

Generación de un sistema de expresión del gen GCaMP6s en la especie *Danio rerio*

Pablo Emiliano Backhoff García¹

Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz (asesor)²

¹emiliano.backhoff@gmail.com; ²rodriguez.ortiz.lr@gmail.com

¹Universidad Autónoma de Querétaro

² CONACYT-Instituto de Neurobiología, UNAM Juriquilla

Querétaro, México

Resumen

El pez cebra es un modelo biológico muy utilizado en los campos de la investigación biomédica, genética y metabólica, entre otras. Para la presente investigación, utilizando el sistema Tol2, se buscó construir un plásmido de expresión ubicua para el gen sensible al calcio GCaMP6s. De tres plásmidos posibles (p5E_h2afx, p_CMV y p_βactin), se modeló el sistema pDestTol2-pCMV-GCaMP6s por medio de SnapGene y se construyó por restricción enzimática y ligación catalizada por T4. Los fragmentos genéticos y vectores construidos se caracterizaron por fragmentos de restricción por electroforesis en 1% de geles de agarosa y PCR en colonia. A los embriones de pez, durante su estado unicelular embrionario, se les microinyectaron dos sistemas de expresión; el Mix 1 (pDestTol2-ph2afx-GCaMP6s) y el Mix 2 (pDestTol2-pELAVL3-GCaMP6s). Tres días después de la fertilización, se observó la expresión de GCaMP6s. Solo las larvas microinyectadas con el Mix 2 expresaron el gen. Los sistemas con promotores CMV y h2afx no se construyeron exitosamente.

Palabras clave: sistema Tol2, GCaMP6s, microinyección, PCR en colonia, clonación por restricción

Abstract

Zebrafish is a biological model widely used in the fields of biomedical, genetic and metabolic research, among others. With the use of the Tol2 system, we sought to construct a ubiquitous expression plasmid for the calcium-sensitive GCaMP6s gene. From three possible plasmids (p5E_h2afx, p_CMV and p_βactin), the pDestTol2-pCMV-GCaMP6s system was modeled via SnapGene and was constructed by enzymatic restriction and ligation catalyzed by T4. The genetic fragments and constructed vectors were characterized by restriction fragments by electrophoresis in 1% agarose gels and PCR in colony. Fish embryos, during their unicellular embryonic state, were injected with two expression systems; Mix 1 (pDestTol2-ph2afx-GCaMP6s) and Mix 2 (pDestTol2-pELAVL3-GCaMP6s). GCaMP6s expression was observed three days after fertilization. Only micro larvae injected with Mix 2 expressed the gene. CMV and h2afx promoter systems were not built successfully.

Keywords: Tol2 system, GCaMP6s, microinjection, in colony PCR, restriction cloning

Artículo arbitrado

Recibido:
08 de septiembre de 2019

Aceptado:
25 de septiembre de 2019

Introducción

Los iones de calcio (Ca^{2+}) tienen una importante función moduladora en una gama muy amplia de procesos celulares; son mensajeros secundarios ubicuos en las células. Cientos de proteínas tienen como función la modulación de niveles de este ion, así como la transducción de estos en cascadas de señalización (Wu, 2019). La concentración intracelular de iones libres de Ca^{2+} tiende a variar rápidamente en células musculares, así como en neuronas. El desarrollo de un método de monitoreo de estos cambios de actividad neuronal, tanto de poblaciones celulares como de una única neurona, representa un paso clave en el desarrollo de tratamientos para problemas de investigación relacionados con las neuronas y la señalización por Ca^{2+} (Ding, 2014). De igual forma, es una valiosa herramienta que posibilita la medición funcional de proteínas blanco y rutas fisiológicas mediadas por dicho ion.

Existen dos tipos de indicadores utilizados para la visualización de este ion: el calcio químicamente sintetizado, que tiene una alta sensibilidad y una rápida cinética, pero no es selectivo en cuanto al tipo de células, y los indicadores de Ca^{2+} codificados genéticamente (GECI), también llamados proteínas indicadoras fluorescentes de calcio (FCIP). Este segundo tipo de indicador, fueron la primera sonda usada para la medición intracelular de este ion. Derivadas de una proteína bioluminiscente producida por *Aequorea victoria*, posibilitan la visualización duradera no invasiva de células específicas, así como de compartimentos subcelulares; sin embargo, presentan una velocidad lenta de respuesta y una baja intensidad luminiscente.

GCaMP es uno de los GECI más utilizados. Surge de la fusión de una variante circular permutada de proteína verde fluorescente mejorada (cpEGFP) con la proteína de unión a calcio, calmodulina (CaM), en

el carbono terminal; mientras tanto, en el amino terminal, posee un péptido sintético M13 con un dominio de unión a calmodulina (Ding, 2014). La luz emitida por esta proteína puede ser observada bajo un microscopio de epifluorescencia.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo biológico ampliamente utilizado en el campo de la investigación biomédica. Gracias al conocimiento de su genoma secuenciado, la relativa facilidad de su manipulación genética, su alta fertilidad, fecundación y desarrollo fuera del útero, así como la presencia de los órganos principales involucrados en el metabolismo humano, este animal se ha vuelto una poderosa herramienta en el estudio de procesos biológicos, enfermedades y desórdenes metabólicos, como diabetes mellitus tipo 2, falla renal crónica y epilepsia, entre otras (Tsegay, 2019). Además, la alta tasa de producción embrionaria (hasta 200 huevos cada siete días) y el hecho de que el embrión sea casi transparente, con un rápido desarrollo anatómico y fisiológico, permiten estudiar el desarrollo de este vertebrado desde estadios tempranos de la embriogénesis hasta la maduración (Tavares, 2013).

Actualmente, el pez cebra es utilizado para estudiar desde desarrollo fisiológico, inmunidad, comportamiento y nutrición hasta psicología; esto debido al gran grado de conservación funcional de la genética, fisiología y morfología entre el pez cebra y los humanos, a la par del desarrollo de técnicas moleculares y nanotecnológicas (Tsegay, 2019).

El **objetivo** de la presente investigación es construir, por medio de clonación por restricción enzimática y ligación, un vector de transformación en pez cebra para la expresión de la proteína sensible al calcio GCaMP6s en todos sus tejidos.

Metodología

Diseño in silico del sistema de transformación:

Haciendo uso del *software* SnapGene (GSL Biotech LLC), se identificaron los sitios de restricción de diversas endonucleasas tipo II para los plásmidos comerciales: pELAVL3_GCaMP6s, p5E_h2afx, p_βactin, pCMV y pDestTol2pA2. Las enzimas de restricción elegidas fueron:

- pELAVL3_GCaMP6s: *EcoRI* (4), *NotI* (1), *XhoI* (2)
- p5E_h2afx: *NcoI* (1), *SacI* (2), *EcoRI* (1), *NotI* (1)
- p_βactin: *HindIII* (1), *Sall* (2), *EcoRI* (1), *NotI* (1), *SacI* (2)
- pCMV: *EcoRI* (1), *Sall* (2), *NcoI* (1), *SacI* (2)
- pDestTol2pA2: *BamHI* (2), *EcoRI* (1), *XhoI* (1), *NcoI* (1), *HindIII* (1)

Se corrieron simulaciones de las digestiones enzimáticas con electroforesis de agarosa en 1% usando un marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, se realizó la construcción del plásmido de destino (pDestTol2pA2+h2afx/actin/CMV+GCaMP6s) en SnapGene (GSL Biotech LLC).

Clonación de plásmidos de interés

Se generaron clones de los plásmidos de interés por medio de la transformación de células competentes de *Escherichia coli* obtenidas del Laboratorio de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología (INB). Se utilizó 1 µl de cada plásmido [100 ng/µl] por cada vial con 100 µl de células competentes y se mezclaron por pipeteo. Como controles positivos, se utilizaron dos plásmidos que contienen el gen de resistencia a ampicilina y a kanamicina, respectivamente; como control negativo, se dejó un vial sin transformar. Se incubaron todos los viales en hielo por 30 minutos; posteriormente, se incubaron a 42 °C por 90 segundos en un termobloque (Thermomixer Compact, Eppendorf) y se dejaron reposar en hielo a 4 °C por 5 minutos. A cada vial se

le añadieron 800 µl de medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37 °C por 90 minutos, con agitación de 180-200 rpm. Las células se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente (TA), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en el medio sobrante. Cada suspensión se inoculó, por esparcimiento en placa, en cajas Petri con Agar LB con antibiótico, ampicilina o kanamicina. Todas las cajas se incubaron a 37 °C durante 16-18 horas.

- LB+Ampicilina: pELAVL3_GCaMP6s, pCMV y pDestTol2pA2
- LB+Kanamicina: p5E_h2afx y p_βactin

Después de 16 horas de incubación, se tomaron colonias aisladas de cada caja Petri con plásmido clonado y se colocaron en tubos de cultivo con 3 µl de medio líquido LB+amp/kan, dependiendo de la resistencia conferida a las células. Cada tubo se incubó a 37 °C por 16-18 horas.

Purificación de plásmidos

Se siguió el protocolo de purificación GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Fisher Scientific) para todas las clonaciones. Primero, se tomaron 1.5 µl de células en medio LB líquido y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 µl; esto se hizo cuatro veces por cada plásmido. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 minuto a TA y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron los pellets en 250 µl de solución de resuspensión fría con RNasa A y se vortexearon para resuspender el paquete celular. Inmediatamente después, se agregaron 250 µl de solución de lisis y se mezcló por inversión; se agregaron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló por inversión. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos a TA y se transfirió cada sobrenadante a una columna GeneJET. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 minuto a TA, se descartó el sobrenadante y se le agregó a cada columna 500 µl de solución de

lavado con etanol a 96%; después, se volvió a centrifugar a 12,000 rpm durante 30 segundos a TA. Se desechó el sobrenadante, se agregaron 500 µl de solución de lavado y se dejó reposar durante dos minutos antes de volver a centrifugar a 12,000 rpm por 30 segundos a TA. Se volvió a descartar el sobrenadante, se transfirió cada columna a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se les añadió 50 µl de solución de elución. Esta solución se dejó reposar en la columna durante dos minutos antes de centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos a TA. Se recolectó el sobrenadante y se descartaron las columnas. Todas las muestras de plásmido purificado se cuantificaron en un NanoDrop (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific). Se cargaron muestras de 1-1.5 µl y se usó 1 µl de la solución de elución como blanco.

Caracterización de plásmidos purificados

Todas las muestras se dirigieron con dos enzimas de restricción diferentes: una endonucleasa que generará un solo corte y otra que generará dos o más cortes. El volumen final de reacción para todas las muestras fue de 15 µl (10 µl de plásmido purificado + 5 µl *master mix* de reacción). Todas las muestras, más sus controles (plásmido sin cortar), se incubaron a 37 °C durante 60 minutos. El *master mix* de reacción para cada plásmido estaba compuesto por 3 µl de amortiguador de enzima, 1 µl de la endonucleasa II respectiva y 12 µl de agua ultrapura (miliQ). Las enzimas, el amortiguador y el tipo de corte que generaban se muestran a continuación:

- *pELAVL3_GCaMP6s*: *EcoRI* (4) con amortiguador *ReAct3*® y *XhoI* (2) con amortiguador *ReAct2*®
- *p5E_h2afx*: *NcoI* (1) con amortiguador *Anza*® y *SacI* (2) con *Anza*®
- *p_actin*: *HindIII* (1) con *ReAct2*® y *Sall* (2) con *ReAct10*®, *SacI* (2) *Anza*®
- *pCMV*: *NcoI* (1) con *Anza*® y *SacI* (2) con *Anza*®

Todas las muestras se incubaron a 37 °C por 60 minutos y, posteriormente, se corrieron en una

electroforesis de agarosa en 1% con 250 ml de amortiguador de corrida (150 ml TAE1X + 100 ml agua mQ). Se cargaron 15 µl de muestra más 3 µl de amortiguador de carga. El orden de carga para todas las muestras fue: plásmido sin digerir, plásmido con un corte y plásmido con dos cortes. En el primer carril, se cargó 1 µl en la escalera de pesos moleculares GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific). Todas las muestras se corrieron a 80-100 voltios por 30 minutos. Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador (MiniBIS Pro, SERVA) bajo luz ultravioleta (UV).

Diseño de cebadores para clonación

pELAVL3_GCaMP6s:

- A. *Directo*: GCCAAGAATTCCACCCCTA
- B. *Indirecto*: GCACCCGGCGCCGCATCTTC

p5E_h2afx, *p_actin* y *pCMV*:

- C. *Directo*: CCATGGGGATCCAAATAATG
- D. *Indirecto*: GTAAAACGACGGCCAGGATCC

Diseño de cebadores para comprobación: GCaMP6s

- E. *Directo*: GGCAATGGCTACATCAGTGC
- F. *Indirecto*: CGAGATCCTTATCGTCATCG

p5E_h2afx:

- G. *Directo*: CAGCTAAAAGTGAATTTCTC

p_actin:

- H. *Directo*: GCTGAAGATTAACGTTAACG

pDestTol2:

- I. *Directo*: GCTGAACGGTCTGGTTATAG
- J. *Indirecto*: GTTGATAATTCACCTGGCCGTC

Aislamiento de GCaMP6s

Al plásmido *pELAVL3_GCaMP6s* se le realizó una PCR utilizando los cebadores A y B. El programa de PCR fue el siguiente: un ciclo de 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos y 72 °C por 3 minutos, así como un ciclo a 4 °C por 1 minuto. Las soluciones de reacción se muestran en la tabla 1.

Reactivos	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Buffer 10x sin Mg	5 µl	5 µl	5 µl
10 mM dNTP's	1 µl	1 µl	1 µl
50 mM MgSO ₄	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Cebador A	1.25 µl	1.25 µl	1.25 µl
Cebador B	1.25 µl	1.25 µl	1.25 µl
pELAVL_GCaMP6s	1 µl	3 µl	5 µl

Taq polimerasa	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Agua mQ	38.5 µl	36.5 µl	33.5 µl

Tabla 1. Soluciones de reacción para PCR. **Fuente:** elaboración propia.

Una vez finalizada la PCR, las muestras se corrieron en un gel de agarosa en 0.7% y 100 V durante 35 minutos. Se usó 1 µl de GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific), que se cargó en el primer carril; asimismo, se cargaron 5 µl de cada muestra + 1 µl de amortiguador de carga por muestra. Se visualizaron los resultados en un fotodocumentador (MiniBIS Pro, SERVA) bajo luz UV.

Para purificar al amplicón, se corrió el resto de las muestras de GCaMP6s amplificadas. Se cargaron los tubos 2 y 3 (45 µl de muestra + 7 µl de amortiguador de carga) en dos pocillos de un gel de agarosa en 0.7% y la muestra 1 se distribuyó en ambos pocillos. Se corrió la electroforesis a 70 V durante 75 minutos y se visualizó en MiniBIS Pro (SERVA). Las bandas fueron cortadas con un bisturí estéril y se purificaron siguiendo el protocolo del kit QIAquick Gel Purification 250 (QIAGEN).

Construcción del plásmido de destino

pDestTol2_h2afx_GCaMP6s: primero se cortaron p5E_h2afx y GCaMP6s con las enzimas de

restricción *EcoRI* y *NotI*, siguiendo la metodología escrita en la sección de *Caracterización de plásmidos purificados*. Después, se llevó a cabo una reacción de ligación entre p5E_h2afx y GCaMP6s a TA por 270 minutos. La solución de reacción se muestra en la tabla 2 (volumen final 20 µl).

Amortiguador 10x	T4	p5E_h2afx	GCaMP6s	Agua mQ
2 µl	0.4 µl	3 µl	3 µl	11.6 µl

Tabla 2. Solución de ligación h2afx+GCaMP6s. **Fuente:** elaboración propia.

Este nuevo vector se clonó por medio de transformación de *E. coli* (véase sección de *Clonación de plásmidos de interés*.) y se purificó como se reportó en la sección de *Purificación de plásmidos*. Asimismo, el vector fue ligado a pDesTol2 de la misma manera reportada en esta sección, pero se dejó la reacción de ligación durante toda una noche. Una vez ligado, el vector de destino se clonó en bacterias *E. coli* (véase sección de *Clonación de plásmidos de interés*) y posteriormente se purificó (véase sección de *Purificación de plásmidos*).

pDestTol2-CMV-GCaMP6s: se siguió el protocolo reportado en esta sección para la ligación de pCMV con GCaMP6s. La reacción se dejó correr por toda una noche. La solución de reacción se muestra en la tabla 3.

Amortiguador 10x	T4	pCMV	GCaMP6s	Agua mQ
2 µl	0.4 µl	10 µl	1.5 µl	6.1 µl

Tabla 3. Solución de ligación CMV+GCaMP6s. **Fuente:** elaboración propia.

Este nuevo vector se clonó y purificó de células de *E. coli* (sección de *Clonación de plásmidos de interés* y *Purificación de plásmidos*); asimismo, se

comprobó su integridad por medio de PCR en colonia. La solución de reacción es la que se muestra en la tabla 3 (se usaron 18 µl por cada muestra).

Reactivos	Volumen
Amortiguador 10x	26 µl
dNTP's	6.5 µl
MgSO ₄	9.75 µl
Taq polimerasa	2.6 µl
Agua mQ	171 µl
Cebador C	9.1 µl
Cebador D	9.1 µl

Tabla 4. Master mix de reacción para 12 muestras. **Fuente:** elaboración propia.

El programa de PCR consistió en 1 ciclo a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 20 ciclos (94 °C por 5 minutos, 52 °C por 30 segundos, 72 °C por 270 segundos) y un ciclo a 72 °C por 4 minutos. Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa en 1% y 100 V durante 45 minutos. Se cargaron 10 µl de muestra + 2 µl de amortiguador de carga y se utilizó el marcador de peso molecular indicado en la sección de *Purificación de plásmidos*. Los resultados se visualizaron bajo luz UV utilizando un fotodocumentador (MiniBIS Pro, SERVA).

Para purificar el amplicón (pCMV-GCaMP6s), se siguió el método reportado en la sección de *Diseño de cebadores para clonación*, junto con el protocolo QIAQuick Gel Extraction 250 (QIAGEN). Este amplicón se cortó con BamHI y se ligó a pDesTol2. La solución de reacción es la que se muestra en la tabla 5.

Amortiguador 10x	T4	pDestTol2	CMV-GCaMP6s	Agua mQ
2 µl	0.4 µl	1 µl	6 µl	10.6 µl

Tabla 5. Solución de ligación pDesTol2+pCMV-GCaMP6s. **Fuente:** elaboración propia

Este plásmido final se clonó por medio de transformación de células de *E. coli* (véase sección de *Clonación de plásmidos de interés*) y se purificó como está reportado en la sección de *Purificación de plásmidos*. Para comprobar su integridad, se caracterizó como está reportado en la sección de *Caracterización de plásmidos purificados*, utilizando las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII*.

Microinyección de embriones

En un tanque de cruce, se colocaron dos peces cebrá hembras y un macho, separados por una mampara transparente, y se dejaron así durante toda una noche. A la mañana siguiente, antes de que comenzara el ciclo de luz, se quitó la mampara para permitir la cruce de peces. Una vez depositados los embriones en el fondo del tanque, se devolvieron los peces a sus respectivas peceras y se recolectaron los embriones haciendo uso de un colador de cocina. Los embriones atrapados en el colador se lavaron con agua de pecera Blue E3 para eliminar contaminaciones. Los embriones limpios se colocaron en una caja Petri con agua de pecera Blue E3 y se observaron bajo un estereoscópico SZ61 (Olympus Life Sciences) para evaluar su integridad. Los embriones saludables se colocaron en los carriles de una caja Petri de medio sólido (agarosa a 1% y Blue E3). Haciendo uso de una lanceta y el estereoscopio, los embriones se acomodaron en los carriles, dejando poco espacio entre cada uno.

Se acercó el pedestal de inyección a la caja con los embriones y se colocó el capilar a un ángulo de 45° respecto de los embriones. Con mucho cuidado de no destruir el embrión, se insertó el capilar atravesando el corion y llegando a la célula vegetal. Una vez ahí, se inyectó el material genético haciendo uso de una bomba de aire; el tamaño de la gota para inyectar debía ser 1/10 del tamaño del embrión. Para comprobar que el material se hubiese depositado correctamente, se observó la velocidad de difusión

de la muestra dentro del embrión; también se dejó cerca de ¼ de embriones sin microinyectar como control experimental.

Las muestras genéticas que se microinyectaron fueron:

- *Mix 1: mRNA de transposasa, pDestTol2-h2afx-GCaMP6s y rojo fenol*
- *Mix 2: mRNA de transposasa, pDestTol2-ELAVL3-GCaMP6s y rojo fenol*

Una vez microinyectados todos los embriones, se colocaron en una caja Petri con agua de pecera Blue E3 limpia y se incubaron a 28.5 °C durante tres días. Las larvas sobrevivientes se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

Resultados y discusión

Generación de pDesTol2-pCMV-GCaMP6s

Se escogió como vector de destino pDestTol2, debido a su alta tasa de transgénesis, de hasta un 50% (Kawakami, 2007). Este plásmido posee un elemento genético transponible (transposón), el cual puede ser reconocido por la enzima transposasa; esta enzima puede integrar al transposón dentro del genoma de un organismo eucarionte o procarionte cortando en regiones que posean la secuencia de reconocimiento para la transposasa (Pray, 2008). El sistema Tol2, integrado con un gen reportero fluorescente (por ejemplo, cpEGFP), puede ser una poderosa herramienta en la selección de organismos transformados exitosamente (Kwan, 2007). Este sistema también facilita la construcción de vectores complejos con relativa facilidad, gracias al sistema de clonación Gateway (Thermo Fischer Scientific); sin embargo, por falta de reactivos necesarios para este sistema, la construcción se realizó a través de clonación por restricción.

La amplificación de GCaMP6s con los cebadores A y B fue exitosa. Se obtuvo un amplicón con un tamaño

cercano a 1.8 kb (véase **figura 1a**); el tamaño de GCaMP6s es de 1,748 pb. Los cebadores A y B poseían sitios de restricción para las endonucleasas II *EcoRI* (G/AATTC) y *NotI* (GC/GGCCG), respectivamente. El plásmido CMV posee los sitios de restricción para *EcoRI* y *NotI*; por lo tanto, se pudo ligar a GCaMP6s dentro del vector pCMV. La ligación fue catalizada por la ligasa T4. Se utilizaron los cebadores C y D para amplificar el promotor (pCMV) junto con GCaMP6s; estos cebadores tenían codificados los sitios de restricción para *BamHI* (G/GATCC). El nuevo amplicón se encontraba debajo de la banda de 3 kb de la escalera de pesos moleculares. Comparando la simulación por SnapGene, que generó un amplicón de 2,776 pb (véase **figura 2a**), con la PCR en colonia, se clonó y aisló exitosamente pCMV-GCaMP6s (véase **figura 1b**).

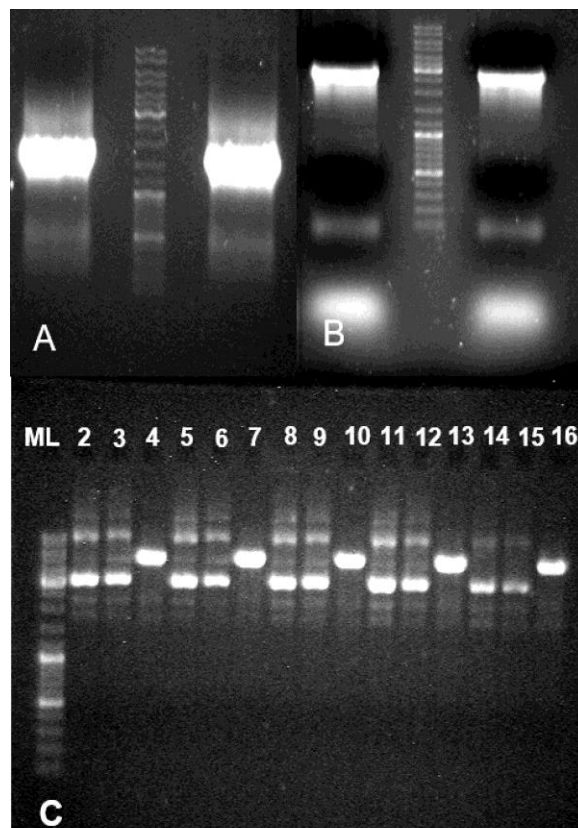


Figura 1: a) amplicón GCaMP6s (1,748 pb) obtenido con cebadores A y B; b) amplicón pCMV-GCaMP6s (2,776 pb) obtenido con cebadores C y D; c) caracterización pDestTol2-pCMV-GCaM6s con enzimas *HindIII* y *NotI*. **Fuente:** elaboración propia.

El plásmido de destino pDestTol2 posee dos sitios de restricción para *Bam*HI; esto permite la ligación del amplicón pCMV-GCaMP6s por medio de clonación por restricción. Como se puede observar en la **figura 1c**, no se logró la ligación del fragmento de interés en el plásmido. En los carriles 3, 6, 9, 12 y 15, se esperaba ver una banda de 7.7 kb generada por la acción de *Not*I, pero se observaron tres bandas, las cuales corresponden al plásmido pDestTol2 en sus formas relajada, enrollada y súper enrollada. Cuando el pDNA se encuentra superenrollado, por la acción de topoisomerasas, disminuye en tamaño. Esto le permite migrar a mayor velocidad debido a una menor fricción contra la agarosa. Cuando el pDNA se

encuentra relajado, o su doble cadena sufre un corte, migra más lento a través de la matriz de agarosa debido a su mayor tamaño y, por ende, superficie de contacto. Cuando ambas cadenas del pDNA se han roto, el pDNA se linealiza y migra a su velocidad normal (García-Milian, 2012). En las bandas 4, 7, 10, 13 y 16, se esperaría ver dos fragmentos, generados por *Hind*III, con longitudes de 5.6 y 2 kb, pero solo se observa una banda con una longitud aproximada a 5 kb. Estos resultados indican que pDestTol2 se religó antes de incorporar el fragmento de interés.

El vector de destino construido puede observarse en la simulación de SnapGene de la **figura 2B**.

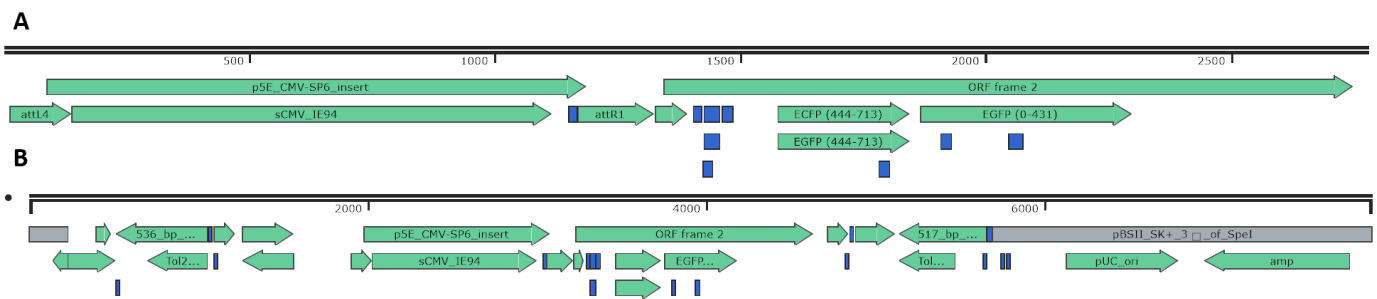


Figura 2: a) amplicón pCMV-GCaMP6s; b) plásmido de destino (simulaciones por SnapGene). **Fuente:** SnapGene.

Larvas de pez cebra transformadas

La fluorescencia generada por la proteína química GCaMP6s sucede cuando el Ca^{2+} se une a la subunidad CaM; esta unión provoca un cambio estructural en el complejo CaM-M13, que lo deja en cercanía con el cromóforo de cpEGFP. Asimismo, esta unión bloquea el acceso de solvente a un espacio antes disponible en el lado de la GFP, lo cual restaura la desprotonación del cromóforo y, finalmente, da lugar a la transición espectroscópica que permite la medición de los cambios en fluorescencia (Ding, 2014).

Como se observa en la **figura 3a**, los embriones microinyectados con el mix 1 no mostraron

fluorescencia; esto pudo deberse a una tasa de transgénesis cercana a 0 y a que todos los peces observados no se transformaran. También pudo deberse a una religación de pDestTol2, lo que habría impedido la incorporación del fragmento ph2afx-GCaMP6s en el vector de destino. Para comprobar la construcción exitosa del vector, se deberá caracterizar por sitios de restricción el plásmido generado. Al término de la estancia del autor de esta investigación, la caracterización de los plásmidos construidos permanecía pendiente.

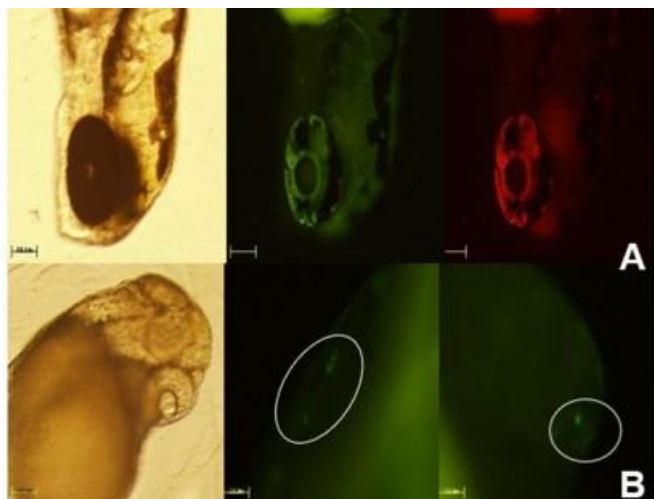


Figura 3: a) larva de pez cebra microinyectada con mix 1, 3 dpf. Se observa la larva en campo claro (izq.), en filtro para ver fluorescencia verde (en medio), y en filtro para descartar autofluorescencia (der.); b) larva de pez cebra microinyectada con mix 2, 3 dpf. Se observa la larva en campo claro (izq.), en filtro para ver fluorescencia verde (en medio) y en filtro para descartar autofluorescencia (der.). Expresión de GCaMP6s señalada en círculos blancos. **Fuente:** elaboración propia.

Los embriones transformados con el mix 2 sí expresaron fluorescencia generada por GCaMP6s. El sistema pDestTol2-pELAVL3-GCaMP6s fue obtenido antes de la participación de un servidor en el proyecto de investigación. Este promotor, a diferencia de pCMV o p5E_h2afx, que se expresan de forma ubicua, es específico para neuronas (Eisen, 2012; Washbourne, 2016). Los pequeños puntos verdes, señalados por círculos blancos en la **figura 3b**, corresponden a la expresión de GCaMP6s únicamente en la corteza neuronal de la larva.

Conclusión

Siguiendo de forma sistemática y consciente la metodología para la clonación por enzimas de restricción, se logró construir parcialmente el sistema de expresión ubicua de GCaMP6s. A pesar de que se clonó GCaMP6s, junto con un promotor de expresión ubicua, no se logró ligar dicho fragmento al vector de destino pDestTol2A2. Aun así, se pudo observar el efecto de este gen en el tejido neuronal y se reforzó el conocimiento de técnicas en biología molecular y bioinformática.

Agradecimientos

Agradecimientos al Dr. Luis Rodríguez por la oportunidad de participar en su proyecto y por su disposición a asesorar y enseñar por medio del trabajo en equipo.

Referencias

1. Ding J. (2014). Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6, *57*, 269-274. Consultado el 7 de septiembre de 2019 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390420>
2. Fowler D.K., Williams C., Gerritsen A.T., & Washbourne P. (2016). Improved knockdown from artificial microRNAs in an enhanced miR-155 backbone: a designer's guide to potent multi-target RNAi. *Nucleic Acids Res.* *44*(5):e48. Consultado el 8 de septiembre de 2019 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797272/>
3. Garcia-Milian R. (2012). *ResearchGate*. Consultado el 8 de septiembre de 2019 en: https://www.researchgate.net/post/Does_supercoiled_dna_migrate_faster_in_agarose_gel_electrophoresis_than_linear_form_of_dna
4. Kawakami K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome biology*, *8 Suppl 1(Suppl 1)*, S7. Consultado el 8 de septiembre de 2019 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2106836/>
5. Kwan K. (2007). The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental Dynamics*, *236*, 3088-3099. Consultado el 7 de septiembre de 2019 en:

- <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.21343>
6. Pray L.A. (2008). Transposons: The Jumping genes. *Nature Education* 1(1):204. Consultado el 8 de septiembre de 2019 en: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/transposons-the-jumping-genes-518/>
 7. Seredick S.D., Van Ryswyk L., Hutchinson S.A. y Eisen J.S. (2012). Zebrafish Mnx proteins specify one motoneuron subtype and suppress acquisition of interneuron characteristics. *Neural Dev.* 2012;7:35. Consultado el 8 de septiembre de 2019 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797272/>
 8. Tavares B. & Santos-Lopes S. (2013). The importance of zebrafish in biomedical research. *Acta Med Port* (5):583-593. Consultado el 7 de septiembre de 2019 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192099>
 9. Tsegay T., Zhen Z., Chao R., Hongling Z., Yalin Y., Qianwen D. et al. (2019). The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, vol. 9 (3): 68-77. Consultado el 7 de septiembre de 2019 en: <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
 10. Wu N. (2019). High-throughput-compatible assays using a genetically-encoded calcium indicator. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 9, 1-17. Consultado el 7 de septiembre de 2019 en: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-49070-8>