

## Protocolo rápido para la edición génica

### Rafael Navajas Pérez

### Aplicaciones de la Ingeniería Genética

1.- Utilizamos ENSEMBL para seleccionar las coordenadas del gen de interés. Para ello, ingresamos en la página web [www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/), seleccionamos la especie y buscamos el gen. Esto se puede hacer buscando por palabras clave o por número de acceso.

2.- Diseño manual de ARNs guía.

**Step 1: Identify a PAM (NGG) sequence in the DNA sequence you would like to target.**

```
GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG
CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC
```

PAM

**Step 2: Determine the 5' start of the actual sgRNA targeting sequence by counting 20 nucleotides upstream of the PAM sequence.**

```
GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG
CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC
```

↑

PAM

**Step 3: Determine the actual sgRNA targeting sequence.**

```
GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG
CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC
```

↑

PAM

5' G AAC CGG TGC CTA GAG AAG G

(Fuente: Clontech)

3.- Lo más frecuente y práctico es utilizar algún software online para el diseño de ARNs guía (sgRNA). Uno de ellos es Chop Chop, de la Universidad de Harvard (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>). Utilizaremos las coordenadas anteriormente obtenidas para indicarle al programa la región en la que queremos diseñar el ARN guía. El resultado aparecerá en formato de tabla. Además de la secuencia del ARN guía, nos puede resultar de interés consultar el número de off-targets.

Name	Graphical user interface	Available species	Input	Output	Ranked list
<a href="#">CRISPR Design Tool</a>					
<a href="#">Citation &gt;</a>	Yes	15	DNA sequence	Candidate guide sequences and off-target loci	Yes
<a href="#">CHOPCHOP</a>					
<a href="#">Citation &gt;</a>	Yes	23	DNA sequence, gene name, genomic location	Candidate guide sequences and off-target loci	No
<a href="#">CasFinder</a>					
<a href="#">Citation &gt;</a>	No (Perl script)	User input	DNA sequence	Candidate guide sequences and off-target loci	Yes
<a href="#">Cas-OFFFinder</a>					
<a href="#">Citation &gt;</a>	Yes	11	Guide sequence	Off-target loci for guide sequences	No
<a href="#">FlyCRISPR</a>					
<a href="#">Citation &gt;</a>	Yes	18	DNA sequence	Candidate guide sequences and off-target loci	No
<a href="#">E-CRISP</a>					
<a href="#">Citation &gt;</a>	Yes	31	DNA sequence or gene name	Candidate guide sequences and off-target loci	Yes

[Citation >](#)

[Guide RNA](#) [Sequence](#) [Design](#)  
[Platform](#)

Yes 10 DNA sequence Candidate guide sequences and off-target loci No

[Citation >](#)

CasOT

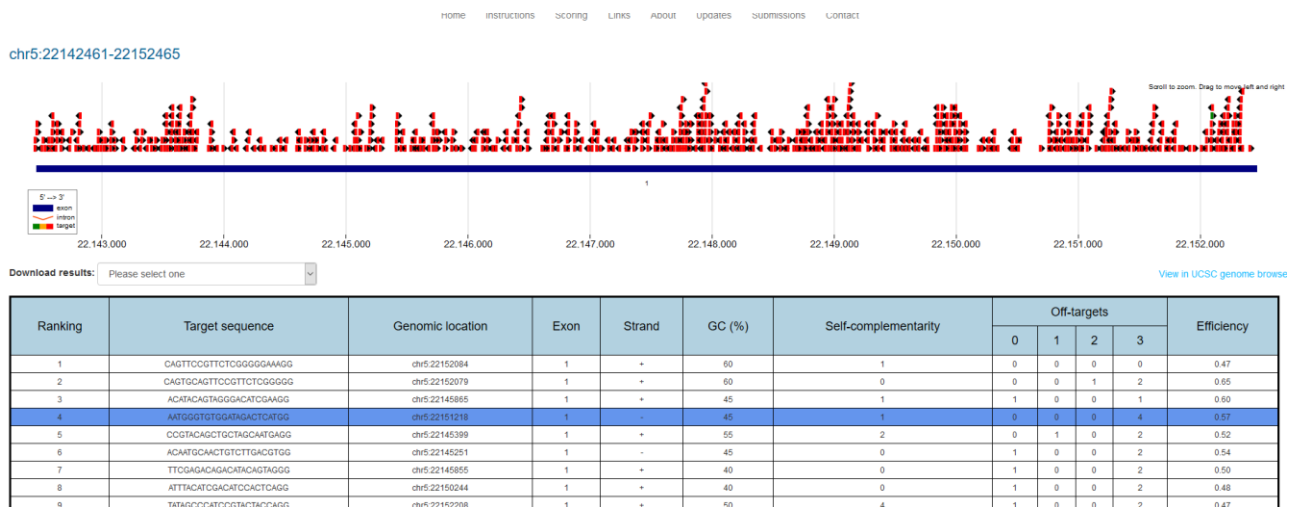
No (Perl script) User input Guide sequence Off-target loci and additional guide sequences No

CRISPR-ERA

Yes 9 DNA sequence, gene name, or TSS location Candidate guide sequences and distances to TSS Yes

Benchling Yes 5 DNA sequence or gene name Candidate guide sequences and off-target loci Yes

## Algunos programas para el diseño de ARNs guía (Fuente: Clontech)



## Salida del programa Chop Chop

4.- Como norma general se recomienda sintetizar 4 o 5 ARNs guía. Se ha observado distinta actividad de estas moléculas. Hay estudios que sugieren que una G en la posición 1 y una A o una T en la posición 17 aumentan la probabilidad de éxito del ARN guía.

Optimal sgRNAs	
Target	sgRNA sequence
<i>CD81</i>	GCAGCCCTCCACTCCCATGG
<i>CXCR4</i>	GGCAATGGATTGGTCATCC
<i>EMX1</i>	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA
<i>AcGFP1</i>	GTGAATCGCATCGAGCTGAC
<i>ZsGreen1</i>	GACCATGAAGTACCGCATGG

(Fuente: Clontech)

5.- Síntesis de ARNs guía.

6.- Estimación de la eficiencia de los ARNs guía.