



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Estudio de la transfección del vector pEGFP-N1 y su
expresión transitoria en un cultivo de hemocitos del
langostino *Litopenaeus vannamei***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Max SALVATIERRA ALOR

ASESOR

Fernando RETUERTO PRIETO

Lima, Perú

2014

RESUMEN

El langostino blanco *Litopenaeus vannamei* es una especie de gran valor comercial y muy aprovechada en el norte del Perú donde se encuentran las condiciones ideales para su crianza y reproducción, razones que promueven la investigación relacionada a este organismo siguiendo la tendencia de otras especies más estudiadas. Entre los avances más resaltantes de los últimos años se encuentra el desarrollo de la transfección celular, una técnica que permite la introducción de material genético en células hospederas, conduciendo muchas veces a una expresión exógena que provee gran cantidad de información genética y permite diversas aplicaciones biotecnológicas.

En el presente trabajo se estandarizó la transfección de un cultivo de hemocitos de langostino blanco con el vector de expresión pEGFP-N1 aplicando dos cantidades: de 2 μ g y 4 μ g de plásmido, así como 2 tiempos de exposición: 12 y 24 horas. La realización de la transfección requirió de una amplificación previa del plásmido utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α en la que se clonó y luego se confirmó mediante amplificación por PCR obteniendo un amplicón característico de 860 pb. Posteriormente, los productos se purificaron, alcanzando altas concentraciones de plásmido y fueron agregados en cultivos primarios de hemocitos utilizando el medio L15 e incubándolos a 28°C. Luego se realizaron las evaluaciones de citotoxicidad producida por la transfección en los hemocitos a diferentes tiempos, así como la presencia del plásmido dentro de las células y la expresión del gen EGFP.

Los valores de viabilidad del tratamiento con 2 μ g de plásmido por 12 horas de exposición tuvieron mayor similaridad con aquellos mostrados en el tratamiento control, los demás tratamientos mostraron valores reducidos de viabilidad. En todos los tratamientos la viabilidad fue disminuyendo en el tiempo hasta alcanzar valores cercanos al 2%. La presencia del plásmido no pudo ser determinada correctamente en la mayoría de las muestras, sin embargo se detectó hasta las 60 horas después de la transfección. Al analizar la expresión del gen reportero EGFP obtenida de los hemocitos transfectados y el control se obtuvo el valor más alto entre las 48 y 60 horas, distinguiéndose al tratamiento de 2 μ g por 12 horas por poseer una mayor expresión que los demás tratamientos, mas no fue un dato significativo, a su vez no se registró expresión en las muestras control.

En conclusión la metodología utilizada fue efectiva ya que se encontró la expresión del gen reportero, además se podría considerar el tratamiento de 2 μ g por 12 horas como el más efectivo de los 4 evaluados debido a su mayor expresión genética y una menor citotoxicidad comparado con los demás tratamientos.

Palabras clave: Transfección, pEGFP-N1, hemocitos, gen reportero, expresión transitoria

ABSTRACT

Shrimp *Litopenaeus vannamei* is a commercially valuable and highly exploited species in northern Peru where exist ideal conditions to culture and reproduction of shrimp, reasons to promote investigation about this organism following the trend of most other species studied. Among the most significant advances in recent years is the development of cell transfection, which is a technique for introducing genetic material within host cells, many times leading to an exogenous expression, it provides a large amount of genetic information and allows various biotechnological applications.

In present paper it was standardized the transfection of cultured white shrimp hemocytes with expression vector pEGFP-N1 using two amounts of plasmid 2 μg and 4 μg , also two time exposures: 12 and 24 hours. The realization of transfection required a pre-amplification of plasmid using *E. coli* DH5 α strain which was cloned, after it was confirmed by PCR resulting a characteristic 860 pb amplicon. The plasmid was then purified to reach high concentrations of this, and they were added was realized in a hemocyte primary culture using L15 medium incubating at 28°C. Then the cytotoxicity produced by transfection tests was performed at different time, as well as plasmid presence into cell and EGFP gene expression.

Viability values of treatment with 2 μg for 12 hours of exposure had greater similarity to that obtained in the control treatment, other treatment showed lower values. Viability was decreasing in every treatment up to 2%. Plasmid presence can't be correctly identified in most samples, perhaps it was detected up 60 hours post transfection. Lastly, when analyzing the reporter gene EGFP expression from transfected hemocytes and the control sample reached highly value between 48 and 60 hours, treatment with 2 μg for 12 hours was highlights because to have a greater expression than the others, but this isn't a significant data, in turn, gene expression wasn't identified in control samples.

In conclusion, the methodology used was effective as the reporter gene expression was found; also it could be considerate as that treatment with 2 μg for 12 hours as the mostly effective of the 4 evaluated due to its greater genic expression and lower cytotoxicity compared with the others used.

Keywords: Transfection, pEGFP-N1, hemocytes, reporter gene, transient expression.