



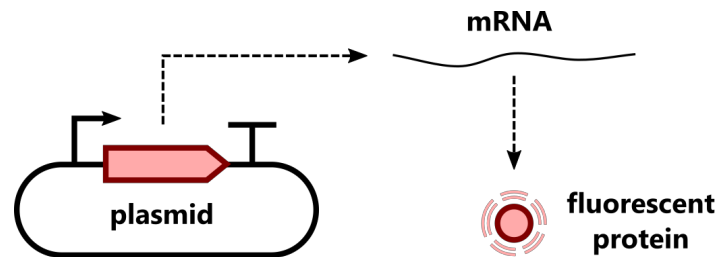
Elaborado por:  
Dr. Fernando Guzman Chavez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM  
PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)

Fundamentos de edición genética por CRISPR/Cas9 mediante el uso de la tecnología de Cell-Free

## PRÁCTICA EXPERIMENTAL

### Objetivos

- Utilizar el sistema *in vitro* de síntesis proteínas (cell-free) mediante la producción de la proteína Cas9.
- Inactivar la proteína fluorescente RFP mediante la tecnología de CRISPR/Cas9.
- Evaluar la especificidad de las gRNAs



### Materiales

- Guantes
- Micropipetas (0.2-2  $\mu$ L, 2-20 $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- Puntas para micropipeta
- Microtubos de 1.5 mL o Microtubos para PCR
- Incubadora o *termoblock* a 29°C
- Mezclador tipo *Vortex*
- Transiluminador o fuente de luz azul
- Marcador permanente

### Reactivos

- Agua libre de nucleasas (MQ)
- Extracto celular de *E. coli*.
- 4x Wizard Mix
- 40% PEG 8000 (almacénese a temperatura ambiente)
- 60 nM DNA circular (plásmidos)
  - spCas9
  - mRFP
  - eforRED
  - gRNA-RFP

- sfGFP (control +). **Este plásmido está a 20nM**

## Metodología

A cada equipo se le hará la entrega de un kit de cell-free el cual contiene el extracto celular, el buffer wizard mix así como los 5 plásmidos que codifican para diferentes proteínas fluorescentes, la gRNA y la proteína Cas9. Por separado se les proporcionará un tubo que contiene el PEG 8000.

### DIA 1.

- 1) Antes de usar los reactivos, agite suavemente cada tubo y proceda a centrifugar brevemente los tubos. Si se ve algún precipitado, pipetee suavemente la mezcla hacia arriba y hacia abajo hasta garantizar la homogeneidad. Evite la formación de espuma.
- 2) Etiquete 1 tubo de 1.5 ml como “**SpCas9**”.
- 3) Añada los reactivos en el tubo, tal y como se indica en la siguiente tabla

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
	<b>Tubo: SpCas9</b>
MQ H <sub>2</sub> O	1.4
40% PEG 8000	0.6
Plásmido SpCas9 (20nM)	3.0
4x Wizard Mix	3.0
Extracto Celular	4.0
<b>Volumen total</b>	<b>12.0</b>

- 4) Incube el tubo a 29°C por 16h o toda la noche.
- 5) Pasado el tiempo de incubación, guarde el tubo a 4°C.

### DIA 2

2. Etiquete 8 tubos vacíos de 1.5 mL como se indica a continuación:

- a) eforRED
- b) eforRED+Cas9
- c) eforRED+Cas9+gRNA
- d) RFP
- e) RFP+Cas9
- f) RFP+Cas9+gRNA
- g) sfGFP (control +)
- h) Maste Mix

3. En el tubo etiquetado como *Master Mix*, **prepare el equivalente a 8 reacciones** de cell-free de acuerdo a los volúmenes descritos en la siguiente tabla. Mantenga a en hielo el tubo de Master mix.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)	VOLUMEN (μL)
	<b>1 reacción</b>	<b>8 reacciones</b>
H <sub>2</sub> O	1.4	11.2

<b>40% PEG8000</b>	0.6	4.8
<b>4x Wizard Mix</b>	3.0	24
<b>Extracto Celular</b>	4.0	32
<b>Volumen total</b>	9	72

4. Del **Master Mix** que se preparó en el punto anterior, añada **9 µL de Master Mix** a cada uno de los 7 tubos restantes (previamente etiquetados). Recuerde que usará la reacción de cell-free en la cual expreso la proteína Cas9.

5. A cada tubo agregue el volumen correspondiente de acuerdo con la siguiente tabla:

<b>Tubo</b>	<b>Agua MQ (uL)</b>	<b>SpCas9 (uL)</b>	<b>eforRED (uL)</b>	<b>gRNA (uL)</b>	<b>RFP (uL)</b>	<b>sfGFP (uL)</b>
<b>eforRED</b>	2	0	1	0	0	0
<b>eforRED+Cas9</b>	1	1	1	0	0	0
<b>eforRED+Cas9+gRNA</b>	0	1	1	1	0	0
<b>RFP</b>	2	0	0	0	1	0
<b>RFP+Cas9</b>	1	1	0	0	1	0
<b>RFP+Cas9+gRNA</b>	0	1	0	1	1	0
<b>sfGFP</b>	0	0	0	0	0	3

Por tanto, el **volumen final** en cada tubo es de **12 uL**

6. Agitar suavemente y centrifugar brevemente (un pulso) los tubos.

7. Incubar los tubos a 29 °C utilizando un “*termoblock*” o incubadora. Pasados 1-2 horas de incubación y utilizando un transiluminador o alguna fuente de luz azul verifique el tubo “sfGFP”. El plásmido que codifica para sfGFP (control +) ya debe presentar fluorescencia. Los tubos del resto de proteínas fluorescentes se pueden dejar incubar a 29°C toda la noche para observar fluorescencia.

**Material Elaborado por: Dr. Fernando Guzmán Chávez y el Dr. José Antonio Pedroza García,** los plásmidos fueron exclusivamente creados para esta práctica por el Dr. Fernando Guzmán Chávez.

Se agradece el apoyo del **PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)** para el desarrollo de este material.

## Referencias

Brooks SM, Alper HS. Applications, challenges, and needs for employing synthetic biology beyond the lab. Nat Commun. 2021 Mar 2;12(1):1390. doi: 10.1038/s41467-021-21740-0. PMID: 33654085; PMCID: PMC7925609.

El Karoui M, Hoyos-Flight M, Fletcher L. Future Trends in Synthetic Biology-A Report. Front Bioeng Biotechnol. 2019 Aug 7;7:175. doi: 10.3389/fbioe.2019.00175. PMID: 31448268; PMCID: PMC6692427

Gallup, O., Ming, H., Ellis, T.: Ten future challenges for synthetic biology. *Eng. Biol.* 2021. 5( 3), 51– 59 . <https://doi.org/10.1049/enb2.12011>

Guzman-Chavez F, Arce A, Adhikari A, Vadhin S, Pedroza-Garcia JA, Gandini C, Ajioka JW, Molloy J, Sanchez-Nieto S, Varner JD, Federici F, Haseloff J. Constructing Cell-Free Expression Systems for Low-Cost Access. *ACS Synth Biol.* 2022 Mar 18;11(3):1114-1128. doi: 10.1021/acssynbio.1c00342. Epub 2022 Mar 8. PMID: 35259873; PMCID: PMC9098194.

Hanczyc MM. Engineering Life: A Review of Synthetic Biology. *Artif Life.* 2020 Spring;26(2):260-273. doi: 10.1162/artl\_a\_00318. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32271630.

Moore SJ, Lai HE, Chee SM, Toh M, Coode S, Chengan K, Capel P, Corre C, de Los Santos EL, Freemont PS. A *Streptomyces venezuelae* Cell-Free Toolkit for Synthetic Biology. *ACS Synth Biol.* 2021 Feb 19;10(2):402-411. doi: 10.1021/acssynbio.0c00581. Epub 2021 Jan 26. PMID: 33497199; PMCID: PMC7901020.

Stark JC, Huang A, Hsu KJ, Dubner RS, Forbrook J, Marshalla S, Rodriguez F, Washington M, Rybnicky GA, Nguyen PQ, Hasselbacher B, Jabri R, Kamran R, Koralewski V, Wightkin W, Martinez T, Jewett MC. BioBits Health: Classroom Activities Exploring Engineering, Biology, and Human Health with Fluorescent Readouts. *ACS Synth Biol.* 2019 May 17;8(5):1001-1009. doi: 10.1021/acssynbio.8b00381. Epub 2019 May 7. PMID: 30925042.

Tinafar A, Jaenes K, Pardee K. Synthetic Biology Goes Cell-Free. *BMC Biol.* 2019 Aug 8;17(1):64. doi: 10.1186/s12915-019-0685-x. PMID: 31395057; PMCID: PMC6688370