

Edición genómica en cultivos celulares eucariotas usando CRISPR-Cas: una aproximación teórico-práctica

Descripción del Flujo de Trabajo

Aplicaciones de la Ingeniería Genética

Enero de 2025

Máster en Genética y Evolución
(Especialidad Agroalimentaria)

00 Introducción: conceptos teóricos

01 Establecimiento de cultivos celulares

02 Elección del gen de interés

03 Diseño de un ARN guía

04 Diseño del vector

05 Chequeo de los cultivos celulares

06 Transfección o delivery

07 Análisis del porcentaje de éxito de la transfección

08 Extracción de ADN

09 Comprobación de la edición genética

01 Establecimiento de cultivos celulares

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS Y TRANSFECCIÓN CON EL VECTOR pTG13077EN *Ruditapes philippinarum*

Francisca Robles, Roberto de la Herrán, Alejandra Gutiérrez-Guerrero, Rafael Navajas-Pérez, Alexander García-Zea, José Luis Cortés y Carmelo Ruiz Rejón

*Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
Avda. Fuentenueva s/n. 18071. Granada (frobles@ugr.es)*

Establecimiento de cultivos celulares en híbridos de esturión *Acipenser naccarii* x *Acipenser baerii*

F. Robles¹, J.L. Cortés², E. Tamayo¹, R. Navajas-Pérez¹, R. de la Herrán¹ y C. Ruiz Rejón¹

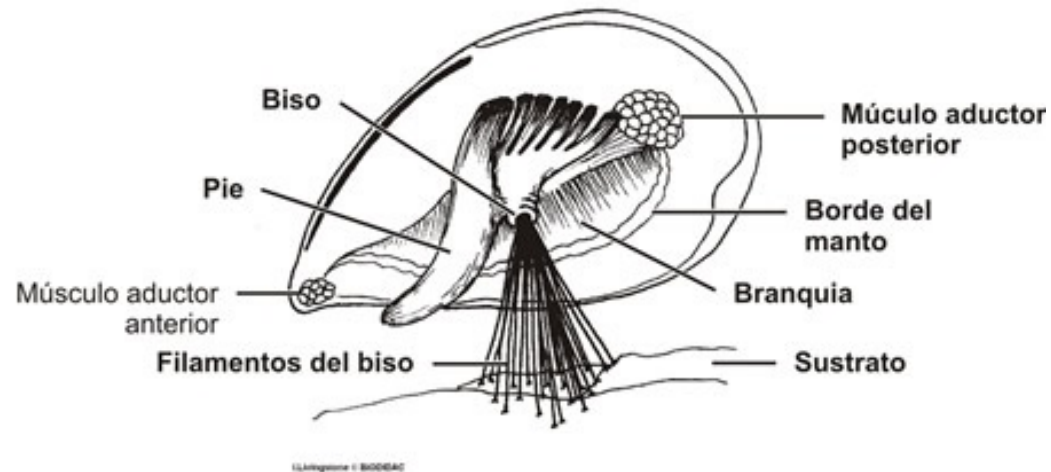
¹ Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Avda. Fuentenueva s/n, 18071 Granada. E-mail: frobles@ugr.es

² Eppendorf Ibérica S.L.U. Avda. Tenerife 2, 28703 San Sebastián de los Reyes, Madrid

01 Establecimiento de cultivos celulares

En Acuicultura, los cultivos celulares son de gran interés ya que permiten el estudio de procesos relacionados con la actividad y división celular, la expresión génica, y sirven como modelos para análisis en virología, inmunología o patología.

Mytilus edulis, mejillón



Cerastoderma edule, berberecho



Ruditapes philippinarum, almeja japonesa

01 Establecimiento de cultivos celulares

En Acuicultura, los cultivos celulares son de gran interés ya que permiten el estudio de procesos relacionados con la actividad y división celular, la expresión génica, y sirven como modelos para análisis en virología, inmunología o patología.



Fuente: Ortuño Montesinos, Ramón, Tesis Doctoral.



Cerastoderma edule, berberecho

Mytilus edulis, mejillón



Ruditapes philippinarum, almeja japonesa

01 Establecimiento de cultivos celulares



Usamos un baño termostatzado o una estufa para cultivos celulares.

01 Establecimiento de cultivos celulares



Medio IMDM: recomendado para cultivos celulares de alta densidad y proliferación rápida.



Medio DMEM: recomendado para diferenciación de células en cultivos celulares.

02 Elección del gen de interés

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



GenBank[®] is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences ([Nucleic Acids Research, 2013 Jan;41\(D1\):D36-42](#)). GenBank is part of the [International Nucleotide Sequence Database Collaboration](#), which comprises the DNA DataBank of Japan (DDBJ), the European Nucleotide Archive (ENA), and GenBank at NCBI. These three organizations exchange data on a daily basis.

02 Elección del gen de interés

Inicio » Actualidad » La secuenciación del genoma del mejillón revela un sistema de genes que podría explicar su gran resistencia



#Nutrición #Virus #Genética #Acuicultura #Pesca

La secuenciación del genoma del mejillón revela un sistema de genes que podría explicar su gran resistencia

Investigadores del CSIC y la Universidad de Vigo han liderado la identificación de los 65.000 genes, más del doble que los del ser humano, de este “superorganismo marino”

Fecha de noticia:

Miércoles, 11 Noviembre, 2020

Un equipo coordinado por científicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Vigo ha secuenciado el genoma completo del mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*), una investigación que, además de revelar que la especie contiene 65.000 genes, más del doble que los del ser humano, ha sacado a la luz algunas claves para comprender la enorme capacidad de adaptación y resistencia al estrés de este “superorganismo marino”. El trabajo, publicado en la revista *Genome Biology* y del que se ha hecho eco la revista *Science*, ha desvelado una arquitectura genómica totalmente inusual para un animal. Este sistema está basado en genes que comparten todos los individuos de la especie y en aproximadamente un 20% de “genes prescindibles”, que no son compartidos por todos y que están relacionados con funciones de supervivencia. Este conocimiento podría ser aplicado, por ejemplo, en el diseño de nuevos tratamientos frente a enfermedades.



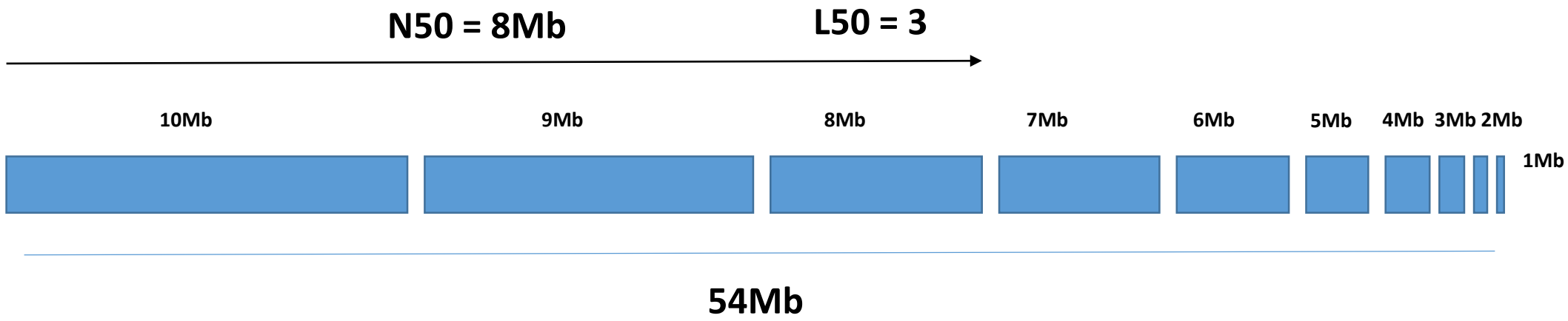
El genoma del mejillón se basa en un sistema integrado por unos 15.000 genes prescindibles relacionados con funciones de supervivencia. / MANUEL GARCÍA BLANCO/IIM-CSIC

02 Elección del gen de interés


Assembly statistics

The screenshot shows the NCBI Genome browser interface. At the top, the NIH logo and 'National Library of Medicine' are visible. A search bar contains 'Mytilus' and a 'Search' button. Below the search bar, there is an 'Important Update' banner. The main content area is divided into two columns. The left column, titled 'TAXONOMY', shows the taxonomic classification of *Mytilus* as a genus of bivalve in the family Mytilidae, with a taxonomy ID of 6548 and buttons for 'Taxonomy browser' and 'Genomes'. The right column contains 'Filters: Manage Filters', 'Find related data' (with a 'Database: Select' dropdown and a 'Find items' button), and 'Search details' (showing the search query '"Mytilus"[Organism] OR Mytilus[All Fields]' and a 'Search' button). At the bottom, there are 'Display Settings: Summary' and 'Send to:' options.

	GenBank
Genome size	1.4 Gb
Total ungapped length	1.4 Gb
Number of chromosomes	18
Number of organelles	1
Number of scaffolds	2,563
Scaffold N50	93.4 Mb
Scaffold L50	7
Number of contigs	3,754
Contig N50	1.7 Mb
Contig L50	237
GC percent	32.5
Genome coverage	30.0x
Assembly level	Chromosome



02 Elección del gen de interés

**National Library of Medicine**
National Center for Biotechnology Information

[Log in](#)

Nucleotide Nucleotide [Search](#)

[Help](#)

Species
Animals (3)
Customize ...

Molecule types
mRNA (2)
Customize ...

Source databases
INSDC (GenBank) (3)
Customize ...

Sequence Type
Nucleotide (3)

Sequence length
Custom range...

Release date
Custom range...

Revision date
Custom range...

[Clear all](#)


[Show additional filters](#)

Summary Sort by Default order Send to: [Filters: Manage Filters](#)

See [Plxna3 \(SEX\)](#), [plexin A3](#) in the Gene database
sex reference sequences [Transcript \(10\)](#) [Protein \(10\)](#)

Items: 3

[Mytilus edulis putative sex determining fem-1 \(Fem1\) mRNA, complete cds](#)
1. 1,392 bp linear mRNA
Accession: MW928591.1 GI: 2183004880
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[TSA: Mytilus edulis, transcriptome shotgun assembly](#)
2. 211,577 rc linear transcribed-RNA
 This entry is the master record for a transcriptome shotgun assembly project and contains no sequence data.
Accession: GJDR00000000.1 GI: 2292923031
[BioProject](#) [BioSample](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#)


[Mytilus edulis isolate Me_DMRT1L putative doublesex- and mab-3-related transcription factor 1L mRNA, complete cds](#)
3. 2,333 bp linear mRNA
Accession: MW916662.1 GI: 2057584607
[Protein](#) [Taxonomy](#)
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)


Analyze these sequences
Run BLAST

Find related data
Database: Select
[Find items](#)

Search details
("Mytilus edulis"[Organism] OR Mytilus edulis[All Fields]) AND sex[All Fields] AND determining[All Fields]
[Search](#) [See more...](#)

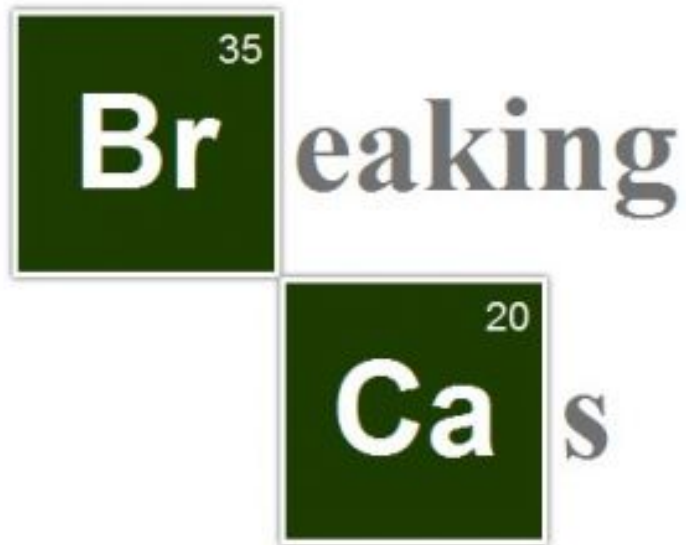
Recent activity
[Turn Off](#) [Clear](#)

 Mytilus edulis sex determining (3) Nucleotide

 Mytilus edulis sex (1447) Nucleotide

03 Diseño del ARN guía

<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>

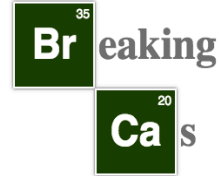


Breaking-Cas es una herramienta web desarrollada en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC (CNB-CSIC) que facilita el diseño de experimentos de edición génica utilizando la técnica CRISPR/Cas. Este programa permite diseñar ARNs guía *ad hoc* para cada experimento.

03 Diseño del ARN guía

Juan C. Oliveros, Mònica Franch, Daniel Tabas-Madrid, David San-León, Lluís Montoliu, Pilar Cubas and Florencio Pazos (2016). Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. [Nucleic Acids Research \(2016\) doi: 10.1093/nar/gkw407](https://doi.org/10.1093/nar/gkw407).

START†	END†	STRAND†	OLIGO†	ONTARGETS†	OFFTARGETS†	GENES†	SCORE‡
118	137	-	GATCGCTCGTTGGCGTCCAA CGG	1	1	1	99.9
455	474	+	GTATTACCAGTGGTACAGACT TGG	1	5	1	99.5
521	540	+	GAGTGTTC AATATCACCACC AGG	1	6	4	99.5
422	441	-	GGTGATGGACACTGAACACCT TGG	0	2	2	99.4
99	118	+	GCAGGCAAAGTAGTAGCCGT TGG	1	5	3	99.3
128	147	-	ATTCTTATCTGATCGCTCGT TGG	1	9	4	99.2
919	938	+	GCCAAGCTATTTGGACCTTAT TGG	1	4	1	99.1
188	207	-	CTCTGAATCTGTTTCAGCAGT TGG	1	11	4	99
697	716	-	CTAAAGCAGAGTTACCCCTT TGG	1	7	4	98.5
97	116	-	GGCTACTACTTTGCCCTGCAC AGG	1	11	8	98.4
464	483	-	TAGTTTCCAGTCTGTACCAC TGG	1	9	3	98.4
923	942	-	ACCATAAGTCCAAATAGCT TGG	1	12	3	97.8
542	561	-	TTT GATGATAACTACCAC TGG	1	17	6	97.6
212	231	+	TCTGCTAAGTTGAGACAGT CGG	1	19	6	97.5
81	100	+	GTAACAACAGTTTCCTGTGC AGG	1	14	10	97.3
224	243	+	AGACAGTACGGTAAGATTGA AGG	1	15	7	97



Breaking-Cas

Oligo guide design tool for CRISPR based genome editing. Any eukaryote genomic sequence available in ENSEMBL (release 84) or ENSEMBLGENOMES (release 31) can be used as reference.

Please cite:

"Juan C. Oliveros, Mònica Franch, Daniel Tabas-Madrid, David San-León, Lluís Montoliu, Pilar Cubas and Florencio Pazos (2016). Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. [Nucleic Acids Research \(2016\) doi: 10.1093/nar/gkw407](https://doi.org/10.1093/nar/gkw407). <http://bioinfofp.cnb.csic.es/tools/breakingcas>"

[Tutorial](#)

1 Choose organism: ([alphabetic list](#)) Write 3 letters or more and select it.

2 Paste one or several query DNA sequences in FASTA format (up to 20,000 nucleotides in total):

Or upload FASTA file (DNA): Ningún archivo seleccionado

3 Select nuclease settings: ▾

Or set your own parameters:

PAM sequence:

PAM position: 5' 3'

Guide length: ▾

Mismatches: ▾

Use predefined settings for Cas9 or Cpf1, or set custom parameters for other nucleases. If necessary, write a different PAM sequence (in IUPAC notation). For Cas9, positional weights based on Hsu et al. (2013) are used by default. See [tutorial pages](#) for details on off-targets score's calculation.

Position-dependent weights

5'-

#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
0	0	0.0	0	0	0.3	0.3	0	0.3	0.0	0.4	0.5	0.6	0.8	0.7	0.8	0.6	0.8	0.6	0.5

 (PAM) **NGG** -3'

Confirmation email (optional):

To receive a message as soon the job finishes. Write it carefully (it will not be checked).

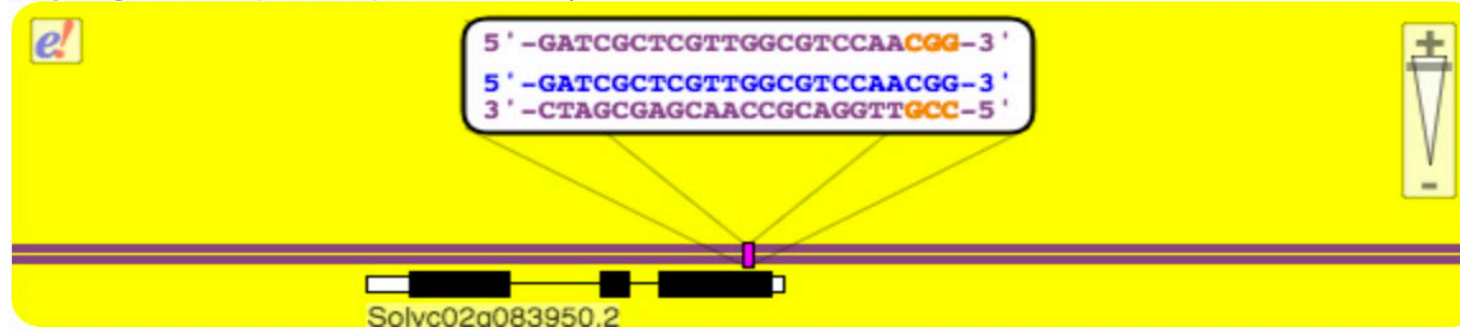
[Fill with example](#)

[Clear fields](#)

03 Diseño del ARN guía

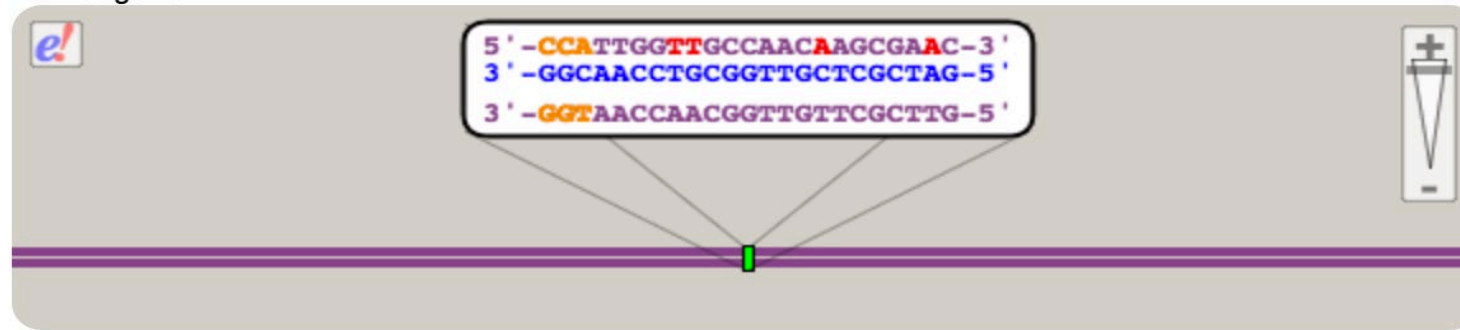
100 2:47191558-47191580(+)

[Solyc02g083950.2 \(unknown\)](#): 23 nts overlap



0.1 9:38106276-38106298(-)

*** Intergenic ***



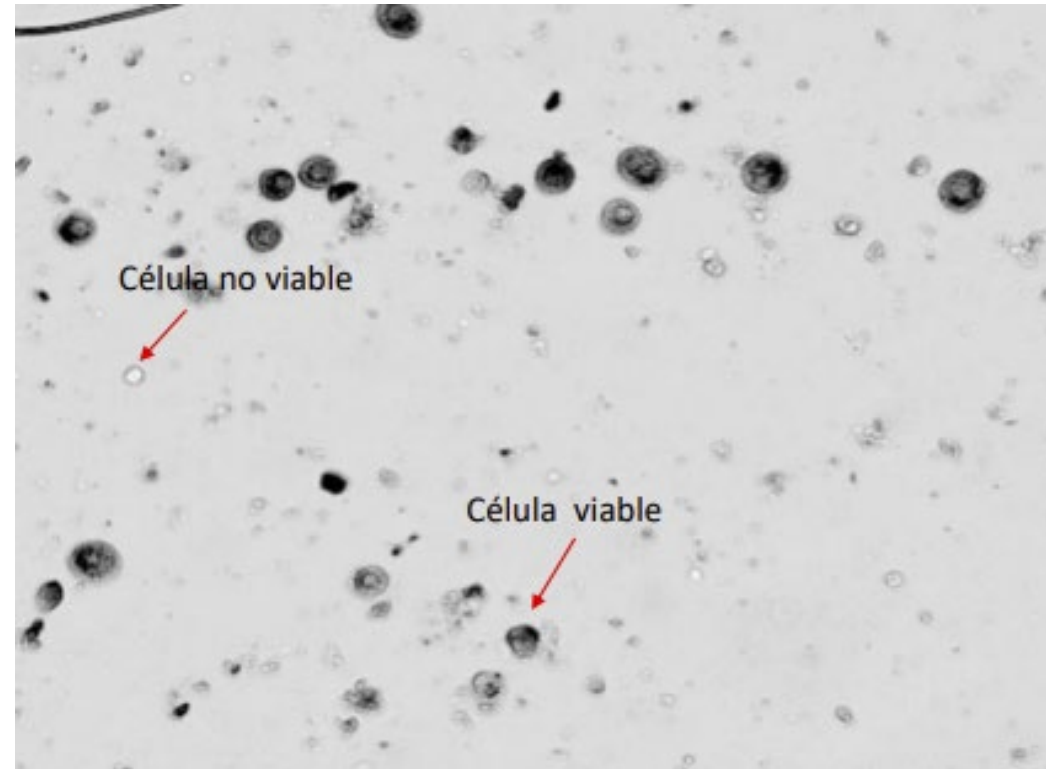
04 Diseño del vector

<https://benchling.com/signup/welcome>



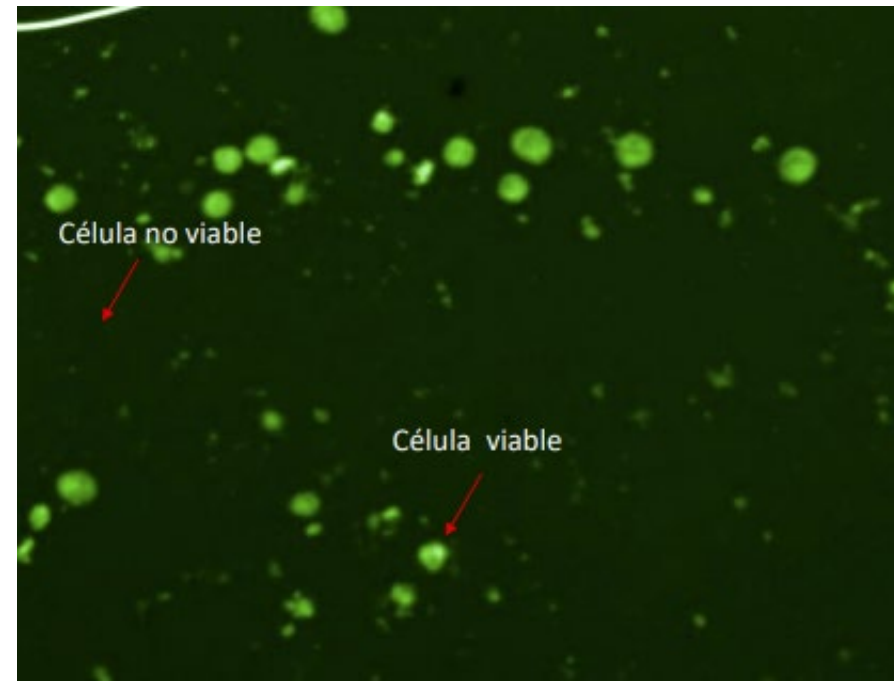
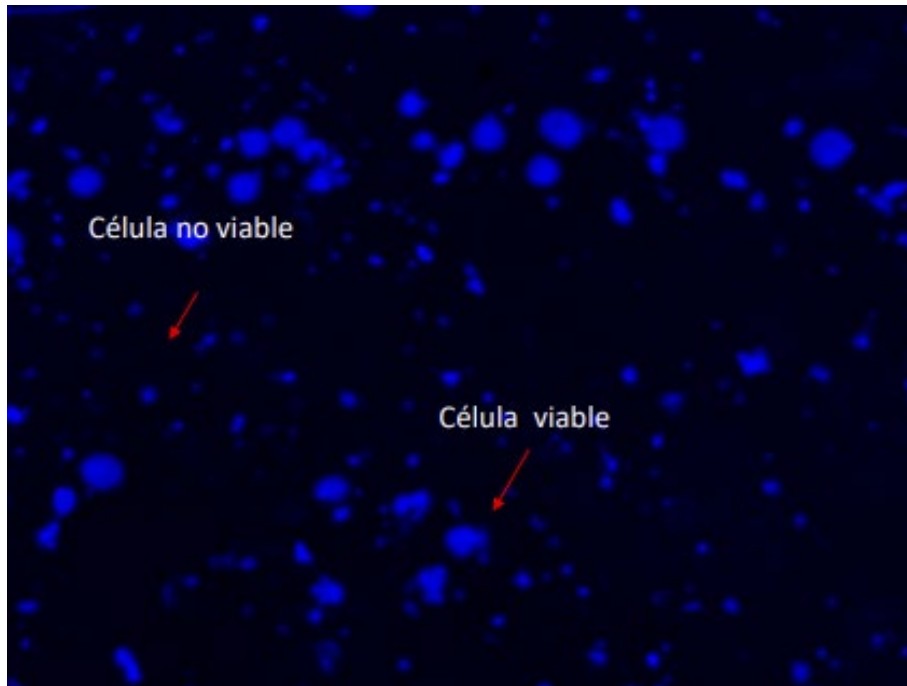
Plataforma para múltiples análisis relacionados con la ingeniería genética, que permite trabajar de forma colaborativa con otros científicos.

05 Chequeo de cultivos celulares



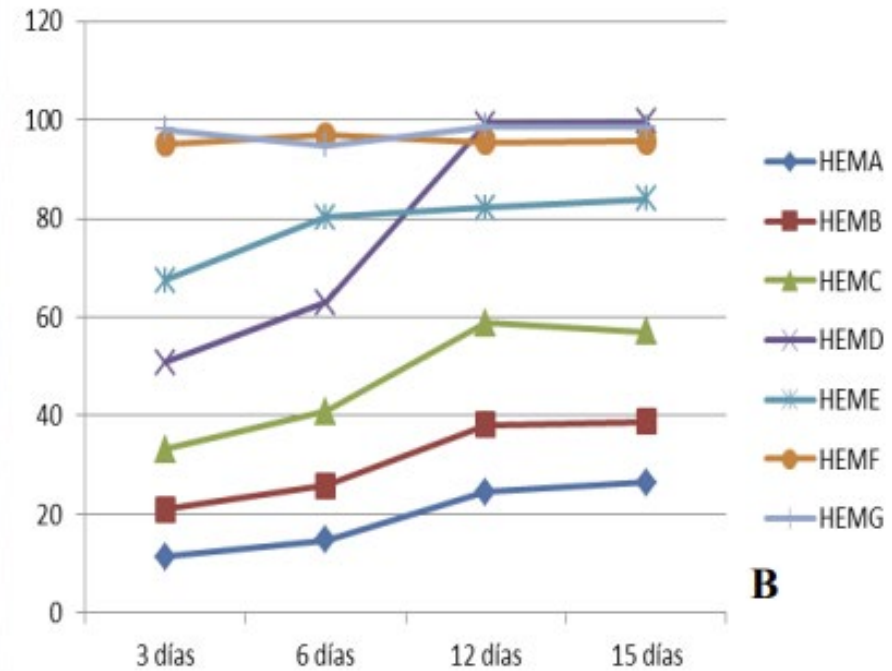
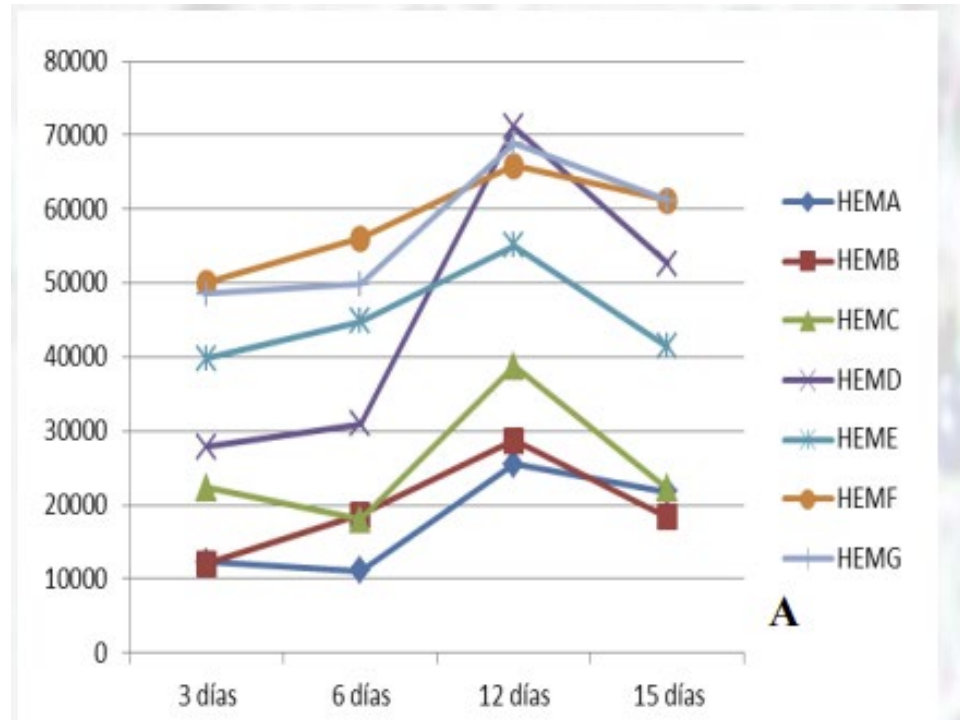
Iniciación de cultivos celulares a partir de tejido de branquia y hemolinfa.

05 Chequeo de cultivos celulares



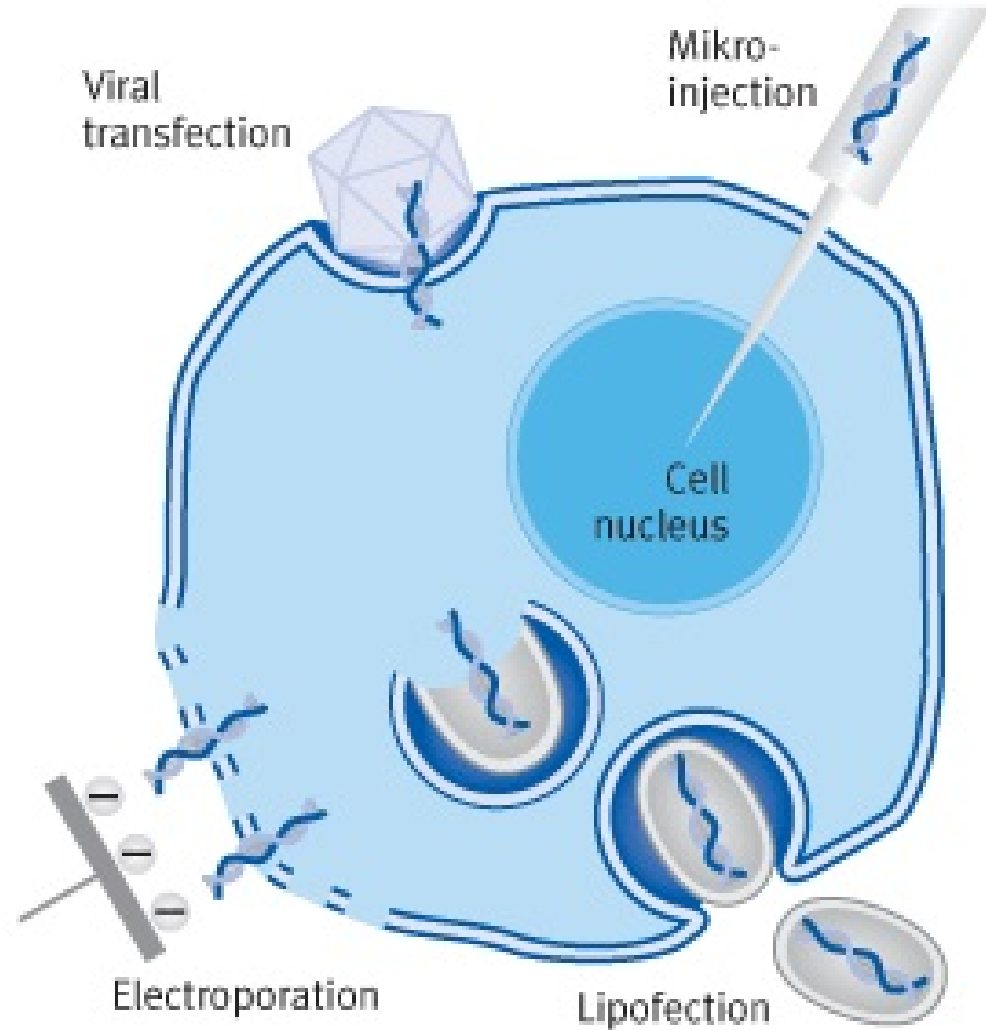
Tinción de células con DAPI y con diacetato de fluoresceína.

05 Chequeo de cultivos celulares



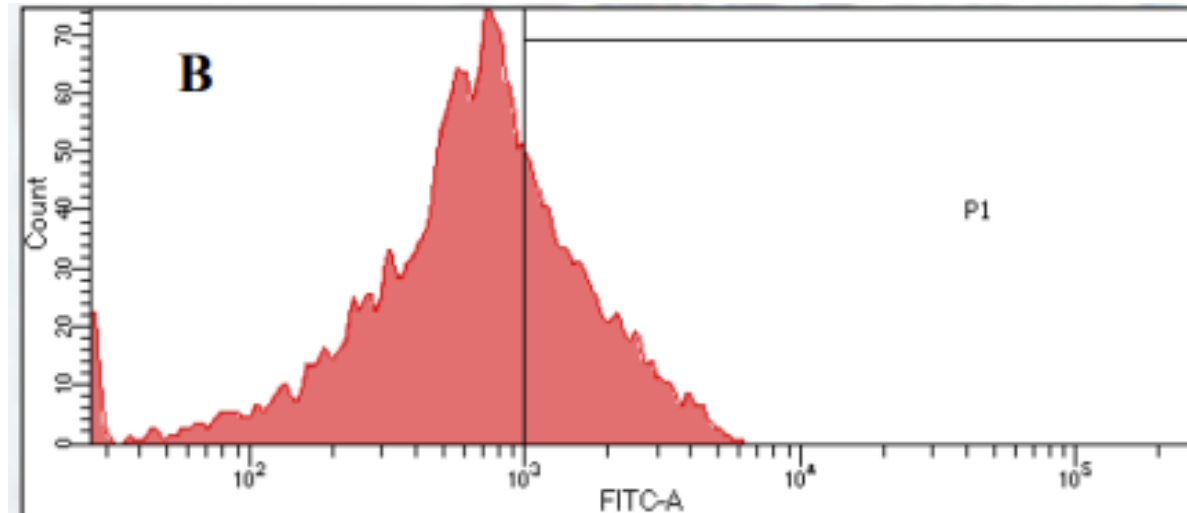
Seguimiento del cultivo durante 15 días: recuento del número de células y el análisis de la confluencia.

06 Transfección o *delivery*



Existen otros métodos químicos que usan, por ejemplo, fosfato cálcico o DEAE dextrano. Forman complejos con el ADN y permite su introducción en la célula mediante choques osmóticos.

07 Análisis del porcentaje de éxito de la transfección

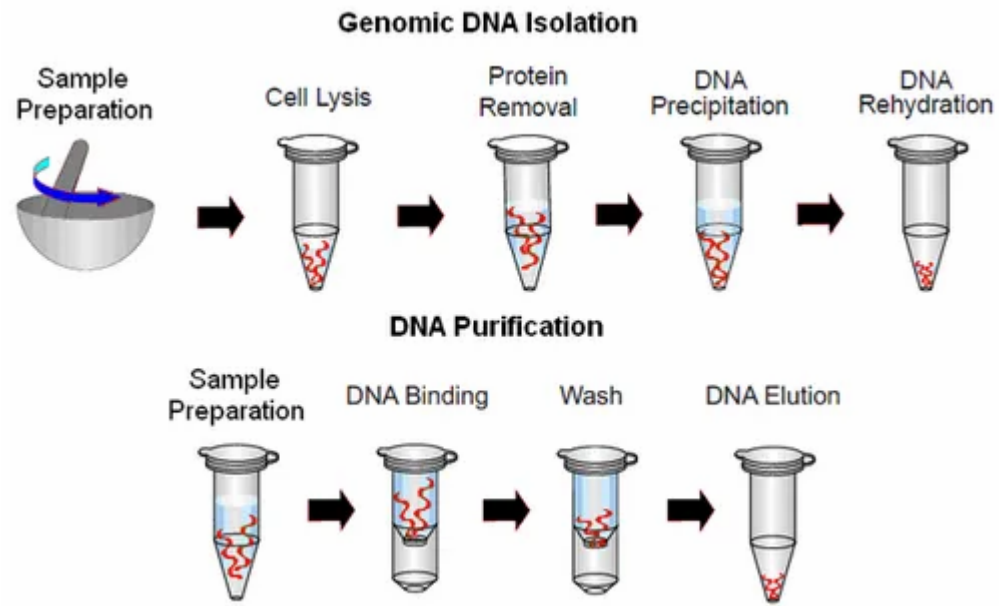


Análisis de la emisión de fluorescencia o inspección visual
bajo microscopio confocal

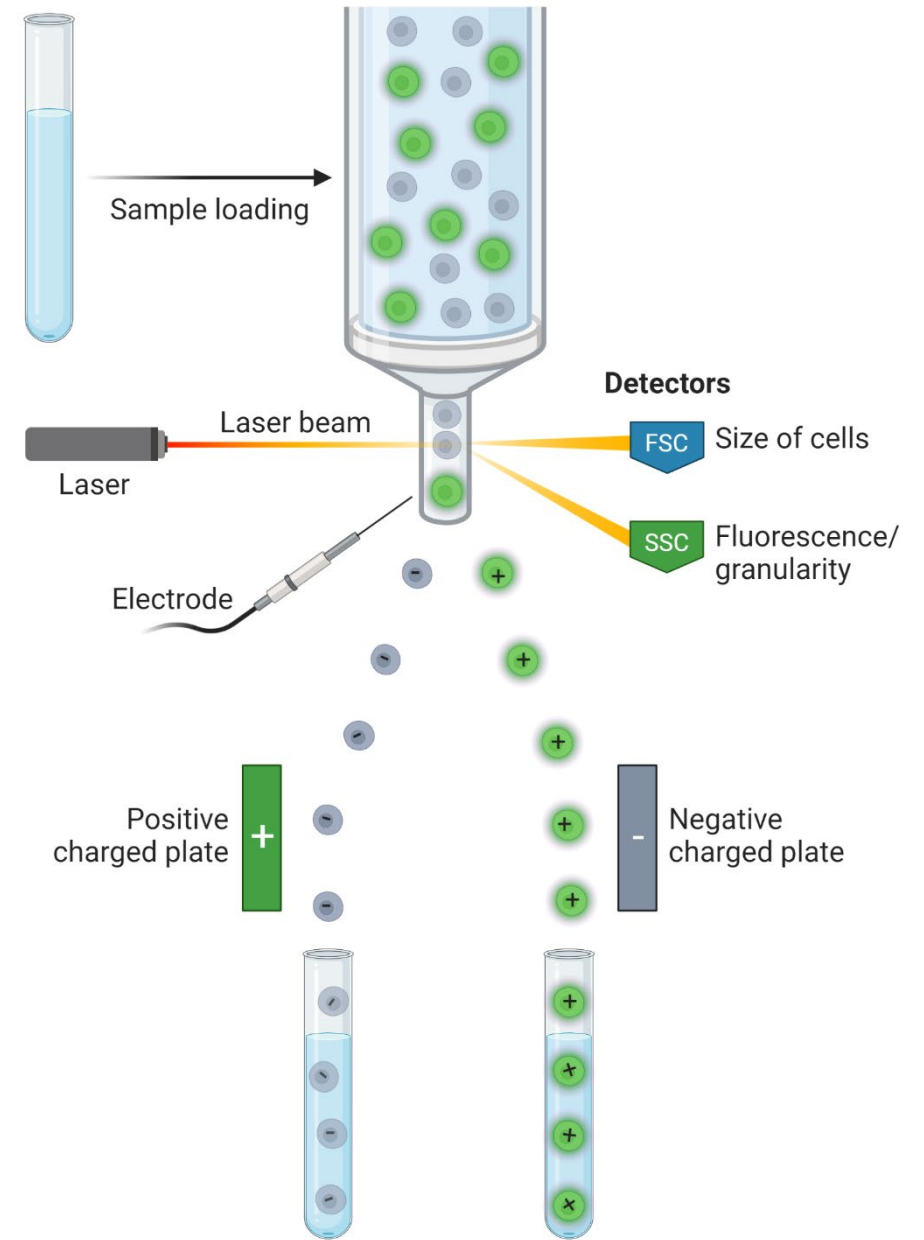
Introducimos el vector pTG13077 utilizando el kit TransIT-X2 Dynamic Delivery System. Este vector lleva integrado un promotor vírico y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Estudiamos la expresión del gen GFP dentro de células. Esto sirve para comprobar el éxito de la transfección a través de la medida de niveles de fluorescencia de las células transfectadas mediante citometría de flujo. La medida de fluorescencia se realiza después de transcurridas 72 horas.

08 Extracción del ADN

Es posible separar las células fluorescentes mediante un tipo especial de citometría de flujo denominado FACS (del inglés Fluorescence-activated cell sorting). Permite identificar y separar grupos de células concretos.

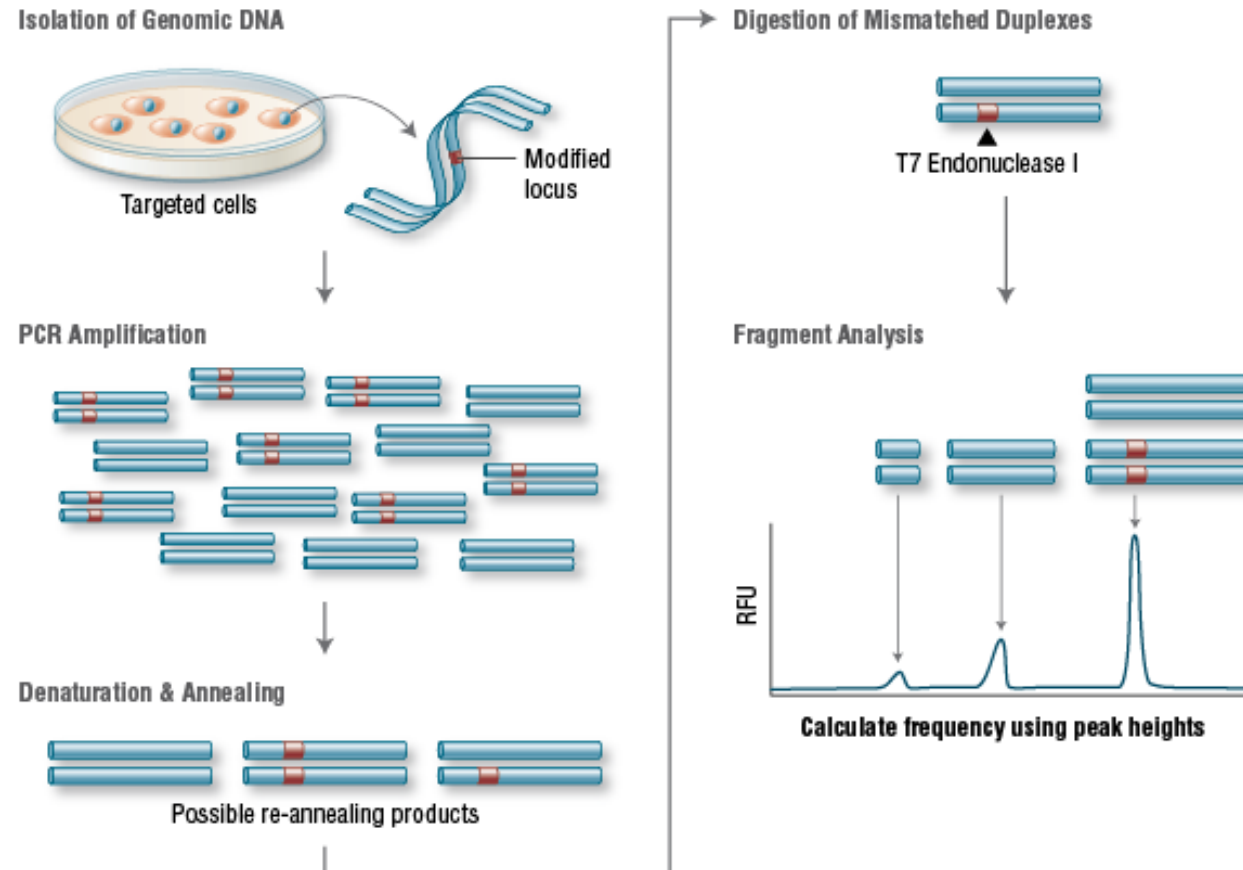


Fuente: <https://www.indiamart.com/>

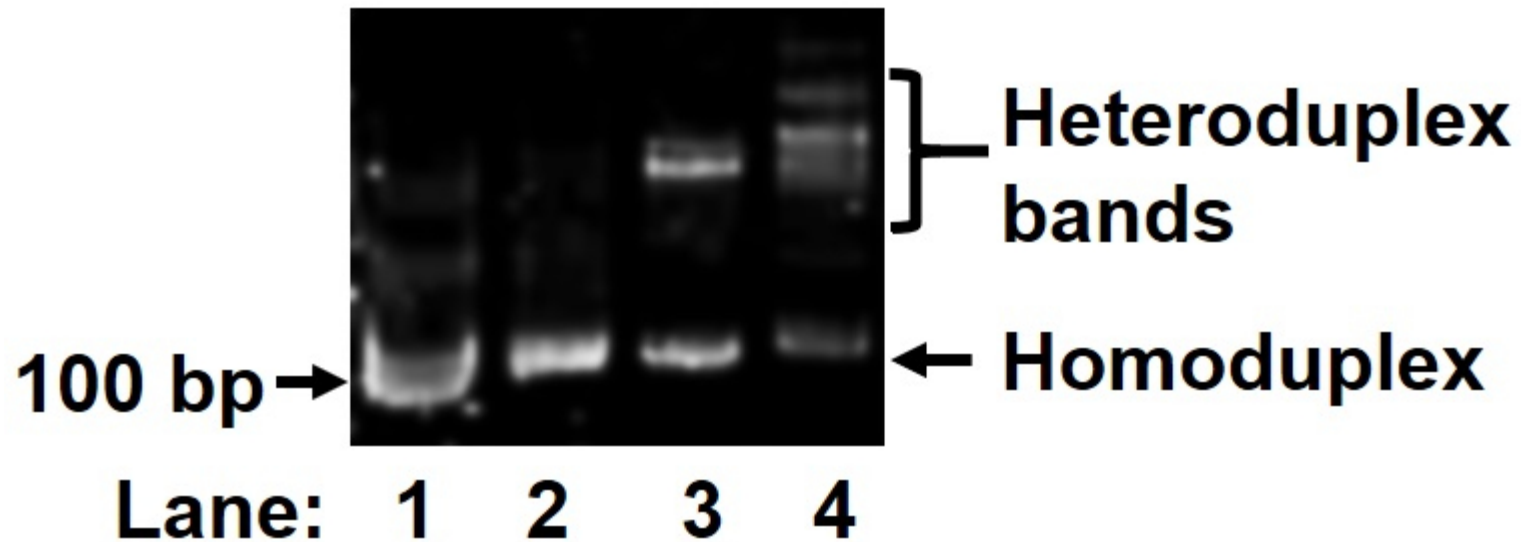


Fuente: AAT Bioquest

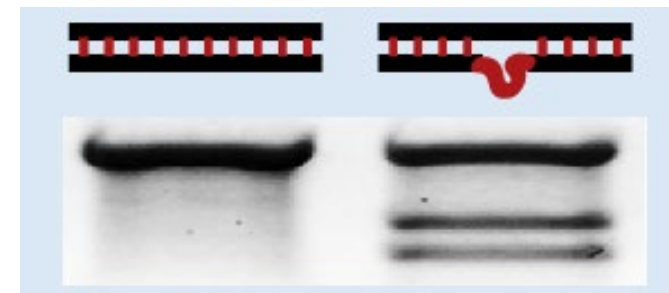
09 Comprobación del éxito de la edición genética



09 Comprobación del éxito de la edición genética



Uso de endonucleasa T7 (corta en posiciones en las que existe desemparejamiento, heterodúplex) y electroforesis en gel de agarosa



09 Comprobación del éxito de la edición genética

WT	ATGATTAATATCAATGCTATGGTTCGTTGATTGTGGTCTCTGGGCTTGACCTATCTAAAT	600
Clone_1	ATGATTAATATCAATGCTATGGTTCGTTGATTGTGGTCTCTGGGCTTGACCTATCTAAAT	530
Clone_2	ATGATTAATATCAATGCTA-----CTGGGCTTGACCTATCTAAAT	584
Clone_3	ATGATTAATATCAATGCTA-----GATTGTGGTCTCTGGGCTTGACCTATCTAAAT	600
Clone_4	ATGATTAATATC-----CTATCTAAAT	592
	*****	*****

Chequeo de la región editada utilizando cebadores
diseñados en las regiones flanqueantes