Cristóbal Martínez Bussenius
Directo Ejecutivo

Desarrollo de un kit qPCR basado en HRM para la identificación de Pseudocóccidos

CORFO Crea y Valida

Índice

- Introducción
- Problemas y oportunidades
- Proyecto CORFO adjudicado
- Ventajas del prototipo propuesto
- Objetivos y resultados esperados

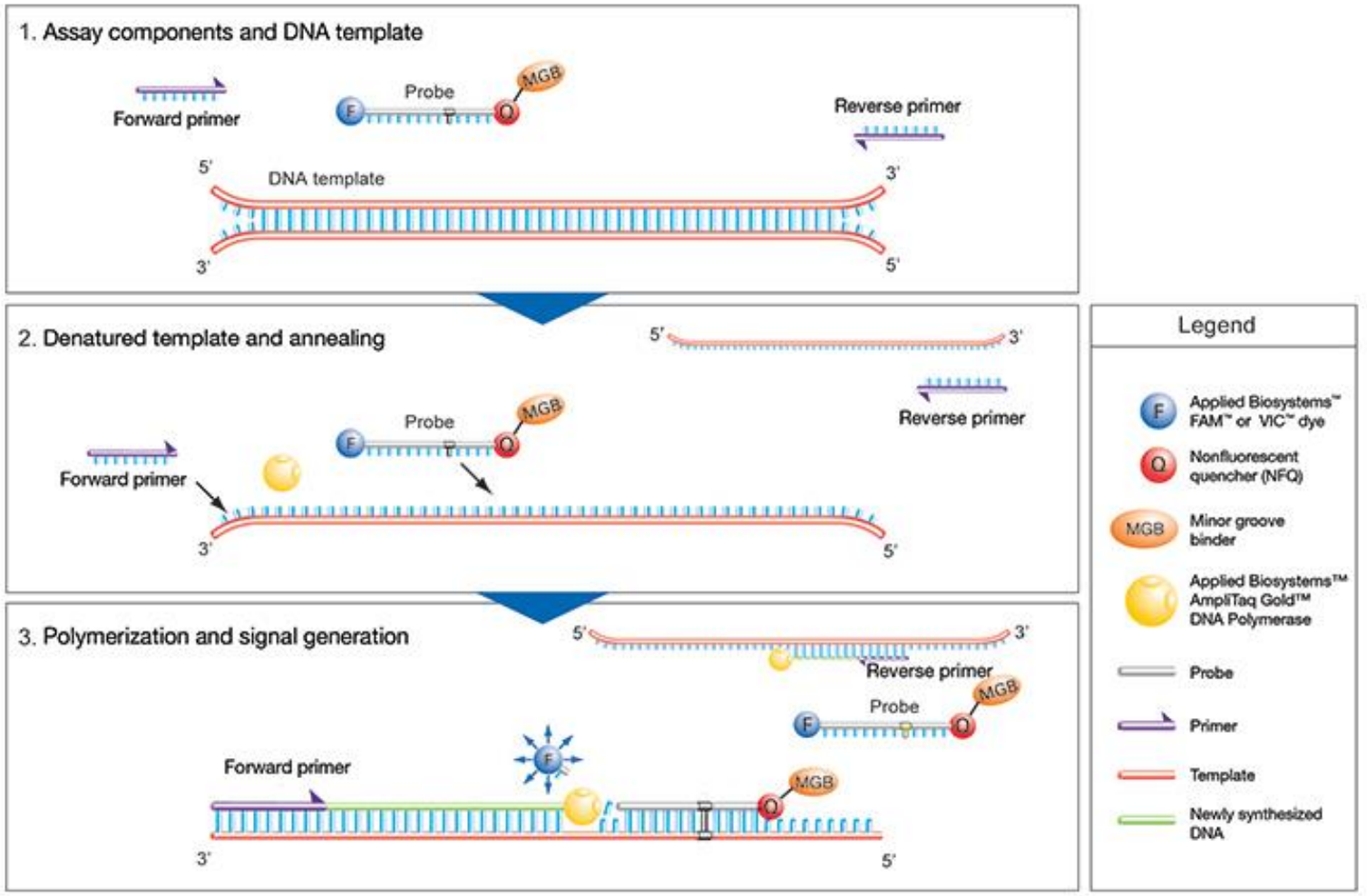
Introducción

- Identificación de Pseudocóccidos a nivel de especie es necesario para evitar rechazos.
- Estados inmaduros son identificados molecularmente mediante PCR.
- Kit actual de qPCR presenta algunos inconvenientes que dificultan su utilización y producción.
- A partir del conocimiento del kit actual y su utilización, se presentó un proyecto CORFO para producir un nuevo kit, que al ser más simple facilitará su producción, utilización e implementación en nuevos sitios de inspección.

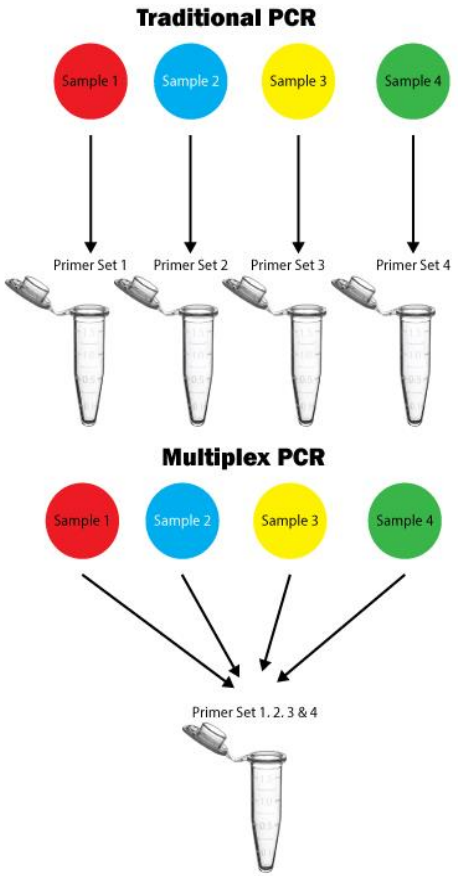
¿En que se basa el kit de q-PCR actual?

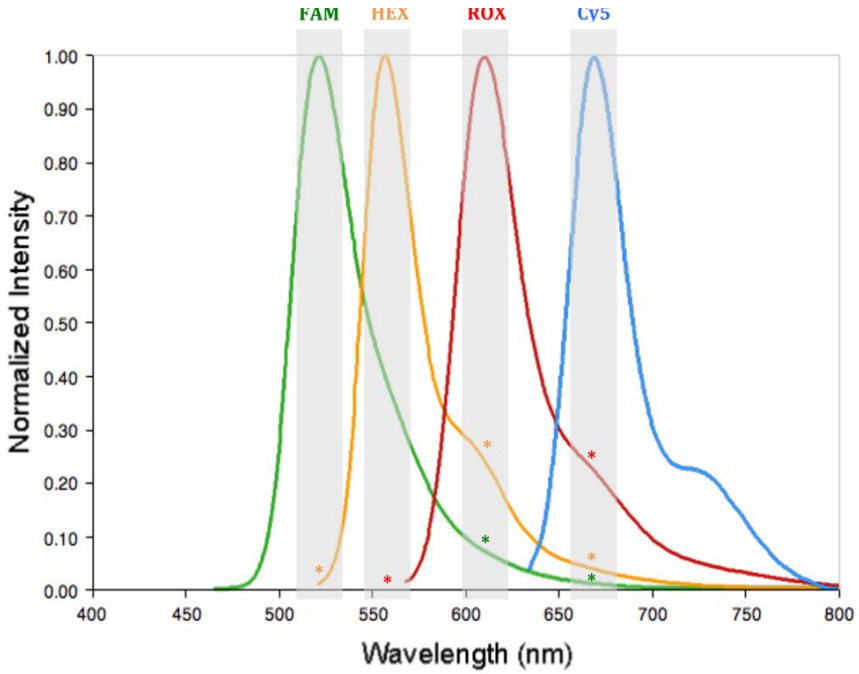
- El kit actual funciona con la técnica q-PCR con sondas TaqMan especificas para cada especie.

- 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)

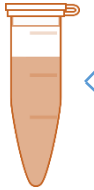
Mix A

- Endogeno (Cy5)
- *P. viburni* (TAMRA)
- *P. meridionalis* (FAM)

Mix B

- *P. citri* (TAMRA)
- *P. calceolariae* (FAM)

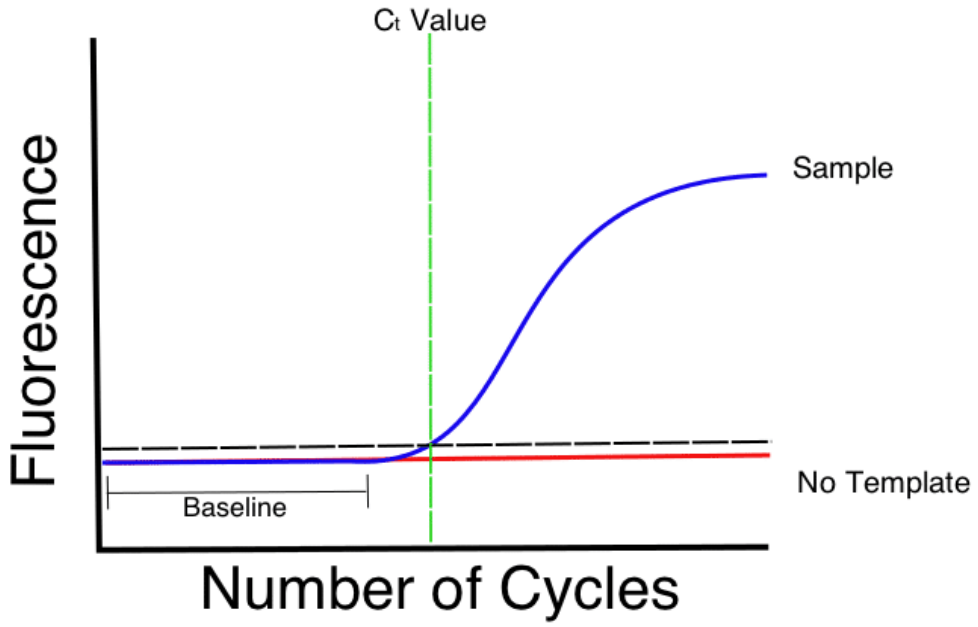
Mix B

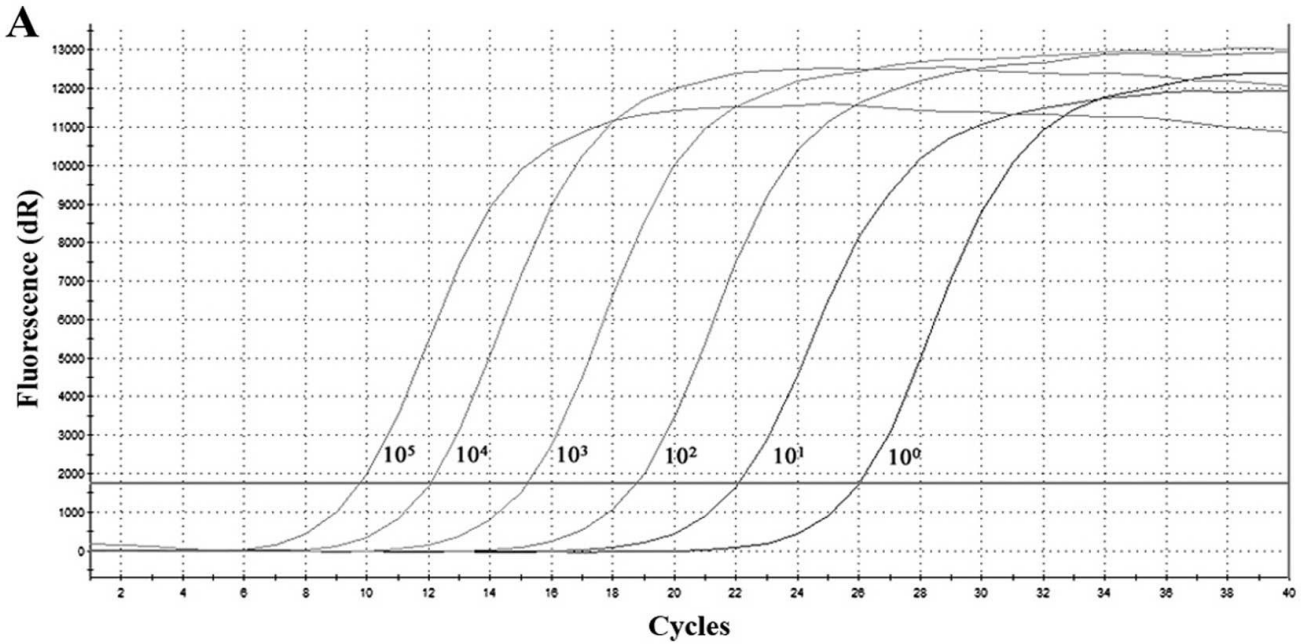


- *P. cribata* (FAM)
- *P. longispinus* (TAMRA)

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

Ventajas y desventajas del kit actual

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Gran especificidad (partidores y sondas)	Sondas fluorescentes de alto valor
Permite experimentos multiplex	Muchos elementos, algunos sin stock permanente en Chile
	Laborioso: múltiples etapas por muestra
	Equipo de detección más complejo y caro (4 canales)
	Parámetros de C_t estrictos

Problemas y oportunidades

Dificultades que presenta el kit actual:

- Aparición de productos inespecíficos (asociados a la técnica utilizada).
- Protocolo muy rígido con pocas posibilidades de optimizar ($\triangle C_t$, cambio polimerasas, sondas, etc.).
- Componentes de difícil acceso en Chile, dificulta producción y tiempo de entrega.
- Múltiples componentes que pueden sufrir degradación (particularmente las sondas fluorescentes).
- Complejidad del sistema dificulta la asistencia remota y capacitación.

Oportunidades:

- Disminuir problemas de resultados no concluyentes.
- Mejorar la disponibilidad de kit con insumos mas económicos y de fácil adquisición.
- Rediseñar kit, con una mayor cantidad de información de Pseudocócccidos de diferentes zonas del país.

Proyecto Crea y Valida Empresarial

Desarrollo de kit PSD01: Un Kit qPCR basado en HRM para identificación estados inmaduro de Pseudocóccidos

Objetivo general

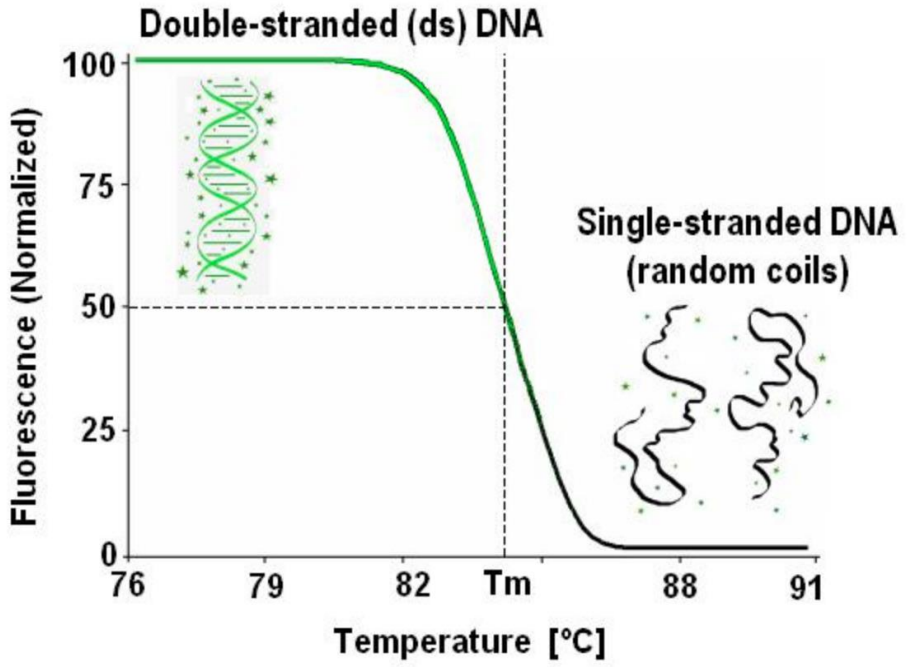
Optimizar el proceso de inspección fitosanitaria de fruta de exportación, a través del desarrollo de un prototipo mínimo viable de un kit de qPCR, basado en la técnica HRM, para la identificación de estados inmaduros de Pseudocóccidos cuarentenarios

INBIO
INNOVACIÓN & BIOTECNOLOGÍA

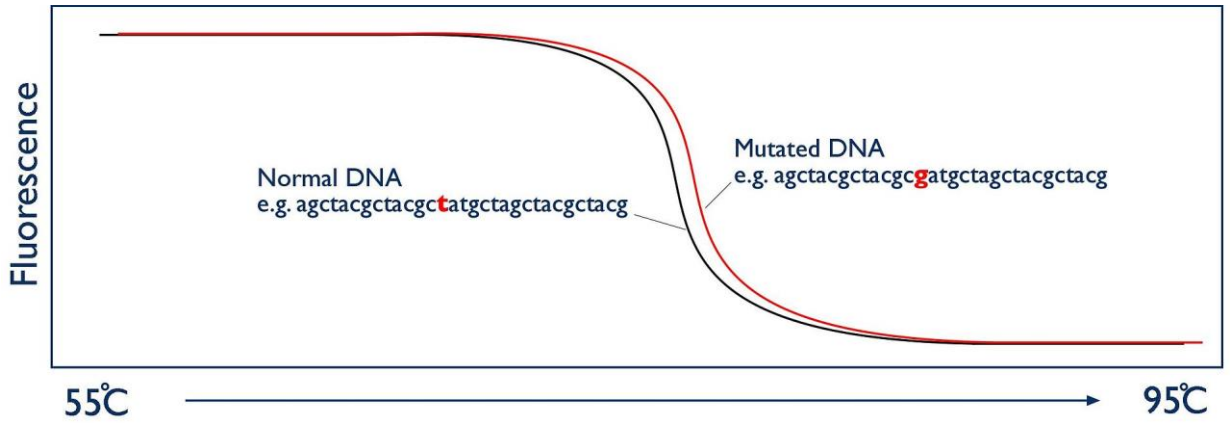
ASOEX
ASOCIACIÓN DE EXPORTADORES DE FRUTAS DE CHILE A.G.
"Juntos, nuestra fruta vale más"

CORFO

Principio del q-PCR HRM: curvas de disociación



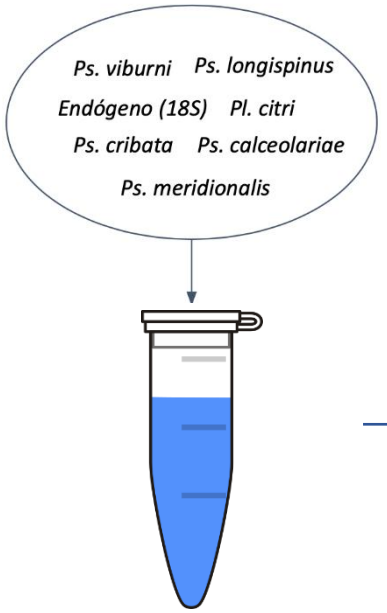
Fluoróforo intercalante se une a la doble hebra de ADN de forma saturante (EvaGreen, LC Green, SYTO 9).

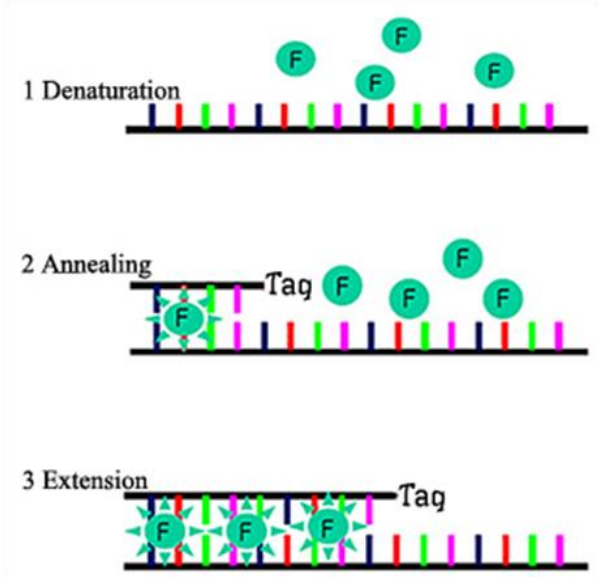


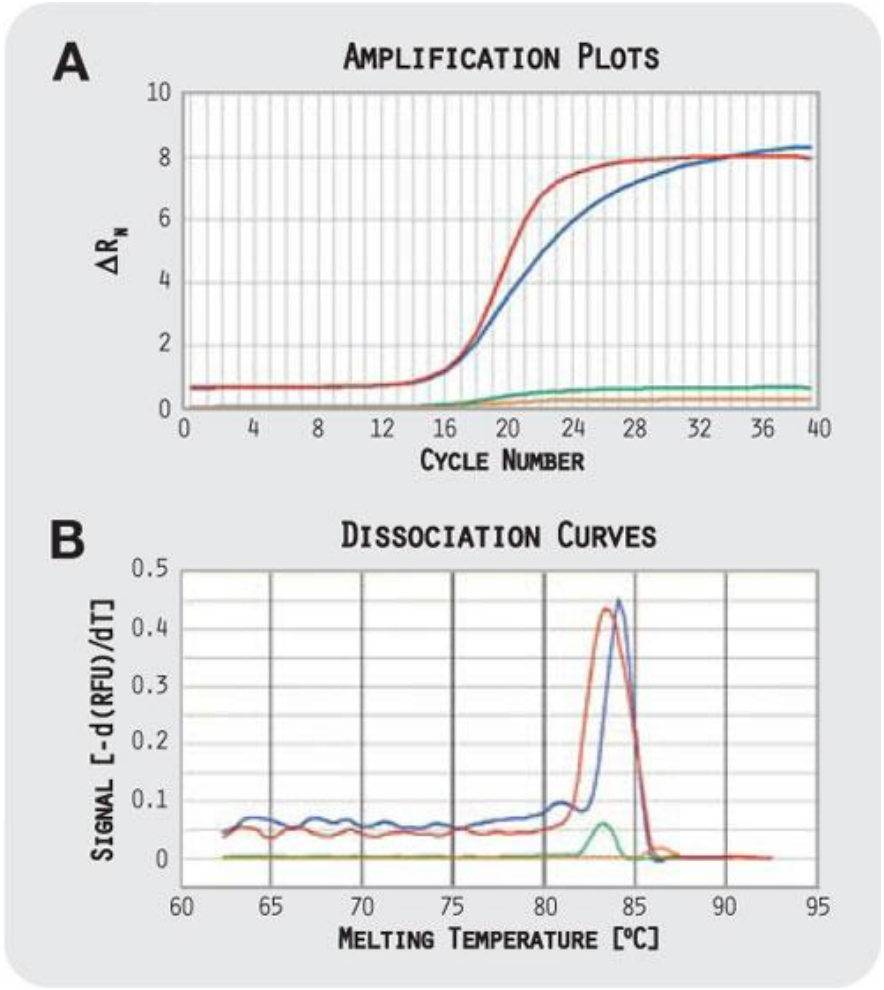
En un análisis post-PCR, se disocia la doble hebra de ADN aumentando la temperatura en incrementos de 0.2 ºC en los que se mide la fluorescencia (alta resolución).

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

Generación de un Kit basado en la técnica de HRM

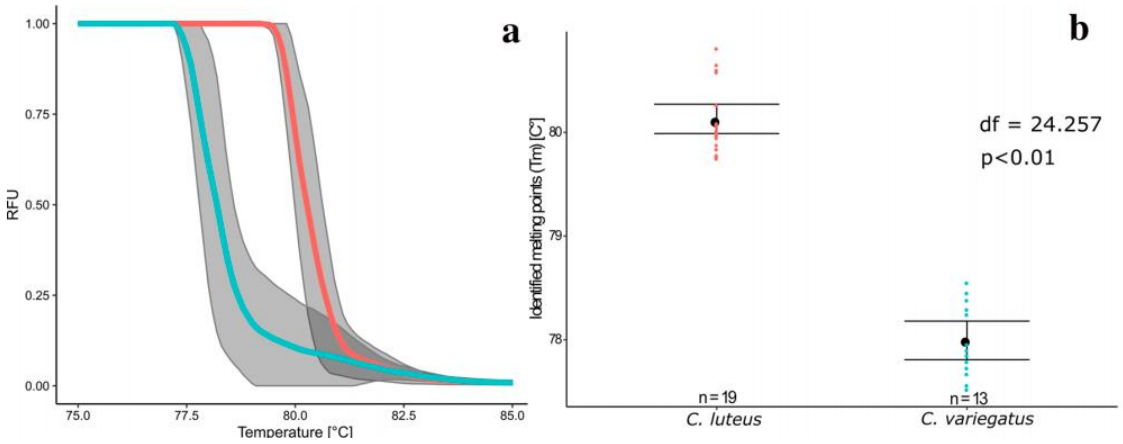






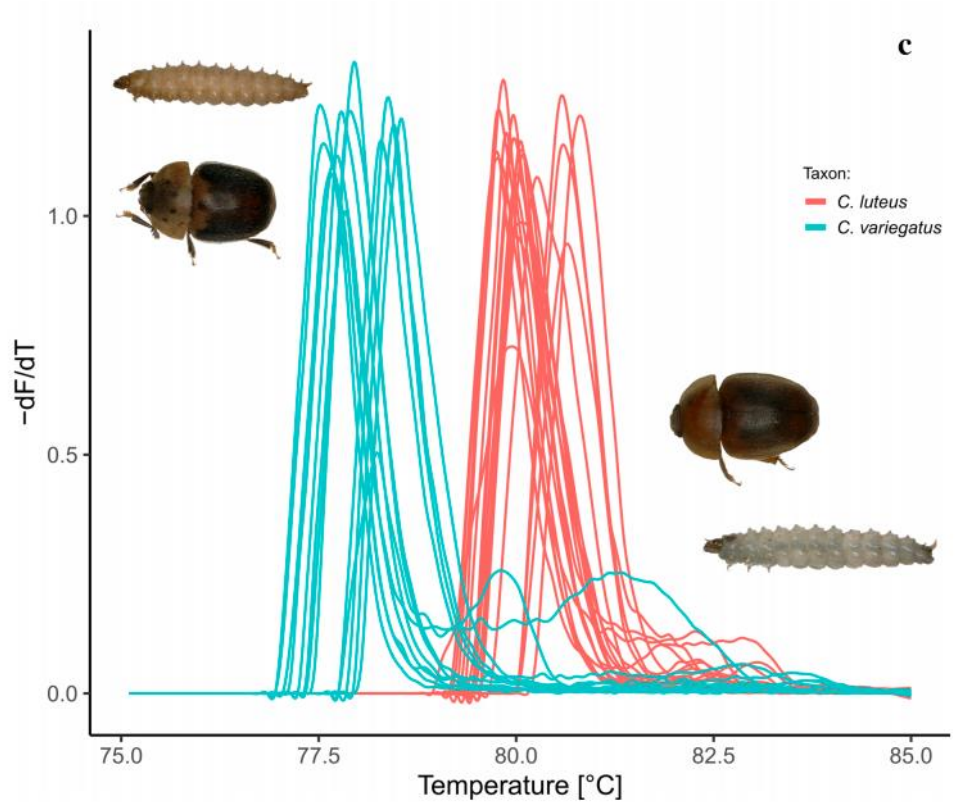
Mezcla de reacción sencilla, fácil de preparar e implementar.

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

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

- Tiempo similar a un q-PCR con sondas Taq Man pero con menor preparación.
- Podría permitir identificación de las seis especies en menos tubos, es decir un manejo mas simple que el kit actual.
- Menor costo (≈35%), dado que no utiliza sondas Taq Man.
- Se puede desarrollar en equipos de menos valor, con solo un canal + HRM.
- Proveedor del kit puede tener un mejor tiempo de respuesta, ya que los reactivos son muchos mas accesibles (especial importancia en eventos como la actual pandemia).
- Permitirá el monitoreo de posibles nuevas especies o variantes genéticas.

Objetivos específicos y Plan de trabajo

- Objetivo 1:
  - Extracción de ADN de 100 especies 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 (muestras ciegas).
  - Validar la técnica ante el USDA (o iniciar proceso de validación).
  - Iniciar proceso de propiedad intelectual

Objetivos y Plan de trabajo

N°	Actividad	Año 1											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Objetivo Específico 1:													
1.1	Pie de Crias de Pseudococcidos												
1.2	Extracción de ADN y secuenciación (n=100)												
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 muestras ciegas (n=100)												
3.2	Validación												
3.2	Patentamiento												

HITO TÉCNICO DE CONTINUIDAD

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)

Primera respuesta correcta

Segunda respuesta correcta

Tercera respuesta correcta