

# **DISEÑO DE CONSTRUCTOS CRISPR-Cas9**

**Rafael Navajas Pérez**

**Enero 2025**

AGTTGCGATTTACGGATGGCTGCAGCTTGGACCGTGGTGCTGGTGACTTTGGTGCTAGGCTTGGCCGT  
GGCATCGGTCATATTGGGGTGCTCCTTGGCTTTTCCGCTTGGCTCGGTCTGTTAGGCCTCCGTGCCCCG  
AGTTTCGGCGCTGTGCTGCCGAGAGTCGGCCATTGTCATTGGGGCCTCACTTGTGGATACCCCGACCTA  
TTTTGACGGGACCACTCGCGGTAGTCGTTGGGCTTAGTCACCGTAAAGTCCTCCGCCGGCCTCCCCCT  
ACAAAAGATGATAAGCTCCGGCAAGCAATATTGAACAACGCAAGGATCGGCGATATAAACAGAGAAA  
CGGCTGATTACTCTTGTTGGTGTGGTATCGCTAAACTGCGTCGCGGAGCCTTATGGCATAAGTCGTCCGC  
GGAGCACTCTGGTAACGCTTATGGTCCATAGCACATTCATCGCATCCGGGCATGCGCTCTATTTGACGA  
TCCCTTGGCGCAGAGATGCTGGCCACGAGCTAAATTAAGCGACTGCACTACTGTAAGGTCCGTCACG  
CAGACGACGGCCCGGGGAGAGCACTAACCCATCAACCTGTACGGGAACCTTTCTATATCGTTCTCGGAC  
GGAGAGATAACTACAGTGCCGCTTACAGCCCCTCTGTCGTCGCCGACGTCTGTAATATAGCCTTGTTGT  
GATTCCACCCTATTGAGGCATTGTGACACCCACACCTTATTTATGCGCTGAGCCCTACTCCTTCCTTAAT  
TTATTTCTCTCACCCCTTTATTTATGAAGCTGCAGCCCTGACTGA...

AGTTGCGATTACGGATGGCTGCAGCTTGGACCGTGGTGCTGGTGACTTTGGTGCTAGGCTTGGCCGT  
GGCATCGGTCATATTGGGGTGCTCCTTGGCTTTTCCGCTTGGCTCGGTCTGTTAGGCCTCCGTGCCCCG  
AGTTTCGGCGCTGTGCTGCCGAGAGTCGGCCATTGTCATTGGGGCCTCACTTGTGGATACCCCGACCTA  
TTTTGACGGGACCACTCGCGGTAGTCGTTGGGCTTAGTCACCGTAAAGTCCTCCGCCGGCCTCCCCCCT  
ACAAAAGATGATAAGCTCCGGCAAGCAATATTGAACAACGCAAGGATCGGCGATATAAACAGAGAAA  
CGGCTGATTACTCTTGTTGGTGTGGTATCGCTAAACTGCGTCGCGGAGCCTTATGGCATAGTCGTCCGC  
GGAGCACTCTGGTAACGCTTATGGTCCATAGCACATTCATCGCATCCGGGCATGCGCTCTATTTGACGA  
TCCCTTGGCGCAGAGATGCTGGCCACGAGCTAAATTAAGCGACTGCACTACTGTAAGGTCCGTCACG  
CAGACGACGGCCCGGGGAGAGCACTAACCCATCAACCTGTACGGGAACTTTCTATATCGTTCTCGGAC  
GGAGAGATAACTACAGTGCCGCTTACAGCCCCTCTGTCGTCGCCGACGTCTGTAATATAGCCTTGTTGT  
GATTCCACCCTATTGAGGCATTGTGACACCCACACCTTATTTATGCGCTGAGCCCTACTCCTTCCTTAAT  
TTATTTCTCTCACCCCTTTATTTATGAAGCTGCAGCCCTGACTGA...

TSS (Sitio de Inicio de la Transcripción) | UTR 5' | **Codón de inicio** | Péptido señal | **Región**  
**codificante (CDS)** con **unión exón-exón** | **Codón de stop** | UTR 3'

AGTTGCGATTTACGGATGGCTGCAGCTTGGACCGTGGTGGTGGTACTTTGGTGGCTAGGCTTGGCCGT  
GGCATCGGTCATATTGGGGTGCTCCTTGGCTTTTCCGCTTGGCTCGGTCTGTTAGGCCTCCGTGCCCG  
AGTTTCGGCGCTGTGCTGCCGAGAGTCGGCCATTGTCATTGGGGCCTCACTTGTGGATACCCCGACCTA  
TTTTGACGGGACCACTCGCGGTAGTCGTTGGGCTTAGTCACCGTAAAGTCCTCCGCCGGCCTCCCCCT  
ACAAAAGATGATAAGCTCCGGCAAGCAATATTGAACAACGCAAGGATCGGGCGATATAAACAGAGAAA  
CGGCTGATTACTCTTGTGGTGTGGTATCGCTAAACTGCGTCGCGGAGCCTTATGGCATAGTCGTCCGC  
GGAGCACTCTGGTAACGCTTATGGTCCATAGCACATTCATCGCATCCGGGCATGCGCTCTATTTGACGA  
TCCCTTGGCGCAGAGATGCTGGCCACGAGCTAAATTAAGCGACTGCACTACTGTAAGGTCCGTCACG  
CAGACGACGGCCCGGGGAGAGCACTAACCCATCAACCTGTACGGGAACTTTCTATATCGTTCTCGGAC  
GGAGAGATAACTACAGTGCCGCTTACAGCCCCTCTGTCGTCGCCGACGTCTGTAATATAGCCTTGTTGT  
GATTCCACCCTATTGAGGCATTGTGACACCCACACCTTATTTATGCGCTGAGCCCTACTCCTTCCTTAAT  
TTATTTCTCTCACCCCTTTATTTATGAAGCTGCAGCCCTGACTGA...

TSS (Sitio de Inicio de la Transcripción) | UTR 5' | **Codón de inicio** | Péptido señal | **Región**  
**codificante (CDS)** con **unión exón-exón** | **Codón de stop** | UTR 3'

AGTTGCGATTACGGATGGCTGCAGCTTGGACCGTGGTGCTGGTGACTTTGGTGCTAGGCTTGGCCGT  
GGCATCGGTCATATTGGGGTGCTCCTTGGCTTTTCCGCTTGGCTCGGTCTGTTAGGCCTCCGTGCCCG  
AGTTTCGGCGCTGTGCTGCCGAGAGTCGGCCATTGTCATTGGGGCCTCACTTGTGGATACCCCGACCTA  
TTTTGACGGGACCACTCGCGGTAGTCGTTGGGCTTAGTCACCGTAAAGTCCTCCGCCGGCCTCCCCCT  
ACAAAAGATGATAAGCTCCGGCAAGCAATATTGAACAACGCAAGGATCGGGCGATATAAACAGAGAAA  
CGGCTGATTACTCTTGTTGGTGTGGTATCGCTAAACTGCGTCGCGGAGCCTTATGGCATAGTCGTCCGC  
GGAGCACTCTGGTAACGCTTATGGTCCATAGCACATTCATCGCATCCGGGCATGCGCTCTATTTGACGA  
TCCCTTGGCGCAGAGATGCTGGCCACGAGCTAAATAAAGCGACTGCACTACTGTAAGGGTCCGTCACG  
CAGACGACGGCCCGGGGAGAGCACTAACCCATCAACCTGTACGGGAACTTTCTATATCGTTCTCGGAC  
GGAGAGATAACTACAGTGCCGCTTACAGCCCCTCTGTCGTCGCCGACGTCTGTAATATAGCCTTGTTGT  
GATTCCACCCTATTGAGGCATTGTGACACCCACACCTTATTTATGCGCTGAGCCCTACTCCTTCCTTAAT  
TTATTTCTCTCACCTTTATTTATGAAGCTGCAGCCCTGACTGA...

TSS (Sitio de Inicio de la Transcripción) | UTR 5' | **Codón de inicio** | Péptido señal | **Región**  
**codificante (CDS)** con **unión exón-exón** | **Codón de stop** | UTR 3'

AGTTGCGATTTACGG**ATG**GCTGCAGCTTGGACCGTGGTGCTGGTGACTTTGGTGCTAGGCTTGGCCGT  
GGCATCGGTCATATTGGGGTGCTCCTTGGCTTTTCCGCTTGGCTCGGTCTGTTAGGCCTCCGTGCCCG  
AGTTTCGGCGCTGTGCTGCCGAGAGTCGGCCATTGTCATTGG**GG**CCTCACTTGTGGATAACCCGACCTA  
TTTTGACGGGACCACTCGCGGTAGTCGTTGGGCTTA**GTCACCGTAAAGTCTCCGC****CGG**CCTCCCCCT  
ACAAAAGATGATAAGCTCCGGCAAGCAATATTGAACAACGCAAGGATCGGCGATATAAACAGAGAAA  
CGGCTGATTACTCTTGTT**GG**TGTGGTATCGCTAAACTGCGTCGCGGAGCCTTATGGCATAGTCGTCCGC  
GGAGCACTCTGGTAACGCTTATGGTCCATAGCACATTCATCGCATCCGGGCATGCGCTCTATTTGACGA  
TCCCTTGGCGCAGAGATGCTGGCCACGAGCTAAATTA**A**AAGCGACTGCACTACTGTAAGGTCCGTCACG  
CAGACGACGGCCCGGGGAGAGCACTAACCCATCAACCTGTACGGGAACTTTCTATATCGTTCTCGGAC  
**GG**AGAGATAACTACAGTGCCGCTTACAGCCCCTCTGTCGTCGCCGACGTCTGTAATATAGCCTTGTTGT  
GATTCCACCCTATTGAGGCATTG**TGA**CACCCACACCTTATTTATGCGCTGAGCCCTACTCCTTCCTTAAT  
TTATTTCTCTCACCTTTATTTATGAAGCTGCAGCCCTGACTGA...

TSS (Sitio de Inicio de la Transcripción) | UTR 5' | **Codón de inicio** | Péptido señal | **Región**  
**codificante (CDS)** con **unión exón-exón** | **Codón de stop** | UTR 3'

AGTTGCGATTTACGG**ATG**GCTGCAGCTTGGACCGTGGTGCTGGTGACTTTGGTGCTAGGCTTGGCCGT  
GGCAT**TCGGTCATATTGGGGTGCTCCTTGGCTTTTCCGCTTGGCTCGGTCTGTTAGGCCTCCGTGCCCCG**  
AGTTTCGGCGCTGTGCTGCCGAGAGTCGGCCATTGTCATTGG**GG**CCTCACTTGTGGATACCCCGACCTA  
TTTTGACGGGA**CCA****CTCGCGGTAGTCGTTGGGCT**TAGTCACCGTAAAGTCCTCCGCCGGCCTCCCCCT  
ACAAAAGATGATAAGCTCCGGCAAGCAATATTGAACAACGCAAGGATCGGCGATATAAACAGAGAAA  
CGGCTGATTACTCTTGTT**GG**TGTGGTATCGCTAAACTGCGTCGCGGAGCCTTATGGCATAGTCGTCCGC  
GGAGCACTCTGGTAACGCTTATGGTCCATAGCACATTCATCGCATCCGGGCATGCGCTCTATTTGACGA  
TCCCTTGGCGCAGAGATGCTGGCCACGAGCTAAAT**TA**AAGCGACTGCACTACTGTAAGGTCCGTCACG  
CAGACGACGGCCCGGGGAGAGCACTAACCCATCAACCTGTACGGGAACTTTCTATATCGTTCTCGGAC  
**GG**AGAGATAACTACAGTGCCGCTTACAGCCCCTCTGTCGTCGCCGACGTCTGTAATATAGCCTTGTTGT  
GATTCCACCCTATTGAGGCATTG**TGA**CACCCACACCTTATTTATGCGCTGAGCCCTACTCCTTCCTTAAT  
TTATTTCTCTCACCTTTATTTATGAAGCTGCAGCCCTGACTGA...

**TSS (Sitio de Inicio de la Transcripción)** | UTR 5' | **Codón de inicio** | Péptido señal | **Región**  
**codificante (CDS)** con **unión exón-exón** | **Codón de stop** | UTR 3'

# RECOMENDACIONES PARA EL DISEÑO MANUAL DE ARNs GUÍA

## ACOTANDO LA SECUENCIA DEL ARN GUÍA

- Localizar el PAM (la secuencia dependerá de la nucleasa que vayamos a utilizar).
- Es recomendable evitar PAMs con exceso de Gs (v. gr. NGGG).
- Copiar los 20 nucleótidos aguas arriba del PAM (hacia el extremo 5'). No incluir el PAM.

## CARACTERÍSTICAS DEL ARN GUÍA

- Seleccionar, preferiblemente, aquellos ARNg que tengan una G en la primera posición. Esto intensifica la actividad de transcripción de la *ARN Polimerasa III*. Si no la tiene, añadirla a la secuencia.
- La presencia de T/A cuatro bases aguas arriba del PAM aumenta la eficiencia de unión de Cas9.
- Evitar ARNg con >TTTT. Esto puede hacer que la transcripción se interrumpa prematuramente.
- %GC no superior a 80%.
- Vigilar la presencia de complementariedad interna que pueda dar lugar a estructuras 2<sup>ias</sup>.
- BLASTear la secuencia contra el genoma de la especie en estudio para detectar *off-targets*.

# ALGUNOS ERRORES COMUNES

Genomic target sequence	5' . . .CGAAATCGATCGATCGATCGATCGTGGATCGATC . . .3'
Correct protospacer sequence	5' ATCGATCGATCGATCGATCG 3'
<u>Common errors:</u>	
Target sequence plus NGG	ATCGATCGATCGATCGATCGATCGTGG
Reverse complement of target	CGATCGATCGATCGATCGAT
Reverse of target	GCTAGCTAGCTAGCTAGCTA
Complement of target	TAGCTAGCTAGCTAGCTAGC

# Guía Rápida de Diseño de ARNs Guía para hacer Knock-Out

## 1. Selección de gen diana



National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

Log in

Gene  Search

GENE Was this helpful?  

[SHP1 – K-box region and MADS-box transcription factor family protein](#)

[Arabidopsis thaliana \(thale cress\)](#)

Also known as: AT3G58780, AGAMOUS-like 1, AGL1, SHATTERPROOF 1

Gene ID: 825047

[RefSeq transcripts \(5\)](#) [RefSeq proteins \(5\)](#) [PubMed \(22\)](#)

[Genome Data Viewer](#) [BLAST](#) [Download](#)

RefSeq Sequences +

**Search results**

Items: 1 to 20 of 35 Selected: 1 << First < Prev Page 1 of 2 Next > Last >>

 Showing Current items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">SHP1</a> ID: 825047	K-box region and MADS-box transcription factor family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	Chromosome 3, NC_003074.8 (21738160..21742517)	AT3G58780, AGAMOUS-like 1, AGL1, SHATTERPROOF 1

# Guía Rápida de Diseño de ARNs Guía para hacer Knock-Out

The screenshot displays the National Library of Medicine Genome Data Viewer interface. At the top, the NIH logo and "National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information" are visible, along with a "Log in" button. A green banner prompts users to explore the new Comparative Genome Viewer (CGV). The main header is "Genome Data Viewer" with navigation links for Home, Share this page, Reset All, More Tools, and More Info.

The user has selected **Arabidopsis thaliana** (thale cress) and is viewing the assembly TAIR10.1 (GCF\_000001735.4) on Chromosome 3 (NC\_003074.8). The search assembly field contains "Location, gene or phenotype" with search and examples buttons.

The main view shows the genomic region NC\_003074.8: 21,737,723 - 21,742,952. The gene **SHP1** and transcript **NM\_115740.3** are selected. The ideogram view shows chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, MT, and Pltd, with chromosome 3 highlighted. The main track displays the gene structure with exons and introns, and the RefSeq propagation from TAIR and Araport, refreshed on 2022-10-20. The transcript NM\_115740.3 is shown with its exons and introns. The EVA RefSNP Release 3 track is also visible at the bottom.

At the bottom, the assembly information is shown: NC\_003074.8: 22M..22M (5,230 nt). The tracks shown are 3/50.

# Guía Rápida de Diseño de ARNs Guía para hacer Knock-Out

## SHP1 K-box region and MADS-box transcription factor family protein [ *Arabidopsis thaliana* (thale cress) ]

Gene ID: 825047, updated on 5-Jan-2023



[Download Datasets](#)

### Summary

Gene symbol	SHP1
Gene description	K-box region and MADS-box transcription factor family protein
Primary source	<a href="#">Araport:AT3G58780</a>
Locus tag	AT3G58780
Gene type	protein coding
RefSeq status	REVIEWED
Organism	<a href="#">Arabidopsis thaliana (ecotype: Columbia)</a>
Lineage	Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; malvids; Brassicales; Brassicaceae; Camelineae; Arabidopsis
Also known as	AGAMOUS-like 1; AGL1; SHATTERPROOF 1
Summary	One of two genes (SHP1 and SHP2) that are required for fruit dehiscence. The two genes control dehiscence zone differentiation and promote the lignification of adjacent cells.
<b>NEW</b>	Try the new <a href="#">Gene table</a>
	Try the new <a href="#">Transcript table</a>

# Guía Rápida de Diseño de ARNs Guía para hacer Knock-Out

## 2. Búsqueda de ARNs guía (*por secuencia o usando el nombre del gen*)



Target

RefSeq/ENSEMBL/gene name or genomic coordinates.

In

[Add new species.](#)

Using

Change default PAM and guide length in Options.

For

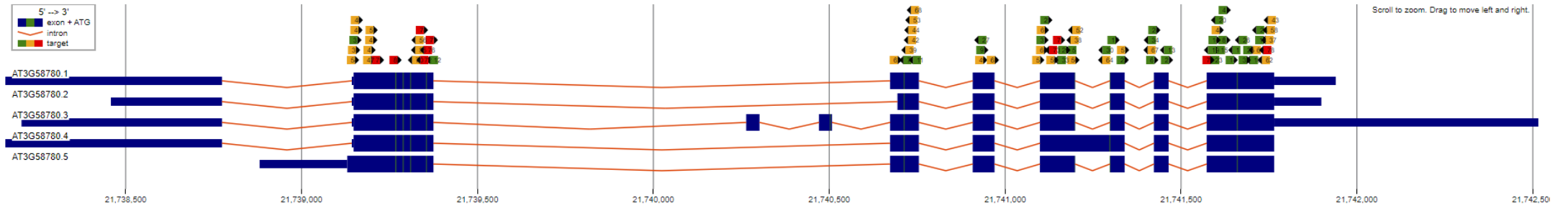
Presets can be adjusted in Options.

<https://chopchop.cbu.uib.no/>

# Guía Rápida de Diseño de ARNs Guía para hacer Knock-Out

## 3. Selección de ARNs guía

AT3G58780



Download results:

[View in UCSC genome browser](#)

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
1	CTGGTCATGAGAAGATACACCGG	Chr3:21741648	-	45	0	0	0	0	0	72.02
2	TAACATGTACCTGCGAGCAAAGG	Chr3:21741445	+	45	0	0	0	0	0	62.66
3	TATATAGGATCAATGGAGGAAGG	Chr3:21739138	+	35	0	0	0	0	0	62.50
4	AGGAATCGAGTGTGATACAAGGG	Chr3:21741609	+	40	0	0	0	0	0	60.04
5	TTACCTTTTTGGAGCGGACACGG	Chr3:21741182	-	45	0	0	0	0	0	59.32
6	TTTTCCATAAATCATGTGTAGG	Chr3:21741403	+	30	0	0	0	0	0	58.83
7	GGAAGGAGGGTTGACGGCATCGG	Chr3:21740713	-	60	0	0	0	0	0	58.55
8	CAGGAATCGAGTGTGATACAAGG	Chr3:21741608	+	45	0	0	0	0	0	58.11
9	AAGAAGCCTCTAAGCTTCGGAGG	Chr3:21740920	+	50	4	0	0	0	0	62.02
10	TTCGGTTCAAGAAGGTTACACCGG	Chr3:21741698	-	45	0	0	0	0	0	55.32
11	TGGTACCTGAGTATTAGCTTCGG	Chr3:21740740	-	40	0	0	0	0	0	54.37
12	AGGAGAAGCGTACCTGTGTGG	Chr3:21739367	-	50	0	0	0	0	0	53.28
13	CGTGGCTAACCTTGTCTCGCAGG	Chr3:21741454	-	60	1	0	0	0	0	53.87
14	GGGACGACAGTTTACGAATCCGG	Chr3:21741629	+	50	1	0	0	0	0	53.63
15	GTATCACACTCGATTCTCTGCTGG	Chr3:21741604	-	50	0	0	0	0	0	51.82
16	CGAAGGCCAGATTGAATCCGG	Chr3:21741580	+	55	0	0	0	0	0	50.36
17	TTTGCAGAAATGAGCTGTAGTGG	Chr3:21741293	+	40	0	0	0	0	0	50.01

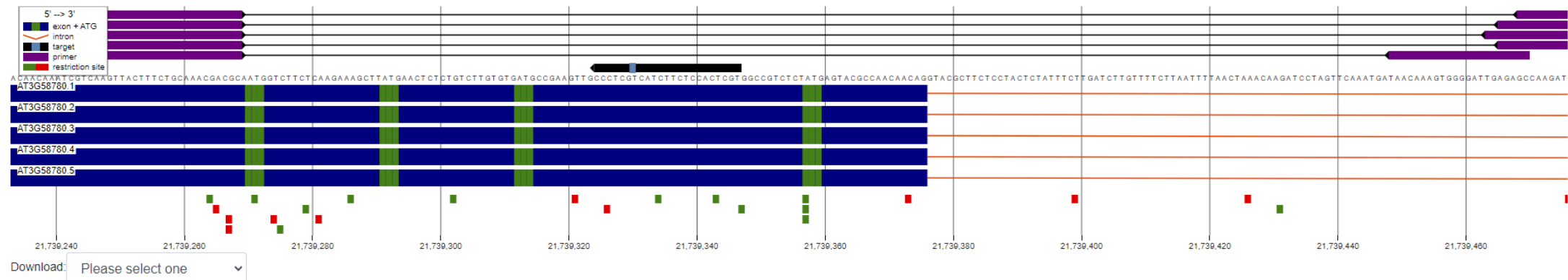
# Guía Rápida de Diseño de ARNs Guía para hacer Knock-Out

## 4. Diseño de primers

Target: **AT3G58780**

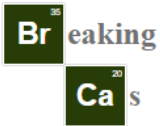
Rank: **35**

Target sequence: **ACGAGTGGAGAAGATGACGAGGG**



Pair	Left primer coordinates	Left primer	Left primer Tm	Left primer off-targets	Right primer coordinates	Right primer	Right primer Tm	Right primer off-targets	Pair off-targets	Product size
1	Chr3:21739248-21739270	AGTTACTTTCTGCAAACGACGC	60.8	0	Chr3:21739449-21739471	GCTCTCAATCCCCACTTTGTTA	60.5	0	0	223
2	Chr3:21739248-21739270	AGTTACTTTCTGCAAACGACGC	60.8	0	Chr3:21739466-21739488	ACCAAACCTAATCTTGGCTCT	60.4	0	0	240
3	Chr3:21739248-21739270	AGTTACTTTCTGCAAACGACGC	60.8	0	Chr3:21739464-21739486	CAAACCTAATCTTGGCTCTCA	60.6	0	0	238
4	Chr3:21739249-21739270	GTTACTTTCTGCAAACGACGC	59.9	0	Chr3:21739466-21739488	ACCAAACCTAATCTTGGCTCT	60.4	0	0	239
5	Chr3:21739248-21739270	AGTTACTTTCTGCAAACGACGC	60.8	0	Chr3:21739469-21739491	TTAACCAACCTAATCTTGGC	59.4	0	0	243

Off-targets		
Location	Number of mismatches	Sequence (including mismatches)
Chr3:4972718	3	CCTTCGcCATCTTCTCctCTctT



# Breaking-Cas

Ensembl collection of protists, fungi, plants and invertebrate metazoa genomes. Release 56 (February 2023) Genomes: 2097

[CNB-CSIC](#) | [BioinfoGP](#) | [tools](#)

Please cite:  
 \*Juan C. Oliveros, Mónica 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://bioinfo.cnb.csic.es/tools/breakingcas>

[Tutorial](#)

- Choose organism:  Write 3 letters or more and select it.
- Paste one or several query DNA sequences in FASTA format (up to 20,000 nucleotides in total):
- Select nuclease settings:

Or set your own parameters:

PAM sequence:

PAM position:  5'  3'

Guide length:

Mismatches:

Position-dependent weights

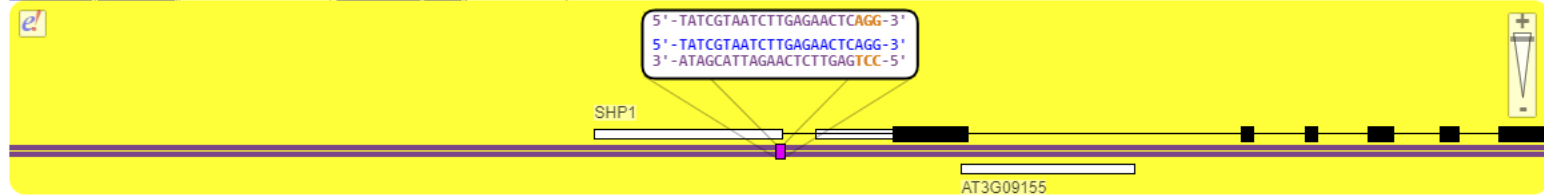
5'-#1-#2-#3-#4-#5-#6-#7-#8-#9-#10-#11-#12-#13-#14-#15-#16-#17-#18-#19-#20(PAM)-3'

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](#)

100 3:21738754-21738776(+)  
 AT3G09155 (AT3G09155): 577 nts downstream; AT3G58780 (SHP1): 23 nts overlap



Thank you for using Breaking-Cas!

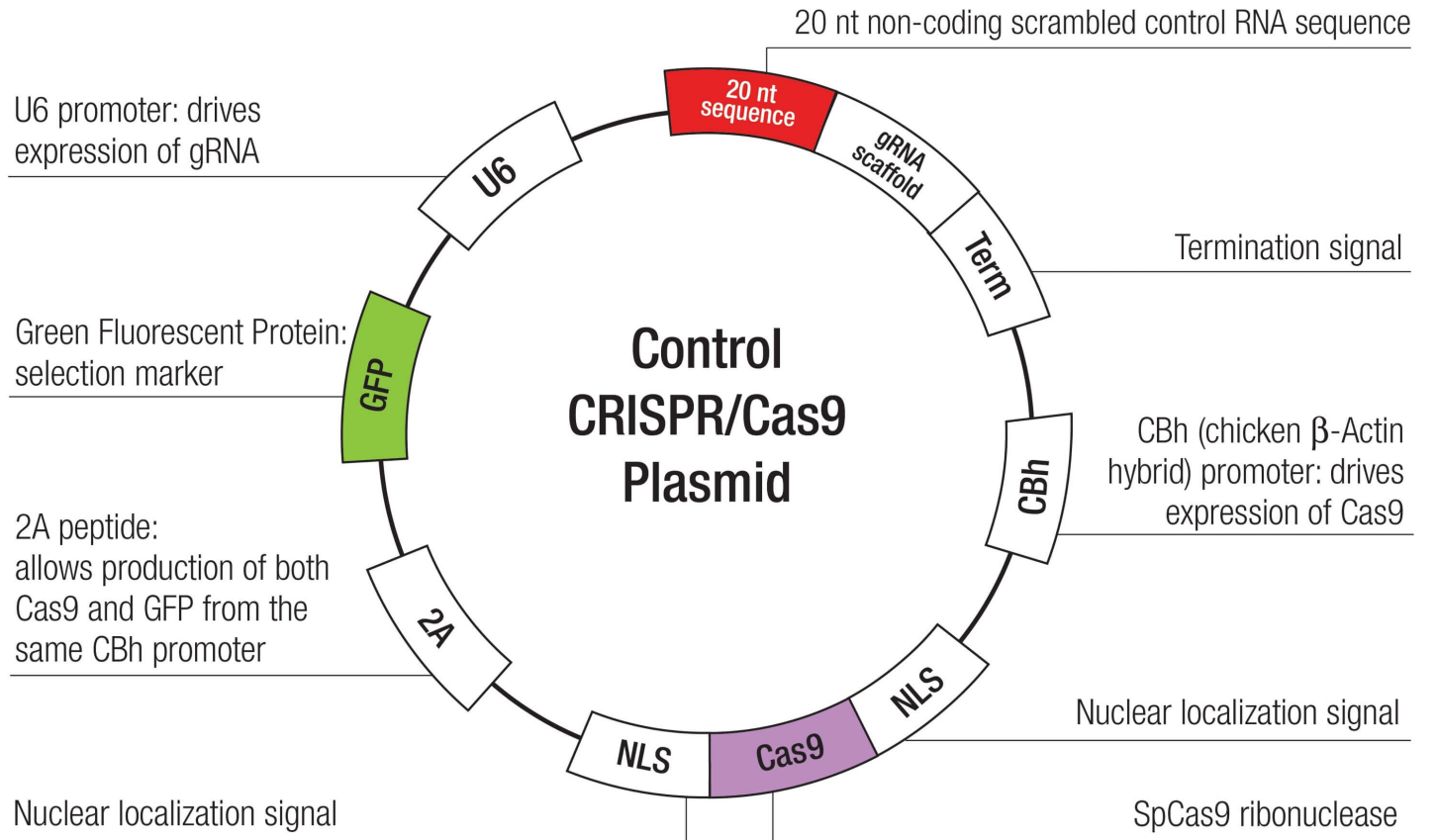
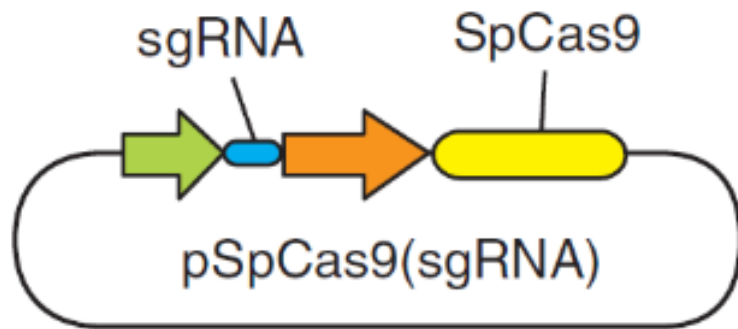
Filter boxes [?](#) [Export Oligos](#) (text-tabulated format)

START↑	END↑	STRAND↑	OLIGO↑	ONTARGETS↑	OFFTARGETS↑	GENES↑	SCORE↓
595	614	+	TATCGTAATCTTGAGAACTCAGG	1	0	2	100
1575	1594	+	GACGGCCCATCAAATTTCTAGG	1	2	4	100
3298	3317	-	CGTGGCTAACCTTTGCTCGCAGG	1	0	2	100
3443	3462	-	ACACTCGATTCCGTGCTGGTC	1	1	3	100
3448	3467	-	GTATCACACTCGATTCCGTGTC	1	1	4	100
4216	4235	+	TCTCACACAGCCCGAAGTATGG	1	0	2	100
600	619	+	TAATCTTGAGAACTCAGGTAAGG	1	3	6	99.9
1595	1614	-	TTTTCACTGAAGTAAACCTTAGG	1	9	6	99.9
1710	1729	+	CTACTGATGAGTTGCACTAGGG	1	2	6	99.9
2179	2198	+	CATGTAATATACACGATACATGG	1	2	4	99.9
3026	3045	-	TTACCTTTTGGAGCGGACACGG	1	6	13	99.9
3542	3561	-	TTCGGTTCAAGAAGGTTTCCCGG	1	5	6	99.9
1539	1558	-	TGTAGAACTGACATGCATCAGG	1	2	4	99.8
1680	1699	+	ACCTCTGTCTGGTGAAGTAAAGG	1	2	5	99.8
2500	2519	-	CACACTAATAAGTAAAGTCCCGG	1	2	4	99.8
2571	2590	-	TTAGCTTCGGTGACGGAAGGAGG	1	4	6	99.8
2703	2722	+	GCATTGAAACGGTTTCGTTATGG	1	6	12	99.8
2770	2789	-	AATCTGCCTCCGAAGCTTAGAGG	1	1	3	99.8
3286	3305	+	TAACATGTACTGCGAGCAAAGG	1	2	4	99.8
3511	3530	-	TCCGATTATAATGTGCGACTTGG	1	2	6	99.8
3554	3573	+	GAACCGAATCAGCAATTTCTCGG	1	4	8	99.8
1391	1410	+	CTCTCTCTATATATGTGTGG	1	1	3	99.7
1709	1728	+	TCTACTGATGAGTTGCTACTAGG	1	1	2	99.7
2578	2597	-	CTGAGTATTAGCTTCGGTGACGG	2	3	8	99.7
3423	3442	-	CGGATTCATCTGGCGCCTTCGG	1	1	4	99.7
3430	3449	+	CAGATTGAATCCGGACCAGCAGG	1	2	5	99.7
3507	3526	+	ACCAATCTGACAGTATATAATCGG	1	2	5	99.7
1679	1698	+	AACCTCTGTCTGGTGAAGTAAAGG	1	3	5	99.6
2379	2398	-	ACCAATATCTGACAGTACGAGG	1	1	3	99.6
4209	4228	-	CGGCTGTGTGAGAGAACAGAGGG	1	2	5	99.6
824	843	+	CCTAATCTAGACCAGAATATGG	1	3	6	99.5
2500	2519	+	CGATCTTACTTATTAGTGTGAGG	1	2	5	99.5
4314	4333	+	TTTTCTAACGAAAGTGTGCGAGG	1	5	8	99.5
979	998	+	TATATAGGATCAATGGAGGAAGG	1	5	9	99.4
			AGTAGCAAGAAACTAGGGAGAGG	1	6	11	99.4
			GGGGATTGAGACCAAGATTAGG	1	6	12	99.4
			TAGCTTCGGTGACCGAAGGAGGG	1	4	9	99.4
			GAAAACACAAGCGGACTTTGG	1	7	14	99.4
			CAGGAATCGAGTGTGATACAAGG	1	1	4	99.4
			GGGACGACAGTTTACGAATCCGG	1	1	4	99.4
			AGACTTATGTAACCTCTGTCTGG	1	9	17	99.3

<https://bioinfo.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>

# Guía Rápida de Diseño de ARNs Guía para hacer Knock-Out

## 5. Selección de vectores y 'delivery'



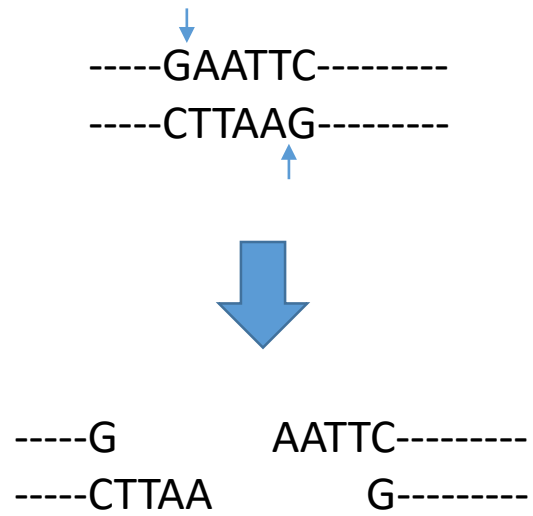
# Guía Rápida de Diseño de ARNs Guía para hacer Knock-Out

## 5. Selección de vectores y 'delivery'



Manejo integral de secuencias, para el diseño de ARNg y su ensamblaje en vectores.

# Diana de Restricción para EcoRI



# Generación de dúplex de ADN para la integración del ARNg

GAATTC TATACTAGAAGTTCTCCTCG **AGG** GAATTC

# Generación de dúplex de ADN para la integración del ARNg

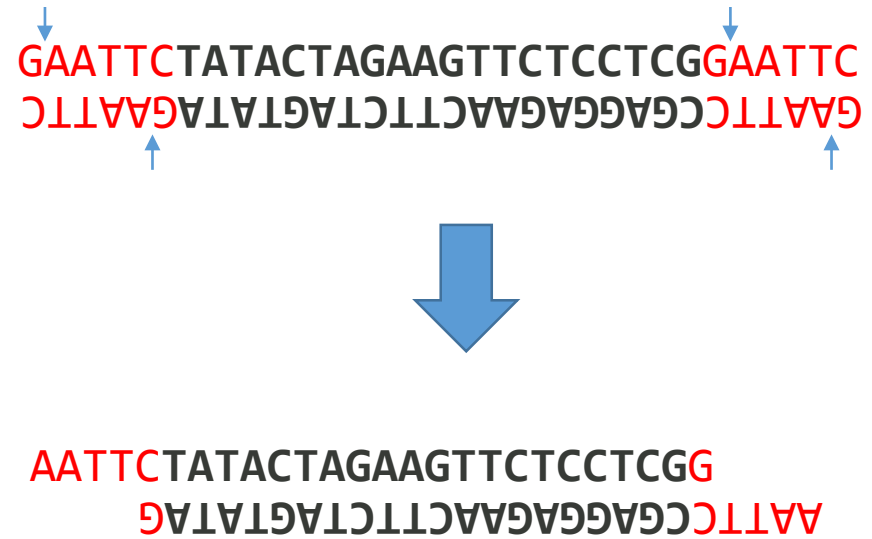
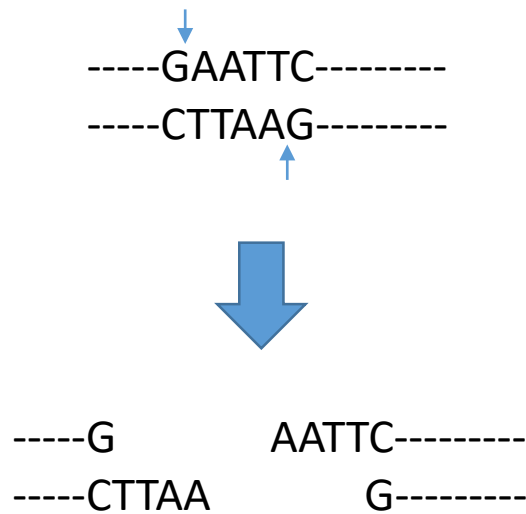
GAATTC TATACTAGAAGTTCTCCTCGGAATTC  
CTTAAGATAGTAAGGAGGATTCGAATTC



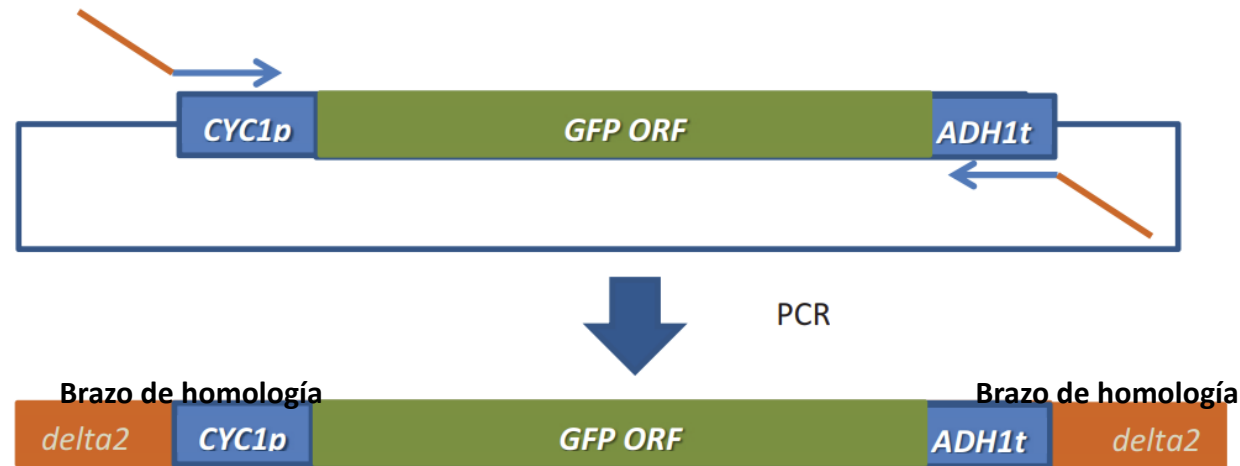




# Generación de dúplex de ADN para la integración del ARNg



# Generación de casetes de clonación para la inserción de fragmentos de ADN



**Figura 12.** Esquema del casete *gfp-delta* tras amplificación por PCR con los cebadores MegaCebadorDelta1 y MegaCebadorDelta2.

Para inserción de un fragmento por recombinación homóloga, se diseñan cebadores híbridos que contienen, por un lado la secuencia complementaria a zonas flanqueantes del gen *reporter* y, en los extremos, secuencias complementarias a la zona de inserción.