



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

VALIDACIÓN FUNCIONAL DE
REGIONES ASOCIADAS A
INFLAMACIÓN Y
AUTOINMUNIDAD: rs1033180 E
IRF4 EN ENFERMEDAD CELIACA

Alumna: *Márquez López, Maitane*

Fecha: Junio 2018

Director

Dr. Jose Ramón Bilbao Catala

Codirectora

Dra. Ainara Castellanos Rubio

Curso Académico

2017/18

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1 DISEÑO DE LAS SECUENCIAS GUÍA.....	5
2.2 AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pX459.....	6
2.3 HIBRIDACIÓN Y CLONAJE DE LOS OLIGOS EN EL VECTOR pX459.....	7
2.4. TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS DH5α.....	8
2.5. SELECCIÓN DEL CLON RECOMBINANTE Y PURIFICACIÓN DEL VECTOR RECOMBINADO.....	8
2.6. DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pX459::<i>sgIRF4</i> Y SECUENCIACIÓN.....	9
2.7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS Y SELECCIÓN.....	10
2.8. ANÁLISIS MUTACIONAL MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN.....	11
3. RESULTADOS.....	13
3.1 DISEÑO DE LAS SECUENCIAS GUÍA FLANQUEANTES.....	13
3.2 PURIFICACIÓN DEL VECTOR pX459 Y DEL PLÁSMIDO DIGERIDO.....	14
3.3 TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS DH5α Y PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINADO.....	15
3.4 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pX459::<i>sgIRF4</i> Y SECUENCIACIÓN.....	16

3.5 ANÁLISIS MUTACIONAL MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN.....	17
4. DISCUSIÓN.....	18
5. CONCLUSIONES.....	20
6. BIBLIOGRAFÍA.....	20

1.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

CRISPR/Cas es un sistema de nucleasa microbiano que constituye un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas (Jansen et al., 2002). El genoma bacteriano contiene genes codificantes para la endonucleasa Cas y la secuencia de CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas), que a su vez se compone de una secuencia líder y de distintas secuencias espaciadoras flanqueadas por elementos repetidos, generalmente palindrómicos. De los tres sistemas CRISPR/Cas conocidos, el tipo II es el mejor caracterizado (Jinek et al., 2012). Cuando un plásmido o el material genético de un virus se introduce en el citoplasma de una bacteria, ésta reconoce una secuencia conocida como PAM (motivo adyacente al protoespaciador), e incorpora los nucleótidos adyacentes al PAM como una nueva secuencia espaciadora. Ante una segunda infección, la bacteria es capaz de formar el sistema CRISPR/Cas cuyo RNA (crRNA) reconozca la secuencia exógena adyacente al PAM. El mecanismo de acción de CRISPR/Cas se ilustra en la **Figura 1**.

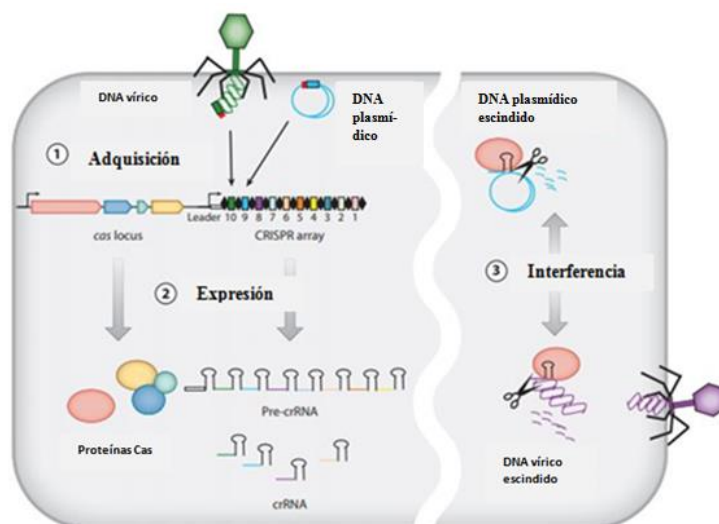


Figura 1. Descripción general del mecanismo de acción CRISPR/Cas de *Streptococcus thermophilus* en tres etapas. Etapa 1: adquisición del espaciador CRISPR. Etapa 2: expresión de CRISPR. Etapa 3: interferencia CRISPR (Adaptado de Bhaya et al., 2011).

En los últimos años, se ha conseguido adaptar el sistema CRISPR/Cas9 para la edición del genoma en células de mamífero mediante la coexpresión de la nucleasa bacteriana Cas9 junto con un RNA guía (sgRNA), complementario a la secuencia de DNA que se quiere editar. En una primera etapa, el sgRNA dirige el dominio catalítico anterior hacia la secuencia de DNA donde se quiere realizar el corte, y posteriormente, se activarán en la célula los mecanismos naturales de reparación del DNA fragmentado (Cong et al., Science 2013). La célula es capaz de reparar dicho corte mediante reparación no homóloga (NHEJ, *non homologous endjoining*) u homóloga (HDR, *homology directed repair*). Esta última, incluye un DNA molde con un alto porcentaje de homología en sus extremos 5' y 3', características que se pueden aprovechar para generar modificaciones precisas y definidas en un lugar diana (Ran et al., 2013).

Utilizando esta herramienta podemos dirigirnos a cualquier gen de interés, reconocer secuencias específicas y silenciar, reemplazar, reparar y remodelar elementos genómicos, lo que la convierte en una herramienta de especial interés en el ámbito de la Biología Molecular y la Terapia génica (Hsu et al., 2014). En 2017, se aplicó por primera vez la técnica CRISPR/Cas9 en embriones humanos, consiguiendo eliminar con éxito una enfermedad hereditaria. Esta investigación se centró en la miocardiopatía hipertrófica, una dolencia del corazón frecuente que provoca muerte súbita en deportistas y personas jóvenes, y está causada por una mutación del gen *MYBPC3*. Para corregir la mutación, se aplicó la tecnología CRISPR, inyectando simultáneamente los espermatozoides de un hombre enfermo y una secuencia CRISPR con la versión correcta del gen en óvulos de mujeres sanas. Los resultados tuvieron una tasa de éxito del 72%, consiguiendo por primera vez un número sustancial de embriones totalmente viables y sin errores genéticos adicionales. El uso de CRISPR permitirá, entre otros, desechar menos embriones en los procesos de reproducción asistida (Ma et al., 2017).

Además, CRISPR/Cas9 presenta una serie de ventajas frente a otras herramientas de edición genómica, como las nucleasas de dedos de zinc ZFNs (Kim et al. 1996) y la tecnología de TALENs (Joung and Sander, 2012), ya que es más eficiente y específica a la hora de localizar y modificar una secuencia, de fácil diseño e introducción, rápida y más económicamente rentable (Pattanayak et al., 2014).

Debido a su modo de actuación y eficacia, la herramienta CRISPR/Cas9 presenta especial interés en el estudio y la edición de polimorfismos de una sola base (SNPs) asociados con el riesgo a desarrollar enfermedades complejas, como la enfermedad celíaca (EC). La EC es una enfermedad crónica inmuno-mediada, común y a la vez compleja, en la que se genera en el intestino delgado una respuesta inmunitaria mediada por células T contra los fragmentos de gliadina de las proteínas del cereal de trigo, centeno y cebada, lo que conduce a la atrofia de las vellosidades. Además de las variantes HLA de riesgo necesarias para desarrollar la enfermedad –HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8–, se han encontrado otros SNP en diferentes regiones del genoma que también contribuyen al riesgo de padecer la EC. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y el proyecto Immunochip han identificado otros 39 *loci* de riesgo no HLA (**Figura 2**). Muchos de estos *loci* también están asociados con otras enfermedades autoinmunes o enfermedades crónicas inmuno-mediadas, como la diabetes tipo 1 y la artritis reumatoide (Trynka et al., 2011).

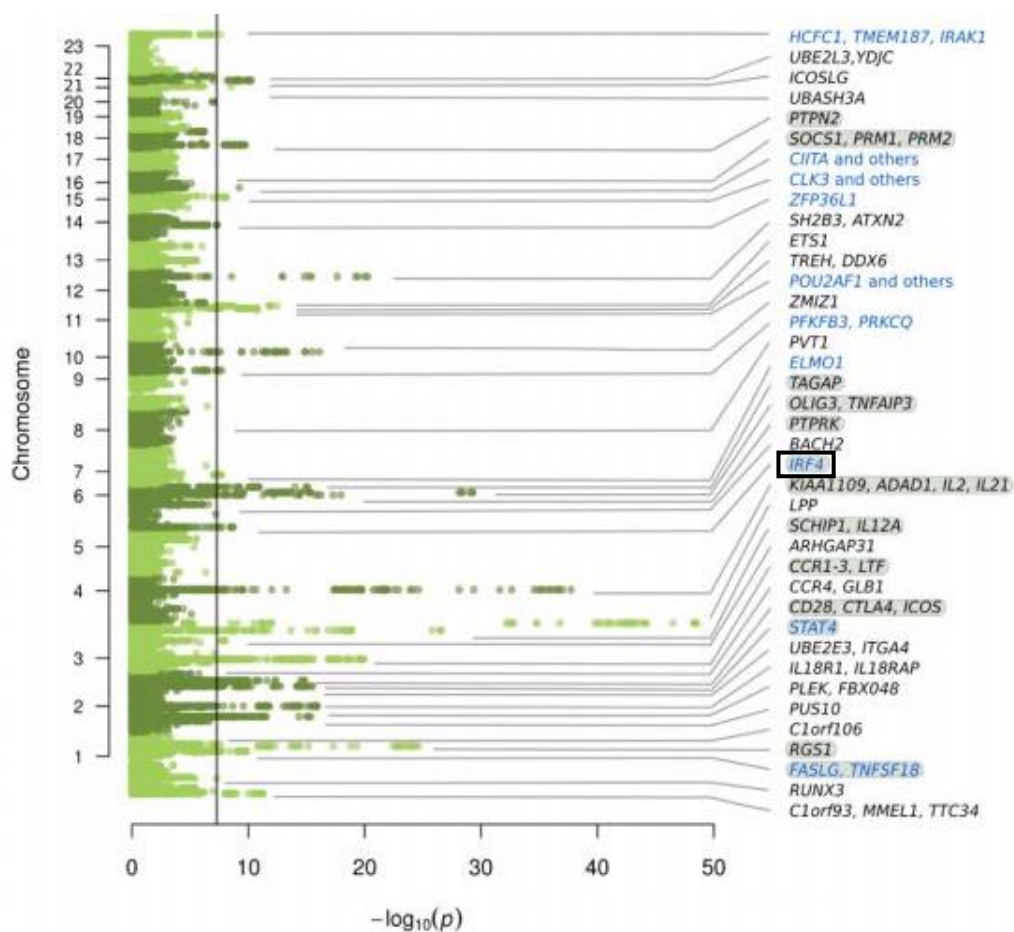


Figura 2. Diagrama de Manhattan de los *loci* de riesgo no HLA implicados significativamente en la EC. La gráfica muestra los *loci* de susceptibilidad a EC identificados por el proyecto ImmunoChip. El gen en el que se centra este proyecto aparece encasillado. El eje X muestra los valores de $-\log_{10}(p)$ de la asociación para cada SNP y el eje Y muestra su posición cromosómica. Los *loci* nuevos y conocidos están indicados en la columna de la derecha: los nuevos están indicados en azul y los *loci* con múltiples señales de asociación están indicados con fondo gris. El umbral de significación está situado en $p=5 \times 10^{-8}$ (Adaptado de Trynka et al., 2011).

En este estudio, nos centraremos en el SNP rs1033180 localizado en el cromosoma 6:383546, GRCh38.p12 (Ensembl.org), el cual pertenece a una región intergénica próxima al gen *IRF4* (Interferon Regulatory Factor 4), relacionado recientemente con la EC (Trynka et al., 2011). En la **Figura 3** se ilustra su contexto genómico.

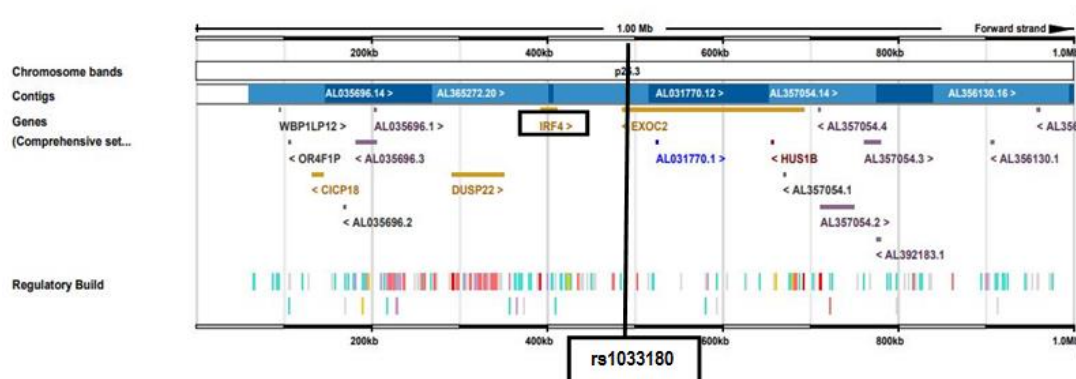


Figura 3. Contexto genómico del SNP rs1033180 y del gen *IRF4* en el Cromosoma 6, GRCh38.p12. El SNP se encuentra a aproximadamente 100 pb aguas abajo del gen *IRF4* (Adaptado de Ensembl.org).

El gen *IRF4* codifica proteínas que pertenecen a la familia de factores de regulación del interferón. Estos factores son importantes en la regulación de interferones en respuesta a infecciones y en la regulación de genes inducibles por interferón. *IRF4* es específico de los linfocitos T y regula negativamente la señalización de los receptores tipo Toll (TLR) fundamentales para la activación de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. Entre sus vías relacionadas están la señalización de interferón de tipo II (IFNG) y las rutas de señalización de IL-4. Las enfermedades asociadas con *IRF4* incluyen Mieloma Múltiple y Linfoma de Colon (Genecards.org).

El objetivo del presente trabajo es la aplicación de la técnica de edición genómica CRISPR/Cas9 en monocitos humanos, con objeto de modificar el SNP rs1033180 y estudiar su influencia sobre *IRF4* y así como su implicación en el desarrollo de la enfermedad celiaca.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DISEÑO DE LAS SECUENCIAS GUÍA

En primer lugar, se realizó el diseño de las secuencias guía (sgRNA) para su posterior clonación en el plásmido pX459. Las sgRNA tienen como función dirigir a Cas9 a la región genómica donde se quiere realizar el corte. Se utilizó la base de datos de polimorfismos de un único nucleótido (dbSNP), un archivo público y gratuito al que se puede acceder online (Ncbi.nlm.nih.gov.), y que contiene todas las variaciones genéticas identificadas. Como criterio de búsqueda, se introdujo el

código *rs*, el cual corresponde al número de identificación del SNP de estudio. Seguidamente, se obtuvieron datos de interés como la clase de variación genética, la frecuencia del alelo menor y la secuencia genómica de la región que flanquea el SNP en formato FASTA, donde además viene indicada la posición y los dos alelos del SNP (C/T) por una Y.

Después, a través de la herramienta bioinformática CRISPR Design Tool (Tools.genome-engineering.org.) que identifica y clasifica los sitios diana adecuados utilizando el fragmento genómico de la región de interés, se seleccionó manualmente las secuencias guía mediante la identificación de una secuencia de 20 nt.

Este proceso de búsqueda se centró en el SNP rs1033180, localizado en el cromosoma 6:383546, GRCh38.p12, región intergénica próxima al gen *IRF4* de humanos, para el cual se diseñaron una secuencia guía y su complementaria.

2.2 AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pX459

Se prepararon 250 ml de caldo Luria Bertani (LB) con ampicilina a una concentración de 50 µg/ml. Para ello, se suspendieron 5 g de medio LB (CAT#1083.00) en 250 ml de agua milli-Q. A continuación, se mezcló y se disolvió con agitación y se hirvió durante un minuto hasta la disolución completa. El medio se esterilizó por filtración con membrana de 20 µm de poro (Atlas and Parks, 1993). Posteriormente, se añadieron 250 µl de un stock 1000X de ampicilina (50 mg/ml).

A continuación, se inocularon 5 µl de un stock conservado a -80°C de *Escherichia coli* DH5α con el plásmido pX459 (**Figura 4**) en 2 ml de medio LB con ampicilina 50 µg/ml. El cultivo se incubó a 37°C con agitación durante 24 horas, con el fin de obtener cantidad suficiente de vector.

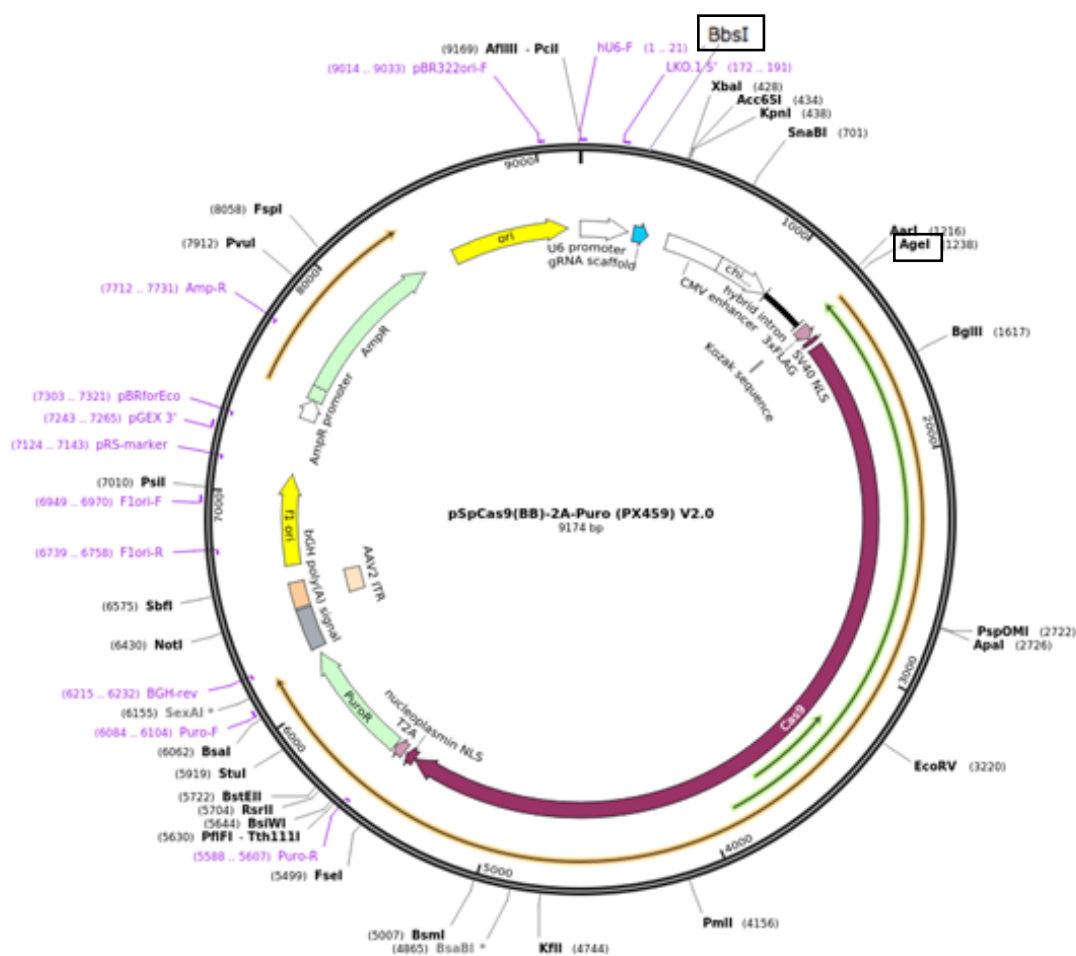


Figura 4. Mapa de secuencia completo para pSpCas9 (BB) -2A-Puro (pX459) V2.0. El pX459 es un vector de expresión de 9174 bp de longitud. Se puede digerir usando *BbsI* y *AgeI* y contiene los genes de resistencia a la ampicilina y a la puromicina como marcadores de selección en bacterias y células eucariotas, respectivamente (Adaptado de Addgene.org).

Posteriormente, se realizó la purificación del DNA plasmídico del cultivo bacteriano usando el kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure de acuerdo a las instrucciones del fabricante (**Anexo 1**).

2.3. HIBRIDACIÓN Y CLONAJE DE LOS OLIGOS EN EL VECTOR pX459

En esta fase del proyecto se realizó el clonaje de los oligos en vector pX459 siguiendo el protocolo de Zhang Lab (Addgene.org) (**Anexo 2**).

En primer lugar, se digirió 1 µg del vector pX459 con la enzima de restricción *BbsI* durante 30 minutos a 37°C. La mezcla contiene 10 µl de plásmido, 1 µl de *BbsI*, 2 µl de tampón de digestión 10X, y ddH₂O hasta un volumen total de 20 µl.

A continuación, se purificó el plásmido digerido mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en TAE, durante 20 min a 150V y se extrajo el DNA de la banda según el protocolo QIAquick Gel Extraction.

Seguidamente, se fosforilaron y anillaron cada par de oligos para formar un fragmento de doble hebra que pudiera introducirse en el vector digerido. La mezcla contiene 2 µl de la pareja de oligos complementarios (*Forward* y *Reverse*), 1 µl de enzima T4 PNK, 1 µl de tampón de T4 DNA ligasa y ddH₂O hasta un volumen total de 10 µl. Se anillaron en un termociclador siguiendo las indicaciones del **Anexo 2**.

Posteriormente, se realizó la ligación del plásmido digerido con el fragmento de doble hebra formado por los oligos previamente fosforilados e hibridados. La mezcla de ligación contiene 1 µl de plásmido pX459 digerido con *BbsI* (22ng), 1 µl del dúplex de oligos, 2 µl de tampón de ligación 10X, 1 µl de enzima ligasa y ddH₂O hasta un volumen total de 20 µl.

2.4. TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS DH5α

Una vez descongeladas las células competentes de la cepa DH5α de *E.coli* en hielo, se añadió la mezcla de ligación preparada en el apartado 2.3. La mezcla se incubó en hielo durante 15 min y se sumergió en un baño a 42°C durante 30s. Después, se incubó en hielo durante otros 2 min. Se añadieron 300 µl de medio SOC y se incubó a 37°C con agitación durante una hora. Se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla. Finalmente, se sembró el producto de la transformación en agar LB complementado con ampicilina 50 µg/ml y se incubó durante la noche a 37°C.

2.5. SELECCIÓN DEL CLON RECOMBINANTE Y PURIFICACIÓN DEL VECTOR RECOMBINADO

Se pusieron a crecer 5 colonias del cultivo en placa del apartado anterior, cada una de ellas en 2 ml de caldo LB con ampicilina 50 µg/ml en un tubo estéril, siguiendo las

indicaciones del apartado 2.1, y se incubaron en movimiento a 37°C durante toda la noche.

Se realizó la purificación del vector usando el kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure de acuerdo a las instrucciones del fabricante (**Anexo 1**) y el DNA plasmídico recombinante se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm en un Nanodrop.

2.6. DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pX459::sgIRF4 Y SECUENCIACIÓN

Se digirió el vector recombinante con las enzimas de restricción *AgeI* y *BbSI*. La mezcla de esta digestión contiene 1 µl de plásmido, 0,5 µl de *BbSI*, 0,5 µl de *AgeI*, 2 µl de tampón tango y ddH₂O hasta un volumen de 20 µl. Se incubó a 37°C durante 30 min y después se corrieron las cinco muestras en un gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE junto con el pX459 sin digerir, que corresponde al control y el marcador de pesos moleculares a 150V durante 20 minutos. Esta doble digestión enzimática con los enzimas de restricción *BbSI* y *AgeI* permitirá discriminar entre clones positivos, que serán aquellos que tengan la sgRNA integrada en el vector, y negativos (**Figura 5**).

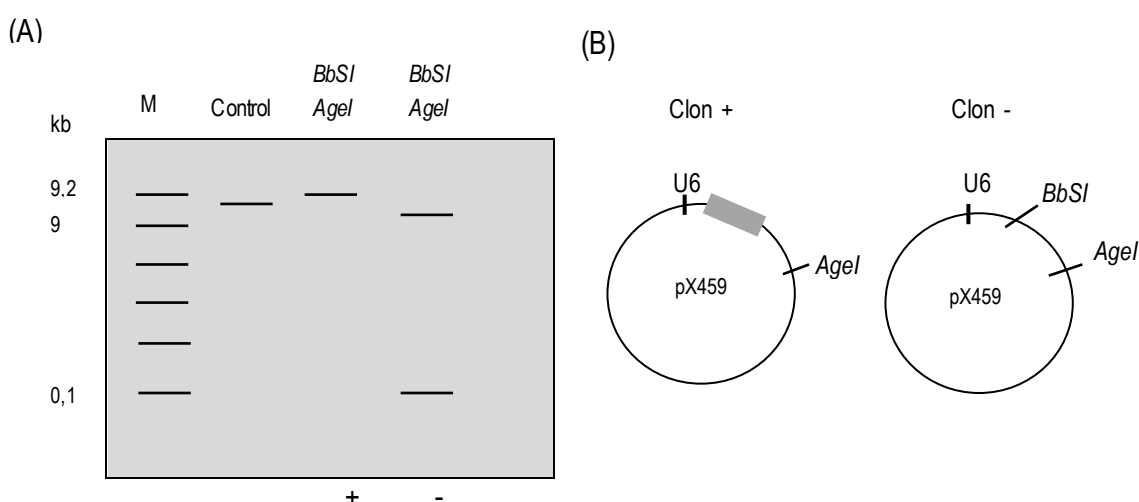


Figura 5. Cortes del plásmido pX459 con las enzimas de restricción *BbSI* y *AgeI* para discriminar entre clones positivos y negativos. Los clones positivos serán aquellos que han clonado las guías en el plásmido y los clones negativos los que no hayan clonado las guías. **A) Esquema de una electroforesis en gel de agarosa.** El control corresponde al plásmido pX459 sin digerir. Si el clon es positivo, se observará una única banda correspondiente al corte con *AgeI*. Si el plásmido no ha insertado las guías, se observarán dos bandas correspondientes al corte con las enzimas *BbSI* y *AgeI*. **B) Esquema del plásmido con y sin guías clonadas.** El rectángulo gris corresponde a la localización que tendrán las guías en caso de ser clonadas en el plásmido.

El inserto del plásmido recombinante purificado se secuenció mediante el método de Sanger utilizando un cebador U6.

2.7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS Y SELECCIÓN

Una vez identificado el plásmido recombinante que contiene el inserto, se procedió a transfectarlo a las células U937. El modelo de línea celular U937 es utilizado para estudiar el comportamiento y la diferenciación de monocitos humanos. Para su descongelación, se depositó un vial con células previamente esterilizado con etanol 70%, en un baño a 37°. Después, se transfirió el contenido del vial a un tubo de centrífuga con 9 ml de medio y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con medio nuevo para cultivarlo en suspensión en un frasco (Lgcstandards-atcc.org) a 37°C y 5% CO₂.

Posteriormente, se contaron las células en una cámara Bürker. Para ello, se preparó una muestra de 10 µl de células y 10 µl de azul tripán como marcador, que permitirá la observación de las U937 al microscopio óptico. Para el conteo de células, se introdujo 10 µl de la muestra preparada en la cámara de recuento y se observó la muestra al microscopio con el objetivo de 4x. Se observó que la cuadrícula de recuento muestra 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm², y cada cuadrado grande está dividido por líneas dobles en 16 cuadrados medianos, cada uno con aristas de 0,2 mm. A continuación, se procedió al conteo con el objetivo de 40x.

$$Células/\mu l = \frac{n^{\circ} \text{ células contadas (cuadrante 1+2)}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{)} \times \text{profundidad cámara (mm)} \times \text{dilución}} \quad (1)$$

La concentración celular en células/µl se determinó con la **Ecuación 1**. (Brand.de).

Paralelamente, se inocularon dos pocillos con 500 µl de medio Optimem, uno con 200 ng de pX459, que permitirá observar los efectos de Cas9 y un segundo pocillo con 200 ng del plásmido recombinante. Se añadieron 6,5 µl de reactivo de transfección X-tremeGENE HP por pocillo, lo que permitirá la entrada de DNA al interior celular (Sigma-Aldrich), dejando actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras el conteo, se añadieron 10^5 células a los dos pocillos que contienen 500 μ l de medio Optimem y 6,5 μ l de reactivo de transfección. Tras 24h de incubación, se añadió 2 μ g/ μ l de puromicina para seleccionar las células que han recibido el vector.

2.8. ANÁLISIS MUTACIONAL MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN

Se diseñaron los cebadores *forward* y *reverse* necesarios para amplificar el fragmento la región del SNP. Para ello, se empleó la herramienta Primer-BLAST (Ncbi.nlm.nih.gov) a partir de la secuencia que flanquea el SNP de estudio en formato FASTA. El cebador *forward* flanqueará los primeros 400 pb y el *reverse* los últimos 400 pb de la secuencia. En cuanto a las temperaturas de fusión de los cebadores, se seleccionó un rango de entre 53-60°C y una diferencia de temperatura máxima entre ambos de 3°C. Los parámetros seleccionados para el diseño de cebadores se recogen en la **Figura 6**.

Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Reset page Save search parameters Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) Clear

Range

From To

Forward primer 1 400

Reverse primer 600 1000

Or, upload FASTA file Ningún archivo seleccionado

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)

PCR product size

Min Max

500 1000

of primers to return

10

Primer melting temperatures (T_m)

Min Opt Max Max T_m difference

57.0 60.0 63.0 3

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

No preference

Exon junction match

Exon at 5' side Exon at 3' side

7 4

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion

Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range

Min Max

Figura 6. Parámetros seleccionados en la herramienta informática Primer-BLAST para el diseño de los cebadores que amplifican la región que flanquea el SNP rs1033180. (Adaptado de Ncbi.nlm.nih.gov)

Primer-Blast nos dio como resultado una lista de cebadores de 20 pb de longitud, de los cuales se seleccionó la primera pareja recogida en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Diseño de cebadores *forward* y *reverse*. Además del sentido, se muestra la longitud (pb), la temperatura de fusión (°C) y el porcentaje de GC (Adaptado de Primer-BLAST).

Cebador	5'-3'	pb	Tm (°C)	GC (%)
<i>Forward</i>	GGGCCAGGCTATCACATCAG	20	60,25	60
<i>Reverse</i>	GTTCTGGGTGTGGAGTCGTC	20	60,32	60

Los parámetros seleccionados para la PCR se recogen en la **Tabla 2**. La temperatura óptima de hibridación de los cebadores se determinó realizando una PCR en gradiente de temperatura de 50-70°C, que se visualizó en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE durante 20 min a 150V.

Tabla 2. Parámetros de la PCR. Se recogen el nº de ciclos, la temperatura y el tiempo de cada uno de los tres procesos: desnaturalización, hibridación y amplificación.

Nº ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Amplificación
1	95°C, 2min		
2-31	95°C, 20s	50-70°C, 20s	72°C, 30s
32			72°C, 3min

A continuación, se realizó una PCR de las células U937 con el plásmido pX459 vacío y la de las células U937 transfectadas con el plásmido pX459::*sgIRF4*. Para ello se prepararon dos mezclas de reacción recogidas en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Mezclas de reacción para la PCR. El master mix contiene Taq polimerasa, tampón de reacción, dNTPs, MgCl₂ y ddH₂O.

	U937	IRF4
DNA (µl)	1	1
Cebadores 10 µM (µl)	0,5	0,5
2X Master Mix (µl)	25	25
H ₂ O (µl)	25	25
Total (µl)	51,5	51,5

Se cargaron los productos de la PCR en un gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE a 150V durante 20 min para verificar que la PCR había funcionado. A continuación, se purificó el amplicón de las U937 transfectadas con el kit de purificación NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (**Anexo 3**) y se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm en un Nanodrop. Las muestras se secuenciaron mediante el método de Sanger. Se compararon las secuencias de DNA de las células U937 transfectadas y sin transfectar para analizar si las primeras mostraban mutación en la región del SNP tras la transfección.

3. RESULTADOS

3.1 DISEÑO DE LAS SECUENCIAS GUÍA FLANQUEANTES

En la **Figura 7** se ilustra la secuencia genómica de la región que flanquea el SNP rs1033180 y que se utilizó para diseñar las guías. La posición y los dos alelos (C/T) del SNP vienen indicados con una Y.

```

AAAGACAGCC AGGATTCAGC CCGCCTCAGT GGAGGGCCCC ACAGCACAAA GGGACCAAGA AGGGATAGCA
AGAGGACAGC CAGAGTGCCC ACAAGCTCGG CAGGAAGGAG GCTCACATCG CCGCGGAAGT CTCGTGATGG
TTCTGGTAGA ATCGTCCCTC TGAAACCTTC TGCTGCCATT ATTGGGTGCT GTCCAATATG CCTTACGCAA
AACACTGACA ATAGCATACA CCTTTCCAGA ATGCCGGCAC GCGCTGTGCA ATGCCCAAAC TGTCCCTGTG
AGTTGAATGC CCTGGCAGG ATGCGTGTCC ACTCCCGCAG GGCCGTGGGT GCCTCCCTTG TCTCACTCCT
CTGCTTCAAC CCTTCCAGA ACTCTGAAGG TTTGAGATGA AATGACTGAG CCACACCTAG TGCAGGAATG
AGCACCAGGG CCTCTCTGCA ACGGCTGCTT AAGGGCCACA GGATAAGCAT AGTGTGGCGC CCCAGTTAT
TCCCTGTTTC GCTCATTGGA CCACCCTGAT AGGCTTCAGG GAGGCAGGAA CCTCCTCTAA GGCAGCAGGA
GAGGGTGA TGGGCGAGC AACAGGTGCA TCTCATGCCT CCGTGTCTC CATAGGGAGG GAGGTGGGCT
AAGAGGCGAG TGGGCGAGG GCCTGGGCCA GCGTGAAGTG TCAGGAGTAA GGGGGGAGAA GACTGGAGGG
GGCAAATCA GGAGCAGCT GAGGCTGCAC TGTGCAATA CAAGCCGGT TACGTCTGTG TAGCTTAGCT
TCCCCAGCCC ACCTGAGCCA GAGCTGGGTC TGCCCGTCTA CCGCTTCTA TTGACATCCA GCAACTCCAA
ATGACCTCTC CCATCTCAAT GGGCTCATCT CCGAAGCCGA ATCTTATAGC CTGCTTCTCC TCCCACCCAG
GCTATAGTGG GAAATCAATG AGGAACTGG TTGAAATGCAT CGCACGGCT CTCTGGTGTG TGAGAGAAGC
TTCATAGCA GCAGGCTGCC CCTGGTGGGC AGGTGCGCA TGGAGGTACC ACGCTCCCA TGCAGCGAGT
AAGAAGGGCA AGGAGAGCTT GTCAGGGGAG TGGGCCAGGC TATCACATCA GATGGACCAG GCCTCGCATC
GCTCTCTGCA TCTAAGCAA CGTCTGACT TGAGTGCCTG GGTTTGTGGT ACTGCAATGC CACAGTACCT
TGGGGAGCCC CCAGGCAAGC CAAGAAAGTT CTGGGAGGCC ACAGCCCTTC ACTCAAGTTC AAAGGTTCAA
AGCAGGAT CTGTGTCACA CTTGCGAAGG TGCCACCCC AACAGAAGCT GTGGCTCTGC AGGACACGTG
CGGGGTAGAC CTCTAAGGCC TTGTCCAGT GGAAATGCC TCCCCTTGG CCTGGGTAGC TGCTCACGCT
TCTGAAACGG GAAAAATCAA CTGCATTCCT GAATGGGAGC CTCAGAGCAT TAGAAAAGAT AATGTTCTGA
TTTTTTAAAG CTAAT Y GTATATGGAA GGAAGCTGAA AGAGGACTTT TGATGAGTCA CCTAATGTTG
ATGTTGAAAT AAACCTAATG ACCCTCTGGC TAAAACTGT TCTCATTTGG GAAGCACCTG AACCTCATT
CTCCCGCCAC TGCTTGACC TCTGGAAAGC AAGGAGCAAA GGCACTCA GCAGCTCCCG CTCCAAAATG
CTCTCCCGAG TCCTCCCAAG CAGCCAGAGG ACGACTCCAC ACCCAGAACC CAGAGTGGCC TGGGAACCAG
GCCTCAGGTT CCTGGCCCAT TTGTCAATGC CCAGGGTCCT CCTGCCAGGA ATCCCCCAC ATCTGCCCCT
GCCTAGAGAA GCCCAGCTCT TCCATCAAAG TTTGCTCAA ATGTCACTGC ATGTTACGTC TTCTTCCAC
ACTCCACATA GCCTTACGC ATCATGCTTG GTTTGCTGAG CTATGTGTGG GGTCTTTCCT TGCCAA CCGT
TCTTCCCTG AGAGGTGCAA TGACCTCATA TTGAGGCTGT CCAC TCCCC ACTCCGACC CCATCCACCA

```

Figura 7. Secuencia genómica de la región que flanquea el SNP rs1033180 en formato FASTA. El SNP viene indicado por una Y. (Adaptado de Ncbi.nlm.nih.gov).

Este SNP corresponde a la sustitución de una citosina (C) por una timina (T). La frecuencia alélica del alelo menor (T) es de 0,022 según el Proyecto 1000 Genomas (Ensembl.org). En la **Figura 8** se pueden observar las frecuencias alélicas de las distintas poblaciones.

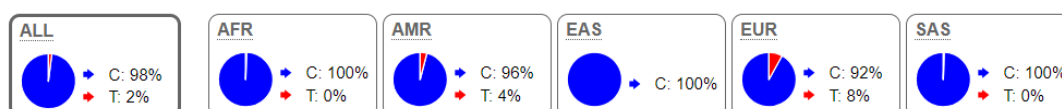


Figura 8. Frecuencias alélicas del SNP rs1033180 de las distintas poblaciones (Adaptado de Ensembl.org).

En la **Figura 9** se recoge un esquema de la posición de las secuencias guía sobre el SNP rs1033180 y en la **Tabla 4** las secuencias guía diseñadas.

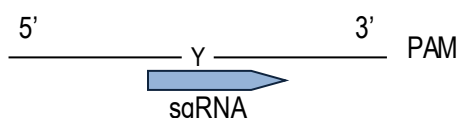


Figura 9. Esquema de la posición de la secuencia guía en la región del SNP rs1033180. El SNP viene indicado por una Y (Adaptado de Tools.genome-engineering.org).

Tabla 4. Diseño de la secuencia guía (*forward* y *reverse*) para el SNP rs1033180. Se especifica las secuencias guía que incluye nuestro SNP. La posición del SNP en las guías aparece indicada sobre fondo negro (Adaptado de Tools.genome-engineering.org).

SNP	Dirección	Secuencias guía
rs1033180	<i>Forward</i>	5'- CACCGTAAAGCTAAAC \blacksquare GTATATGGA-3'
	<i>Reverse</i>	5' - AAACCTCATATAC \blacksquare TTTAGCTTTAC -3'

3.2 PURIFICACIÓN DEL VECTOR pX459 Y DEL PLÁSMIDO DIGERIDO

La concentración de DNA plasmídico purificado se midió espectrofotométricamente a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop. Se obtuvo una concentración de DNA de 200 ng/ μ l.

En la **Figura 10** se recogen los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE tras la digestión del vector pX459 con el enzima de restricción *BbSI*. La extracción de la banda de DNA permitió purificar el plásmido digerido.

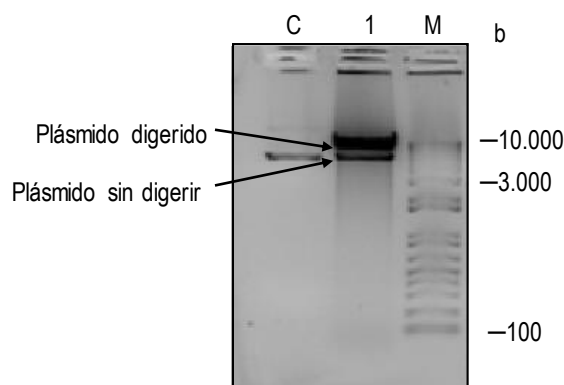


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE. La calle C corresponde al control (pX459 vacío); la calle 1 corresponde al vector digerido con *BbSI*; la calle M corresponde al marcador de peso molecular.

La concentración de DNA plasmídico digerido y purificado, medida espectrofotométricamente a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop, fue de 22 ng/ μ l.

3.3 TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS DH5 α Y PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINADO

En la **Figura 11** se muestra el crecimiento bacteriano en placa de las células competentes DH5 α transformadas tras 24h de incubación a 37°C.

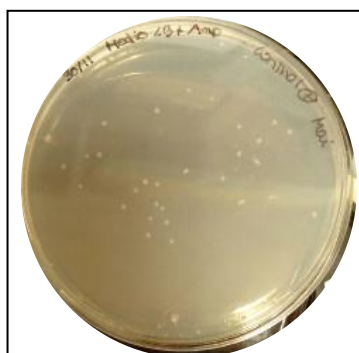


Figura 11. Colonias de *Escherichia coli* DH5 α transformadas en agar LB complementado con ampicilina 50 μ g/ml tras 24h de incubación a 37°C.

Los datos obtenidos de la cuantificación del DNA plásmidico recombinante purificado de las colonias de *E. coli* DH5 α se recogen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Se muestran la concentración en ng/ μ l de DNA plasmidico recombinante purificado de cinco muestras. Estos resultados se midieron a 260 nm espectrofotométricamente en un Nanodrop.

Muestra	DNA plasmidico purificado (ng/ μ l)
1	342,5
2	179,6
3	153,6
4	240,0
5	183,7

3.4 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE pX459::sgIRF4 Y SECUENCIACIÓN

Se observó la electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE tras la digestión con los enzimas de restricción *BbsI* y *AgeI* del plásmido recombinante (**Figura 12**). En la calle del control se observó una única banda correspondiente a pX459 sin digerir. En las cinco calles siguientes, se observó una única banda correspondiente al corte con *AgeI* pero no con *BbsI*, lo que demuestra que el vector ha insertado la secuencia guía en las cinco muestras.

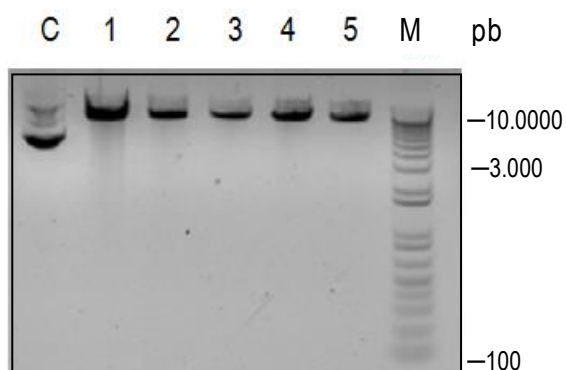


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE. La calle C corresponde al control; las calles 1-5 corresponden a las muestras 1-5 del plásmido recombinante digerido con *AgeI* y *BbsI*; la calle M corresponde al marcador de peso molecular en pb.

En la **Figura 13** se muestran los resultados de la secuenciación mediante el método Sanger de la muestra 3, que incluye la secuencia guía.

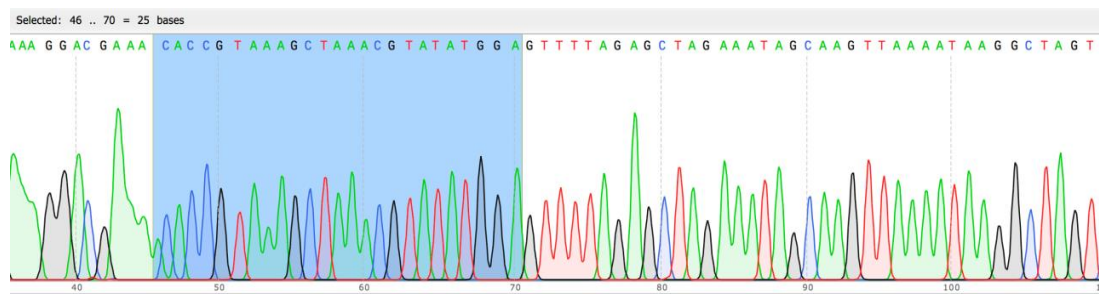


Figura 13. Cromatograma de secuencia de la muestra 3 por la técnica de Sanger. La secuenciación de la secuencia guía se marca en azul.

3.5 ANÁLISIS MUTACIONAL MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN

Los resultados que recogen la temperatura óptima de hibridación de los cebadores para la PCR se ilustran en la **Figura 14**. Se determinó que la temperatura óptima de hibridación de los cebadores es de 66,6°C.

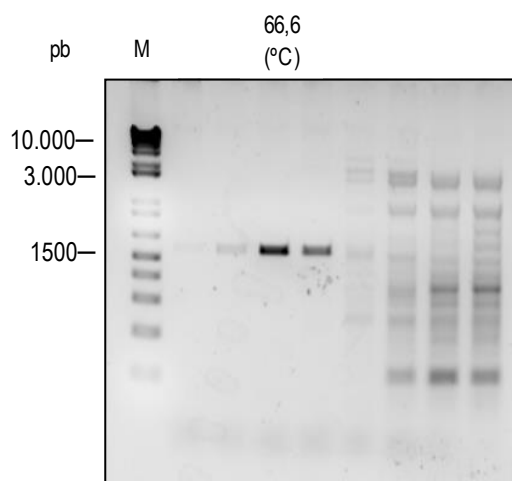


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE. La tercera banda corresponde a la temperatura óptima de hibridación de 66,6°C.

Se analizó el DNA de las células U937 antes de la transfección y después de ser transfectadas con pX459::sgIRF4. El análisis de las secuencias mostró un 98% de

similitud entre ellas. Las diferencias observadas se encuentran al principio de la secuencia y no en la región del SNP, por lo que no se observó mutación (**Figura 15**).

Sequence ID: Query_115477 Length: 807 Number of Matches: 1

Range 1: 140 to 562 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
734 bits(397)	0.0	415/423(98%)	4/423(0%)	Plus/Plus
Query 3	CCCA-GC-AGCC-AG-AAGTTCTGGGAGGCCACAGCCCTTCACTCAAGTTCAAAGGTTCA	58		
Sbjct 140	CCCAGGCAAGCCAAGAAAGTTCTGGGAGGCCACAGCCCTTCACTCAAGTTCAAAGGTTCA	199		
Query 59	AAGCAGGGATTCTGTGTACACTTGCGAAGGTGCCACCCCAACAGAAGCTGTGGCTCTG	118		
Sbjct 200	AAGCAGGGATTCTGTGTACACTTGCGAAGGTGCCACCCCAACAGAAGCTGTGGCTCTG	259		
Query 119	CAGGACACGTGCGGGGTAGACCTCTAAGGCCCTTGCCAGTGGAAATGCCCTCCCACCTTG	178		
Sbjct 260	CAGGACACGTGCGGGGTAGACCTCTAAGGCCCTTGCCAGTGGAAATGCCCTCCCACCTTG	319		
Query 179	GCCTGGGTAGCTGCTCAGCTTCTGAAACGGGAAAAATCAACTGCATTCTGAATGGGAG	238		
Sbjct 320	GCCTGGGTAGCTGCTCAGCTTCTGAAACGGGAAAAATCAACTGCATTCTGAATGGGAG	379		
Query 239	CCTCAGAGCATTAGAAAAGATAAATGTTCTGATTTTTAAAGCTAAACGATATGGAAGGA	298		
Sbjct 380	CCTCAGAGCATTAGAAAAGATAAATGTTCTGATTTTTAAAGCTAAACGATATGGAAGGA	439		
Query 299	AGCTGAAAGAGGACTTTTGATGAGTACCTAATGTTGATGTTGAAATAAACCTAATGACC	358		
Sbjct 440	AGCTGAAAGAGGACTTTTGATGAGTACCTAATGTTGATGTTGAAATAAACCTAATGACC	499		
Query 359	CTCTGGCTAAAATCTGTTCTCATTGGGAAGCACCTGAACACTATTCTCCAACCAATGC	418		
Sbjct 500	CTCTGGCTAAAATCTGTTCTCATTGGGAAGCACCTGAACCTATTCTCCGCCACTGC	559		
Query 419	TCT	421		
Sbjct 560	TCT	562		

Figura 15. Análisis de la secuencia genómica de las células U937 antes y después de ser transfectadas con pX459::sgIRF4. El recuadro bordea el SNP rs1033180. (Adaptado de Ncbi.nlm.nih.gov).

4. DISCUSIÓN

En los últimos años se han realizado diversos estudios de asociación genómica, en los que se han identificado nuevas regiones asociadas a la EC y se han propuesto una larga lista de genes candidato. De entre los SNPs asociados a la EC (Trynka et al., 2011), se seleccionó el SNP rs1033180, localizado en una región intergénica próxima al gen *IRF4*. Para conocer la implicación de este SNP en el desarrollo de la EC, se aplicó la técnica CRISPR/Cas9 con el objetivo de modificar la secuencia y analizar su implicación en la patogénesis de la EC.

El primer paso en la edición de genes mediante la herramienta CRISPR/Cas9 es diseñar las secuencias guía. Debido a que los sgRNAs son los únicos responsables de dirigir a Cas9 a *loci* genómicos específicos, el diseño óptimo de sgRNA es crítico para los experimentos exitosos de edición de genes. La elección de la secuencia guía

se realizó con el objetivo de aparear las bases del sgRNA y la diana de modo que éstas coincidan al 100%. Algunos estudios verifican que un alto contenido en GC promueve una mejor hibridación mientras que un bajo contenido en estas bases así como un bucle de desapareamiento en la unión DNA-RNA aumentan los *off-target* (Lin et al. 2014).

En cuanto a la clonación de las guías en el plásmido pX459, ésta resultó exitosa. El crecimiento en agar LB complementado con ampicilina de las colonias de *E.coli* DH5 α sugiere que éstas fueron transformadas con el plásmido pX459, el cual contiene los genes de resistencia a la ampicilina como marcadores de selección en bacterias. Además, la digestión del plásmido recombinante con los enzimas de restricción *BbsI* y *AgeI* mostró una única banda en el gel de electroforesis, lo que implica que las guías fueron clonadas en el plásmido. El cromatograma de secuencia permitió determinar que las secuencias guía se clonaron correctamente en el vector y que las cepas de *E.coli* habían sido transformadas correctamente con el plásmido recombinante pX459::sg*IRF4*.

Por otro lado, la secuenciación del DNA de las células U937 trasfectadas no mostró mutación en la región del SNP, por lo que la aplicación de la técnica CRISPR/Cas9 en las condiciones utilizadas no resultó eficiente para modificar el SNP de estudio. Los resultados de este trabajo por tanto, no permiten determinar la influencia del SNP rs1033180 sobre *IRF4*, ni su implicación en el desarrollo de la EC.

Es necesario considerar una serie de limitaciones importantes de este estudio. En primer lugar, los problemas que pueden surgir al trabajar con cultivos celulares. El hecho de que las células estén en continua división durante el cultivo, puede ocasionar el agotamiento de los nutrientes del medio, la acumulación de células apoptóticas o necróticas y la diferenciación celular masiva provocada por los contactos intercelulares. Además, las técnicas de cultivo celular necesitan unas estrictas condiciones de asepsia (Freshney et al., 1995). En segundo lugar, las limitaciones que presenta el sistema CRISPR/Cas9. Una de ellas es la necesidad de encontrar la secuencia PAM por Cas9. La otra limitación es la posible actividad *off-target* de la herramienta (Ran et al., 2013).

Futuras investigaciones deberán centrarse en resolver estas cuestiones. Una de las posibles alternativas es trabajar con otras líneas celulares y ver cómo responden al proceso de la transfección. Por otro lado, para minimizar la actividad *off-target* se pueden emplear las Cas9 nickasas (Cas9n), que son proteínas de Cas9 mutantes que sólo producen corte en una de las hebras de DNA. Para poder editar genes con Cas9n, se necesitan dos sgRNA que flanqueen los extremos de la región genómica donde se encuentra el SNP diana para guiar a dos Cas9n diferentes (Mali et al., 2013). Finalmente, gracias a la actividad endonucleasa de Cas9, se pueden generar deleciones de fragmentos grandes de DNA de doble hebra que incluyan el SNP diana, en lugar de mutaciones concretas (He et al., 2014).

5. CONCLUSIONES

En este proyecto, se diseñó una secuencia guía encima del SNP rs1033180 que fue clonada de manera exitosa en el plásmido. La transfección de las células U937 con el plásmido pX459::sg*IRF4* no causó mutación al aplicar la herramienta CRISPR/Cas9, por lo que no se pudo estudiar la influencia del SNP rs1033180 sobre *IRF4* ni su implicación en el desarrollo de la enfermedad celiaca. Sería interesante que futuras investigaciones resolvieran las cuestiones pendientes para seguir avanzando en el campo de la Terapia génica.

6. BIBLIOGRAFÍA

Addgene.org. <https://www.addgene.org/62988> Acceso: 30 de marzo 2018.

Atlas, R.M., L.C. Parks. 1993. Handbook of Microbiological Media, 4th ed. CRC Press, Inc. London.

Bhaya, D., Davison, M., Barrangou, R. 2011. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Ann. Rev. Genet.* 45: 273–297.

Blast.ncbi.nlm.nih.gov.

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome Acceso: 14 de junio 2018.

Brand.de. <https://www.brand.de/es/productos/laboratorio-clinico/camaras-de-recuento/> Acceso: 8 de abril 2018.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F. 2013. Multiplex Genome Engineering using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 339: 819–823.

Ensembl.org. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Phenotype?db=core;r=6:383046-384046;v=rs1033180;vdb=variation;vf=747436 Acceso: 30 de marzo 2018.

Freshney, R., Capes-Davis, A., Gregory, C., Przyborski, S. 1995. *Culture of animal cells*, 3rd ed.

Genecards.org. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRF4> Acceso: 19 de febrero 2018.

He, Z., Proudfoot, C., Mileham, A., McLaren, D., Whitelaw, C., Lillico, S. 2014. Highly efficient targeted chromosome deletions using CRISPR/Cas9. *Biotechnol. Bioeng.* 112: 1060–1064.

Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S.W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., Darby, H., Van Dyken, C., Li, Y., Kang, E., Park, A.R., Kim, D., Kim, S.T., Gong, J., Gu, Y., Xu, X., Battaglia, D., Krieg, S.A., Lee, D.M., Wu, D.H., Wolf, D.P., Heitner, S.B., Belmonte, J.C.I., Amato, P., Kim, J.S., Kaul, S., Mitalipov, S. 2017. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 548: 413–419.

Hsu, P., Lander, E., Zhang, F. 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 157: 1262–1278.

Jansen, R., Embden, J., Gastra, W., Schouls, L. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43: 1565–1575.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., Charpentier, E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 337: 816–821.

Joung, J., Sander, J. 2012. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 14: 49–55.

Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S. 1996. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 1156–1160.

Lgcstandards-atcc.org. U937-DC-SIGN ATCC ® CRL-3253™ Homo sapiens pleural effusion. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-3253.aspx>
Acceso: 8 de abril 2018.

Lin, Y., Cradick, T., Brown, M., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., Wile, B., Vertino, P., Stewart, F., Bao, G. 2014. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids. Res.* 42: 7473–7485.

Mali, P., Aach, J., Stranges, P., Esvelt, K., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., Church, G. 2013. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* 31: 833–838.

Ncbi.nlm.nih.gov. dbSNP Home Page. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
Acceso: 8 de abril 2018.

Ncbi.nlm.nih.gov. Primer designing tool. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
Acceso: 30 de marzo 2018.

Pattanayak, V., Guilinger, J., Liu, D. 2014. Determining the Specificities of TALENs, Cas9, and Other Genome-Editing Enzymes. *Methods. Enzymol.* 546: 47–78.

Ran, F., Hsu, P., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D., Zhang, F. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8: 2281–2308.

Sigma-Aldrich.

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/xtghpro?lang=es®ion=ES&24%20clid=CjwKCAjw-6bWBRBiEiwA_K1ZDT1b_Xgv8gZEvhMvs8Gv3ulOM9-ORGGkYvfFnAawl8t5e0CKrzFPRhoCClwQAvD_BwE
Acceso: 8 de abril 2018.

Tools.genome-engineering.org. <http://tools.genome-engineering.org> Acceso: 8 de abril 2018.












Trynka, G., Hunt, K., Bockett, N., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S., Bardella, M., Bhaw-Rosun, L., Castillejo, G., de la Concha, E., de Almeida, R., Dias, K., van Diemen, C., Dubois, P., Duerr, R., Edkins, S., Franke, L., Fransen, K., Gutierrez, J., Heap, G., Hrdlickova, B., Hunt, S., Izurieta, L., Izzo, V., Joosten, L., Langford, C., Mazzilli, M., Mein, C., Midah, V., Mitrovic, M., Mora, B., Morelli, M., Nutland, S., Núñez, C., Onengut-Gumuscu, S., Pearce, K., Platteel, M., Polanco, I., Potter, S., Ribes-Koninckx, C., Ricaño-Ponce, I., Rich, S., Rybak, A., Santiago, J., Senapati, S., Sood, A., Szajewska, H., Troncone, R., Varadé, J., Wallace, C., Wolters, V., Zhernakova, A., Thelma, B., Cukrowska, B., Urcelay, E., Bilbao, J., Mearin, M., Barisani, D., Barrett, J., Plagnol, V., Deloukas, P., Wijmenga, C., van Heel, D. 2011. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat. Genet.* 43: 1193–1201.

Anexo 1

Plasmid DNA purification

Protocol-at-a-glance (Rev.02)

NucleoSpin® Plasmid EasyPure

1	Cultivate and harvest bacterial cells			12,000 x <i>g</i> , 30 s
2	Cell lysis			150 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, up to 2 min 350 µL Buffer A3
3	Clarification of the lysate			> 12,000 x <i>g</i> , 3 min
4	Bind DNA			Load supernatant 1,000–2,000 x <i>g</i> , 30 s
5	Wash and dry silica membrane			450 µL Buffer AQ > 12,000 x <i>g</i> , 1 min
6	Elute DNA			50 µL Buffer AE RT, 1 min > 12,000 x <i>g</i> , 1 min

Anexo 2



Target Sequence Cloning Protocol

(Standard de-salted oligos are sufficient)

PX330-based plasmids, including PX458-462 – SpCas9 (or SpCas9n D10A nickase) + single guide RNA:

To clone the guide sequence into the sgRNA scaffold, synthesize two oligos of the form:



PX260 and PX334 – SpCas9 (or SpCas9n D10A nickase) + CRISPR array + tracrRNA:

To clone the guide sequence into the sgRNA scaffold, synthesize two oligos of the form:



* * * * *

Oligo annealing and cloning into backbone vectors:

1. Digest 1ug of plasmid with *BbsI* for 30 min at 37°C:

1 ug	Plasmid
1 ul	FastDigest <i>BbsI</i> (Fermentas)
1 ul	FastAP (Fermentas)
2 ul	10X FastDigest Buffer
X ul	ddH ₂ O
20 ul	total

2. Gel purify digested plasmid using QIAquick Gel Extraction Kit and elute in EB.

3. Phosphorylate and anneal each pair of oligos:

1 ul	oligo 1 (100uM)
1 ul	oligo 2 (100uM)
1 ul	10X T4 Ligation Buffer (NEB)
6.5 ul	ddH ₂ O
0.5 ul	T4 PNK (NEB)
10 ul	total

Anneal in a thermocycler using the following parameters:

37°C	30 min
95°C	5 min and then ramp down to 25°C at 5°C/min

4. Set up ligation reaction and incubate at room temperature for 10 min:

X ul	<i>BbsI</i> digested plasmid from step 2 (50ng)
1 ul	phosphorylated and annealed oligo duplex from step 3 (1:200 dilution)
5 ul	2X Quickligation Buffer (NEB)
X ul	ddH ₂ O
10 ul	subtotal
1 ul	Quick Ligase (NEB)
11 ul	total

5. (optional) Treat ligation reaction with PlasmidSafe exonuclease to prevent unwanted recombination products:

11 ul	ligation reaction from step 4
1.5 ul	10X PlasmidSafe Buffer
1.5 ul	10mM ATP
1 ul	ddH ₂ O
15 ul	total










Incubate reaction at 37C for 30 min.

6. Transformation

Anexo 3

PCR clean-up, gel extraction

Protocol-at-a-glance (Rev. 04)

	PCR clean-up	Gel extraction	DNA clean-up (with SDS)	Single stranded DNA clean-up
1 PCR clean-up, DNA clean-up, or single stranded DNA clean-up: Adjust binding condition Gel extraction: Excise DNA fragment / solubilize gel slice		  200 µL NTI/ 100 µL PCR 200 µL NTI/ 100 mg gel 50 °C 5–10 min	 500 µL NTB/ 100 µL sample	 200 µL NTC/ 100 µL sample
2 Bind DNA			11,000 x <i>g</i> 30 s	
3 Wash silica membrane			700 µL NT3 11,000 x <i>g</i> 30 s <u>Recommended:</u> 2 nd wash 700 µL NT3 11,000 x <i>g</i> 30 s	
4 Dry silica membrane			11,000 x <i>g</i> 1 min	
5 Elute DNA			15–30 µL NE RT 1 min 11,000 x <i>g</i> 1 min	