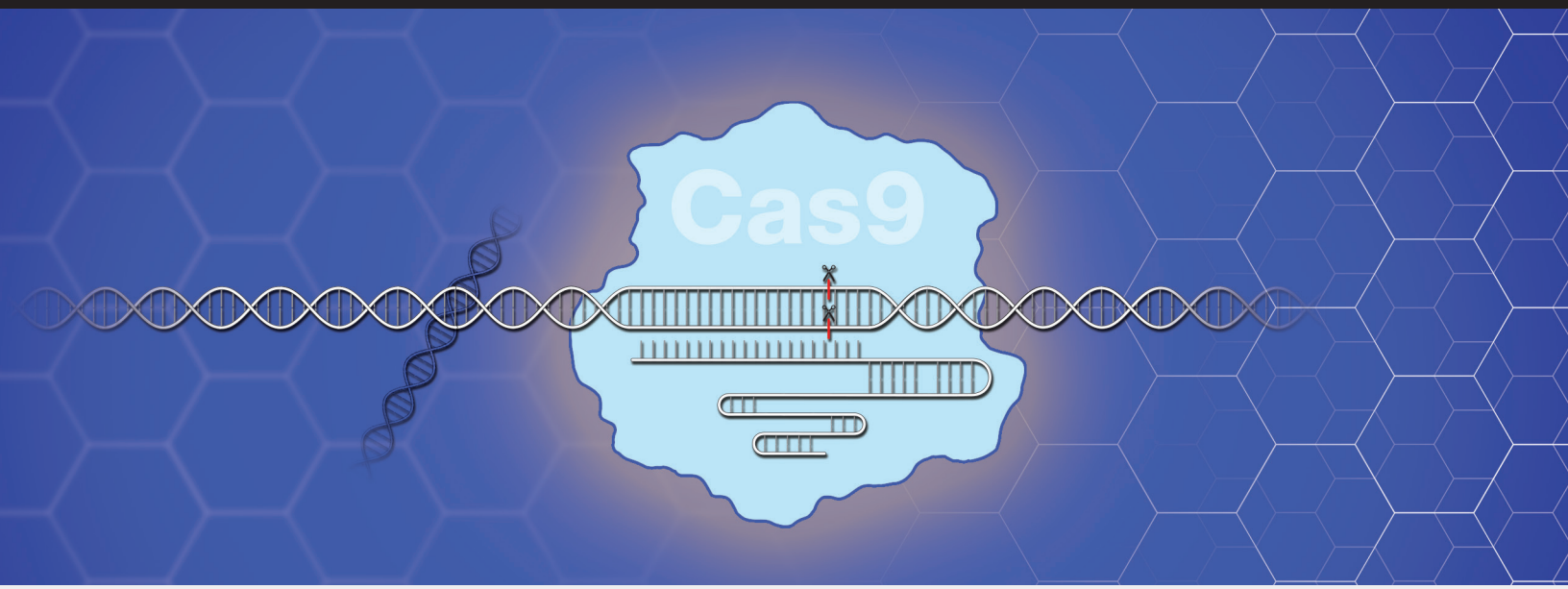
BIO-RAD Explorer



Out of the Blue CRISPR Kit

Referencia #12012608EDU

Guía del instructor

Nota: Se permite la reproducción total o parcial de este documento solo para uso educativo y no comercial. El uso comercial de contenidos protegidos por derechos de autor, incluido el uso en materiales didácticos por los que se recibe un pago, requiere el permiso expreso de Bio-Rad™ Laboratories, Inc. Contáctenos en **explorer@bio-rad.com** para obtener más información.

Este producto no es para autoadministración.

Para obtener asistencia técnica, llame a su oficina local de Bio-Rad o en los Estados Unidos, llame a **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723) opción 2.

BIO-RAD

Estimado instructor

El ritmo de los descubrimientos en las ciencias de la vida y la fuerza del ingenio humano están cambiando la vida y el futuro de sus estudiantes diariamente. Los científicos ya pueden ahora aprovechar la habilidad innata de una célula para reparar su ADN y modificar un genoma. Se han desarrollado varios enfoques para la edición del genoma y, entre ellos, el CRISPR (acrónimo de «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats»)-Cas9 se distingue por su precisión, facilidad de utilización y bajo costo. Lo que fue descubierto como una forma de inmunidad procariótica está revolucionando la investigación científica, la agricultura y la medicina.

El kit Out of the Blue CRISPR brinda a sus alumnos las herramientas para realizar una auténtica edición de genes en el aula. Este kit, una actividad de aprendizaje única en su género, hará que sus alumnos exclamen: «¡Guau! ¡He hecho CRISPR!». Utilizando reactivos, técnicas y organismos conocidos y seguros, los estudiantes utilizarán la edición genética CRISPR-Cas9 para interrumpir el gen *lacZ* en *E. coli*. El fenotipo resultante se visualiza fácilmente a través del filtradoazul / blanco, y los estudiantes pueden utilizar la PCR para confirmar la edición de cromosomas mediante la extension opcional Out of the Blue Genotyping Extension. A medida que sus alumnos adquieren un conocimiento más profundo de las habilidades y limitaciones únicas de la tecnología CRISPR-Cas9, serán cada vez más capaces de participar en conversaciones más significativas acerca de la promesa, los riesgos y la ética de la edición genética.

Las actividades incluidas en este kit se han desarrollado en colaboración con Sherry Annee, ex presidenta de la Asociación Nacional de Profesores de Biología y profesora de biotecnología en la Brebeuf Preparatory Academy de Indianápolis (IN), y Thomas Tubon Jr., profesor y director del Programa de Células Madre del Madison Area Technical College de Wisconsin.

Nos esforzamos por mejorar continuamente nuestro plan de estudios y nuestros productos, y su opinión es muy importante para nosotros. Agradecemos sus historias, comentarios y sugerencias.

Comparta el éxito de sus alumnos en las redes sociales @bioradeducation.

El equipo Bio-Rad Explorer
Bio-Rad Laboratories
6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547
explorer@bio-rad.com

Tabla de Contenidos

Antes de empezar
Almacenamiento del kit 1
Directrices de seguridad 1
Componentes del kit 2
Información para pedidos 3
Descripción general de las actividades del kit 4
Calendario de actividades 5
Plan de estudios 6

Preparación del instructor
Instrucciones de preparación 7
Antecedentes del instructor 12

Guía del instructor
Actividad 1 Introducción a la tecnología de edición genética CRISPR-Cas9 15
Actividad 2 Laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR 16
Actividad principal Identificación y análisis bioinformáticos de los sitios objetivo de Cas9 17

Apéndice A: Debate estructurado de los estudiantes en torno a la edición genética CRISPR 19
Apéndice B: CRISPR-Cas9 y un sistema inmunológico microbiano 23
Apéndice C: Instrucciones para preparar placas de agar LB en microondas pequeños 25

Recursos 28

Avisos legales 29

Almacenamiento del kit

Cuando reciba el Out of the Blue CRISPR Gene Editing Kit, realice los siguientes pasos:

1. Anote el lugar de almacenamiento y los números de lote de las etiquetas de los productos.

2. Guarde la **bolsa de reactivos del Out of the Blue CRISPR Kit** en el congelador (–20 °C).

3. Guarde el **polvo de agar nutritivo LB** y las **cápsulas de caldo LB** a temperatura ambiente (~20 °C).

4. Visite **bio-rad.com/outoftheblue** para descargar las guías del instructor y del estudiante más actualizadas.

Para asistencia técnica envíe un correo electrónico a support@bio-rad.com o llamando al 1-800-4BIORAD, opción 2.

Directrices de seguridad

El Out of the Blue CRISPR Kit y el paquete de reemplazo del mismo, contienen kanamicina y espectinomicina, antibióticos que pueden causar reacciones alérgicas o irritación. Ambos antibióticos se agregan al medio de agar LB, el cual los alumnos manejarán como parte de la actividad. Las personas alérgicas a estos antibióticos o similares deben consultar a su médico antes de manipular los materiales y reactivos en el kit. Al finalizar las actividades de laboratorio, coloque todas las placas bacterianas y cualquier material que haya entrado en contacto con las bacterias en una solución de cloro al 10% durante al menos 20 minutos para descontaminarlos. Siga las normativas locales para otras recomendaciones de eliminación.

La cepa bacteriana *E. coli* HB101-pBRKan contenida en este kit no es patógena y ha sido modificada genéticamente para prevenir su crecimiento a menos que se cultive en un medio enriquecido. No obstante, debe recurrirse a prácticas microbiológicas habituales.

Al igual que las enzimas de restricción, Cas9 corta el ADN, pero a diferencia de estas, Cas9 es programable y puede ser dirigido para cortar una secuencia de ADN en particular. La actividad de laboratorio del Out of the Blue CRISPR Kit consiste en utilizar Cas9 para cortar un gen bacteriano particular, el gen *lacZ*, que solo está presente en las bacterias. Los alumnos cortarán el gen *lacZ* y reemplazarán una parte de su secuencia con una porción de ADN que alterará el gen. La disrupción del gen *lacZ* en las bacterias es común en los salones de clase, así como en los laboratorios de investigación. La aproximación a esta actividad de laboratorio se basa en estas prácticas científicas seguras y comprobadas, utilizando adicionalmente el Cas9 como un nuevo par de tijeras moleculares.

Se deben seguir las pautas básicas de seguridad en el laboratorio, incluyendo el uso de guantes y lentes de seguridad.

Componentes del kit

Cada kit contiene materiales para 8 estaciones de trabajo para estudiantes.

Elemento	Cantidad
E. coli HB101-pBRKan, liofilizada	1 vial
Plásmido de plantilla de ADN donante (pLZDonor)	215 µl
Plantilla de ADN donante y plásmido de ARN guía (pLZDonorGuide)	215 µl
Mezcla KIX (KIX Mix)	263 mg
Espectinomicina en polvo	18 mg
L (+) arabinosa, liofilizada	600 mg
Agar nutritivo LB en polvo	25 g
Cápsula de caldo LB, hace 50 ml de caldo LB	1 cápsula
Anillo de inoculación, estéril, 10 µl	80
Caja de Petri, 60 mm, estéril	60
Tubo de microcentrífuga, natural, 2.0 ml	90
Solución de transformación (50 mM $CaCl_2$, pH 6.1), estéril	15 ml
Guía rápida de inicio	1
Guía de respuestas del instructor	1

Materiales requeridos (no incluidos en este kit)	**Cantidad**
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 100-1,000 µl	1–8
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 20-200 µl	4–8
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 2-20 µl	4–8
Balanza con rango de 1 a 10 g	1
Esterilizador Autoclave u horno de microondas	1
Termómetro (0-60 °C)	1
Baño seco o baño de agua con regulación de temperatura	1
Flotadores de espuma, si se utiliza un baño de agua	8
Matraz Erlenmeyer o frasco esteriliizable en autoclave con tapón, 500 ml	1*
Matraz Erlenmeyer o frasco esterilizable en autoclave con tapón, 1 L	1*
Frasco esterilizable en autoclave con tapón, 150-250 ml	1
Cilindro graduado, 500 ml	1
Agua desionizada o destilada	750 ml
Hielo picado y recipiente (por ejemplo, hielera o vaso de poliestireno)	8
Tijeras	8
Marcadores permanentes	8
Papel aluminio	
Blanqueador doméstico, solución al 10 %.	
Cinta de laboratorio	

Materiales recomendados (no incluidos en este kit)	**Cantidad**
Horno de incubación o incubadora de agitación con bandeja	1
Controlador de pipetas y pipetas serológicas estériles	1
Agitador vórtex	1
Gradilla para tubos	8

* Si su microondas no puede acomodar un frasco de 1 L, consulte el Apéndice C para ver las instrucciones de preparación de placas de agar LB modificadas. Necesitará dos frascos adicionales de 500 ml.

Out of the Blue CRISPR Kit

Información para pedidos

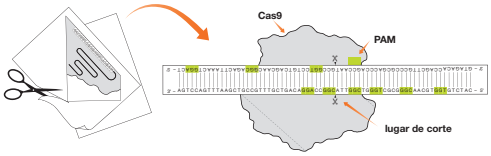
Referencia #	Descripción
Kits y paquetes de recarga	
12012608EDU	**Out of the Blue CRISPR Kit**
12012620EDU	**Out of the Blue CRISPR Kit Refill Pack**
12012607EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension**
12012708EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension Refill Pack**
17006070EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension with Small Fast Blast Electrophoresis Pack**
17006284EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension with Small UView Electrophoresis Pack**
17006081EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits**
17006285EDU	**Out of the Blue CRISPR y Genotyping Extension kits plus Small UView DNA Electrophoresis Pack**
17006286EDU	**Out of the Blue CRISPR y Genotyping Extension kits plus Small Fast Blast DNA Electrophoresis Pack**
Consumibles	
1660472EDU	**LB Nutrient Agar**, 500 g
1660412EDU	**LB Broth Capsule**, hace 50 ml de caldo LB
1660421EDU	**LB Nutrient Broth**, 10 ml
1660470EDU	**Petri Dishes [Cajas de Petri]**, 500
2239430EDU	**2 ml EZ Micro Test Tubes [Microtubos de Ensayo 2 ml EZ]**, 500
1660471EDU	**Inoculation Loops [Anillos de inoculación]**, 80
Equipos y material de laboratorio	
1660501EDU	**Mini Incubation Oven [Mini horno de incubación]**, 120 V
17002944EDU	**Benchtop Shaking Incubator Starter Set [Juego de iniciación incubadora de mesa agitable]**, 120 V
17002946EDU	**Benchtop Shaking Incubator Starter Set [Juego de iniciación incubadora de mesa agitable]**, 230 V para Europa y el Reino Unido
12005504EDU	**Petri Dish Shelf for Shaking Incubator [Caja de Petri para incubadora de agitación]**
12011919EDU	**Mini Centrifuge [Minicentrífuga]**, 100–240 V
1660610EDU	**BR-2000 Vortexer**, 120 V
1660611EDU	**BR-2000 Vortexer**, 220 V para la UE
1660621EDU	**BR-2000 Vortexer**, 220 V para el Reino Unido
1660490EDU	**Professional Pipet Controller [Controlador de pipetas profesional]**
1660481EDU	**Green Racks [Gradillas verdes]**, juego de 5 gradillas

Descripción general de las actividades del kit

Actividad 1

Introducción a la Tecnología de Edición Genética CRISPR-Cas9

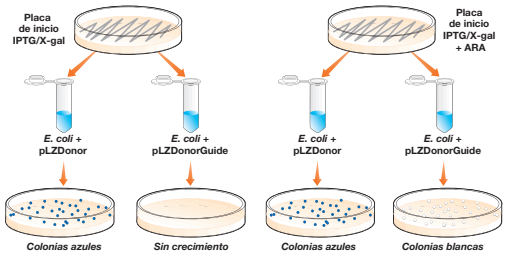
Luego de una breve lectura, los alumnos utilizan un modelo de papel para seguir los pasos de la escisión del ADN por CRISPR-Cas9 y de la reparación dirigida por homología. A continuación, utilizan un modelo matemático para demostrar que la exactitud de la tecnología CRISPR-Cas9 es mucho más alta que la de las enzimas de restricción.



Actividad 2

Laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR

Los alumnos editan el gen *lacZ* cromosómico en *E. coli* transformándolo por medio de sistemas de expresión basados en plásmidos de la plantilla de ADN donante asì como de ARN guía. A continuación, utilizan el filtrado azul / blanco para calcular la eficacia de la edición genética y finalmente escriben explicaciones científicas de sus observaciones.



Actividad principal

Identificación y análisis bioinformático de los sitios objetivo de Cas9

Los estudiantes aplican sus conocimientos para identificar, dentro de los genes vinculados a esta enfermedad, a los candidatos a sitios objetivo de Cas9. A continuación, utilizando los resultados de BLAST como evidencia, los estudiantes clasifican sus sitios de objetivo propuestos en función del riesgo de edición fuera del objetivo.

Calendario de actividades

Las actividades de este kit están diseñadas para durar tres periodos de clase de 90 minutos o más, como se muestra en la Tabla 1. En la Tabla 2 se presenta un calendario alternativo para períodos de ~50 minutos.

Tabla 1. Calendario sugerido para períodos de clase de 90 minutos o más de duración y que tengan lugar una o dos veces por semana.

	Período de clase 1	Período de clase 2	Período de clase 3
Trabajo en clase	Clase de presentación u otra instrucción directa Inicie la actividad 1 Introducción a la Tecnología de Edición Genética CRISPR-Cas9, partes 1 a 4	Actividad 2 Laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR, Parte 2. Realice la edición de genes	Inicie la actividad final
Trabajo fuera de clase	Finalice la actividad 1 Actividad 2 Laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR, Parte 1. Responda a las preguntas previas al laboratorio	Los alumnos recuperan sus placas tras la incubación y analizan los resultados Actividad 2, Parte 3. Responda a las preguntas posteriores al laboratorio	Complete la actividad final

Tabla 2. Calendario alternativo para periodos de clase diarios de ~50 minutos.

	Período de clase 1	Período de clase 2	Período de clase 3	Período de clase 4	Período de clase 5
Trabajo en clase	Clase de presentación u otra instrucción directa Inicie la actividad 1 Introducción a la Tecnología de Edición Genética CRISPR/Cas9	Inicie la Actividad 2 Laboratorion de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR, Parte 2. Realice la edición de genes	Continuación Actividad 2, Parte 2	Finalice la actividad 2, Parte 2. Inicie la actividad 2, Parte 3. Respuesta a las preguntas posteriores al laboratorio	Inicie la actividad final
Trabajo fuera de clase	Finalice la actividad 1 Inicie la actividad 2, Parte 1. Respuesta a las preguntas previas al laboratorio			Finalice la actividad 2, Parte 3. Respuesta a las preguntas posteriores al laboratorio	Complete la actividad final

Plan de estudios

Conocimientos previos requeridos

- Estructura y función básica del ADN, el ARN y las proteínas
- Emparejamiento de bases nucleótidas (cómo se escribe una hebra complementaria de ADN o ARN)
- Dogma central (ADN → ARN → Proteína → Característica)
- Cálculos simples de probabilidad
- Pasos clave de la transformación bacteriana, incluyendo la estructura y función del plásmido, los marcadores de selección de resistencia a los antibióticos y el choque térmico
- Cómo cultivar bacterias en medios de agar
- Cómo utilizar una micropipeta

Nociones, temáticas y competencias

- **Estructura y función del ADN, el ARN y las proteínas**: Cas9 es una proteína y nucleasa que corta el ADN de acuerdo con las indicaciones del ARN guía. Las estructuras de estos tres elementos del sistema CRISPR-Cas9 — proteína, ADN y ARN— son indispensables para su funcionamiento
- **Dogma central**: los alumnos interrumpirán el gen *lacZ* (ADN), que codifica, por medio del ARNm, la β-galactosidasa (proteína), enzima que permite a *E. coli* hidrolizar la lactosa, un azúcar lácteo (característica). Los estudiantes editarán el gen *lacZ* y observarán una alteración visible en el fenotipo
- **Transformación bacteriana**: esta actividad de laboratorio implica la transformación de bacterias mediante plásmidos que codifican componentes de CRISPR-Cas9. El proceso de transformación bacteriana se beneficia de las propiedades químicas de las paredes celulares bacterianas y del ADN para introducir información genética en un organismo
- **Ingeniería genética**: la manipulación o modificación de los genomas para obtener un fenotipo determinado constituye el objetivo fundamental de la ingeniería genética. La transformación bacteriana y la edición genética mediante CRISPR son dos técnicas que forman parte de este extenso dominio tecnológico
- **Bioinformática**: los estudiantes practicarán el utilizando la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés) para determinar los riesgos relativos a la edición de genes fuera del objetivo para así aplicarlos a sus potenciales sitios objetivos de Cas9 y evaluarán la seguridad de su utilización en la terapia génica basada en CRISPR
- **Cuestiones éticas, jurídicas y sociales**: la aplicación de la tecnología CRISPR plantea muchas cuestiones más amplias debido a la relativa facilidad con la que pueden realizarse cambios genéticos hereditarios

Instrucciones de preparación

Paso de preparación	Tiempo necesario	Cuándo comenzar la preparación
Prepare las placas de agar LB	1 a 2 hr más dos días para secar las placas	3 a 14 días antes de la actividad
Rehidratar *E. coli*	5 minutos más entre 8 y 24 horas de incubación	2 días antes de la actividad
Estríe las placas de inicio	20 min más 24 horas de incubación	24 horas antes de la actividad
Dispense las soluciones	1 hora	Hasta 3 días antes de la actividad

Consejos

- La *E. coli* rehidratada se debe incubar a 37 °C para obtener resultados óptimos
- Si las placas de inicio se incuban a temperatura ambiente (20-25 °C), deben incubarse durante 72 horas. Si prepara las placas de inicio durante un fin de semana, incúbelas a temperatura ambiente durante 72 horas

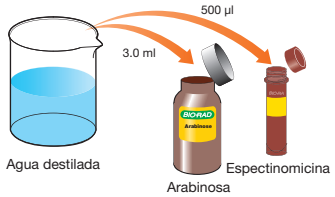
Prepare las placas de agar LB entre 3 a 7 días previos a la actividad 2

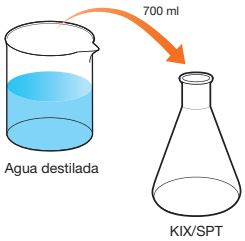
Si su microondas no puede acomodar un matraz de 1 l, consulte el Apéndice C para obtener instrucciones modificadas sobre el vertido de placas.

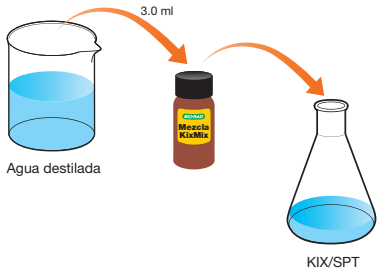
1. Etiquete un matraz de 500 ml **KIX** y un matraz de 1 L **KIX/SPT**.
2. Añada 3.0 ml de agua destilada o desionizada en el vial de arabinosa. Agite con ayuda del vórtex o mezcle con una pipeta durante unos 30 segundos para iniciar la disolución. Agite brevemente con la ayuda del vórtex o mezcle cada pocos minutos hasta que se disuelva por completo. La arabinosa puede tardar más de 10 minutos en disolverse completamente.
3. Añada 500 µl de agua destilada o desionizada al vial de espectinomicina. Mezcle con un agitador vórtex o con una pipeta hasta que se disuelva.
4. Añada 700 ml de agua destilada o desionizada al matraz etiquetado como **KIX/SPT**.
5. Añada 3.0 ml de agua destilada o desionizada al vial de la mezcla KIX, vuelva a colocar la tapa y agite durante 5 segundos para mezclar. Verter la mezcla KIX en el matraz **KIX/SPT**.

   Seguridad! La mezcla KIX contiene kanamicina, IPTG y X-gal, que son peligrosos en caso de inhalación. No saque el polvo seco de la mezcla KIX del frasco sin antes agregar agua.

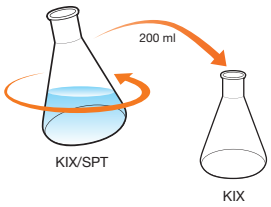
   Nota: la mezcla KIX no se disolverá por completo y puede tener un aspecto grumoso.
6. Repita el paso 5 como mínimo dos veces para enjuagar bien los residuos de la mezcla KIX del vial.







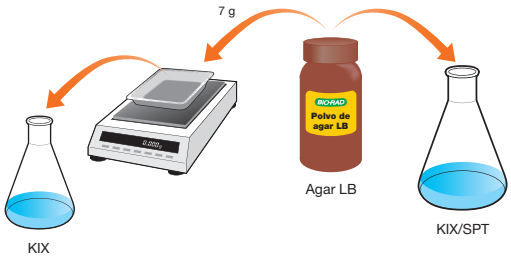
7. Agite la solución por 20 segundos o hasta que el polvo blanco insoluble quede suspendido de manera uniforme. Vierta inmediatamente 200 ml de mezcla en el matraz **KIX** de 500 ml.



8. Añada 7 g de polvo de agar LB al **KIX** matraz. Añada el polvo de agar LB restante al **KIX/SPT** matraz.

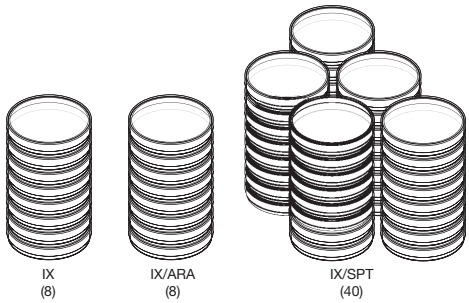
9. Esterilice ambos frascos en un autoclave durante 30 minutos en un ciclo de líquido, o bien, caliéntelos en el microondas hasta que hiervan por tres veces, teniendo cuidado de que no se derramen.

   Nota: si se utiliza un autoclave, compruebe el paso 16 antes de completar el paso 9.

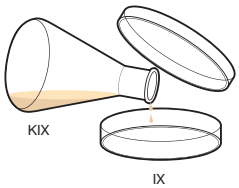


10. Etiquete ocho placas **IX** y ocho placas **IX/ARA**. Etiquete 40 placas **IX/SPT**.

    Nota importante! La mezcla KIX contiene el antibiótico kanamicina (K), el cual se uitiliza para seleccionar *E. coli* HB101-pBRKan. Todas las placas de agar LB en esta actividad contienen kanamicina. Para simplificar, «K» y kanamicina se omiten en el texto y las etiquetas de todos los materiales didácticos para estudiantes.
    Si prefiere discutir el papel de la kanamicina con sus alumnos, sustituya las etiquetas **IX** con **KIX**.

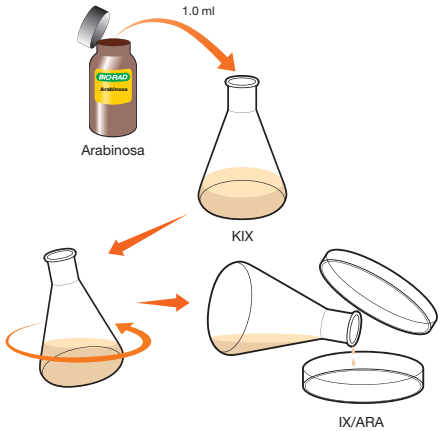


11. Llene rápidamente ocho placas **IX** desde un tercio hasta la mitad de su capacidad (~10 ml) con agar **KIX** LB fundido.



12. Añada 1.0 ml de arabinosa rehidratada al resto del agar **KIX** LB fundido. Agite para mezclar y llene ocho placas **IX/ARA** desde un tercio hasta la mitad de su capacidad (~10 ml) con el agar fundido.

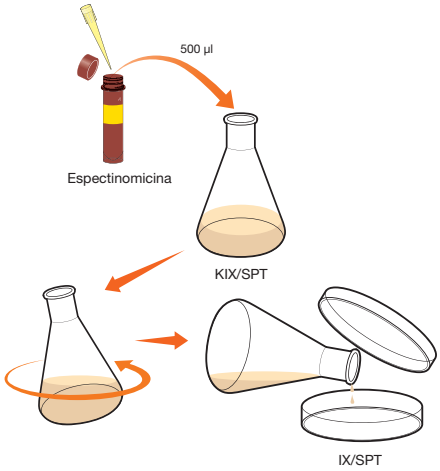
    Nota: enjuague el matraz KIX inmediatamente para impedir que el agar solidificado se adhiera al fondo.



13. Cuando el matraz **KIX/SPT** pueda tomarse cómodamente (aproximadamente a 50 °C), añada 500 µl de espectinomicina rehidratada. Agite para mezclar y llene al menos 40 placas **IX/SPT** aproximadamente desde un tercio hasta la mitad de su capacidad (~10 ml) con el agar fundido. Cualquier placa adicional vertida puede usarse como reemplazo si es necesario.

    Nota: el calor excesivo (>60 °C) destruirá la espectinomicina. No añada la espectinomicina hasta que el agar se haya enfriado lo suficiente como para su manipulación. Sin embargo, el agar se solidificará a 27 °C, por lo que debe asegurarse de verter las placas antes de que se haya enfriado demasiado. Coloque los matraces en un baño de agua a 50 °C para evitar que el agar se enfríe demasiado rápido.

    Nota: enjuague el matraz KIX/SPT de inmediato para evitar que el agar solidificado se adhiera al fondo.



14. Una vez solidificado (~30 min), deje secar las placas sin envolver y en la obscuridad durante dos días a temperatura ambiente.

    Nota: los aditivos de la mezcla **KIX** son sensibles a la luz, pero las placas no deben envolverse mientras durante el secado. Permita que las placas se sequen durante dos días para mejorar la absorción de las muestras de transformación líquida durante la lección para los estudiantes.

15. Después del secado, acomode las placas en columnas y envuélvalas en papel de aluminio para protegerlas de la luz y luego cúbralas con plástico o colóquelas de nuevo en la funda de plástico original. Guarde las placas boca abajo y refrigérelas a 4 °C. Las placas pueden almacenarse de esta manera hasta dos semanas antes de ser utilizadas.

Rehidrate las bacterias 2 días antes de la Actividad 2

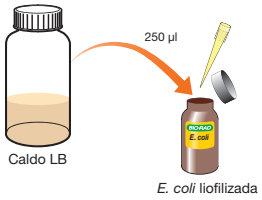
Si usted planea incubar las placas de inicio a 37 °C, rehidrate las bacterias 2 días antes de la Actividad 2.

Si va a incubar las placas de inicio a temperatura ambiente, rehidrate las bacterias ***4*** días antes de la Actividad 2.

16. Añada la cápsula de caldo LB y 50 ml de agua destilada o desionizada a un frasco de 150-250 ml. ***Tape sin apretar*** y esterilice en un autoclave o en el microondas hasta que hierva tres veces. Deje que el caldo se enfríe a temperatura ambiente. Apriete el tapón y almacénelo a 4 °C. Caliéntelo a temperatura ambiente antes de utilizarlo.

    Nota: si se utiliza un autoclave, este paso se puede combinar con el paso 9 anterior.

17. Con una punta de pipeta ***estéril*** añada 250 µl de caldo LB a temperatura ambiente al vial de *E. coli* HB101-pBRKan liofilizado. Vuelva a tapar el vial de *E. coli* y agite suavemente para suspender las bacterias nuevamente. Incube el vial de 8 a 24 horas a 37 °C.

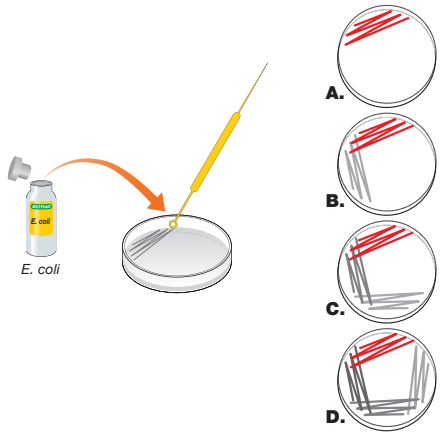


18. Como precaución contra la contaminación, vuelva a hervir el caldo LB restante una vez en el microondas con el tapón aflojado; apriete el tapón y guárdelo a 4 °C.

Estríe e incube las placas de inicio 24 horas antes de la Actividad 2

19. Estríe la placa de inicio rehidratada utilizando un anillo de inoculación de plástico estéril, *E. coli* HB101-pBRKan en ocho placas IX y ocho placas IX/ARA.

    Nota importante! La técnica adecuada de estriado de placas para generar colonias individuales es esencial para el éxito de la actividad. Siga el patrón de estriado indicado en los pasos A-D. En primer lugar, se debe estriar *E. coli* de lado a lado en el borde de un cuadrante (A). Gire la placa aproximadamente un cuarto de vuelta. Pase el anillo de lado a lado a través de las estrías anteriores varias veces, extendiéndolas hacia el siguiente cuadrante (B). Repita dos veces más (C, D).

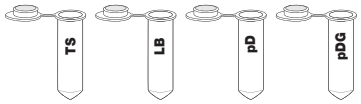


20. Incube las placas de inicio boca abajo en un horno de incubación a 37 °C durante 24 horas. Asegúrese de que las placas permanezcan a oscuras dentro de la incubadora, pero no las envuelva herméticamente en papel de aluminio. Cubrir la puerta de la incubadora con papel de aluminio resulta efectivo para realizar este paso

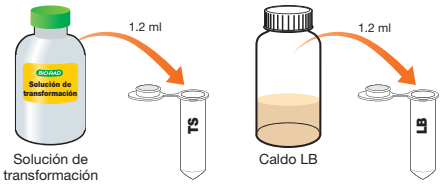
    Nota: alternativamente, las placas de inicio se pueden incubar boca abajo a temperatura ambiente (20-25 °C) en la oscuridad durante 72 horas.

Distribuya las soluciones antes de la Actividad 2 y almacene a 4 °C
Para evitar la contaminación, ***el caldo LB debe ser distribuido como máximo 3 días antes de la Actividad 2.*** Las otras soluciones pueden distribuirse hasta 7 días antes de la actividad 2.

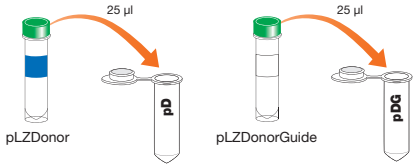
21. Para cada una de las ocho estaciones de trabajo, etiquete un juego de cuatro tubos de 2 ml con lo siguiente: **TS**, **LB**, **pD** y **pDG** (32 tubos en total).



22. Añada 1.2 ml de solución de transformación a cada uno de los ocho tubos **TS**.
23. Añada 1.2 ml de caldo LB estéril a cada uno de los ocho tubos **LB**.



24. Gire a pulso el pLZDonor y pLZDonorGuide para recoger el líquido en la parte inferior de los tubos.
25. Añada 25 µl de plásmido pLZDonor a cada uno de los ocho tubos de **pD**.
26. Añada 25 µl de plásmido pLZDonorGuide a cada tubo **pDG**.



27. Guarde todas las soluciones a 4 °C hasta que estén listas para usarse. Permita que todos los reactivos con excepción la solución de transformación (**TS**) alcancen la temperatura ambiente antes de que los estudiantes los utilicen.

Prepare las estaciones de trabajo de los alumnos el día de la Actividad 2.

Estación de trabajo de los estudiantes

Materiales	Cantidad
Placa de inicio de *E. coli* IPTG/X-gal (**IX**) LB fresca	1
Placa de inicio de *E. coli* IPTG/X-gal/ARA (**IX/ARA**) LB fresca	1
Placas LB con IPTG/X-gal/espectinomicina (**IX/SPT**)	4
Caldo nutritivo LB (**LB**)	1.2 ml
Solución de transformación (**TS**) en hielo	1.2 ml
Plásmido pLZDonor (**pD**), 80 ng/µl	25 µl
Plásmido pLZDonorGuide (**pDG**), 80 ng/µl	25 µl
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 100-1,000 µl (recomendado)	1
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 20-200 µl	1
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 2-20 µl	1
Microtubo de ensayo, 2.0 ml	4
Anillo de inoculación amarilla	8
Baño de agua helada con hielo picado	1
Marcador permanente	1
Flotador de espuma (si se utiliza un baño de agua)	1
Gradilla para tubos (recomendada)	1
Vaso para desechos	1

Estación de trabajo común

Materiales	Cantidad
Baño de agua o baño seco (los orificios debe estar llenos de agua) a 60 °C	1
Horno de incubación o incubadora de agitación con bandeja a 37 °C (recomendado)	1
Cinta de laboratorio	

Formación del instructor

El sistema Out of the Blue CRISPR-Cas9

El gen *lacZ* y el filtrado azul / blanco

En esta actividad, los estudiantes utilizarán la tecnología CRISPR-Cas9 para interrumpir el gen *lacZ*, el cual se encuentra de naturalmente en el cromosoma de *E. coli* HB101-pBRKan, la cepa de bacterias utilizada en este kit. Un gen del operón bacteriano *lac*, *lacZ,* codifica la enzima β-galactosidasa (β-gal), que permite a *E. coli* hidrolizar la lactosa. La β-gal también puede hidrolizar un análogo incoloro de la lactosa, el X-gal, que traduce en la formación de un pigmento azul. La presencia de colonias azules o blancas es un indicador visual del éxito de la edición del gen *lacZ*: las bacterias con *lacZ* funcional se vuelven azules cuando se cultivan en medios con X-gal; las que tienen un gen *lacZ* interrumpido y no funcional permanecen blancas (Fig. 1).

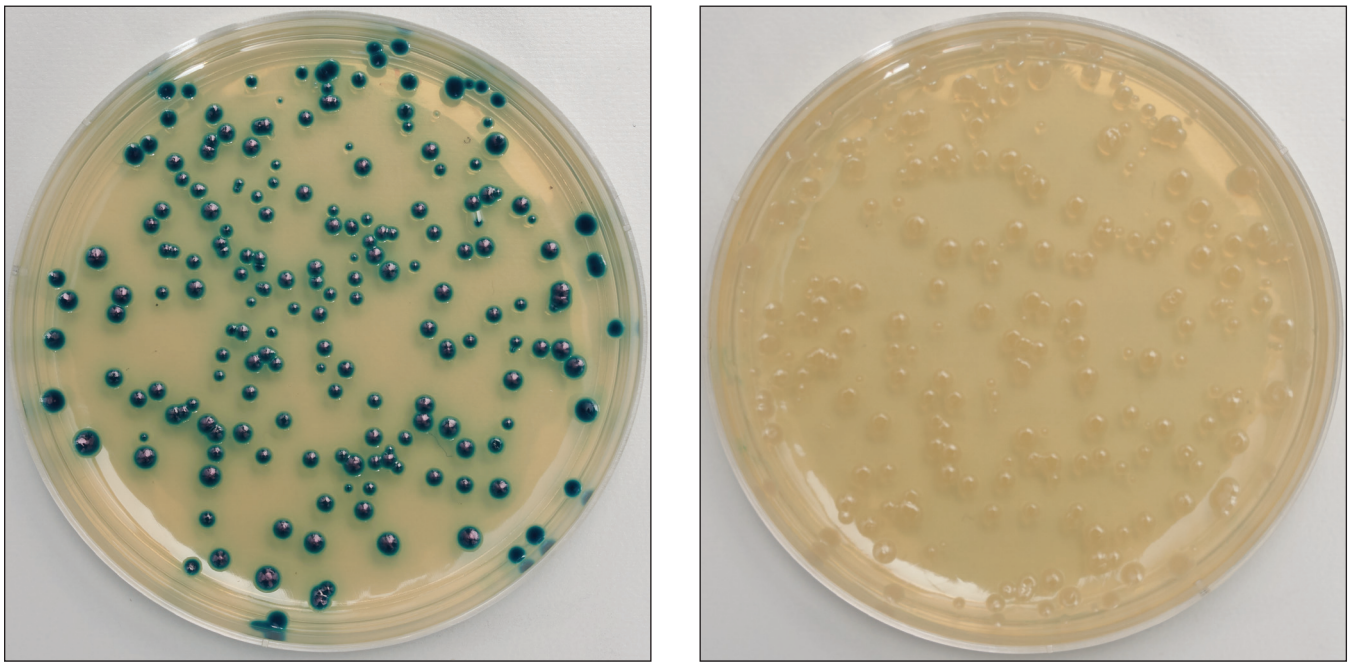


Fig. 1. *E. coli* sembrada en un medio que contiene X-gal. Las bacterias con un gen *lacZ* funcional son de color azul (izquierda). Las bacterias con un gen *lacZ* interrumpido y no funcional permanecen blancas (derecha).

Rupturas de ADN mediadas por CRISPR-Cas

El sello distintivo de CRISPR es el uso de las proteínas asociadas a CRISPR, o proteínas Cas, para apuntar a secuencias específicas de ADN. Cas9 es la endonucleasa bacteriana «clásica» usada en las tecnologías CRISPR, aunque muchas otras han sido identificadas y diseñadas. Cas9 puede ser programada para realizar rupturas de doble cadena en el ADN en un sitio objetivo específico. El sitio objetivo está determinado por una molécula corta de ARN, llamada ARN guía, que forma un complejo con Cas9.

Reparación del ADN mediante homología dirigida

Una vez que Cas9 hace un corte en el cromosoma, este debe ser reparado de alguna manera o la bacteria morirá. Las bacterias utilizadas para esta actividad no tienen la capacidad de reparar ADN roto de forma nativa, pero han sido diseñadas para expresar las enzimasa partir de un proceso de reparación de ADN llamado reparación dirigida por homología (HDR). Los genes que codifican la ruta de la HDR se encuentran n bajo el control de un promotor inducible por la arabinosa. Para reparar una ruptura de ADN, la HDR requiere una plantilla de ADN donante con homología a las secuencias que flanquean el sitio de corte. La plantilla de ADN donante se suministra en los plásmidos incluidos en el kit (véase más adelante).

E. coli HB101-pBRKan

Las bacterias incluidas en este kit, HB101-pBRKan, han sido diseñadas para expresar la enzima Cas9. Llevan un plásmido que contiene genes para la reparación dirigida por homología (HDR) bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. El plásmido transporta un gen de resistencia a la kanamicina como marcador de selección.

El ARNsg y la plantilla de ADN donante

Los estudiantes transformarán la *E. coli* HB101-pBRKan con uno de los dos plásmidos, cada uno de los cuales contiene un gen de resistencia a la espectinomicina:

- pLZDonor: (control) incluye una secuencia de la plantilla de ADN donante que será utilizada por la maquinaria de HDR para reparar las rupturas de ADN de doble hebra La secuencia donante incluye un codón de parada que impedirá la función de *lacZ* cuando sea insertada
- pLZDonorGuide: incluye tanto la secuencia de la plantilla de ADN donante de pLZDonor como una secuencia que codifica el ARN guía único (ARNsg). Una vez transcrito, el ARNsg guiará a la proteína Cas9 hasta el punto de corte de *lacZ*

La secuencia de la plantilla donante contiene un codón de parada que completará la traducción del gen *lacZ*. Las bacterias que se han sometido a la edición de genes utilizando esta plantilla de ADN donante no expresarán β-gal funcional, pero continuarán creciendo en colonias blancas. Las bacterias con una ruptura de doble hebra de ADN en su cromosoma, pero sin un mecanismo activo para repararla, morirán.

Cómo funcionan los componentes juntos

Diferentes medios aditivos son utilizados en estas actividades para obtener diferentes resultados en los experimentos (Tabla 3).

- Todas las placas contienen el antibiótico kanamicina como marcador de selección para *E. coli* HB101-pBRKan
- Todas las placas contienen IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido) y X-gal (5-bromo-4-cloroindol-3-il-β-D-galactopiranósido) para el filtrado azul / blanco. El IPTG es un análogo no metabolizable de la galactosa que induce la expresión del operón *lac*, incluyendo *lacZ*, que codifica para β-gal
- La arabinosa induce la expresión de las enzimas HDR. Los estudiantes pueden estar confundidos sobre la razón por la cual las placas experimentales (IX/SPT) no contienen arabinosa. Debido a que todo el proceso de edición de genes, incluyendo la HDR, se completa antes de que los estudiantes plateen sus muestras bacterianas, no es necesario que las placas experimentales contengan arabinosa.
- Las placas que contienen espectinomicina seleccionan las bacterias transformadas con pLZDonor o pLZDonorGuide

Tabla 3. Aditivos de los medios para las placas de agar LB de inicio y experimentación.

Nombre de la placa	**Kanamicina*** Marcador de selección para la cepa bacteriana	**IPTG** Induce la expresión de β-gal	**X-gal** Hidrolizado por β-gal para producir un pigmento azul	**Arabinosa** Induce la expresión del sistema HDR	**Espectinomicina** Marcador de selección para pLZDonor y pLZDonorGuide
IX	✔	✔	✔		
IX/ARA	✔	✔	✔	✔	
IX/SPT	✔	✔	✔		✔

*** Nota importante!** Todas las placas utilizadas en esta actividad contienen el antibiótico kanamicina (K), el cual es usado para seleccionar la cepa bacteriana. Para simplificar la actividad, la «K» y la kanamicina se omiten en el texto y en las etiquetas de todos los materiales didácticos para estudiantes. Si prefiere discutir el papel de la kanamicina con sus alumnos, remplace las etiquetas IX con KIX y explique su propósito a sus alumnos.

Los estudiantes comenzarán la actividad con bacterias cultivadas en dos placas de inicio diferentes (**IX** y **IX/Ara**).

- Todas las bacterias expresan Cas9
- Las bacterias cultivadas en placas **IX** no expresan las enzimas necesarias para la HDR (sistema de reparación desactivado)
- Las bacterias cultivadas en placas **IX/ARA** expresan las enzimas necesarias para la HDR (sistema de reparación activado)

Las bacterias en ambas placas de inicio se transformarán con pLZDonor o pLZDonorGuide (véase la Fig. 2).

- Las bacterias transformadas con pLZDonor no tendrán el ARNsg que se necesita para guiar a Cas9 para cortar *lacZ*. Por lo tanto, la edición del gen no ocurrirá y las transformantes serán azules independientemente de si el sistema de reparación está activado o desactivado.
- Las bacterias transformadas con pLZDonorGuide tendrán tanto el ARNsg como la plantilla de ADN donante
  - Si el sistema HDR no se expresa (la arabinosa está ausente), se producirá el corte mediado por Cas9 pero la reparación del ADN no ocurrirá; por tanto,as células morirán. No se observará ningún crecimiento.
  - Si el sistema HDR se expresa (hay arabinosa), se producirá el corte mediado por Cas9 y la maquinaria HDR usará la plantilla de ADN donante de pLZDonorGuide para corregir el corte e insertar un codón de parada en el gen *lacZ*.
    Las transformantes serán de color blanco
- Inmediatamente después de la transformación, comenzarán los procesos de corte y reparación con la mediación de Cas9. Estos procesos se completarán en su mayor parte antes de la extensión en las placas **IX/SPT**.
- La espectinomicina en el medio de agar **IX/SPT** selecciona las bacterias exitosamente transformadas.

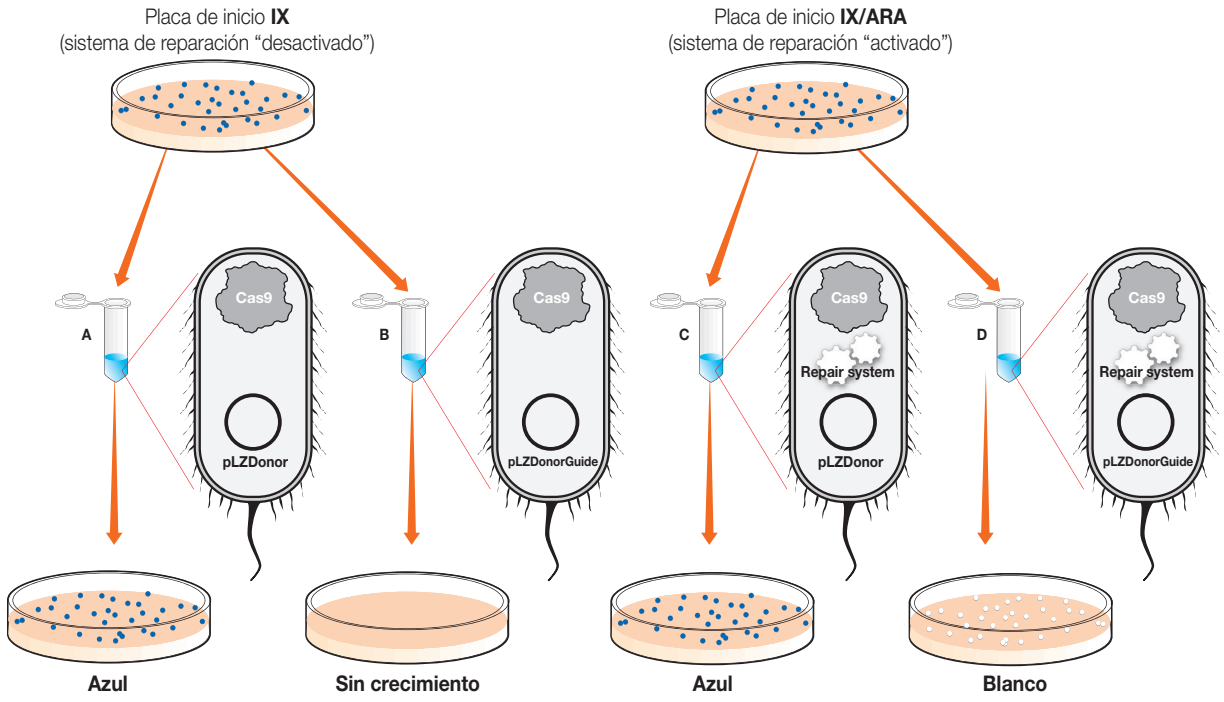


Fig. 2 Transformaciones realizadas a través de esta actividad. Se muestran los resultados esperados.

Actividad 1

Introducción a la Tecnología de Edición Genética mediante CRISPR-Cas9

Las actividades de este kit se centran en el proceso de la tecnología de edición genética CRISPR-Cas9 y proporcionan a los alumnos una explicación limitada del sistema inmunitario adaptativo bacteriano del que cual fue derivado. Proporcione información de base adicional de esta guía, ya sea con un vídeo, un artículo de noticias o por medio de instrucciones directas para presentar estos conceptos según sea apropiado para sus estudiantes. En los apéndices encontrará recursos adicionales.

Objetivos: los alumnos comprenden los pasos de la escisión del ADN mediada por Cas9 y pueden predecir la ubicación de la escisión al recibiruna secuencia de ARNsg. Los alumnos pueden utilizar modelos matemáticos para explicar la especificidad relativa de las enzimas de restricción y de Cas9 para cortar el ADN.

	Consejos y notas para la enseñanza
Parte 1. Simular el mecanismo molecular de escisión del ADN de Cas	• Esta actividad está diseñada para que ser dirigida principalmente por los estudiantes • Los estudiantes deben utilizar el ARNsg 1 y la tira de ADN 1 • La secuencia de ADN de la actividad es una parte del *E. coli* cromosomal en el *lacZ* génico • Oportunidad de evaluación formativa: revise la precisión de los sitios de corte predichos por los alumnos y aborde cualquier concepto erróneo que encuentre • Opción: proporcione una secuencia de ADN más grande de un gen notable y una secuencia de ARNsg de su elección. Haga que los alumnos predigan el sitio de corte
Parte 2. Diseñar la región guía de un ARNsg	• Los estudiantes deben utilizar el ARNsg 2 y la tira de ADN 2 • Oportunidad de evaluación formativa: revise la precisión de las secuencias de ARNsg de los alumnos y aborde cualquier concepto erróneo que encuentre. Consulte la Guía de Respuestas del Instructor incluida en el kit para conocer la secuencia correcta de ARNsg • Opción: proporcione una secuencia mayor del ADN de un gen notable y pida a los alumnos que escriban una secuencia de ARNsg que corte dentro de la secuencia de ADN suministrada
Parte 3. Comparar la especificidad de las herramientas de corte del ADN	• Las preguntas de esta parte hacen que los alumnos asuman que el genoma humano es una secuencia aleatoria de A, T, C y G. En realidad, numerosas secuencias de nucleótidos se repiten en el genoma humano • Discuta el posible impacto de las repeticiones de secuencias, como los parálogos, los ortólogos y las repeticiones *Alu* en la especificidad de la tecnología CRISPR-Cas9 • Oportunidad de evaluación formativa: verifique los cálculos y las interpretaciones de los estudiantes. Consulte la Guía de Respuestas del Instructor incluida en el kit
Parte 4. Diseñar la plantilla de ADN donante para la reparación del ADN	• En las discusiones con los alumnos, haga hincapié en la diferencia entre la reparación de genes, la fijación de la secuencia de un gen para su función, la reparación del ADN y la fijación de las rupturas moleculares en el ADN • Oportunidad de evaluación formativa: pida a los alumnos que muestren sus cadenas de la plantilla de ADN donante antes de pegarlas a las tiras de ADN cortadas. Pida a los demás alumnos que lo revisen • Opción: pida a los estudiantes que encuentren la secuencia completa del gen *lacZ* usando la base de datos del NCBI y que propongan una secuencia objetivo de ARNsg y una secuencia de la plantilla de ADN donante para insertar un codón de frenado

Actividad 2

Laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR

Objetivo: los estudiantes llevan a cabo la edición de genes cromosómicos y comprenden los resultados esperados de un experimento CRISPR-Cas9.

	Consejos y notas para la enseñanza
Parte 1. Responda a las preguntas previas al laboratorio	• Todas las placas de esta actividad contienen kanamicina como marcador selector de la cepa bacteriana utilizada en este kit. Para simplificar, la «K» y la kanamicina se omiten en el texto y en las etiquetas de todos los materiales de enseñanza para los estudiantes. Si prefiere discutir el papel de la kanamicina con sus alumnos, reemplace las etiquetas IX por KIX durante la preparación. • La edición de genes en esta actividad es cromosómica y se realiza principalmente antes de que los estudiantes coloquen e incuben sus muestras. La implantación e incubación de placas permiten la formación de colonias y un fenotipo visible • Los estudiantes pueden estar confundidos respecto a por qué no se necesita la arabinosa en las placas experimentales. La arabinosa es necesaria para la reparación del ADN, que comienza inmediatamente después de la transformación. Una vez que se ha reparado el corte en el cromosoma bacteriano, la maquinaria de reparación ya no es necesaria. Todas las células hijas generadas durante la formación de la colonia tendrán la edición cromosómica, la cual no será cortada nuevamente por Cas9. • Oportunidad de evaluación formativa: antes de pasar a la Parte 2, revise las respuestas de los alumnos en las Tablas 3 y 4 de la Guía del Estudiante para verificar que no haya conceptos erróneos
Parte 2. Realización del protocolo de edición de genes	• Antes de la fase de choque térmico, es esencial que los estudiantes mantengan sus muestras en hielo en todo momento, a menos que transfieran las soluciones de forma activa. • Si va a continuar con Out of the Blue Genotyping Extension, los estudiantes deberán conservar sus placas bacterianas. Visite **bio-rad.com/outoftheblue** o consulte la Guía del Instructor de Out of the Blue Genotyping Extension para obtener más información • Si sus estudiantes no van a analizar sus placas inmediatamente después de la incubación, guárdelas refrigeradas (4 °C) por un máximo de dos semanas antes del análisis
Parte 3. Responder a las preguntas posteriores al laboratorio	• No deberían crecer colonias en la placa B porque las bacterias tienen Cas9 activo con ARN guía, pero carecen de la expresión del sistema de reparación de ADN diseñado al haber sido cultivadas sin arabinosa. En raras ocasiones, los estudiantes pueden observar algunas colonias blancas creciendo en la placa B. Estas bacterias probablemente han sufrido un evento de deleción poco frecuente en el que una parte del gen *lacZ* se ha eliminado y el ADN cromosómico se ha dejado intacto. • El sistema de edición de genes CRISPR-Cas9 de este kit es muy eficiente, pero al 100 %. Algunos estudiantes encontrarán colonias azules en la placa D que provienen de bacterias con genes *lacZ* que no fueron modificados • Opción: si se continúa con la ampliación del genotipado, instruya a los estudiantes para que analicen el genotipo de una colonia que haya experimentado un evento de deleción • Oportunidad de evaluación formativa: pida a los alumnos que expliquen las funciones de IPTG, X-gal y espectinomicina en el experimento • Oportunidad de evaluación formativa: pida a los alumnos que hagan predicciones acerca del color esperado de las colonias bacterianas si subcultivan una muestra en placas que contengan IPTG y X-gal pero no espectinomicina

Actividad principal

Identificación y análisis bioinformático de los sitios objetivo de Cas9

Objetivo: los estudiantes descubren las aplicaciones médicas de CRISPR y exploran los factores reales que afectan el riesgo de los efectos fuera de objetivo en las terapias de enfermedades. Los estudiantes refuerzan las habilidades de BLAST y revisan los requerimientos básicos de diseño para los experimentos CRISPR.

Introducción

La posibilidad de que se produzcan efectos fuera del objetivo es un factor importante en las discusiones éticas sobre la tecnología de edición genética mediada por CRISPR. La elección del sitio de corte objetivo y la secuencia de ARN guía requerida son fundamentales para reducir el riesgo de efectos fuera del objetivo. Es posible que los estudiantes que están aprendiendo por primera vez sobre la tecnología CRISPR no reconozcan de inmediato estas limitaciones y que no reconozcan la necesidad de evaluar los riesgos durante el diseño y el desarrollo de la terapia génica. En esta actividad, los estudiantes utilizarán BLAST para evaluar los sitios de corte objetivo de Cas9 candidatos en un gen terapéutico pertinente, basándose en los riesgos de los efectos fuera del objetivo.

Los resultados de esta actividad son cualitativos y su objetivo es guiar a los estudiantes para realizar las preguntas (y no las respuestas) adecuadas sobre los riesgos reales asociados con las aplicaciones de CRISPR. Se trata de una actividad en la que no existen respuestas correctas, sólo argumentos bien justificados. Ofrece a los estudiantes un espacio para que exploren, prueben, fallen y repitan hacia un objetivo definido.

Notas sobre el diseño de la actividad y sus limitaciones

La realidad de la evaluación de las secuencias de ARN guía para los efectos fuera del objetivo es compleja. Existen muchas herramientas en línea gratuitas que ayudan a los
científicos a encontrar y clasificar las secuencias de ARN guía potenciales (candidatas); no obstante, sus algoritmos y criterios de puntuación son complejos y/o están
patentados. En esta actividad, los estudiantes utilizan BLAST no sólo para practicar el uso de una herramienta tan importante, sino también porque la realidad
de las secuencias fuera del objetivo se hace evidente. Por lo tanto, si bien esta actividad no es el flujo de trabajo que los científicos usan normalmente, ayuda a
los estudiantes a considerar algunos elementos de diseño básicos.

- BLAST tiene limitaciones cuando se trata de secuencias cortas y prioriza las secuencias con alineación secuencial de nucleótidos sobre aquellas que tienen desajustes intermitentes o brechas de alineación. Como resultado, BLAST puede pasar por alto algunas secuencias con un alto potencial de estar fuera del objetivo
- BLAST no puede utilizar correctamente un nucleótido comodín (N), en búsquedas de nucleótidos cortos. En su lugar, el algoritmo pasa por alto todos los nucleótidos posteriores a N, que en este caso incluye la secuencia PAM
- Una búsqueda minuciosa fuera del objetivo debería incluir la secuencia protoespaciadora con cada una de las cuatro combinaciones PAM (5'-AGG, 5'-TGG, 5'-CGG y 5'-GGG). Dado que BLAST no puede manejar adecuadamente N en una sola secuencia de consulta, se necesitan cuatro búsquedas BLAST separadas, una para cada combinación de secuencias PAM, para evaluar realmente el potencial fuera del objetivo de una secuencia objetivo candidata. Para adaptarse al tiempo de una actividad en clase, esta actividad se ha simplificado y los alumnos utilizan sólo una secuencia
- La base de datos de genes de referencia humanos, que los alumnos utilizan en esta actividad, incluye solo secuencias de genes. Por lo tanto, todos los resultados de la consulta serán de secuencias de genes, lo cual ayuda a poner de relieve para los estudiantes el posible impacto biológico de un corte fuera del objetivo. No se encontrarán objetivos fuera de los genes, pero los resultados serán mucho más fáciles de interpretar para los estudiantes
- Como extensión adicional, pida a los estudiantes que elaboren una lista de requerimientos de diseño para que un desarrollador de software desarrolle una herramienta de diseño de ARNsg

	Consejos y notas para la enseñanza
Parte 1. Identificar y catalogar secuencias objetivo	• Asigne grupos de estudiantes y proporcione a cada uno una ficha informativa sobre el estado de una enfermedad (Enfermedad arterial coronaria, anemia de células falciformes o fibrosis quística) • Las secuencias genéticas proporcionadas son de una duración limitada para reducir el número de sitios objetivo potenciales • Todos las secuencias consideradas como candidatas a sitios objetivo deben tener 23 nucleótidos de longitud (secuencia del protoespaciador más un PAM en el extremo 3') y estar escritos como una secuencia de una sola hebra de 5' a 3' • Recuerde a los alumnos que la secuencia guía del ARNsg es complementaria a una secuencia objetivo. Cuando se selecciona un sitio objetivo, también se especifica la secuencia del ARNsg. Por lo tanto, «diseñar» la región guía de un ARNsg es básicamente lo mismo que seleccionar un sitio objetivo específico
Parte 2. Realizar una búsqueda BLAST de secuencias fuera de objetivo	• Las secuencias de consulta de BLAST se deben escribir de 5' a 3' pero pueden provenir cualquier hebra de ADN • Los estudiantes usan BLAST para encontrar secuencias de ADN que coincidan total o parcialmente con su secuencia de ADN candidata. No están buscando secuencias de ARN • Opción: si hay varios estudiantes en un grupo, haga que cada miembro que busque sus secuencias potenciales (candidatas) con una de las cuatro opciones de secuencias PAM (5'-AGG, 5'-TGG, 5'-CGG y 5'-GGG). Consulte las notas sobre el diseño de la actividad y las limitaciones que se indican más arriba
Parte 3. Evaluar las secuencias secuencias objetivo	• Durante la actividad, es posible que los estudiantes lleguen a encontrar números de acceso con secuencias de gran tamaño que contiengan varios genes independientes, cada uno de los cuales tiene su propio número de acceso. En efecto, estos genes están duplicados en la base de datos. En estos casos, y con el objetivo de simplificar la tarea, tal vez lo mejor es que los estudiantes ignoren estas grandes secuencias cuando analicen sus resultados Ejemplo: NG_000007.3 es un fragmento largo de ADN que contiene cinco genes de globina, entre ellos el *HBB*, que está contenido separadamente en NG_059281.1 • Al desarrollar los criterios, los estudiantes pueden tener en cuenta: - si una secuencia potencial fuera de objetivo se encuentra junto a una secuencia PAM en la orientación correcta - el número de posibles secuencias fuera de objetivo que coincidan por completo con la secuencia objetivo - el número de posibles secuencias fuera de objetivo correspondan con al menos el 80 % de la secuencia objetivo (o algún otro porcentaje) - la ubicación y el patrón de los desajustes entre una posible secuencia fuera de objetivo y la secuencia objetivo (lejos o cerca del PAM) • Los criterios de los alumnos deben abordar dos aspectos del riesgo de los objetivos fuera del objetivo: el nivel de riesgo de que un determinado sitio fuera de objetivo pueda cortarse, y el número de objetivos fuera del objetivo riesgosos que existen para un sitio objetivo individual

Apéndice A

Debate estructurado entre los estudiantes sobre la edición genética CRISPR

El potencial de la tecnología de edición genética CRISPR para abordar problemas en los ámbitos médico, agrícola y medioambiental solo es comparable a su potencial de uso indebido. Aunque los debates éticos en torno a la ingeniería genética no son nuevos, el hecho de que CRISPR pueda ser más precisa y más fácil de realizar que otras tecnologías ha vuelto a despertar la preocupación por sus aplicaciones. Un debate entre estudiantes es una excelente manera de involucrar a sus alumnos en las discusiones públicas actuales sobre la tecnología CRISPR y así fortalecer su entendimiento de los hechos científicos.

Áreas clave del debate

- ¿En qué punto el riesgo de una edición no deseada supera el potencial de una cura o tratamiento para una enfermedad debilitante?
- ¿Se debe permitir la terapia genética CRISPR en la línea germinal? Estos cambios podrían eliminar las enfermedades genéticas, pero ¿podrían tener consecuencias indeseables para una población?
- Si CRISPR se puede utilizar para eliminar enfermedades, ¿debería utilizarse también para el mejoramiento genético, para modificar el color de los ojos, la inteligencia, la capacidad atlética o la altura?
- ¿Quién debería decidir qué alteraciones genéticas están permitidas o prohibidas?

Primer día – Preparar el escenario

1. Encuentre un artículo reciente que describa un caso concreto del uso de una tecnología de edición genética basada en CRISPR. Utilice un artículo que explique las técnicas específicas utilizadas.

2. Divida la clase en dos grupos al azar y asigne uno de ellos para apoyar el uso de la tecnología de edición genética CRISPR en el artículo y al otro para oponerse a su uso.

3. Explique el formato del debate y pida a cada equipo elija un capitán.

Días dos a cinco – Investigación de los estudiantes

4. Proporcione el artículo a sus alumnos. Pídales que lleven a cabo investigaciones adicionales sobre el caso y que registren sus resultados en la Hoja de Datos Pro/Con de la página 22; opcionalmente, asígnela como tarea.

5. Indique a los equipos que reúnan información de todos sus miembros.

6. Permita que los equipos escriban discursos de presentación de 4 minutos y pídales que designen portavoces.

Día seis – Debate

Tabla 4 Formato del debate.

Sección	Tiempo	Requisito
Discurso de presentación	4 min	Los autores de la propuesta presentan una discurso inicial en apoyo de la resolución
Pausa	2 min	Los oponentes recopilan una lista de preguntas que consideran muestran inconsistencias en los argumentos de los proponentes
Preguntas	2 min	Los oponentes presentan sus preguntas
Discurso de presentación	4 min	Los opositores presentan un primer argumento rebatiendo el tema
Pausa	2 min	Los proponentes reúnen una lista de preguntas que consideran muestran incoherencias en los argumentos de los oponentes
Preguntas	2 min	Los proponentes presentan sus preguntas
Réplica	2 min	Los proponentes responden a las preguntas de los oponentes
Réplica	2 min	Los opositores responden a las preguntas de los proponentes
Argumentos finales	3 min	Opiniones contrarias
Argumentos finales	3 min	Posturas de respaldo

Rúbrica de calificación

	4	3	2	1
Discurso de presentación	Elocuentes, muy bien organizado, documentado y muy bien expuesto	Bien organizado, documentado y expuesto	Algo organizado, documentado y expuesto	Falta de organización, investigación parcialmente correcta, mal presentado
Preguntas	Las preguntas fueron reflexivas, plantearon preocupaciones legítimas, se basaron en la investigación y estuvieron bien presentadas	Las preguntas eran algo reflexivas, planteaban algunas preocupaciones y estaban bien presentadas	Las preguntas no estaban basadas en la investigación, no planteaban preocupaciones legítimas o no estaban bien presentadas	Las preguntas no estaban relacionadas con el tema, no planteaban preocupaciones legítimas o no estaban bien presentadas
Réplica	Los alumnos utilizaron los datos y los hallazgos de la investigación para rebatir directamente las preguntas	Los alumnos utilizaron los datos y las conclusiones de la investigación para rebatir parcialmente las preguntas	Los alumnos utilizaron los datos y las conclusiones de la investigación de manera inapropiada para intentar rebatir las preguntas	Los alumnos no rebatieron las preguntas
Declaraciones de cierre	La declaración de cierre fue elocuente, muy bien organizada, documentada y expuesta	La declaración de cierre estuvo bien organizada, investigada y presentada	La declaración de cierre estuvo algo organizada, investigada y presentada	La declaración de cierre careció de organización, utilizó una investigación parcialmente correcta y no estuvo bien presentada
Trabajo como miembro del equipo (en función de la evaluación de los demás miembros del equipo)	Participó plenamente y contribuyó con el equipo	Participó y contribuyó con el equipo	Participó parcialmente, contribuyó de alguna manera con el equipo	Poca participación poca ayuda al equipo

Hoja de datos Pro/Con

Enumere los beneficios del uso de la tecnología de edición genética CRISPR mencionados en el artículo (incluya las referencias).

Enumere las consecuencias negativas de utilizar la tecnología de edición genética CRISPR mencionada en el artículo (incluya las referencias).

Escriba la información de la investigación que pueda ser utilizada para rebatir los argumentos del otro grupo de debate. Inclúyala en su declaración inicial o final.

Apéndice B

CRISPR-Cas9 y un sistema inmunitario microbiano

Los animales tienen sistemas inmunitarios complejos que involucran las actividades coordinadas de múltiples tipos de células, órganos y sistemas de señalización para reconocer y responder a las infecciones activas. Solo recientemente los investigadores han descubierto que las procariotas, bacterias y arqueas también poseen una forma de inmunidad adaptativa que les permite reconocer y reaccionar ante las infecciones virales: el sistema CRISPR-Cas.

Algunos genomas procarióticos contienen secuencias cortas de ADN palindrómico que se repiten muchas veces, con secuencias «espaciadoras» únicas entre las repeticiones. A estas secuencias repetidas se les llama «repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente intercaladas», o CRISPR, por sus siglas en inglés (Fig. 3). Cada repetición palindrómica es seguida por segmentos cortos de ADN espaciador que se ajustan a las secuencias de ADN encontradas en los genomas de los bacteriófagos (los bacteriófagos son virus conocidos por infectar bacterias). Junto a las secuencias CRISPR existen también agrupaciones de genes asociados a CRISPR (Cas) y estos genes Cas codifican las enzimas que cortan el ADN en lugares específicos, como si fueran tijeras moleculares muy precisas.

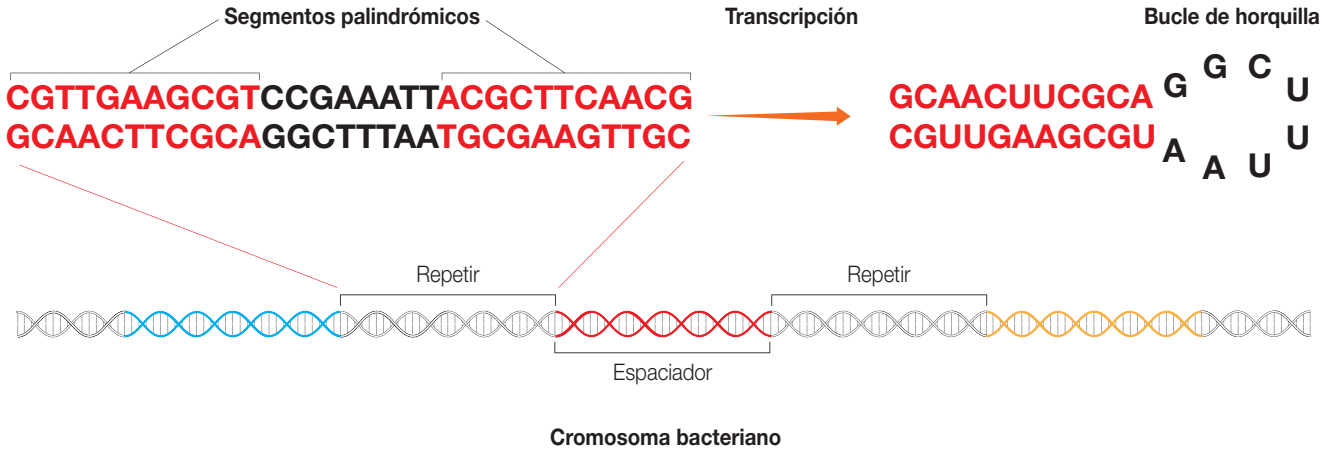


Fig. 3 Región de un genoma bacteriano con repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR). Los genomas procariotas contienen grupos de repeticiones palindrómicas. Estas repeticiones están separadas (regularmente espaciadas) por segmentos cortos de ADN espaciador. Estos segmentos CRISPR aparecen junto a grupos de genes asociados con CRISPR (Cas), los cuales codifican las enzimas Cas responsables de cortar el ADN. En una repetición palindrómica, la secuencia de nucleótidos es igual en ambas direcciones y, tras la transcripción, el ARN resultante forma una estructura de bucle de varias horquillas.

En 2007, los investigadores reunieron estos hechos curiosos para demostrar que los genes CRISPR y Cas trabajan conjuntamente para ofrecer una respuesta inmunitaria a la invasión de bacteriófagos (Barrangou et al. 2007), la cual implica tres fases (Fig. 4):

- **Corte y captura:** cuando las bacterias son infectadas por un virus, utilizan componentes de su sistema CRISPR para cortar el ADN viral invasor e insertar fragmentos del mismo (espaciadores) en su propio genoma como un «recuerdo» de la infección
- **Seguimiento:** las bacterias transcriben los espaciadores en ARN que pueden formar un complejo con la enzima Cas. Estos complejos monitorean la célula en busca de secuencias de ADN que complementen el ARN
- **Defensa:** si se encuentra un ADN compatible (viral), el complejo ARN-Cas del espaciador se une al mismo y corta el ADN viral para evitar la replicación. Esto detiene la infección viral.

Con este sistema, las bacterias pueden recoger secuencias de diversos virus infecciosos para crear una «biblioteca». Dado que la secuencia CRISPR está contenida en el ADN genómico, se transfiere a cada generación, y la biblioteca continúa desarrollándose con el tiempo.

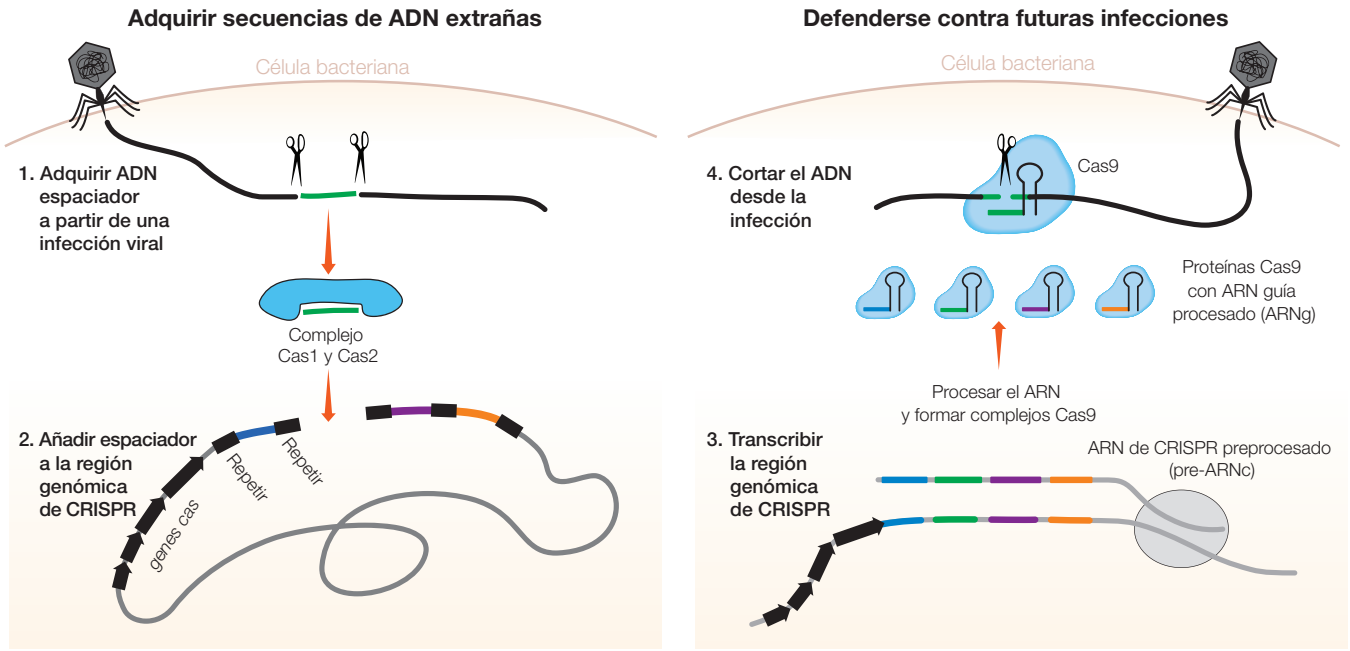


Fig. 4 El sistema de defensa microbiana CRISPR-Cas9. 1, las enzimas Cas1-Cas2 del microbio reconocen el ADN extraño y cortan un segmento. **2**, las enzimas Cas1-Cas2 insertan el segmento de ADN en la región CRISPR de su propio genoma como un espaciador. **3**, se transcribe una secuencia espaciadora y se une a una proteína Cas9. **4**, en caso de reinfección por el mismo invasor, el complejo CRISPR-Cas9 puede reconocer la secuencia de ADN ajeno y cortarla para prevenir la infección completa.

Apéndice C

Instrucciones para preparar placas de agar LB en microondas pequeños

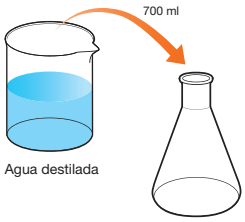
Si utiliza un microondas que no puede acomodar un frasco de 1 L, refiérase a estas instrucciones modificadas, usando frascos de 500 ml en el microondas para preparar las placas de agar LB. Luego, continúe con la preparación normal.

1. Etiquete un matraz de 500 ml **KIX** y dos matraces de 500 ml **KIX/SPT**.

2. Añada 3.0 ml de agua destilada o desionizada en el vial de arabinosa. Agite con ayuda del vórtex o mezcle con una pipeta durante unos 30 segundos para iniciar la disolución. Agite brevemente con la ayuda del vórtex o mezcle cada pocos minutos hasta que se disuelva por completo. La arabinosa puede tardar más de 10 minutos en disolverse completamente.

3. Añada 500 µl de agua destilada al vial de espectinomicina. Mezclar con un agitador vórtex o con una pipeta hasta que se disuelva.

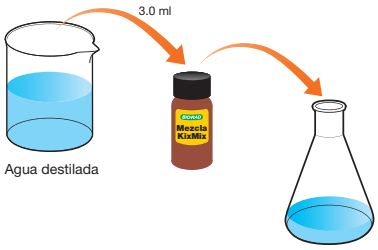
4. Añada 700 ml de agua destilada o desionizada a un matraz vacío de 1 L.



5. Añada 3.0 ml de agua destilada o al vial de la mezcla KIX, vuelva a colocar la tapa y agite durante 5 segundos para mezclar. Verter la mezcla KIX en el matraz de 1 L.

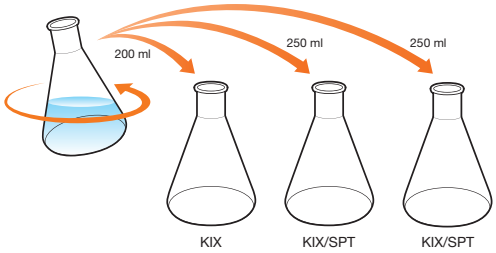
   Seguridad La mezcla KIX contiene kanamicina, IPTG y X-gal, que son peligrosos en caso de inhalación. No saque el polvo seco de la mezcla KIX del frasco sin antes agregar agua.

   Nota: la mezcla KIX no se disolverá por completo y puede tener un aspecto grumoso.

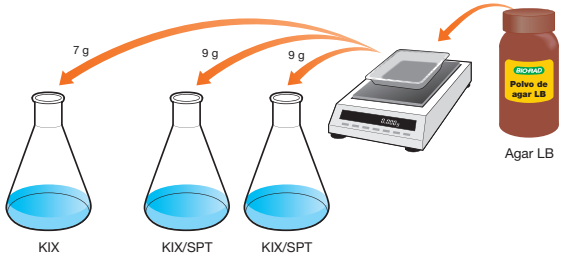


6. Repita el paso 5 como mínimo dos veces para enjuagar bien los residuos de la mezcla KIX del vial. Inspeccione el frasco para asegurarse de que todo el contenido haya sido transferido al matraz.

7. Agite la solución durante 20 segundos o hasta que el polvo blanco insoluble quede suspendido de manera uniforme. Vierte inmediatamente 200 ml en el matraz **KIX**. Agite la suspensión y verter inmediatamente 250 ml en cada matraz **KIX/SPT**.

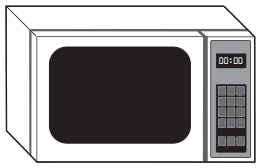


8. Añada 7 g de polvo de agar LB al matraz**KIX**. Añada 9 g de polvo de agar LB a cada uno de los matraces **KIX/SPT**. Remueva para mezclar.

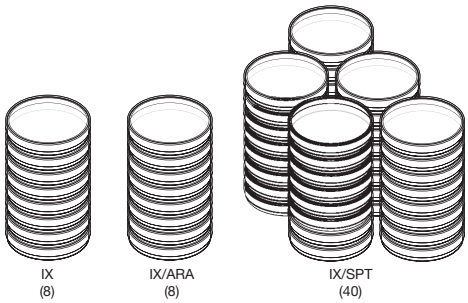


9. Caliente cada matraz en el microondas hasta que hierva tres veces, teniendo cuidado de que no se derrame. Comience con 3 minutos y agregue intervalos de 1 minuto según sea necesario.

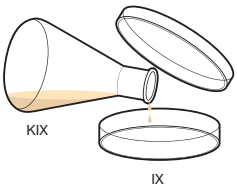
   Nota: utilice una almohadilla o guante al entregar el matraz caliente. Tenga cuidado de no permitir que el LB/agar se derrame. Ajuste el microondas a potencia baja y vigile cuidadosamente. Deje que el agar fundido se enfríe ligeramente antes de agitarlo para evitar que se derrame.



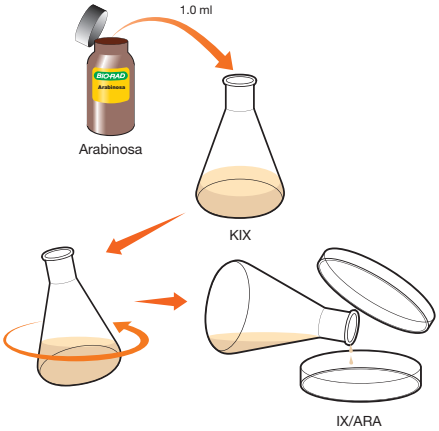
10. Etiquete ocho placas **IX,** ocho placas **IX/ARA**, y 40 placas **IX/SPT**.



11. Llene rápidamente ocho placas **IX** desde un tercio hasta la mitad de su capacidad (~10 ml) con agar **KIX** LB fundido.

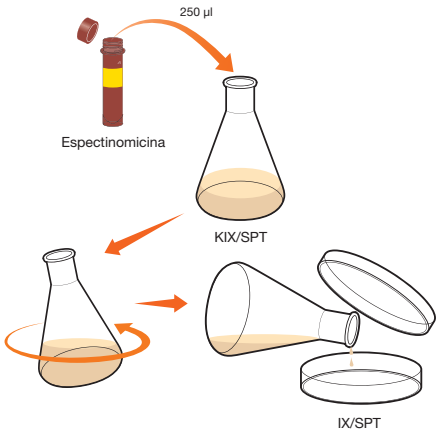


12. Añada 1.0 ml de arabinosa rehidratada al resto del agar **KIX** LB fundido. Agite para mezclar y llene ocho placas **IX/ARA** desde un tercio hasta la mitad de su capacidad (~10 ml) con el agar fundido.



13. Cuando los matraces **KIX/SPT** puedan tomarse cómodamente (aproximadamente a unos 50 °C), añada 250 µl de espectinomicina rehidratada a cada matraz **KIX/SPT**. Agite para mezclar y llene al menos 40 placas **IX/SPT** desde un tercio hasta la mitad de su capacidad (~10 ml) con agar **KIX/SPT** LB fundido. Las placas adicionales vertidas se pueden utilizar como reemplazo si es necesario.

    Nota: el calor excesivo (>60 °C) destruirá la espectinomicina. No añada la espectinomicina hasta que el agar se haya enfriado lo suficiente como para poder manipularlo. Sin embargo, el agar se solidificará a 27 °C, por lo que debe asegurarse de verter las placas antes de que se haya enfriado demasiado. Coloque los matraces en un baño de agua a 50 °C para evitar que el agar se enfríe demasiado rápido.



14. Una vez solidificado (~30 min), deje secar las placas, sin envolver y en la oscuridad, durante dos días a temperatura ambiente.

    Nota: los aditivos de la mezcla **KIX** son sensibles a la luz, pero las placas no deben envolverse mientras durante el secado. Permita que las placas se sequen durante dos días para mejorar la absorción de las muestras de transformación líquida durante la lección para los estudiantes.

15. Después del secado, acomode las placas en columnas y envuélvalas en papel de aluminio para protegerlas de la luz y luego cúbralas con plástico o colóquelas de nuevo en la funda de plástico original. Guarde las placas boca abajo y refrigérelas a 4 °C. Las placas pueden almacenarse de esta manera hasta dos semanas antes de ser utilizadas.

Recursos

Visite **bio-rad.com/outoftheblue** para obtener recursos adicionales para el aula.

Tecnologìa CRISPR (general)

Adli M (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. Nat Commun 9, 1,911.

Barrangou R (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315, 1,709–1,712.

Carroll D (2017). Genome editing: past, present, and future. Yale J Biol Med 90, 653–659.

National Science Foundation (2015). Rewriting genetic information to prevent disease. nsf.gov/discoveries/disc_summ.jsp?cntn_id=134286&org=NSF, accessed October 30, 2019.

Cong L et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems. Science 339, 819-823.

Cribbs AP and Perera SMW (2017). Science and bioethics of CRISPR-Cas9 gene editing: an analysis towards separating facts and fiction. Yale J Biol Med 90, 625-634.

Jinek et al. (2012). A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337, 816-821.

Ran FA et al. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc 8, 2,281–2,308.

CRISPR in enfermedades humanas

Enfermedad de células falciformes (HBB)

Dever DP et al. (2016). CRISPR/Cas9 β-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. Nature 539, 384–389.

Park SH et al. (2019). Highly efficient editing of the β-globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. Nucleic Acids Res 47, 7,955–7,972.

Enfermedad arterial coronaria (PCSK9)

Ding Q et al. (2014). Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. Circ Res 115, 488–492.

King A (2018). A CRISPR edit for heart disease. Nature 555, S23–S25.

Fibrosis quística (CFTR)

Firth AL et al. (2015). Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. Cell Reports 12, 1,385–1,390.

Hodges CA and Conlan RA (2019). Delivering on the promise of gene editing for cystic fibrosis. Genes Dis 6, 97–108.

Avisos legales

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc.
Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos titulares.
© 2022 Bio-Rad Laboratories, Inc.
Este producto no es para autoadministración.

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Website *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
Canada *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
France *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
Italy *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 2 3473 4460* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
Russian Federation *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
Switzerland *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

10000122375 Ver C ES

22-0525 0822 Sig 0122