

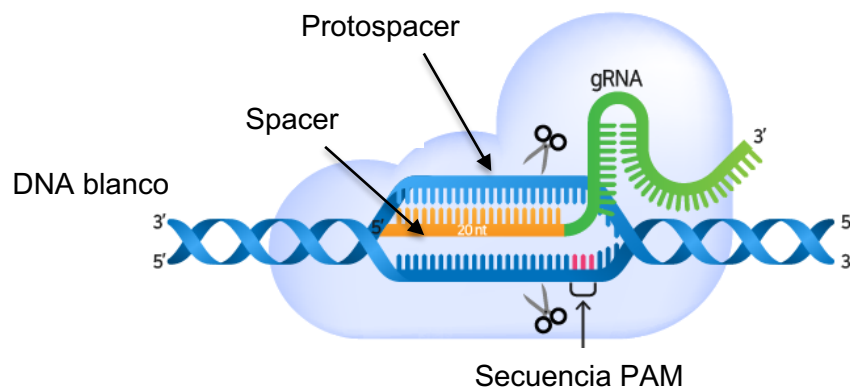


Elaborado por:
Dr. Fernando Guzman Chavez
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM
PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)

Edición genómica en levadura por CRISPR/Cas9

Introducción

En la última década la **tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9** ha cobrado relevancia por su amplio potencial en la investigación científica y en su aplicación en diferentes áreas que van desde la biotecnología, la agricultura hasta el desarrollo de fármacos personalizados. Desarrollada por Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna (Ganadoras del Premio Nobel de Química 2020), esta tecnología se caracteriza por su capacidad para editar el genoma de prácticamente cualquier organismo de manera **precisa, dirigida y programable**. Este sistema está constituido por dos elementos (Figura 1): Una **guía de RNA (gRNA)** y una **nucleasa Cas9**, que al unirse forman un complejo que *escanea* el genoma en busca de una secuencia de tres bases llamada PAM (5' NGG). Una vez encontrada esta secuencia, si un extremo de 20 bases (secuencia spacer) de la gRNA hibrida con 20 bases del DNA blanco (secuencia protospacer), Cas 9 cortará adyacentemente al sitio PAM. Por lo cual, el elemento que determina el sitio de corte en el genoma y que por ende el elemento que podemos programar es la gRNA.



<https://eng.bioneer.com/c-life-science/service/crispr.html>

Figura 1- Complejo gRNA-Cas9

En esta práctica utilizarás la tecnología CRISPR-Cas9 para editar el genoma de la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*), con el objetivo de modificar la ruta de biosíntesis de la adenina mediante la inactivación de un gen llamado *ADE2*, el cual codifica para una enzima involucrada en la síntesis de esta purina (Figura 2). La inactivación será efectuada por la ruptura de la doble cadena en la región del gen *ADE2*, corte mediado por la nucleasa Cas9,

lo que llevará a la acumulación de un intermediario de color rojo (AIR : 5-aminoimidazol ribonucleotido) de la ruta de biosíntesis de la adenina, observándose colonias de color rojo (fenotipo). Aquellas células que NO fueron editadas, formarán colonias de color blanco.

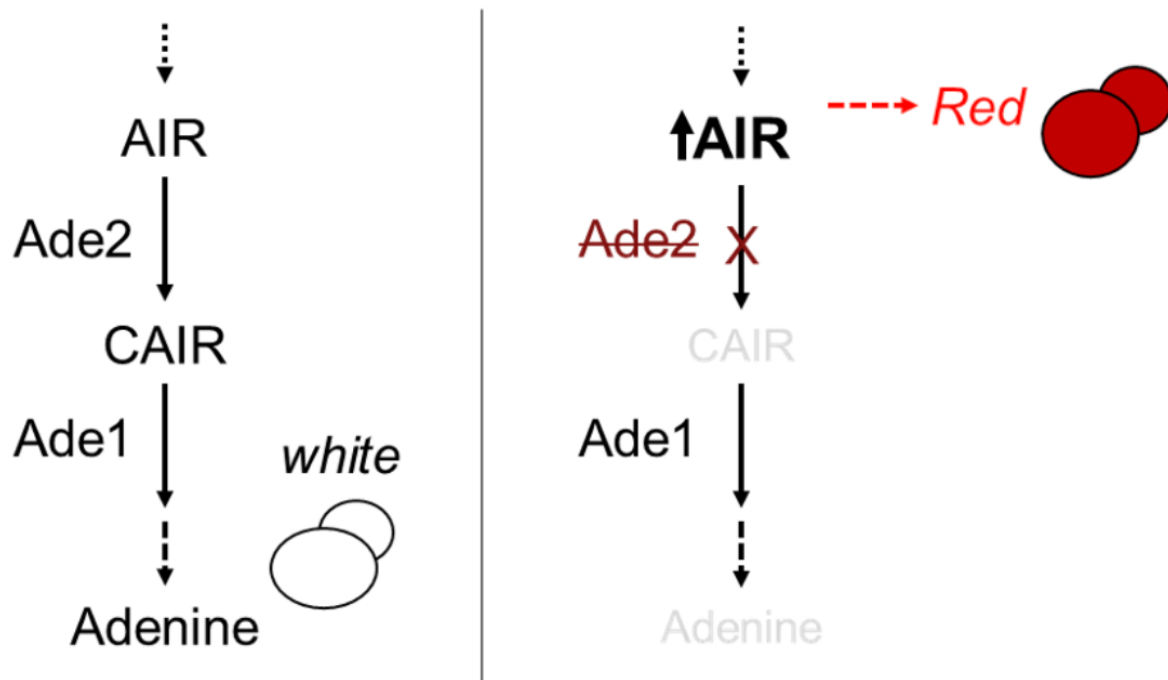


Figura 2.- Ruta de biosíntesis de la adenina. En presencia de una proteína funcional Ade2 las colonias resultantes despliegan un color blanco, mientras que en aquellas en donde la proteína Ade2 carece de actividad, se formarán colonias rojas debido a la acumulación del pigmento en la vacuola.

Referencias

- Sankaran SM, Smith JD, Roy KR. CRISPR-Cas9 Gene Editing in Yeast: A Molecular Biology and Bioinformatics Laboratory Module for Undergraduate and High School Students. J Microbiol Biol Educ. 2021 May 31;22(2):e00106-21. doi: 10.1128/jmbe.00106-21
- Shortt, C; Krippaehne, E; Wasko, BM (2023). A simple and accessible CRISPR genome editing laboratory exercise using yeast. microPublication Biology. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000699>

Agradecimientos

- Material elaborado y adaptado por: **Dr. Fernando Guzmán-Chávez (IIBO-UNAM)** con ayuda del **Dr. José Antonio Pedroza-García (FQ)** y **QFB. Karem Sanchez-Martinez (FQ)**, a partir del trabajo desarrollado por el Dr. Kevin R. Roy de la Universidad de Stanford (<https://doi.org/10.1128/jmbe.00106-21>)
- Los plásmidos fueron facilitados y adquiridos exclusivamente para esta práctica con el apoyo del **PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)** bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Científico (MTA, por sus siglas en inglés) firmado con Addgene. Cualquier uso distinto al presente protocolo deberá ser consultado con el **Dr. Pedroza-Garcia**.