de la enzima de restricción, su *buffer* de reacción, y una solución de BSA en frío utilizando una bandeja con hielo.
2. Utilizando tubos Eppendorf de 2 [ml] estériles, se preparan 0.2 [ml] de *buffer* de enzima de restricción a concentración 1x. Si el *stock* se encuentra a una concentración mayor, se debe diluir en agua estéril (**Importante:** No utilizar agua destilada en este paso, ya que al no ser estéril puede presentar proteasas que interferirían con la digestión.)
3. Depositar un *plug* en cada tubo e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Retirar la solución y reemplazar por la siguiente composición:
 - Para el tubo Eppendorf donde se realizará la digestión, añadir 0.2 [ml] de *buffer* de enzima de restricción a concentración 1x; 5 [μ l] de BSA concentrado a 10x, y 30 - 50 [U] de enzima de restricción.
 - Para el control negativo, aplicar todo lo anterior excepto la enzima de restricción.De esta forma el *plug* de control tendrá las mismas condiciones, excepto por la enzima de restricción seleccionada.
5. Incubar a 37°C por al menos 6 horas. **Importante:** Tener especial precaución con enzimas que puedan presentar actividad estrella (*Star activity*)

Si se desea realizar este ensayo utilizando más *plugs* de agarosa, solo se debe aumentar los volúmenes de reacción de forma proporcional, procurando que los *plugs* permanezcan sumergidos en la solución durante la etapa de incubación a 37°C.

Digestión CRISPR-Cas9

1. Mezclar los reactivos (excepto DNA) como se muestra en la tabla 6 según el caso que corresponda (ver Anexo IV: Digestión CRISPR-Cas9).
2. Incubar la reacción a 25°C por 10 minutos.
3. Añadir un *plug* por tubo.
4. Incubar a 37°C por 3 horas (El tiempo se puede variar de ser necesario).
5. Si es que corresponde, añadir RNase.
6. Incubar a 50°C por 30 minutos.
7. Descartar la reacción y lavar el *plug*
8. Realizar una electroforesis de campo pulsado, en gel de 2% en *buffer* TBE, por 16 horas a 3[V/cm] (tomar la distancia entre los electrodos).

Resultados

Integridad del ADN Genómico

Tras el cultivo de *S. coelicolor* M145 en medio de cultivo ISP2 y la preparación de *plugs* de agarosa, se debió procesar dichos *plugs* utilizando Lisozima, Proteinasa K, y realizando lavados con PMSF y buffer TE. Este proceso se hace con el objetivo de lisar las células bacterianas y mantener sólo el ADN Genómico dentro del *plug* de agarosa.

Posterior a ello, se puede realizar una digestión enzimática (con enzimas de restricción o CRISPR-Cas9), sin embargo, es necesario comprobar que el ADN dentro de los *plugs* se mantiene íntegro, es decir, que no se ha fragmentado producto de estrés térmico o mecánico. Para ello, se realiza una electroforesis común a 60[V] en buffer TAE, utilizando un *ladder* 1kb, por 1 hora. El resultado de ello se muestra en la Figura 1.

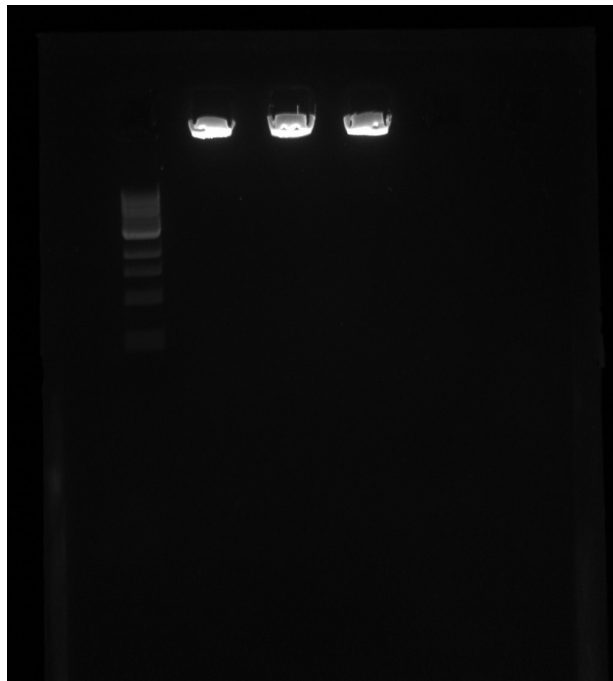


Figura 1: Electroforesis común aplicada a distintos *plugs* de agarosa, con OD = 0.3. El primer carril muestra un *ladder* de 1 kb, mientras que los tres siguientes carriles muestran tres *plugs* procesados con Lisozima, Proteinasa K, y lavados con PMSF y buffer TE.

Como se puede apreciar en la Figura 1, el ADN genómico se mantiene en el carril a medida que el *ladder* avanza por el gel, lo cual indica que el ADN se mantiene íntegro y, por lo tanto, es posible utilizarlo en una digestión enzimática. La razón por la cual se han procesado tres *plugs* en la imagen es para asegurar que la integridad se mantiene en todos los *plugs* de la colección, a través de un triplicado del experimento.

Digestión enzimática con EcoRI

Posterior a la comprobación de la integridad del ADN dentro de los *plugs* de agarosa, se hizo una prueba utilizando enzimas de restricción, con el fin de comprobar que el ADN puede ser fragmentado a través de una digestión. El resultado se muestra en la figura 2.

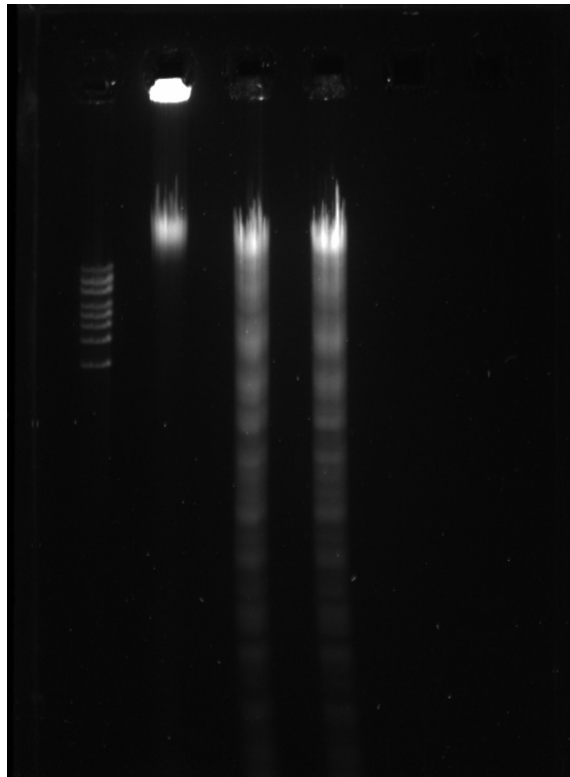


Figura 2: Electroforesis común aplicada a *plugs* (OD = 0.3) digeridos con la enzima de restricción EcoRI. El primer carril muestra un *ladder* High Range, el segundo carril contiene un *plug* de control, y los siguientes dos carriles muestran *plugs* digeridos con EcoRI. Los parámetros de electroforesis fueron: matriz de agarosa al 0.4 %, 42[V], 12 horas.

Como se puede apreciar, el ADN se fragmenta en los últimos dos *plugs*, mientras que en el primero el ADN se mantiene en gran parte dentro del carril, lo cual sugiere que la digestión enzimática se ha llevado con éxito. Por otro lado, se puede apreciar la presencia de una banda de alto peso molecular en los tres *plugs*, lo que provoca la aparición de "barridos" también conocidos como *smearing* en la imagen. La presencia de esta "banda" puede deberse a una alta cantidad de material genético en el carril, lo cual puede corregirse mediante una electroforesis de campo pulsado (PFGE) para una mejor visualización.

Síntesis de Oligos y sgRNA

Antes de realizar una digestión con CRISPR-Cas9 es necesario sintetizar los sgRNA que la enzima Cas9 utilizará para llegar al sitio de corte deseado. Para ello, primero hay que sintetizar oligonucleótidos de hebra doble (en adelante, los “Oligo”) a partir de un *scaffold* y protoespaciadores. Dado que se necesitan dos sgRNA, se necesitan sintetizar dos Oligo (ver Anexo V: Síntesis de sgRNA para consultar el protocolo).

Una vez sintetizados los Oligo, se verifica su tamaño a través de una electroforesis común. El resultado se muestra a continuación:

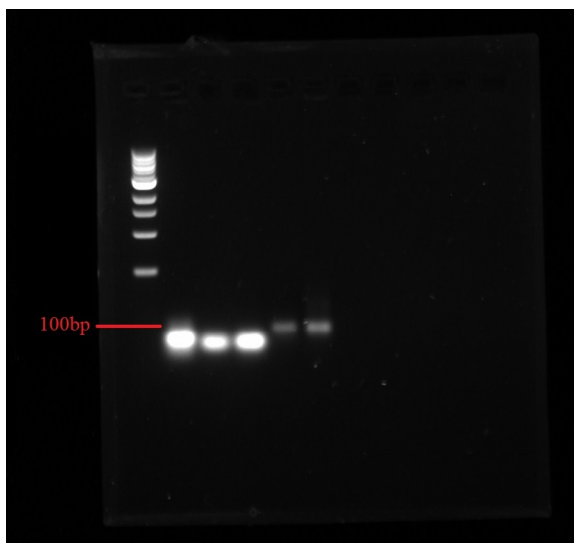


Figura 3: Electroforesis común para verificar el tamaño de los Oligo-ds sintetizados. El primer carril muestra un *ladder* 1kb, el segundo carril muestra el *scaffold*, el tercer y cuarto carril muestran los protoespaciadores 3.2 y 5.3 respectivamente, y los carriles 5 y 6 muestran los Oligos 3.2 y 5.3, respectivamente.

Los oligo se muestran sobre la banda de 100[bp], lo cual coincide con su tamaño esperado de 120[bp], mientras que el *scaffold* y los protoespaciadores tienen un tamaño aproximado de 80[bp]. La razón para colocar el *scaffold* y los protoespaciadores es para comprobar que los oligonucleótidos sintetizados son de tamaño mayor.

A partir de los Oligo sintetizados, se procede a sintetizar los sgRNA (ver Anexo V: Síntesis de sgRNA para consultar el protocolo). Su validación se registra en la siguiente sección.

Validación de sgRNA y Cas9: Digestión de 1kb

Para comprobar que la enzima Cas9 y los sgRNA son viables para el experimento se realiza una digestión de fragmentos de tamaño 1[kb] (en adelante, los “1kb”), correspondientes a fragmentos del ADN genómico que contienen el sitio de corte esperado. Para ello, se digiere un “1kb” para cada sgRNA, en específico, se llamará 1kb3’ al fragmento cortado por sgRNA 3.2, y 1kb5’ al fragmento cortado por sgRNA 5.3. El resultado se muestra a continuación:

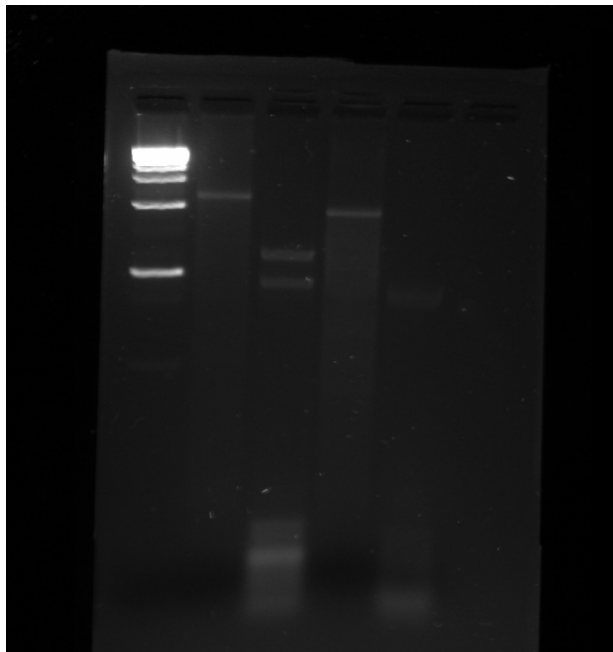


Figura 4: Electroforesis común aplicada a fragmentos de 1[kb] digeridos con la enzima Cas9 y su correspondiente sgRNA. El primer carril muestra un *ladder* 1kb, el segundo carril corresponde a un control de 1kb3’, el tercero a una digestión de 1kb3’, el cuarto a un control de 1kb5’ y el quinto a su respectiva digestión. Los parámetros de electroforesis fueron: matriz de agarosa al 1 %, 60[V], 1 hora.

En la figura 4 se puede observar cómo en los carriles 2 y 4 los controles negativos se mantienen en buen estado. El tamaño del fragmento 1kb3’ es de 1124[bp], y se observa sobre la banda de 1[kb], mientras que el fragmento 1kb5’ tiene un tamaño de 940[bp] y se observa ligeramente debajo de la banda de 1[kb].

En cuanto a las digestiones, el corte del fragmento 1kb3’ genera dos fragmentos, uno de 627[bp] y otro de 497[bp], de modo que sumando los tamaños se obtiene el tamaño del fragmento original. Para 1kb5’ es similar aunque más difícil de visualizar, porque lo que parece una sola banda cerca de la marca de 500[bp] corresponde a los dos fragmentos generados: uno de 482[bp] y uno de 458[bp]. De este modo, se logra validar la enzima Cas9 y ambos sgRNA para la digestión de los *plugs* de ADN.

Digestión de ADN genómico con CRISPR-Cas9

Tras la validación de la enzima Cas9 y de ambos sgRNA, se procede a realizar ensayos con los *plugs* de con ADN genómico. Debido a que se utilizan dos sgRNA, se debe estudiar la proporción adecuada entre estos y la cantidad de enzima Cas9 presente, por lo que se presentan dos escenarios (ver Anexo IV: Digestión CRISPR-Cas9 para consultar el protocolo).

Usualmente, la adición de RNase A es necesaria cuando se trata con muestras líquidas. Sin embargo, el protocolo estándar sugiere inactivarla a 55°C, lo cual puede comprometer la integridad de los *plugs* al estar hechos de agarosa *low melting point*, cuyo punto de fusión es a 50°C. Se decide añadir la RNase A sin inactivarla. El resultado obtenido se muestra a continuación:

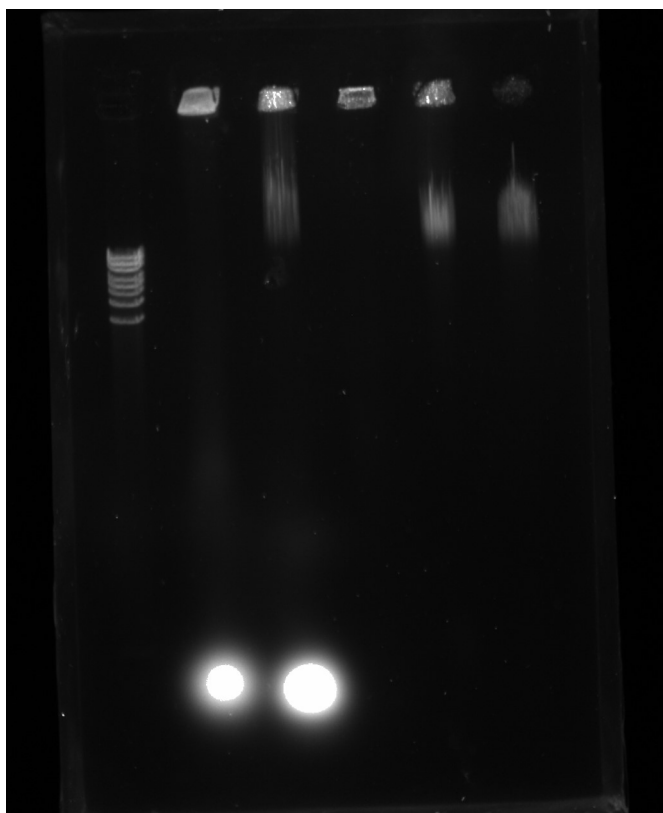


Figura 5: Electroforesis común aplicada a *plugs* digeridos con la enzima Cas9 y ambos sgRNA. El primer carril muestra un *ladder High Range*, el segundo carril corresponde a una digestión con el doble de volumen de Cas9 (2x Cas9), el tercero a una digestión con la mitad de volumen de sgRNA (1/2 sgRNA), el cuarto a un control negativo, el quinto a un control usando sólo agua, y el sexto carril a una digestión usando EcoRI. Los parámetros de electroforesis fueron: matriz de agarosa al 0.4 %, 42[V], 6 horas.

En la figura 5 se puede observar que en ninguna de las dos digestiones realizadas (2x Cas9 y 1/2 sgRNA) se observa la banda correspondiente al *cluster* de Actinorodina, el cual es de aproximadamente 17[kb]. Sin embargo, el control negativo resulta exitoso al exhibir el ADN sin *smearing* e íntegro en su carril. El control sólo con agua resulta confuso, por cuanto se observa la misma banda de alto peso que se aprecia en la figura 2. Esto es igual

para el control con enzima de restricción, que exhibe el mismo comportamiento que se ve en la figura 2. Adicionalmente, en ambas digestiones se observa una banda de bajo peso y muy alta concentración, correspondiente a los sgRNA.

Se sospecha que la causa de esto tenga que ver con el uso de SDS, ya que en productos de digestión con Cas9 en ADN líquido se utiliza un buffer de carga con SDS para que la enzima Cas9 “suelte” al ADN. Debido a esto, se realiza una nueva digestión, esta vez realizando un lavado con *buffer* TE + 1% SDS previo a la electroforesis.

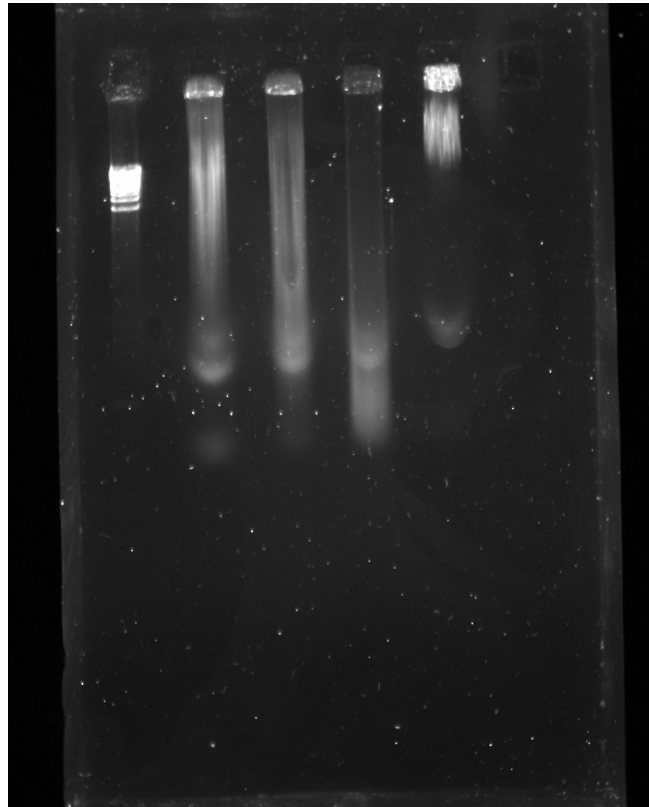


Figura 6: Electroforesis común aplicada a *plugs* digeridos con la enzima Cas9 y ambos sgRNA. El primer carril muestra un *ladder High Range*, el segundo carril corresponde a una digestión con el doble de volumen de Cas9 (2x Cas9), el tercero a una digestión con la mitad de volumen de sgRNA (1/2 sgRNA), el cuarto a un control negativo, el quinto a un control usando sólo agua. Se omite la digestión con EcoRI, ya que se obtuvo el resultado esperado en la figura 5. Los parámetros de electroforesis fueron: matriz de agarosa al 0.4%, 42[V], 3 horas.

Tras la adición del lavado con *buffer* TE + 1% SDS, se observa *smearing* en todos los *plugs*, excepto para el control con sólo agua. El control negativo también se ve afectado por este *smearing*, lo que implica que se trata de un problema global y no sólo de las digestiones realizadas. Esto sugiere que este lavado no es suficiente, y que es necesario recurrir a nuevos tratamientos.

Para ello, se propone tratar controles negativos con distintos tipos de lavados. Un estudio del 'Korea Advanced Institute of Science and Technology' sugiere realizar tratamientos con Proteinasa K, Cloruro de Calcio (CaCl_2) y SDS [15]. Adicionalmente, se propone estudiar la real importancia de añadir RNase A a la solución. De este forma, se propone un estudio de

controles negativos tomando en consideración los siguientes volúmenes de reacción:

	Reactivo	Volumen [μ l]		
		Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3
Reacción	H ₂ O	120	160	160
	Buffer 3.1 (10x)	20	20	20
	Cas9 (1 [mg/ml])	20	20	20
	RNAse A (0.2 [mg/ml])	40	-	-
	ADN	<i>plug</i>	<i>plug</i>	<i>plug</i>
Lavado	Prot. K (21.4 [mg/ml])	14	14	-
	CaCl ₂ (100mM)	30	30	-
	SDS (10 %)	30	30	30
	H ₂ O	26	26	70

Tabla 1: Detalle de volúmenes de reactivos para lavados post reacción con Cas9

Es importante notar que en la tabla 1 se hace una distinción entre la etapa de reacción y la etapa de lavado. La etapa de reacción se realiza de igual forma que las reacciones Cas9 mostradas con anterioridad, mientras que la etapa de lavado es un paso posterior a la reacción con Cas9. No se deben mezclar los componentes de lavado antes de terminar la reacción de Cas9, incluso cuando se trata de controles negativos.

Tras realizar los lavados correspondientes, se observa el resultado en una electroforesis común.

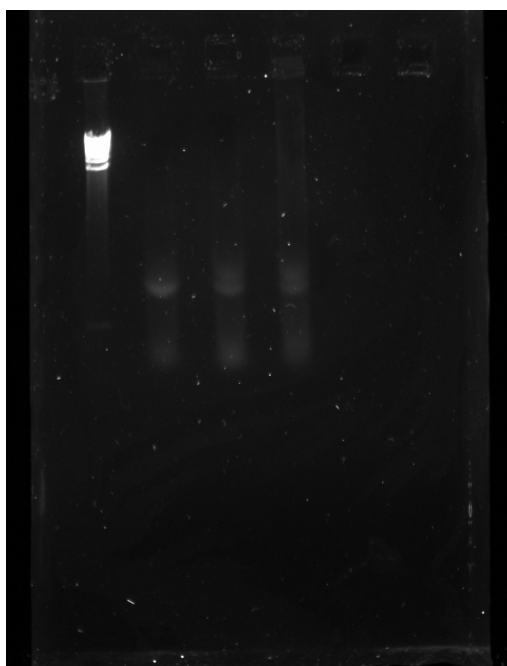


Figura 7: Electroforesis común aplicada a *plugs* utilizados como control negativo. El primer carril muestra un *ladder High Range*, y los siguientes carriles muestran los lavados y reacciones en el mismo orden que se muestran en la tabla 1. Los parámetros de electroforesis fueron: matriz de agarosa al 0.4 %, 42[V], 2 horas.

El resultado sugiere que el ADN ha migrado desde los *plugs* hacia el exterior, por lo que no es posible establecer una diferencia entre los lavados realizados. Se presume que el problema puede residir en la cantidad de material genético dentro de ellos, por lo que se sugiere crear nuevos *plugs* con una mayor densidad óptica.

Al mismo tiempo, se propone que la calidad de la imagen puede tener relación con el uso de una electroforesis común, en vez de una de campo pulsado como sugieren varios estudios, entre ellos el tomado como inspiración para los lavados presentados en la figura 7. De este modo, se realiza una nueva digestión, tomando el siguiente mix de reactivos y lavados:

	Reactivo	Volumen			
		Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3	Control agua
Reacción	H2O	120	160	160	200
	Buffer 3.1	20	20	20	-
	Cas9	20	20	20	-
	ADN	1/2 Plug	1/2 Plug	1/2 Plug	1/2 Plug
	RNAse A	40	-	-	-
Lavado	SDS 1%	30	30	30	-
	Prot. K	14	14	-	-
	CaCl2	30	30	-	-
	H2O	26	26	70	100

Tabla 2: Detalle de volúmenes para reacción con Cas9 y lavados posteriores, para PFGE

Esta vez, se añade un control negativo con sólo agua, tal como en los primeros casos estudiados. El resultado se observa en la figura 8.

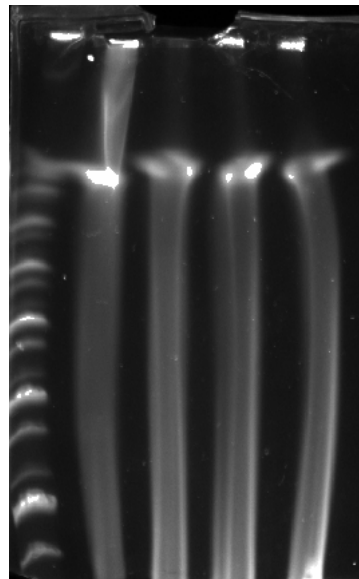


Figura 8: Electroforesis de campo pulsado aplicada a *plugs* utilizados como control negativo. El primer carril muestra un *ladder High Range*, el segundo carril muestra el control de sólo agua, y los siguientes carriles muestran el lavado 3, el lavado 2 y el lavado 1 respectivamente (Ver la tabla 2). Los parámetros de electroforesis fueron: matriz de agarosa al 2%, 30[V], 16 horas.

El resultado, si bien ya no muestra una desaparición del ADN, muestra un resultado similar al de la figura 6 al exhibir *smearing* en todos los casos estudiados. Esto sugiere que es necesario estudiar más a fondo las condiciones posteriores a la digestión con CRISPR-Cas9, para poder observar el corte esperado.

Discusión

La preparación de los *plugs* de agarosa para su posterior tratamiento es un paso que requiere gran rigurosidad y cuidado, ya que el ADN genómico contenido dentro de ellos es particularmente susceptible a perturbaciones de carácter mecánico y variaciones de temperatura. Es por este motivo que en muchos pasos, como por ejemplo, el tratamiento con Proteinasa K, es recomendable evitar la agitación de los *plugs*, ya que el movimiento excesivo puede provocar la fragmentación del ADN dentro de ellos. Debido a esto, es importante además realizar una comprobación de la integridad del ADN genómico previo al tratamiento con enzimas de restricción, a través de una electroforesis común (o PFGE, si se prefiere). La elección del *ladder* para estos efectos no es importante, ya que solo sirve para comprobar que el estado del gel, de los *plugs* y las condiciones de la electroforesis son correctas. En estricto rigor, cualquier *ladder* se podría ocupar en este caso, cuidando que las condiciones de voltaje y porcentaje de agarosa sean las ideales para la correcta separación de las bandas de tal *ladder*.

No obstante, una vez comprobada la integridad de los *plugs* de ADN, no es recomendable realizar el tratamiento con CRISPR-Cas9 de forma inmediata. Es preciso realizar un ensayo previo con enzimas de restricción, para asegurar que la digestión enzimática es posible. Visto de otro modo, si una digestión con una enzima de restricción cualquiera funciona, entonces una digestión con CRISPR-Cas9 debiese funcionar. Por ello, en este estudio se realiza previamente una digestión con EcoRI (ver figura 2). La elección de la enzima de restricción tampoco es muy importante, ya que solo se utiliza con fines de comprobación, aunque es preferible escoger enzimas que produzcan pocos fragmentos y de tamaños diferenciables a modo de distinguir el tamaño de las bandas producidas en caso de ser necesario. En este caso, además de EcoRI era posible utilizar enzimas como HindIII y XbaI, que cumplen con lo anteriormente mencionado. La elección del *ladder* en este caso no se hizo de forma arbitraria: se eligió el *ladder* de alto peso molecular *Gene Ruler High Range*, ya que el ADN genómico de *S. coelicolor* M145 es particularmente grande. De este modo, es usual encontrar la presencia de grandes fragmentos en una digestión simple.

Es importante notar la presencia de una banda de alto peso molecular en la digestión enzimática con EcoRI (ver figura 2). Esta banda se encontró en variadas producciones de *plugs*, y su presencia puede deberse a degradación de parte del genoma, lo cual es posible en moléculas de gran tamaño como el ADN genómico de *S. coelicolor*, cuyo tamaño es de 8.6[Mbp]. Esto se puede corregir a través de una electroforesis de campo pulsado, ya que resuelve las bandas de mejor forma. En estricto rigor, la presencia de esta banda no debiese afectar un tratamiento enzimático al permanecer íntegra la mayor parte del ADN dentro del

canal. Si la degradación fuese mayor, sería recomendable preparar *plugs* nuevos.

La producción de sgRNA es un paso vital para el correcto funcionamiento de la enzima Cas9, al funcionar como guía para que la enzima llegue al sitio de corte. Su producción, sin embargo, está supeditada a la síntesis de oligonucleótidos que servirán, posteriormente, como ADN templado para reacción de síntesis de sgRNA. El proceso de síntesis de oligonucleótidos no permite asegurar que se obtendrá una concentración adecuada, ya que sólo al final del proceso es posible medirla. Adicionalmente, la síntesis de sgRNA también está supeditada a mediciones al final del proceso, por lo que esta etapa puede generar pérdidas de tiempo y atascos imprevistos. También, la producción de sgRNA encuentra una dificultad adicional al depender de una separación de fases. Por medio de un tratamiento con PCI (Solución Fenol - Cloroformo - Alcohol Isoamílico), una solución bifásica, se concentra el material genético en la fase superior. El no retirar completamente la fase superior de esta solución puede incidir en pérdidas de material genético o incluso en su no obtención. En un paso posterior, por medio de centrifugación, es posible ver un *pellet* de material genético. No ver este *pellet* no es una garantía de que no hay material en el tubo, pero se debe considerar la posibilidad en caso de que la concentración final sea muy baja.

Es necesario validar la enzima Cas9 y los sgRNA por medio de un ensayo simple. Por esa razón, se opta por digerir los fragmentos 1kb3' y 1kb5', que contienen los mismos sitios de corte que el ADN genómico de *S. coelicolor* (ver figura 4). Esta prueba es importante, por cuanto es necesario cerciorarse de que los sgRNA sintetizados se ensamblan correctamente con la enzima Cas9 y que la enzima se encuentra en buen estado, sin contaminación, y puede cortar el ADN blanco. Esta comprobación permite eliminar el estado de la enzima Cas9 y los sgRNA como posibles fuentes de error, lo que permite a su vez limitar las alternativas posibles para modificar los protocolos. De esta forma, la causa de que la digestión del ADN genómico dentro de los *plugs* no resultara no guarda relación con el estado de ambos reactivos.

En la figura 5 se puede observar que la digestión con Cas9 no funciona adecuadamente, puesto que es necesaria la acción de algún agente que permita separar la enzima Cas9 del ADN genómico. Cuando se trata de muestras líquidas se utiliza un buffer de carga con SDS, el cual de hecho es utilizado en la figura 4, al validar la enzima Cas9 y los sgRNA. De forma similar, se sugiere realizar un lavado adicional tras la digestión con Cas9 con *buffer* TE + 1 % SDS, a modo de emular la acción del SDS en el buffer de carga. Sin embargo, el resultado no resulta favorable por cuanto lo único que se obtiene es una alta cantidad de *smearing* en todos los carriles (ver figura 6). Al consultar protocolos de estudios similares, se llega a la conclusión de que es necesario realizar lavados post-digestión con otros reactivos, como Proteinasa K en solución, Cloruro de Calcio, y SDS en solución (es decir, sin buffer TE). Por este motivo, se decide realizar una digestión de controles negativos, como medida para ahorrar reactivos y para comprobar cuál o cuáles de los lavados favorecen la visualización de las bandas, minimizando el *smearing*. Sin embargo, el ADN parece haber difundido de los *plugs* hacia el *buffer* de electroforesis. La causa más probable guarda relación con la densidad óptica de bacterias utilizada para crear los *plugs*, la cual fue de 0.3.

La densidad óptica de bacterias utilizada para estos experimentos es menor que la recomendada en el libro "Practical Streptomyces Genetics", la cual es de entre 1.9 y 2.0 [16]. Este libro constituye la principal fuente de información para los experimentos realizados, por lo

que muchos de los reactivos utilizados encuentran su fuente en protocolos detallados allí. No obstante, la modificación de la densidad óptica se debe a la presencia de la banda de alto peso encontrada. En variados intentos, se comprobó que una mayor densidad óptica bacteriana influía en una mayor intensidad en esta banda de alto peso, por lo que para restringir su intensidad y limitar su aparición se decidió utilizar *plugs* con una OD cercana a 0.3, bastante menor a la sugerida, aún cuando el protocolo consultado indica que la densidad óptica puede quintuplicarse si se desea.

En este caso, la decisión de disminuir la densidad óptica pudo haber repercutido en la imagen obtenida, por cuanto una menor densidad óptica influye en una menor intensidad de bandas, y colocar esos *plugs* versus un *ladder* de alta intensidad o reactivos como sgRNA muy concentrados puede hacer que el ADN contenido dentro de ellos se vea aún menos intenso. No obstante, esto no explicaría la repentina “desaparición” del ADN observada en la figura 7. Se decide crear nuevos *plugs*, esta vez tomando la sugerencia del libro y aumentando la densidad óptica de 0.3 a 8.0.

El resultado de aumentar la densidad óptica permite visualizar mejor el ADN, tal como se aprecia en la figura 8. Sin embargo, ninguno de los lavados propuestos parece funcionar, ya que todos los tratamientos terminan en *smearing*, aún tratándose de controles negativos. La causa de esto puede deberse a la integridad de los *plugs*, la cual vista en una electroforesis común resulta en la siguiente imagen:

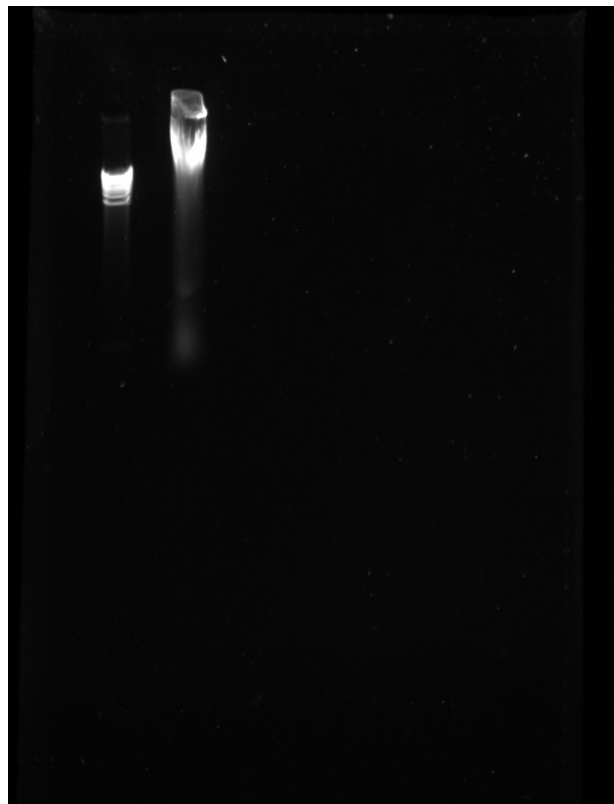


Figura 9: Ensayo de integridad del ADN genómico en *plugs* con $OD = 8.0$ a través de una electroforesis común. Los parámetros de electroforesis fueron: matriz de agarosa al 0.4%, 42V, 1.5 horas.

El resultado del mismo ensayo de integridad, realizado en una electroforesis de campo pulsado, muestra un *plug* totalmente íntegro como se observa en la figura 1. Por consiguiente, se decidió desconfiar de la validez de la electroforesis común para determinar la integridad de los *plugs* especialmente tratándose de densidades ópticas muy elevadas. Esto pudo haber constituido una fuente de error, ya que el ADN se ve fragmentado desde un inicio y, por lo tanto, puede ser la causa de que los lavados mostrados en la figura 2 no resultaran bien.

Por falta de tiempo, no se logró repetir el experimento para comprobar las causas del *smearing* en los ensayos realizados. Sin embargo, una cosa es evidente: es necesario estudiar con detención las proporciones entre los reactivos (especialmente entre Cas9 y sgRNA), así como también, es necesario comprobar la integridad del ADN dentro de los *plugs*, sin desconfiar de los métodos convencionales como la electroforesis común. De esta forma, con más análisis y más tiempo podría ser posible observar la banda correspondiente al *cluster* de Actinorodina, la cual no pudo ser identificada en el proceso.

Conclusión

Trabajar con ADN genómico encapsulado en *plugs* de agarosa no es una tarea sencilla. Son muchos los factores que pueden incidir en resultados negativos: exceso de estrés mecánico o de temperatura, densidades ópticas inadecuadas, lavados post-tratamientos, etc. Tampoco se trata de un estudio típico, por cuanto existen técnicas para cortar el ADN en estado líquido de un microorganismo y amplificar el fragmento obtenido (como, por ejemplo, PCR). Sin embargo, al trabajar con *plugs* de agarosa se trabaja también con técnicas de biología molecular novedosas, que aportan al desarrollo científico y al aprendizaje. La obtención del *cluster* de Actinorodina, si bien es ideal, resulta completamente posible en estudios venideros.

En cuanto a los objetivos, se logró encapsular el ADN genómico de *S. coelicolor* M145 en *plugs* de agarosa, comprobando su integridad y la factibilidad de fragmentarlo por medio de digestiones con enzimas de restricción (en este caso, EcoRI). Fue posible sintetizar los sgRNA para la enzima Cas9, así como también fue posible validarlos por medio de una digestión de fragmentos de tamaño 1[kb] con los sitios de corte para el *cluster* Actinorodina. Sin embargo, no fue posible realizar una escisión de dicho *cluster*, ya que no fue posible visualizarlo en geles de electroforesis. No obstante, el estudio de la escisión de *clusters* responsables de la producción de metabolitos como Actinorodina presenta un futuro favorable, por cuanto la determinación de proporciones entre los reactivos, así como los lavados posteriores a la digestión, debiesen permitir observar el fragmento cortado con claridad, y así, el proceso podría extenderse a otros metabolitos provenientes de *clusters* crípticos, como Chaxalactina o Chaxamicina, también encontrados en bacterias procedentes del Desierto de Atacama. Aun así, antes de aquello, más estudios en cuanto a los tratamientos posteriores a la digestión con Cas9 son necesarios, y quedan propuestos para futuros memoristas.

Bibliografía

- [1] José Manuel Sanchez de Lorenzo-Cáceres. Plagas y enfermedades de las plantas.
- [2] Zahaed Evangelista-Martinez. Isolation and characterization of soil Streptomyces species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30.5:1639–1647, 2014.
- [3] Jean-Pierre Bigre, Antonio Peña, Michel Tharaud, and Jean-Claude Morand. *Patología de los cultivos florales y ornamentales*. Mundi-Prensa, España, 1990.
- [4] Ralph Dean. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13.4:414–430, 2012.
- [5] Asghar Pessarakli and H Mohammad. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10.4:273 – 290, 2010.
- [6] Rafik Errakhi. Evidences of biological control capacities of Streptomyces spp. against Sclerotium rolfsii responsible for damping-off disease in sugar beet (Beta vulgaris L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23.11:1503 – 1509, 2007.
- [7] Lilia Fourati-Ben Fguira, Serge Fotso, Raoudha Ben Ameer-Mehdi, Lofti Mellouli, and Hartmut Laatsch. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated Streptomyces sp. strain US80. *Research in Microbiology*, 156.3:341 – 347, 2005.
- [8] Yoshitake Tanaka and Satoshi Omura. Agroactive compounds of microbial origin. *Annual Review of Microbiology*, 47.1:57 – 87, 1993.
- [9] María Francisca Vicente. Microbial natural products as a source of antifungals. *Clinical Microbiology and Infection*, 9.1:15 – 32, 2003.
- [10] Hao Wang, David P Fewer, Liisa Holm, Leo Rouhiainen, and Kaarina Sivonen. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25):9259–9264, 2014.
- [11] Elisângela Soares Gomes, Viviane Schuch, Eliana Gertrudes, and De Macedo Lemos. Biotechnology of polyketides : New breath of life for the novel antibiotic genetic pathways

discovery through metagenomics. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1034(44):1007–1034, 2013.

- [12] Paul Dewick. Medicinal natural products: a biosynthetic approach, 2002.
- [13] Wayne Barnes. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91.6:2216 – 2220, 1994.
- [14] Wenjun Jiang. Cas9-Assisted Targeting of Chromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters. *Nature Communications*, 6:8101, 2015.
- [15] Yunkun Liu, Weixin Tao, Shishi Wen, Zhengyuan Li, Anna Yang, and Zixin Deng. In Vitro CRISPR / Cas9 System for Efficient Targeted DNA Editing. *mBio*, 6(6):1–8, 2015.
- [16] T. Kieser and John Innes Foundation. *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, 2000.

Anexos

Anexo I: Preparación del medio de cultivo ISP2

Para preparar este medio de cultivo, se utilizan las siguientes proporciones:

Reactivo	Cantidad	Unidad
Extracto de levadura	4	g
Extracto de malta	10	g
Dextrosa	4	g
Agua destilada	1000	ml

Tabla 3: Proporción de reactivos para preparación de medio ISP2

Una vez medidos los reactivos, se debe ajustar el pH a 7.2 para luego autoclavar el medio.

Anexo II: Preparación de *buffers*

Buffer TE

Este *buffer* se utiliza para lavar los *plugs* después del tratamiento con Proteinasa K, y también sirve como medio para conservarlos una vez estén listos para su tratamiento con enzimas. Es importante notar que este *buffer* solo sirve para conservar los *plugs* por un período de tiempo máximo de 1 mes. Para tiempos mayores de conserva, se recomienda mantenerlos en una solución de EDTA concentrado a 0,5[M] y pH 8.0.

Para preparar este *buffer*, se siguen los siguientes pasos:

1. Se prepara una solución de 10[mM] de Tris-HCl a pH 8.0. Para ello, se pesan 10[mM] de Tris base, se lleva a solución utilizando agua destilada y se ajusta el pH a 8.0 utilizando HCl.
2. Se pesa 1[mM] de EDTA, se añade a la solución y se ajusta el pH a 8.0 utilizando NaOH.
3. Agitar hasta que la solución esté homogénea.

Este *buffer* puede prepararse en grandes cantidades y mantenerse guardado a temperatura ambiente, y no es necesario autoclavar.

***Buffer* TE25-S**

Este *buffer* se utiliza para la re-suspensión del micelio, una vez cultivado y centrifugado. Además, se utiliza en la preparación de la solución de Lisozima.

Para preparar este *buffer*, se siguen los siguientes pasos:

1. Se prepara una solución de 25[mM] de Tris-HCl a pH 8.0. Para ello, se pesan 25[mM] de Tris base, se lleva a solución utilizando agua destilada y se ajusta el pH a 8.0 utilizando HCl.
2. Se pesan 25[mM] de EDTA, se añade a la solución y se ajusta el pH a 8.0 utilizando NaOH.
3. Se pesan 0,3[M] de Sacarosa y se añaden a la solución.
4. Agitar hasta que la solución esté homogénea.

Es importante notar que este *buffer* no se puede autoclavar debido a la presencia de sacarosa en el medio, ya que esta puede tomar forma sólida (básicamente "caramelizarse") bajo las condiciones de temperatura del autoclave. Además, al igual que el *buffer* TE, este *buffer* puede prepararse en grandes cantidades y guardarse a temperatura ambiente.

***Buffer* NDS**

Este *buffer* se utiliza exclusivamente en la preparación de la solución de Proteinasa K. Para preparar este *buffer* se siguen los siguientes pasos:

1. Se prepara una solución de 10[mM] DE Tris-HCl a pH 9.0. Para ello, se pesan 10[mM] de Tris base, se lleva a solución utilizando agua destilada y se ajusta el pH a 9.0 utilizando HCl.
2. Se pesan 0,5[M] de EDTA y se añaden a la solución. Se ajusta el pH a 9.0 utilizando NaOH (**Importante:** Debido a la gran cantidad de EDTA, esta solución se homogeniza sólo a pH básico, por lo que se recomienda utilizar *pellets* de NaOH en vez de soluciones líquidas, para acelerar el proceso de homogenización)
3. Se pesa N-Lauroilsarcosinato de Sodio al 1% masa-volumen con respecto al volumen total. Se puede reemplazar con SDS. Añadir a la solución y disolver aplicando una temperatura entre 50°C y 70°C, aproximadamente.
4. Filtrar la solución utilizando una jeringa y un filtro de 0.2µm.

Es importante notar que esta solución se debe utilizar fresca, por lo que no es recomendable preparar grandes cantidades ya que no es factible guardar este *buffer* para futuras aplicaciones.

Anexo III: Preparación de soluciones

Solución de Lisozima

Para preparar esta solución, se debe pesar lisozima en concentración 2[mg/ml] en *buffer* TE25-S. Es importante notar que la lisozima es un reactivo que se mantiene a -4°C , por lo tanto, es importante mantener el *stock* del reactivo en frío, idealmente en una bandeja con hielo.

Solución de Proteinasa K

Para preparar esta solución es necesario contar con el *buffer* NDS, el cual se debe utilizar fresco. La preparación se hace de la siguiente forma:

1. Pesar Proteinasa K en concentración 1 [mg/ml] de *buffer* NDS.
2. Incubar la solución a 50°C , por entre 30 minutos y 1 hora, antes de utilizarla.

Es necesario notar que, al igual que la lisozima, este reactivo se conserva a -4°C , por lo que es importante mantenerlo en frío al momento de pesar. Además, es importante su incubación en el *buffer* NDS, ya que esto permitirá su ambientación con el *buffer* y correcta activación a la hora de realizar el tratamiento.

Solución de PMSF

Importante: Este reactivo es muy tóxico. Se recomienda fuertemente utilizar mascarilla, guantes y delantal a la hora de manipular este reactivo, y reemplazar los guantes inmediatamente después de usarlo.

Para preparar esta solución, hay que seguir los siguientes pasos:

1. Pesar 100[mM] de PMSF y diluir en isopropanol.
2. Disolver a 50°C por 5 minutos.
3. Guardar a -20°C .

Anexo IV: Digestión CRISPR-Cas9

Diseño del *mix* de reactivos

Para realizar una digestión CRISPR-Cas9, se tomó como base el siguiente *mix* de reactivos:

Reactivo	Volumen [μ l]
H ₂ O	Hasta 30
Buffer 3.1 (10x)	3
sgRNA (1[μ g/ μ l])	2.5
Cas9 (1[μ g/ μ l])	3
DNA	6 - 10 [η g]

Tabla 4: *Mix* base para digestión con Cas9

Al reemplazar el DNA de la tabla anterior por un *plug*, se vuelve necesario escalar todos los volúmenes de reacción. Un *plug* de 2[mm] de ancho queda completamente cubierto en 200 [μ l] de reacción, por lo que la tabla escalada quedaría de la siguiente forma:

Reactivo	Volumen [μ l]
H ₂ O	Hasta 200
Buffer 3.1 (10x)	20
sgRNA (1[μ g/ μ l])	16.7
Cas9 (1[μ g/ μ l])	20
DNA	<i>plug</i>

Tabla 5: *Mix* escalado para digestión de *plugs* con Cas9

Ya que la idea es cortar el *cluster* de Actinorodina, es necesario utilizar dos sgRNA: uno para cortar justo antes del *cluster* y uno para cortar después. Por este motivo, y para mantener las proporciones entre sgRNA y Cas9, se decide probar con las siguientes mezclas de reactivos:

Reactivo	Volumen [μ l]			
	2x Cas9	1/2 sgRNA	Control negativo	Control agua
H ₂ O	Hasta 200	Hasta 200	Hasta 200	200
Buffer 3.1 (10x)	20	20	20	-
sgRNA 3.2 (1[μ g/ μ l])	16.7	8.4	-	-
sgRNA 5.3 (1[μ g/ μ l])	16.7	8.4	-	-
Cas9 (1[μ g/ μ l])	40	20	20	-
DNA	<i>plug</i>	<i>plug</i>	<i>plug</i>	<i>plug</i>

Tabla 6: *Mix* final para pruebas de digestión de *plugs* con Cas9

Usualmente, una digestión con CRISPR-Cas9 involucra también la adición de RNase, sin embargo, aquí se omite debido a que su uso es para terminar la reacción con Cas9 y, por lo tanto, corresponde a un proceso posterior que está pendiente de estudiar a cabalidad.

Anexo V: Síntesis de sgRNA

Oligo Joining

Para sintetizar los sgRNA primero es necesario crear ADN templado (En adelante, "oligo") de hebra doble como templado para una reacción posterior. Para ello, se utilizan *scaffold* y protoespaciadores, según corresponda (Ya que en este experimento se necesitan dos sgRNA, es necesario realizar un *Oligo joining* para cada protoespaciador). Se siguen los siguientes pasos:

1. Mezclar en frío los siguientes reactivos:

Reactivo	Volumen [μ l]
H ₂ O	Hasta 50
Buffer HF (5x)	10
Protoespaciador (3.2 ó 5.3)	2.5
<i>Scaffold</i>	2.5
dNTPs (10[mM])	1
Polimerasa Phusion	0.5

Tabla 7: *Mix* de reacción para *Oligo joining*

2. Incubar la reacción bajo la siguiente secuencia de temperaturas:

Temperatura [°C]	Tiempo [s]
98	20
72	20
60	20
55	20
48	20
42	20
37	60
42	40
48	30
55	20
60	20
72	20

Tabla 8: Secuencia de temperaturas para *Oligo joining*

3. Purificar cada oligo utilizando el kit de purificación GeneJet Gel Extraction Kit.
4. Cuantificar la concentración con Maestro Nano
5. Si se desea, se puede verificar mediante electroforesis en gel de agarosa (Los fragmentos deben ser de aproximadamente 120 [bp]).

Transcripción *in vitro* para producción de sgRNA

Para producir los sgRNA se utilizaron los oligo sintetizados anteriormente como ADN templado. Se mezclan a temperatura ambiente los siguientes reactivos (**Importante: chequear concentración de oligos antes de mezclar los reactivos. Ajustar volúmenes si es necesario**):

Reactivo	Volumen [μ l]
H ₂ O	Hasta 30
NTP Buffer Mix	10
Oligo (3.2 ó 5.3) (200 [η g/ μ l])	1
Mix T7 RNA Polimerasa	2

Tabla 9: Mix de reacción para producción de sgRNA a partir de ADN templado (oligo) de hebra doble.

1. Incubar la reacción a 37°C por 16 horas.
2. Diluir los 30[μ l] de reacción en 150[μ l] de agua libre de nucleasas.
3. Añadir 4[μ l] de DNaseI e incubar a 37°C por 15 minutos.
4. Añadir 180[μ l] de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), pH <5.0.
5. Agitar por 15 minutos en vortex y dejar homogenizar por 3 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar la solución a 12000g a 4°C por 10 minutos.
7. Transferir la capa superior a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 [ml].
8. Agregar 20[μ l] de Acetato de Sodio 3M. Agitar fuertemente.
9. Centrifugar a 12000g por 30 minutos a 4°C. Debería poder observarse un *pellet*.
10. Remover el sobrenadante.
11. Lavar el pellet con Etanol 70% y centrifugar a 12000g por 10 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante y repetir el lavado.
12. Retirar todo el etanol y secar el pellet a 37°C por 5 minutos.
13. Resuspender en 100[μ l] de agua libre de nucleasas y dejar reposar toda una noche.
14. Cuantificar concentración con Maestro Nano. Una concentración de entre 0.3 y 1 [μ g/ μ l] y una proporción A260/A280 >2.0 son parámetros ideales.