Cristóbal Martínez
Directo Ejecutivo INBIO

Índice

- Relación con ASOEX y SAG
- Funcionamiento del Kit actual
- Ventajas y desventajas de este
- Alternativa al Kit actual: Técnica HRM
- Ventajas de la alternativa propuesta
- Objetivos y plan de trabajo de la alternativa propuesta

Misión y Visión

Misión

- Brindar servicios especializados de consultoría y asesoría estratégica a empresas e instituciones del sector productivo en el ámbito científico, biotecnológico y de la innovación, con el fin de impulsar su desarrollo y crear una ventaja competitiva en el mercado.

Visión

- Posicionarnos como una empresa líder en desarrollo tecnológico e innovación, siempre a la vanguardia del conocimiento científico y biotecnológico, aportando ideas de negocio para satisfacer las necesidades y demandas de nuestros clientes de manera integral

Índice

- Relación con ASOEX y SAG
- Funcionamiento del Kit actual
- Ventajas y desventajas de este
- Alternativa al Kit actual: Técnica HRM
- Ventajas de las alternativa propuesta
- Objetivos y plan de trabajo de la alternativa propuesta

Relación con ASOEX-SAG

- La relación comienza el 2017 por medio de la solicitud de una asesoría técnica para analizar la utilización del kit de q-PCR de Pseudocóccidos y problemas asociados a su implementación.

- Desde el 2018 a la fecha INBIO se ha adjudicado la licitación de los kits de q-PCR para la identificación de Pseudocóccidos y Curculiónidos.

- Apoyo en la implementación de la técnica de detección de Curculionidos mediante q-PCR.

- Recientemente trabajo en conjunto en la implementación del laboratorio de identificación ubicado en ZEAL (Valparaíso).

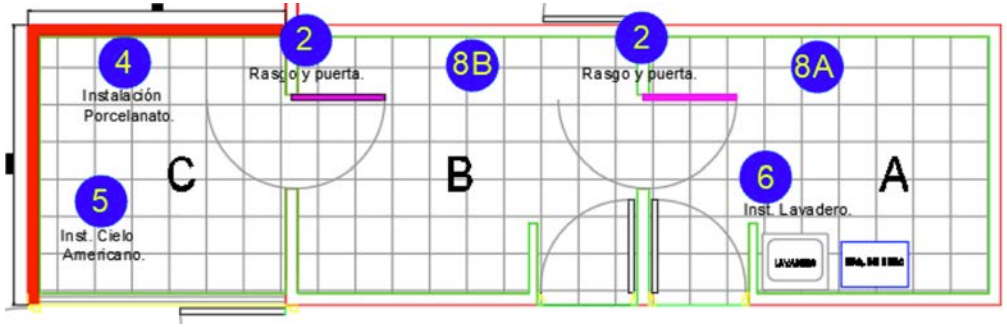
Proyecto ZEAL

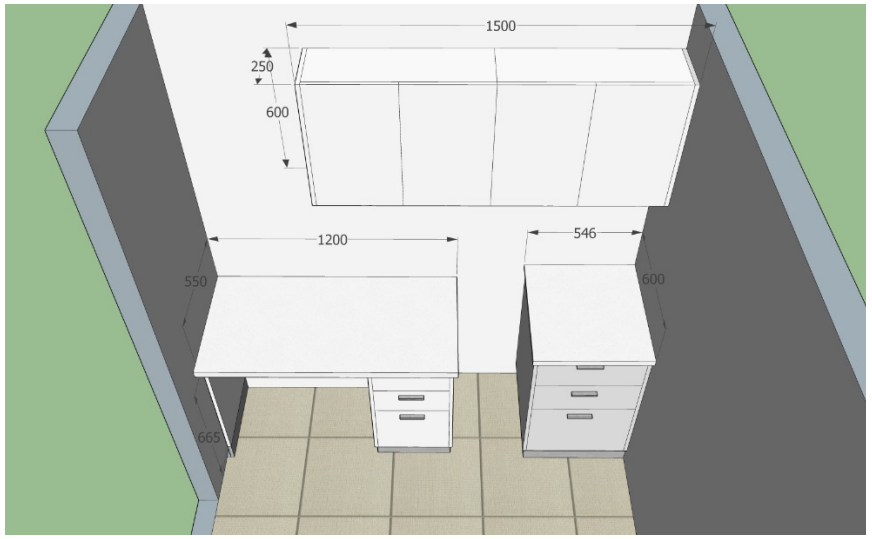
- Implementación de un laboratorio de biología molecular para la identificación de especies mediante q-PCR

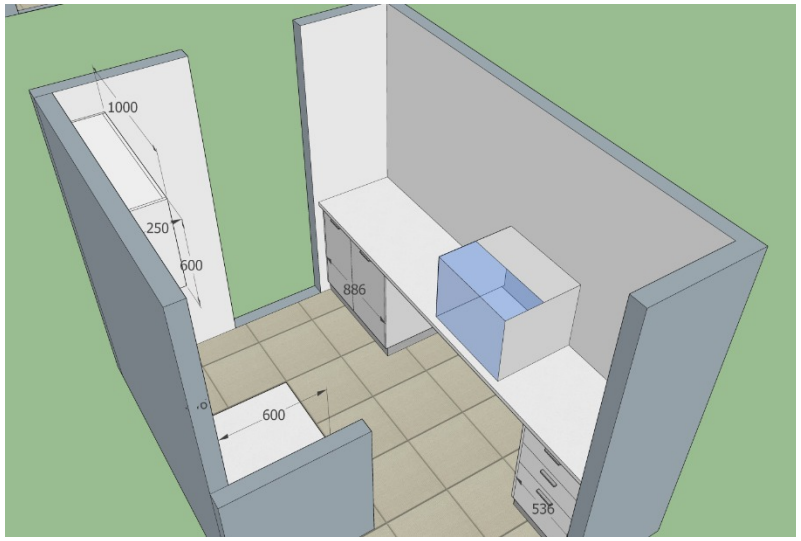
  - Evaluación de proyecto
  - Diseño de laboratorio
  - Supervisión construcción, equipamiento y habilitación del laboratorio
  - Capacitación del personal

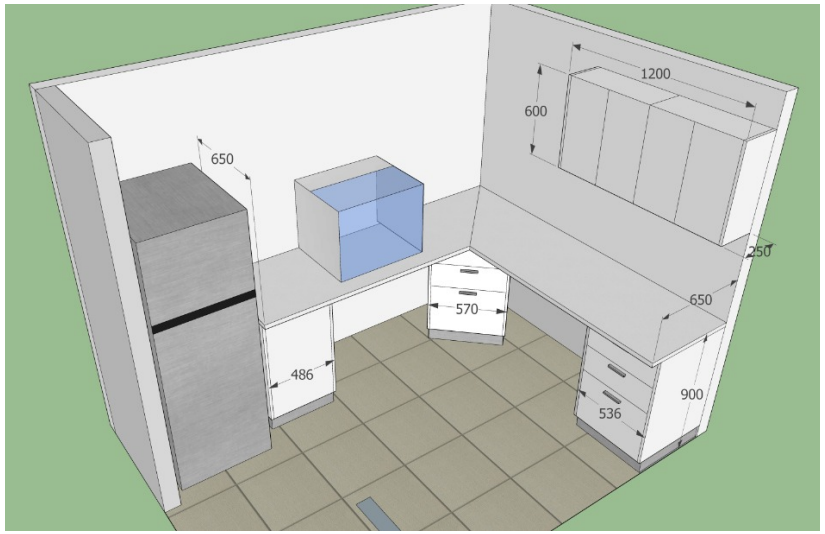
- El laboratorio cuenta con la capacidad de realizar las técnicas de q-PCR actuales, PCR convencional y análisis de curva de melting de alta resolución (HRM).

Diseño de Laboratorio ZEAL









Equipamiento Laboratorio ZEAL

Habilitación y Capacitación

Relación como proveedores del SAG

- Comunicación constante con personal del SAG y ASOEX para monitorear estado de la técnica.
- Soporte constante a personal del SAG.
- Capacitaciones anuales
- Operación continua sin detención en el proceso de identificación y con una menor cantidad de análisis indeterminados.

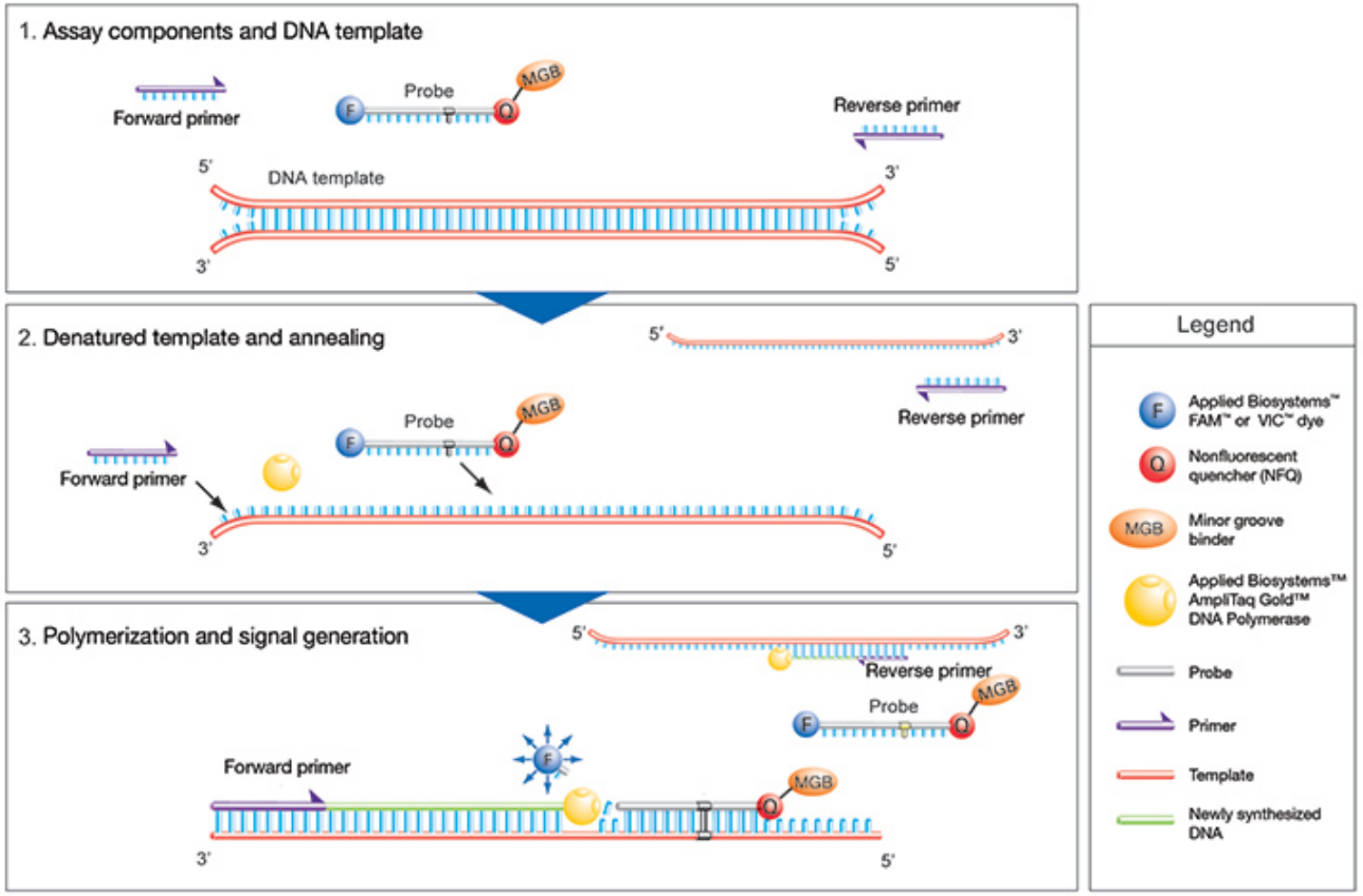
Índice

- Relación con ASOEX y SAG
- Funcionamiento del Kit actual
- Ventajas y desventajas de este
- Alternativa al Kit actual: Técnica HRM
- Ventajas de la alternativa propuesta
- Objetivos y plan de trabajo de la alternativa propuesta

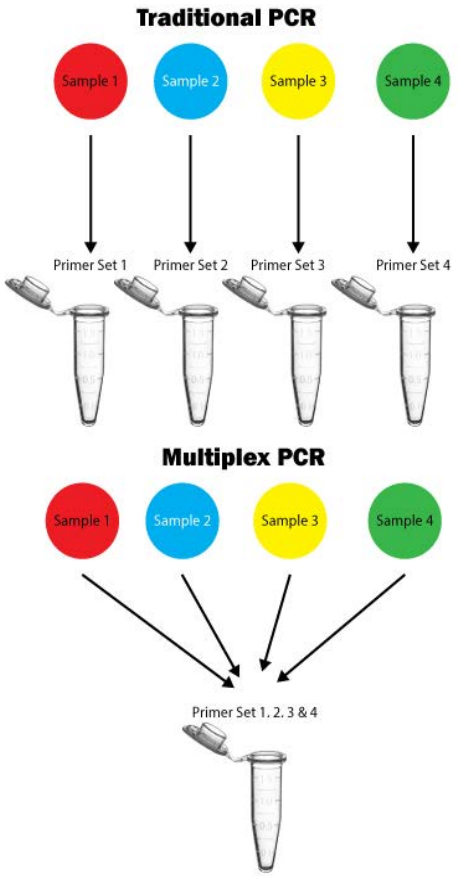
¿En que se basa el kit de q-PCR actual?

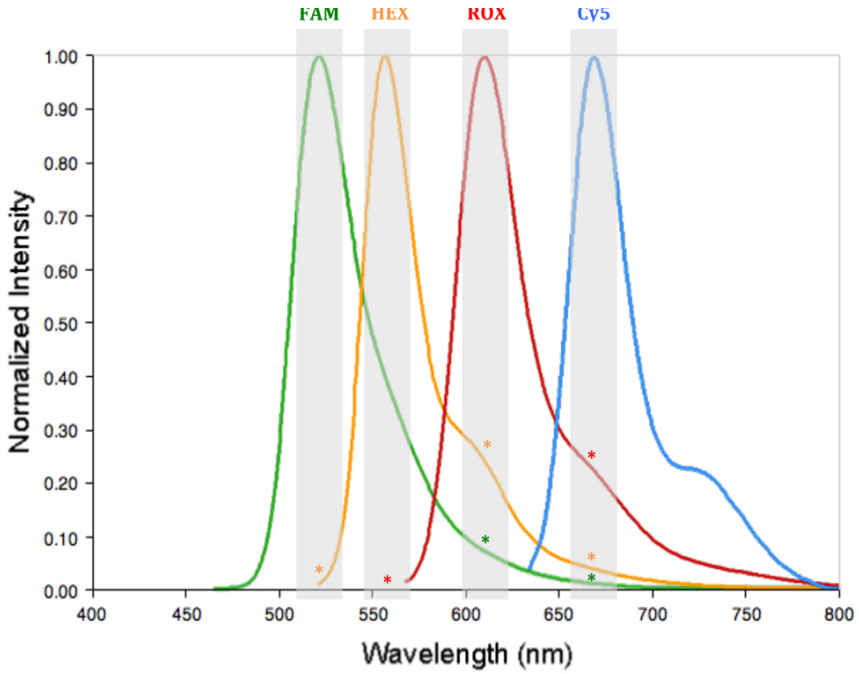
- El kit actual funciona con la técnica q-PCR con sondas TaqMan especificas para cada especie.

- A grandes rasgos, la detección se basa en la señal emitida, debido a la separación del reportero y el quencher de la sonda.



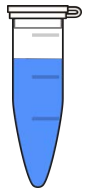
q-PCR multiplex:





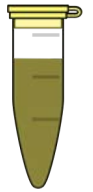
Kit Actual (para una muestra)

Mix A



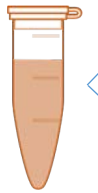
- Endogeno
- Ps. Viburni
- Ps. Meridionalis

Mix B



- Ps. Cribata
- Ps. calceolariae

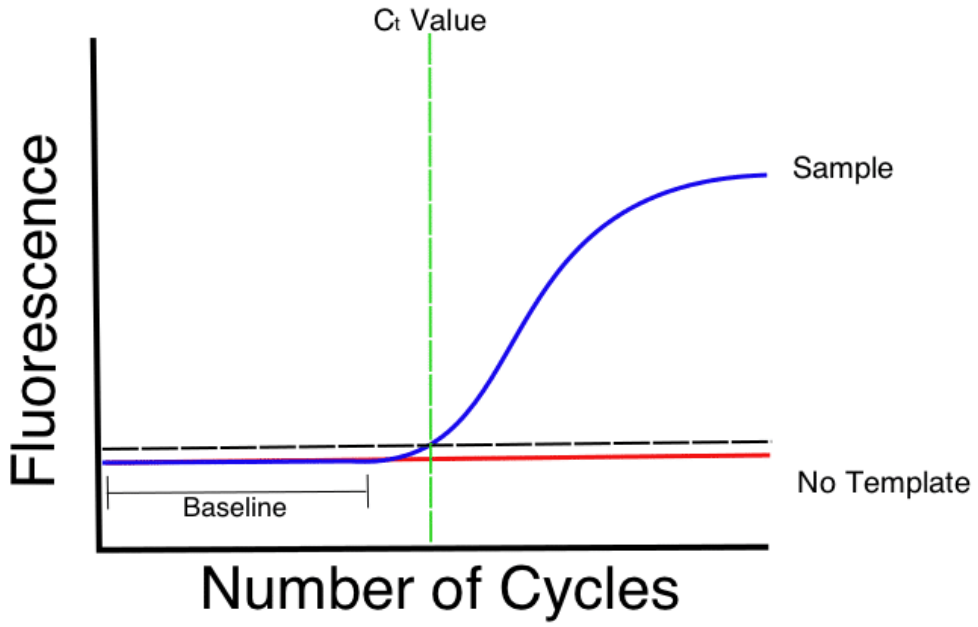
Mix B

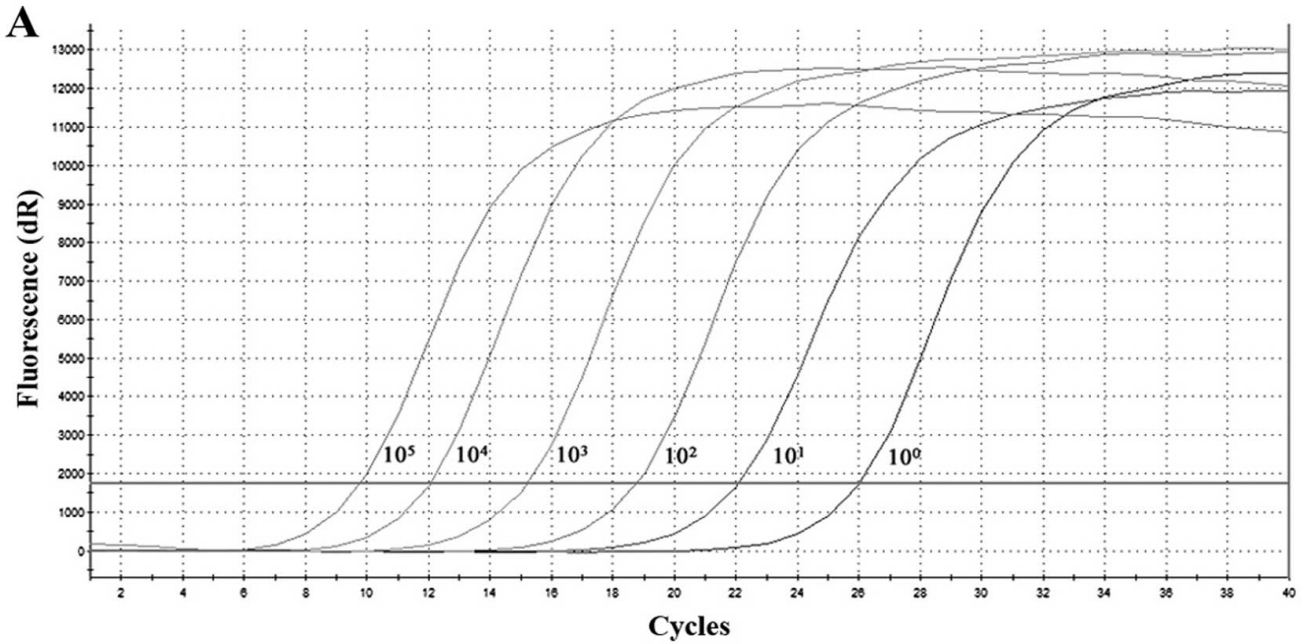


- Ps. Citri
- Ps. Longispinus

X2, para Control Positivo y negativo

Curvas tipo de fluorescencia en q- PCR:





Pseudococcus meridionalis	Pseudococcus viburni	Control constitutivo	Pseudococcus calceolariae	Pseudococcus citri	Pseudococcus cribata	Pseudococcus longispinus
21±2	24±2	22±2	20±2	22±2	21±2	26±2

Índice

- Relación con ASOEX y SAG
- Funcionamiento del Kit actual
- Consideraciones, ventajas y desventajas del Kit actual
- Alternativa al Kit actual: Técnica HRM
- Ventajas de la alternativa propuesta
- Objetivos y plan de trabajo de la alternativa propuesta

Consideraciones del Kit actual

Dificultades que presentaba el kit actual:

- Productos inespecíficos.
- Protocolo muy rígido con pocas posibilidades de optimizar (ΔC_t, cambio polimerasas, sondas, etc.)
- Posible degradación de sondas y controles positivos.

Estrategias utilizada para resolver estos problemas :

- Generación de controles positivos estables, para poder obtener C_t dentro de rango.
- Mejorar Confiabilidad del Kit, con una comprobación previa de cada Kit entregado.
- Verificación de productos inespecíficos, capacitación del personal y soporte continuo.

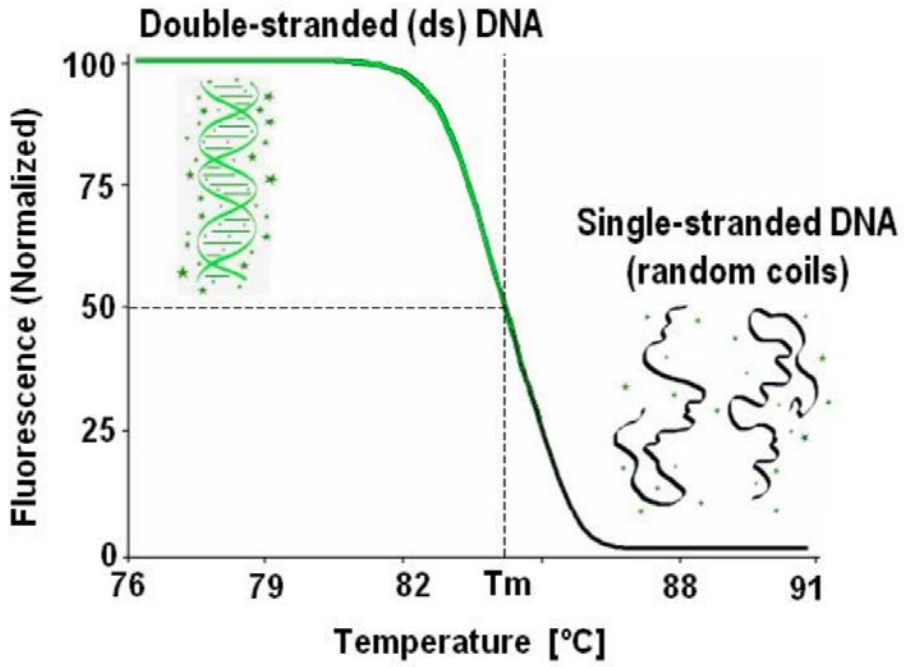
Ventajas y desventajas del kit actual

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Gran especificidad (partidores y sondas)	Sondas de alto valor
Permite experimentos multiplex	Muchos elementos sin stock
	Técnica con varios pasos de pipeteo
	Equipo de detección más complejo (4 canales)
	Parámetros de C_t estrictos

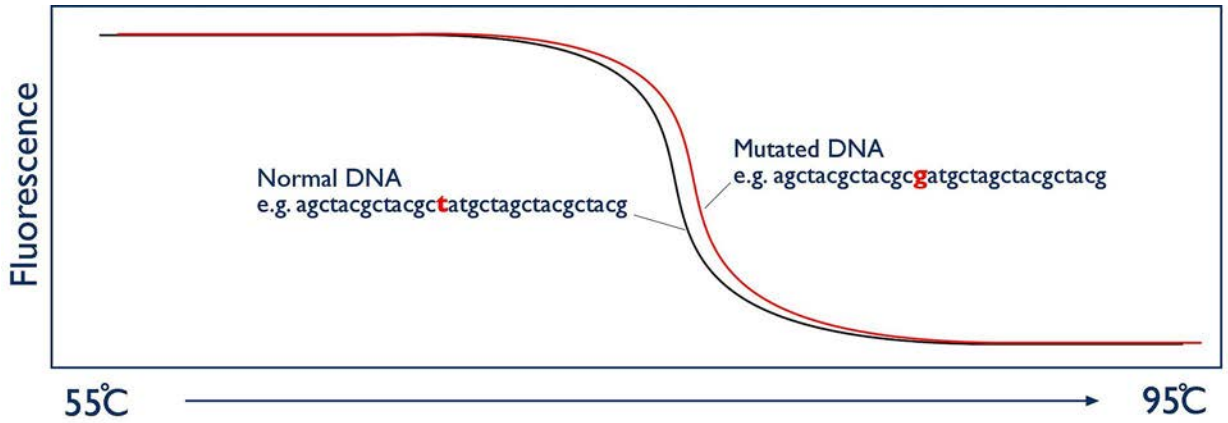
Índice

- Relación con ASOEX y SAG
- Funcionamiento del Kit actual
- Consideraciones, ventajas y desventajas del Kit actual
- Alternativa al Kit actual: Técnica HRM
- Ventajas de la alternativa propuesta
- Objetivos y plan de trabajo de la alternativa propuesta

Principio del q-PCR HRM: curvas de disociación



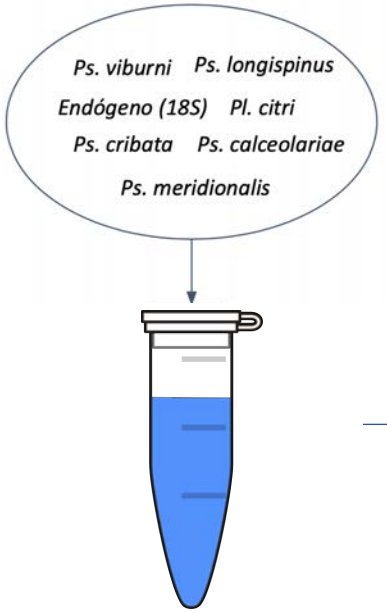
Fluoróforo intercalante se une a la doble hebra de ADN de forma saturante (EvaGreen, LC Green, SYTO 9).

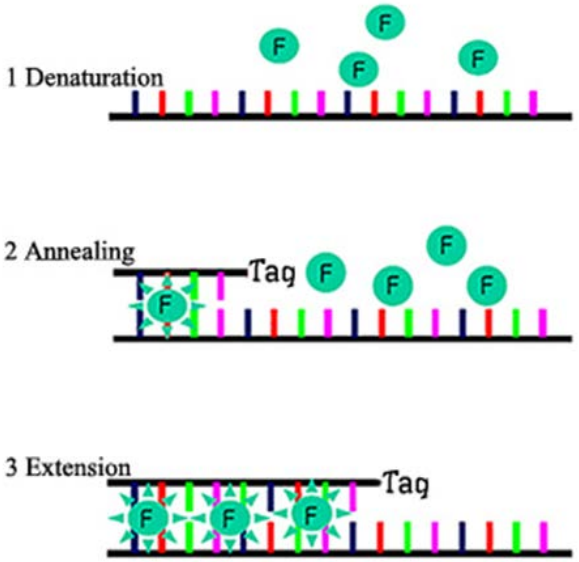


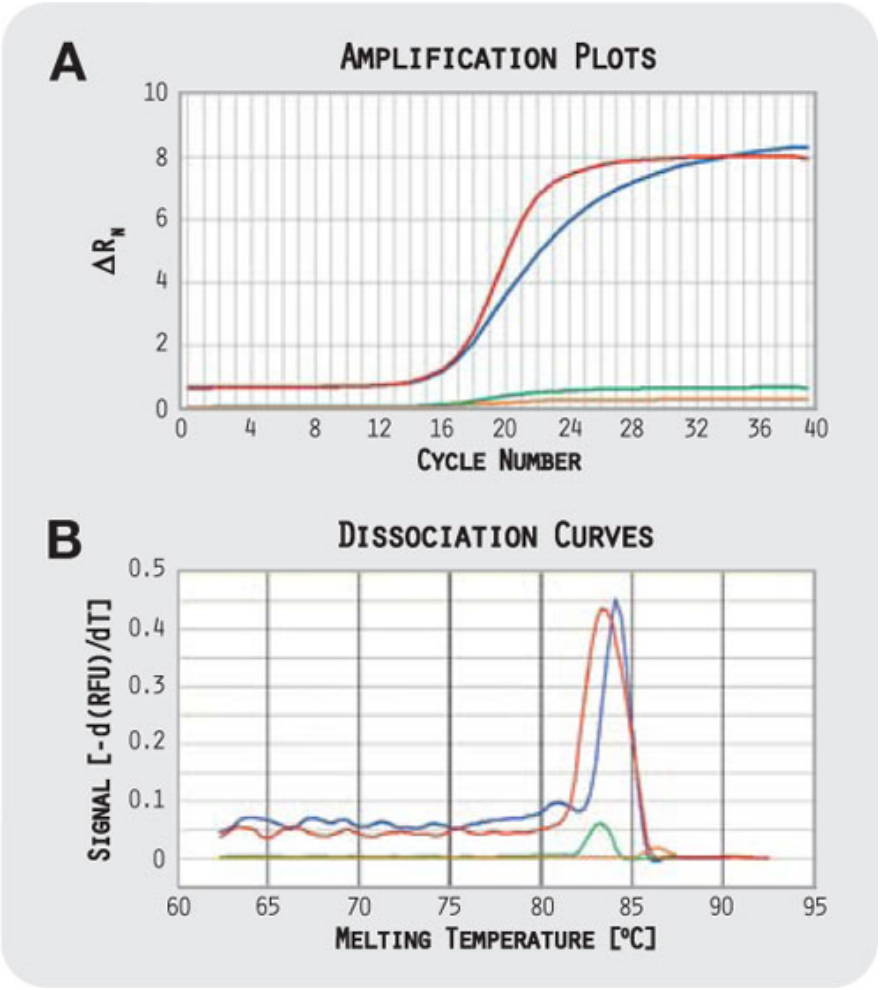
En un análisis post-PCR, se disocia la doble hebra de ADN aumentando la temperatura en incrementos de 0.2 ºC en los que se mide la fluorescencia (alta resolución).

Cada amplicón (especie de insecto), tendrá una Tm característica.

Generación de un Kit basado en la técnica de HRM

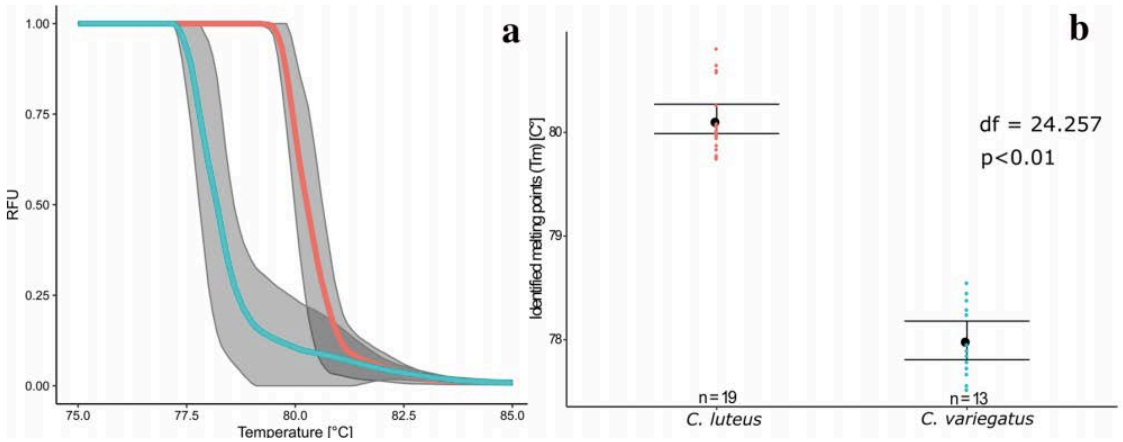


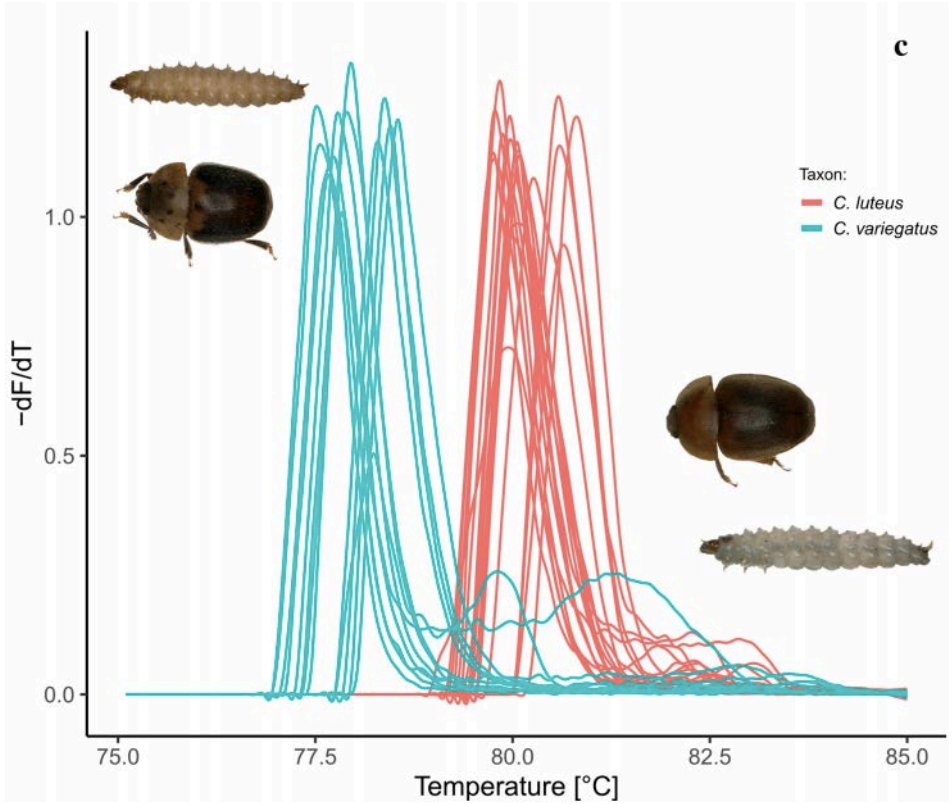




Mezcla de reacción sencilla, fácil de preparar e implementar.

Un ejemplo aplicado de la tecnica HRM





En ejemplo se usó citocromo oxidasa I (COI) para distinguir entre dos larvas de *Cychramus*.

Es importante realizar un buen diseño y seleccionar un marcador molecular con variabilidad interespecie y homología intraespecie

Zangl, L., Oberreiter, H., Huss, H. *et al.* Discriminating larvae of two syntopic *Cychramus* species (Coleoptera, Nitidulidae) by means of bar-HRM analysis. *Mol Biol Rep* 47, 8251–8257 (2020). https://doi.org/10.1007/s11033-020-05786-9

Índice

- Relación con ASOEX y SAG
- Funcionamiento del Kit actual
- Consideraciones, ventajas y desventajas del Kit actual
- Alternativa al Kit actual: Técnica HRM
- Ventajas de la alternativa propuesta
- Objetivos y plan de trabajo de la alternativa propuesta

¿Cuales son las ventajas de un kit basado en el análisis HRM?

- Tiempo similar a un q-PCR con sondas Taq Man.
- Menor costo (≈35%), dado que no utiliza sondas Taq Man.
- Se puede desarrollar en equipos de menos valor, con solo un canal + HRM.
- Podría permitir identificación de las seis especies en un solo tubo, lo que implica menos pipeteo, es decir un manejo mas simple que el kit actual.
- Permite un mejor tiempo de respuesta, ya que los reactivos son muchos mas accesibles.

Objetivos y Plan de trabajo

- Objetivo 1:
  - Extracción de ADN de Pseudocóccidos para secuenciación de región objetivo. Se pretende obtener muestras ambientales para incorporar variabilidad al diseño.

- Objetivo 2:
  - Diseño y evaluación de partidores potenciales para el kit q-PCR-HRM.
  - Optimizar reacción de PCR con partidores seleccionados.
  - Obtener un prototipo mínimo viable.

- Objetivo 3:
  - Validar técnicamente y comercialmente el kit.
  - Validar la técnica ante el USDA (o iniciar proceso de validación).
  - Iniciar proceso de patentamiento

Objetivos y Plan de trabajo

N°	Actividad	Año 1												Año 2			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Objetivo Específico 1:																	
1.1	Recolección de Muestras	■	■														
1.2	Extracción de ADN y secuenciación			■	■												
1.3	Analisis de secuencias de interés				■	■											
Objetivo Específico 2:																	
2.1	Diseño de Partidores					■	■										
2.2	Obtención de curvas de fusión							■	■								
2.3	Oprtimización de HRM								■	■	■	■	■				
Objetivo Específico 3:																	
3.1	Extracción de ADN (100 individuos)								■	■	■	■					
3.2	Validación (muestras ciegas 100 individuos)												■	■	■	■	
3.2	Patentamiento																■

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.

EQUIPO INBIO

- Claudio Navarro, Bioquímico (Pontificia Universidad Católica de Chile), Doctor en Microbiología (Universidad de Chile) y Post Doctorado en Biología Molecular (Universidad de Chile).

- Diego von Bernath, Ingeniero en Biotecnología Molecular (Universidad de Chile). Estudiante Doctorado en Ingeniería Civil (Pontificia Universidad Católica de Chile)

- Cristóbal Martínez Bussenius, Ingeniero en Biotecnología Molecular (Universidad de Chile), Magister en Ciencias Biológicas, Estudiante Doctorado en Ingeniería Civil (Pontificia Universidad Católica de Chile)