



# Edición genética de linfocitos murinos mediante CRISPR/Cas9

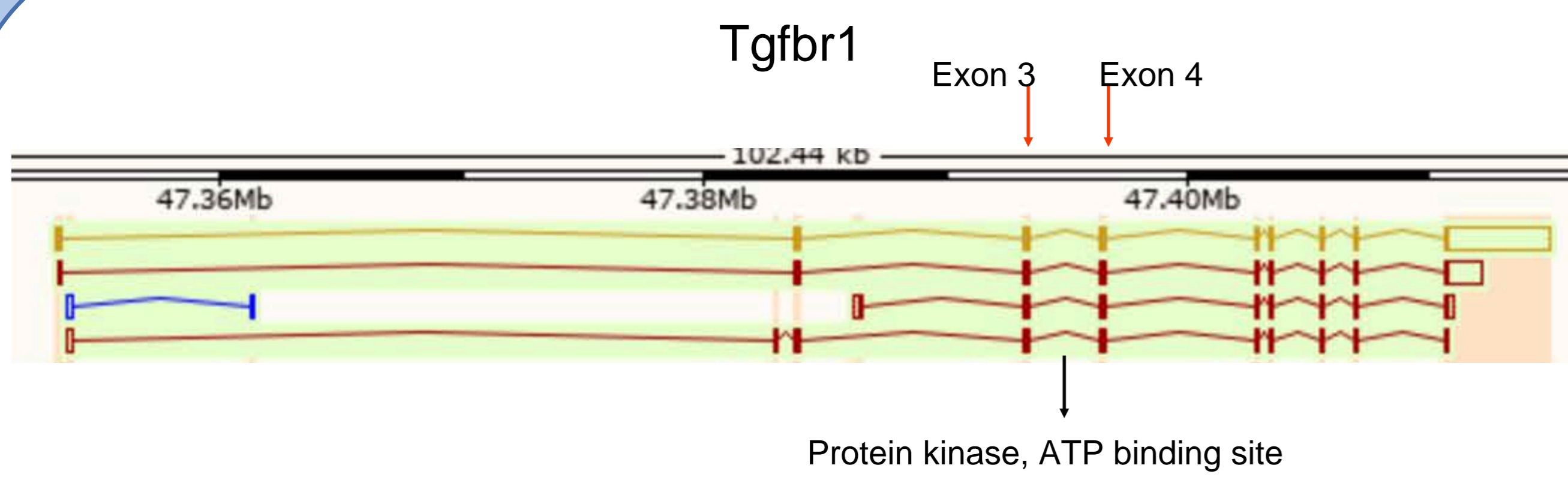
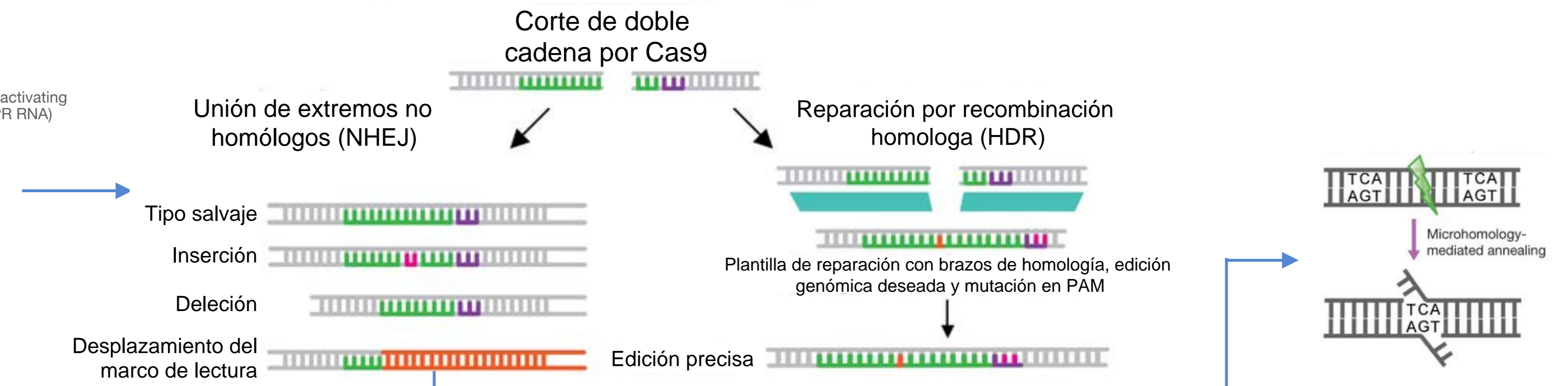
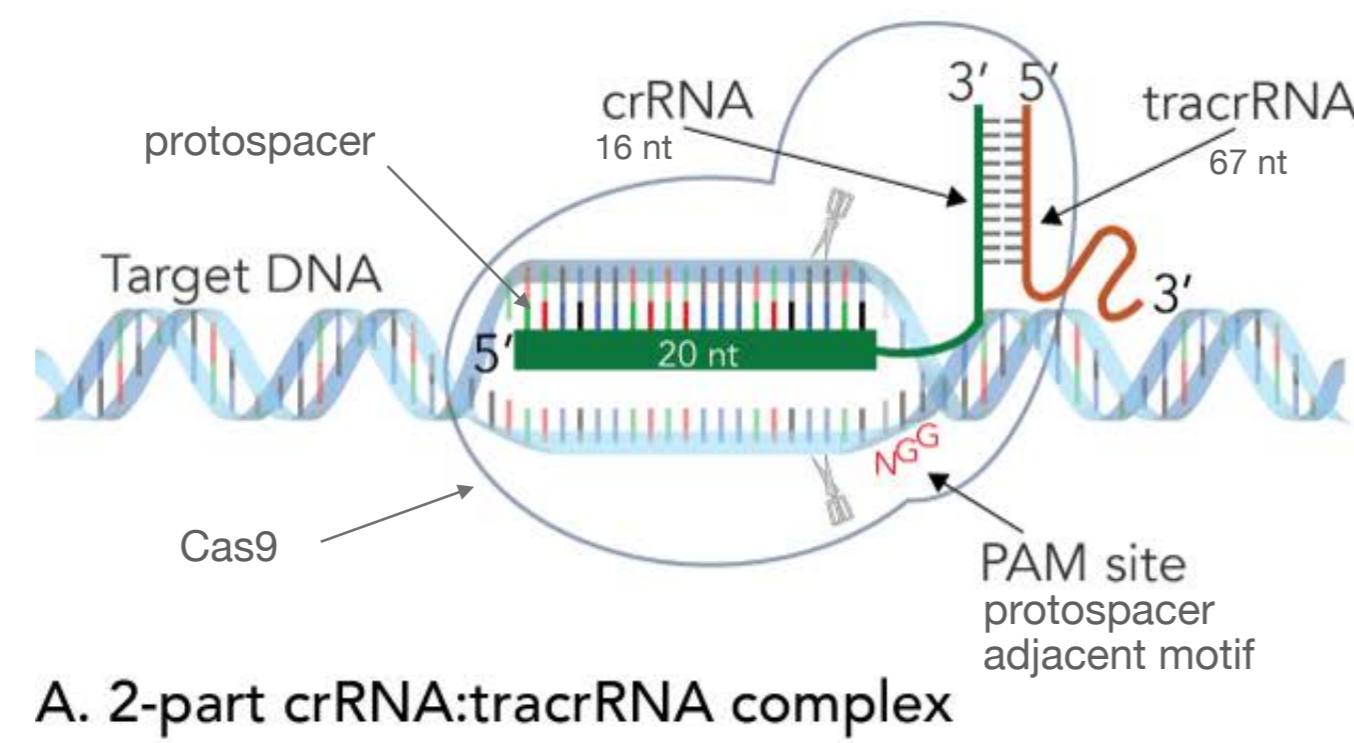
Marcial Medina C, Ruiz Medina B. E, Rios-Ramirez DB, Ramos-Balderas JL, Licona-Limón Paula.  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM



## El sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición del genoma

### Elementos del sistema CRISPR/Cas9

- crRNA - 36 nt**
  - Espaciador o guía - 20 nucleótidos que se emparejan con la secuencia blanco (o protospacer) y con secuencia PAM (protospacer adjacent motif)
  - Secuencia andamio (scaffold sequence) - 16 nucleótidos que hibridan con tracrRNA
- tracrRNA - 67 nt**
  - Requerido para formar complejo con Cas
- Cas9**
  - Endonucleasa encargada de los cortes de doble cadena en el ADN



## Diseño de RNA guías

Gen	Exón	Guía	MIT	CFD	Out of frame	Lindel	Off-targets	IDT	Bases eliminadas	Primers	Tm
Tgfb1	3	CCTCTTCATTGGCACACGG TGG	90	91	70	89	0-0-1-5-73 0-0-0-0-0 79 off-targets	Recommended	3005	AGCTGTCATTGCTGTCACG Fw	60.322
	4	TTCTGTAAACACAATGGTCC TGG	80	89	56	65	0-0-2-16-122 0-0-0-0-7 140 off-targets	Recommended		CTCCCTTTTGTCTGACCC Fw interno	59.962
										CAACTTCTCTCCCGCCAT Rev	60.035

Exon 3 GACCTTTTTTCAGAAAAGCAGTCTGAGCTGGCCTTGGTCTGTGGAGCTGGCAGCTGTCATTGCTGGTCCAGTCTGCTTCGTCTGCATTGCACTTATGCTGATGGTCTATATCTGCCATAACCGCACTGTCATTCAACACCGTGTGCCAAATGAAGAGGATCCATC  
ACTAGATCGCCCTTTCATTTCAGAGGGCACCACCTTAAAGATTAAATTTATGATATGACAACATCAGGGTCTGGATCAG

.intron 2580 bp

Exon 4 ctgtaaatctctccacaacccctctcttctctcccttctctgctgacccctaaaggaaaagtcagtttacgtccccaatctctagcagggtctctggttcttca  
gtactactatTTTTTTTccacttttggtgagaagcaaaagcttccacaagcaaggttaaggaatgactgctggtgctcattgtggactgcaggggtgag  
acagggactgtgatgattatgctgacttattctatattagGTTTACCACCTGCTTGTCAAAGAACAAATTGCCAGGACCATTTGTTACAAGAAA  
GCATTGGCAAAGGTCGGTTTGGAGAAAGTTTGGCGAGGCAAAATGGCGGGGAGAAGAAGTTGCTGTGAAGATATTCCTTCT  
AGAGAAGAGCGTTTCATGTTCCGAGAGGCAGAGATTTATCAGACTGTAATGTTACGCCATGAAAATATCCTGGGATTATAG  
CAGCAGACAACAAAG

322 bp control (+) 128 bp con delección (3133 bp completo)

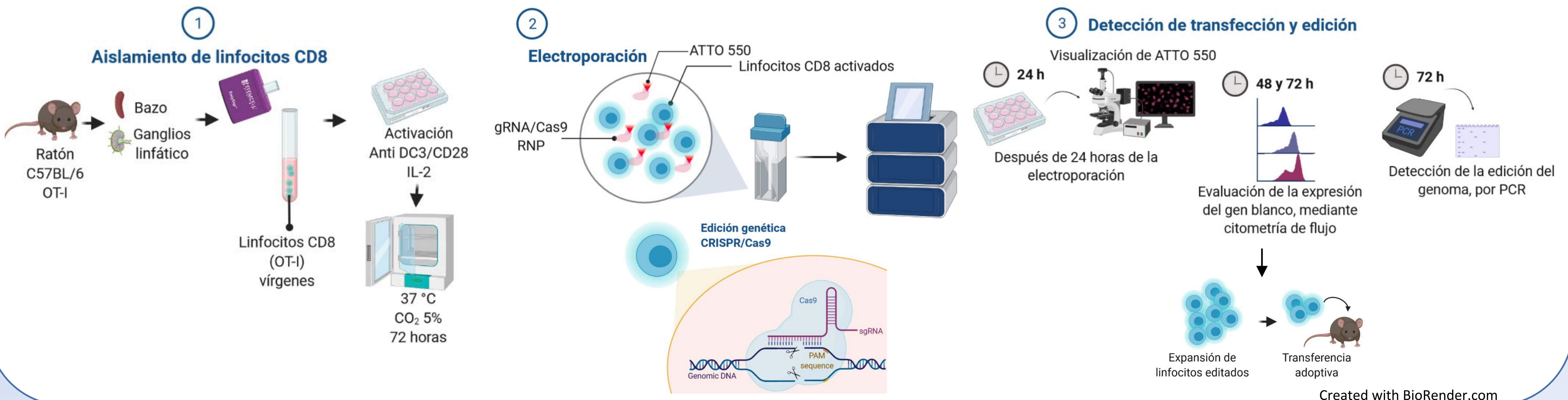
CRISPOR (citation) is a program that helps design, evaluate and clone guide sequences for the CRISPR/Cas9 system. CRISPOR Manual  
Jan 2022: CasX fixes, sequence viewer fix Full list of changes

**Step 1**  
Planning a lentiviral gene knockout screen? Use CRISPOR Batch  
Sequence name (optional):  
Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon

**Step 2**  
Select a genome  
Mus musculus - Mouse (reference) - UCSC Dec. 2011 (mm10-C57BL/6J) + SNPs: C57BL/6J, C57BL/6J  
Note: pre-calculated exonic guides for this species are on the UCSC Genome Browser.  
We have 764 genomes, but not yours? Search NCBI assembly and send a GCF\_/\_GCA\_ ID to CRISPOR support.

**Step 3**  
Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)  
20bp-NGG - Sp Cas9, SpCas9-HF1, spCas9 1.1  
See notes on enzymes in the manual.

## Complejos ribonucleicos (RNP) CRISPR/Cas9 en células primarias CD8 murinas



## Edición del gen Tgfb1 en linfocitos CD8

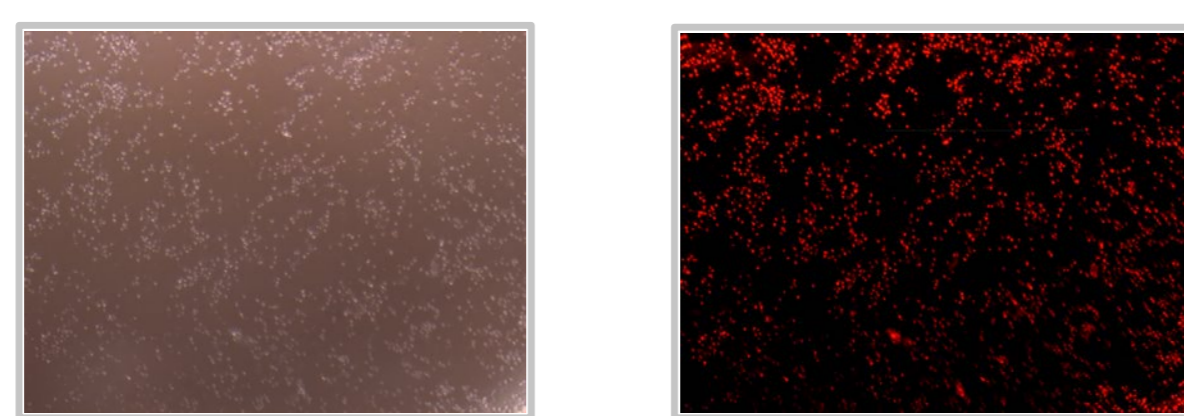


Figura 1. Detección del tracrRNA marcado con ATTO 550 mediante microscopía de fluorescencia. Se electroporaron 1.5 millones de electroporación. Objetivo 10X. linfocitos CD8 con 2µM RNP (Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 ensamblada con Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA y tracrRNA) y 2µM de Alt-R Cas9 Electroporation Enhancer, utilizando el sistema Bio-Rad Gene Pulser Xcell. Las imágenes fueron tomadas 24 horas después de la

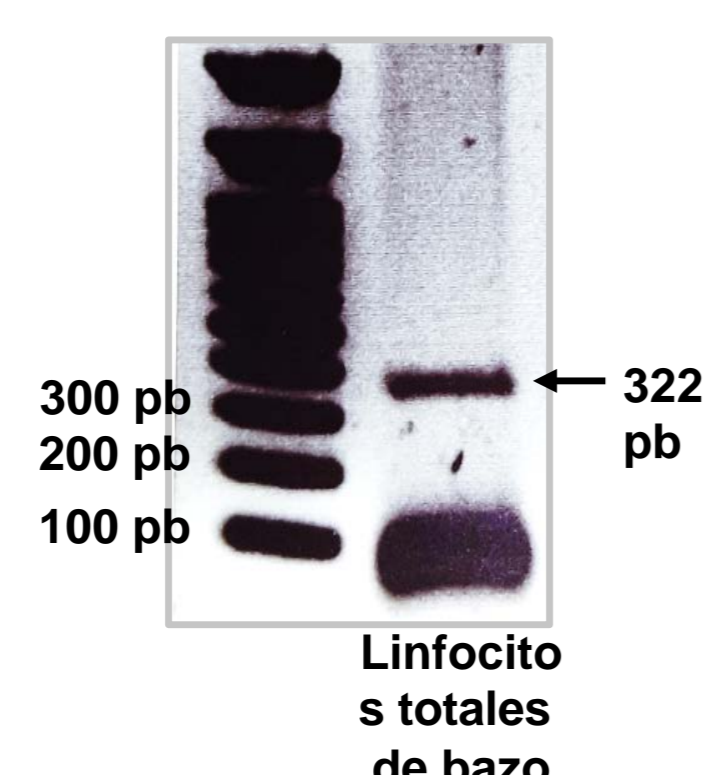


Figura 2. Método para detectar edición genética, mediante PCR. Se diseñaron primer para amplificar la región blanco del gen Tgfb1. La eficiencia de la transfección puede ser evaluada mediante un gel de agarosa, un producto de PCR de 322 pb indica que no hubo edición genética y un producto de 128 pb indica que la transfección con el complejo CRISPR/Cas9, generó la modificación deseada en este gen.

## Referencias

- Leonova EI, Gainetdinov RR. CRISPR/Cas9 Technology in Translational Biomedicine. Cell Physiol Biochem. 2020 Apr 17;54(3):354-370. doi: 10.33594/00000224. PMID: 32298553.
- Chen M, Mao A, Xu M, Weng Q, Mao J, Ji J. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. Cancer Lett. 2019 Apr 10;447:48-55. doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.017. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30684591.

**Agradecimientos:** CONACyT proyecto PRONAI 303027, CONACyT beca Estancias posdoctorales por México, modalidad 2 CVU: 418637, al Instituto de Fisiología Celular, UNAM y a los Laboratorios 202 Sur y 125 Norte.