
Enginyeria genètica i tecnologia CRISPR

Què és, d'on venim i on anem



Guió docent

**Aquests materials didàctics són per a ús docent i d'investigació. Resta
prohibida la seva comercialització o modificació.**

Font imatge: <https://www.freepik.es/vector-gratis/cientificos-moleculas-adn-8356407.htm#fromView=search&page=4&position=29&uuid=4348c5e4-dfe7-4a62-8479-ca6bf3d110d1>

1. Context

Imagina que visquessis als anys 80 i et diguessin que els ordinadors ho conquistarien tot, des de fer compres, buscar parella o invertir en borsa; que bilions de persones estarien connectades a través d'un tipus de xarxa; que utilitzaries cada dia un dispositiu mòbil molt més poderós que els súper ordinadors.

T'hauria semblat absurd, però ha passat. La ciència ficció s'ha convertit en la nostra realitat i no parem ni a pensar-ho.

Ens trobem en un punt similar amb l'enginyeria genètica.

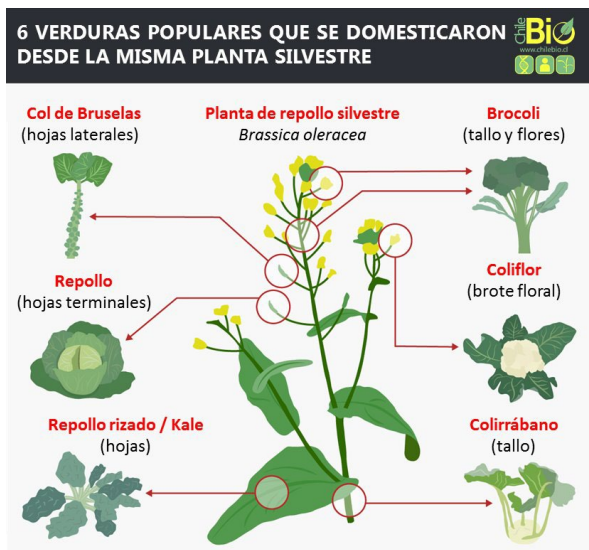
1. Saps que són les eines d'edició genètica? Coneixes alguna eina d'edició genètica? En pots anomenar alguna?

2. Quina utilitat poden tenir les eines d'edició genètica?

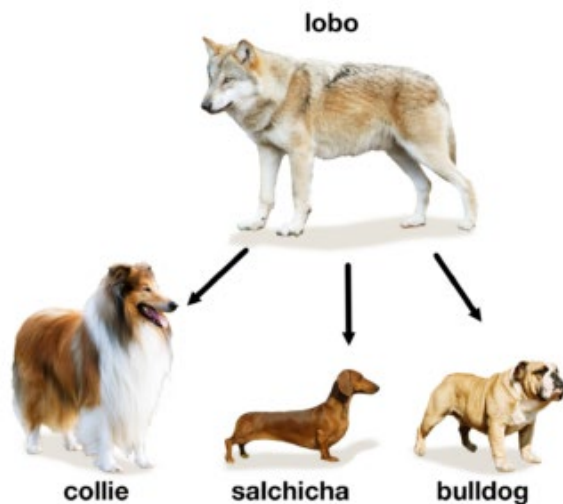
2. (Molt) breu i incompleta història de l'enginyeria genètica

Millora tradicional

Els humans han modificat organismes des de fa milions d'anys. Mitjançant la selecció artificial, hem enfortit trets útils en plantes i animals. Amb la cria i el cultiu d'aquests organismes, es trien com a reproductors els individus que es consideren millors, els que tenen les característiques més valorades.¹ S'aconseguien grans resultats, com en el cas dels gossos i moltes plantes comestibles, però no s'entenia realment com funcionava fins que es va conèixer el codi de la vida: l'àcid desoxiribonucleic (ADN).



Font: <https://chilebio.cl/2019/03/26/estudio-actualiza-la-familia-de-plantas-que-incluye-al-brocoli-coliflor-y-coles-de-bruselas/>



Font: <https://evolution.berkeley.edu/evidencias-de-la-evolucion/seleccion-artificial/>

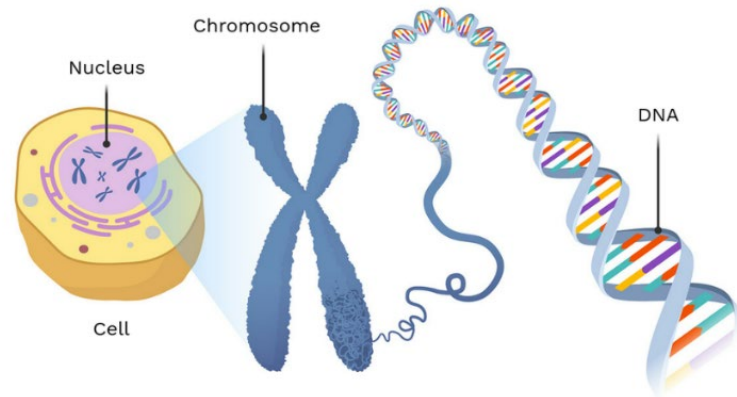
Història de l'enginyeria genètica

L'ADN és una complexa molècula de l'interior de les cèl·lules que conté la informació genètica necessària per què la majoria d'organismes creixin i es desenvolupin i es reproduïxin.² L'ADN està format per quatre nucleòtids: adenina (A), timina (T), guanina (G) i citosina (C), units formant la cadena de DNA. Dues cadenes d'ADN s'uniran de manera complementària, és a dir, l'A s'uneix a la T, i la G a la C, i les dues cadenes s'enrotllaran sobre si mateixes formant una hèlix, i a mesura que l'hèlix es vagi condensant, és formaran els cromosomes³.

¹ Font: <https://educacioidigital.cat/ioc-batx/moodle/mod/book/view.php?id=12794&chapterid=8886>

² Font: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/adn>

³ Font: https://transferencia.fundaciorecerca.cat/docs/Ficha_estudiante_CRISPR.pdf



Font: Django-wiki

Quan les cèl·lules es divideixen, l'ADN es duplica, de manera que cadascuna de les còpies passi a cada cèl·lula filla. L'ADN és doncs com un llibre d'instruccions, però si aquestes canvien l'organisme que el conté també pot canviar. Per exemple, si el procés de duplicació de l'ADN pot donar lloc a errors, també anomenats mutacions. Aquests errors són molt abundants, i la majoria són corregits o eliminats pel nostre propi cos. Quan el nostre cos no és capaç de corregir o eliminar aquestes mutacions, poden originar un mal funcionament de la cèl·lula.³

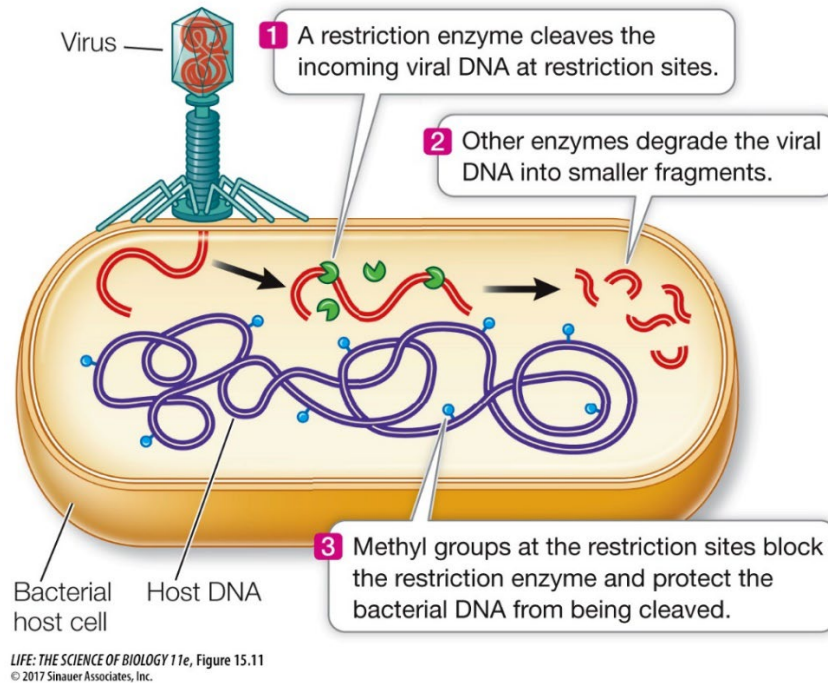
Amb la millora tradicional d'animals i plantes els canvis acostumaven a ser lents i imprecisos, amb canvis secundaris no desitjats i difícils de controlar. Tot i així, aquests canvis podien arribar a ser ràpids en el cas de la hibridació, creuament sexual entre dues espècies properes per tal d'obtenir un híbrid, o l'empelt entre plantes. Aquestes tècniques permeten transmetre cloroplasts, ADN mitocondrial i tot el nucli cel·lular per crear potencialment una nova espècie.

Un gran avenç va ser quan es va descobrir que les mutacions es podien induir mitjançant **mutàgens físics i químics** (agents que modifiquen el material genètic d'un organisme, utilitzat principalment en plantes).⁴ Els mutàgens físics solen produir canvis cromosòmics i delecions a l'ADN de major envergadura, mentre que els mutàgens químics solen donar lloc a mutacions puntuals. A la **dècada de 1960** es va començar a experimentar amb rajos gamma, mutàgens físics, que poden augmentar la taxa de mutació natural de 1.000 a 1 milió de vegades, i han donat lloc a més del 70% de les varietats de cultius mutants actuals.⁴

Però a partir del descobriment dels **enzims de restricció**, proteïna d'origen procariota, que forma part del sistema de defensa dels bacteris per defensar-se d'ADN aliè. Els enzims de restricció reconeixen seqüències curtes d'ADN víric determinades i poden digerir-les, tallar-les, per prevenir que el virus es reproduïxi a la cèl·lula bacteriana.⁵

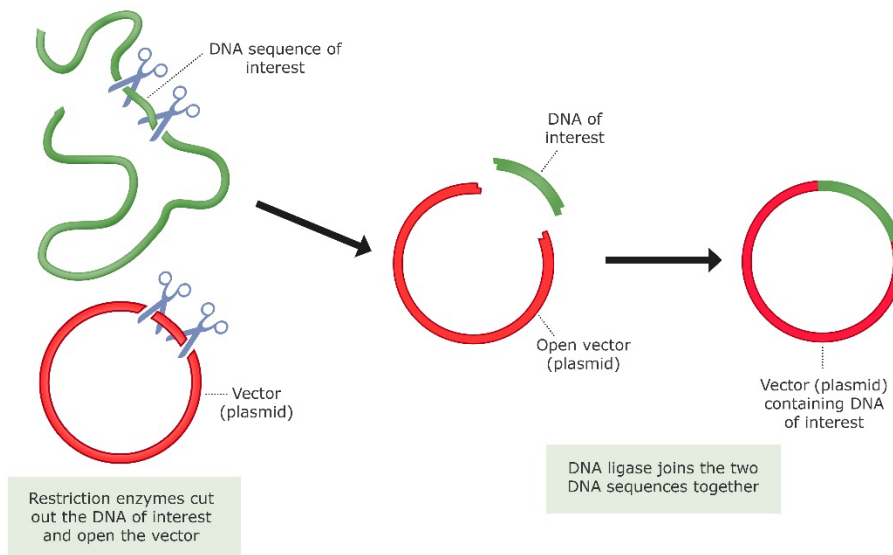
⁴ Font: <https://www.iaea.org/es/temas/induccion-de-mutaciones>

⁵ Font: <https://revistas.uam.es/tarbiya/article/view/15176>



Font: https://digfir-published.macmillanusa.com/life11e/life11e_ch15_20.html

La possibilitat de manipular les molècules d'ADN va sorgir al adonar-se que dues d'aquestes seqüències curtes d'ADN idèntiques dins de molècules diferents, digerides amb el mateix enzim de restricció, posseïen extrems complementaris. Així doncs, era possible tornar a ajuntar-les aprofitant la complementarietat de les seqüències, i segellar les unions gràcies a les lligasses (enzims). Aquest descobriment va permetre als biòlegs moleculars tallar i connectar fragments d'ADN d'origens diferents, fins i tot d'organismes diferents.



© The University of Waikato Te Whare Wananga o Waikato | www.sciencelearn.org.nz

Font: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/527-how-to-add-foreign-dna-to-bacteria>

Aquesta innovació tècnica es va convertir en rutina i es va popularitzar en tots els laboratoris de biologia molecular del món, en aquest moment va néixer l'enginyeria genètica. La tecnologia de l'ADN recombinant va permetre, a la **dècada de 1970**, la **modificació genètica animal**, i el 1974 va néixer el primer ratolí transgènic.⁵ **Als anys 80** es van començar a crear **aplicacions de l'enginyeria genètica en biotecnologia per la societat**, una de les primeres va ser l'obtenció d'una bactèria capaç de produir **insulina** humana, després d'haver-li inserit en un plasmidi bacterià el gen humà que codifica aquesta hormona. Convertint-se en el primer producte terapèutic obtingut gràcies a l'ADN recombinant, derivat d'un **organisme transgènic**.⁵

	Tratamiento de	Fabricado en	Coste / gramo
Oro	N/A	N/A	\$40
Insulina	Diabetes	<i>E. coli</i>	\$60
Hormona del Crecimiento Humana	Desorden de crecimiento	<i>E. coli</i>	\$227,000
Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos	Cáncer	<i>E. coli</i>	\$1,357,000

Font: elaboració pròpia

A la **dècada de 1990** es va **comercialitzar** el primer **aliment modificat genèticament**, el tomàquet "Flavr Savr", al qual van introduir un gen que suprimia la acumulació d'un enzim de putrefacció, fet que allargava molt la seva vida. Va ser també en aquesta dècada, en que l'enginyeria genètica es va utilitzar per tractar la **infertilitat materna a partir de la transferència ooplasmàtica (introducció d'ADN mitocondrial d'un 3r individu)**, donant lloc a **nadons de 'tres pares'**. Posteriorment, es van desenvolupar diferents tècniques l'objectiu de prevenir malalties genètiques, principalment malalties metabòliques causades per mitocondris defectuosos.⁶ Però als anys 2000, els estudis de substitució mitocondrial en animals van donar resultats contradictoris, com envelliment accelerat o una disminució de la funció cognitiva a l'edat adulta, mentre que d'altres estaven aparentment sans i eren capaços de reproduir-se. Els resultats també son incerts pel que fa a fins a quin punt aquestes tècniques podrien prevenir l'herència de la malaltia mitocondrial.⁷

⁶ Font: <https://www.nature.com/articles/nature.2016.20698>

⁷ Font: <https://www.britannica.com/science/three-parent-baby>

En aquest moment la enginyeria genètica va patir una explosió d'idees i noves aplicacions de les modificacions genètiques:

[Granotes transparents](#)

[Pollastres sense plomes](#)

[Peixos fluorescents](#)



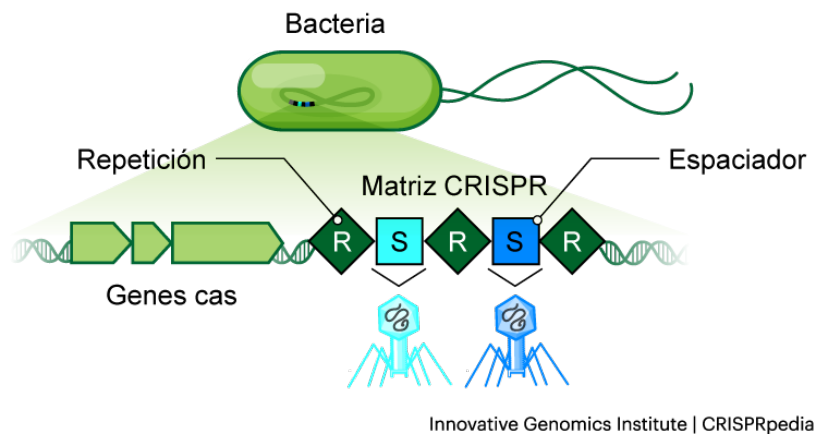
Els organismes modificats genèticament (OMG) son molt útils, especialment els animals, en investigació sobre el càncer, malalties cardiovasculars, etc.; en el cas dels cultius, ha permès crear varietats resistents a malalties, sequeres o plagues i produir aliments millorats nutricionalment. També han permès la producció d'insulina, medicaments, hormones, vacunes, anticancerígens. Però hi ha un gran problema en el desenvolupament d'aquestes variants: tenen un alt cost econòmic, de temps i el percentatge d'èxit és baix.

La guerra més antiga del món: l'origen de CRISPR

Els bacteris i els virus s'han barallat des de l'inici de la vida. Els virus bacteriòfags cacen bacteris i insereixen el seu genoma als bacteris per poder-se reproduir.

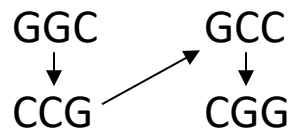
Però, com ja sabem, els bacteris tenen mecanismes de defensa, com els enzims de restricció. A més dels diversos sistemes de defensa innats dels bacteris, alguns també tenen un mecanisme immunitari adaptat anomenat CRISPR-Cas.⁸ Aquest sistema els permet generar, ràpidament, immunitat contra nous bacteriòfags i va ser descobert, el 2005 per Francisco Mojica, investigador de la Universitat d'Alacant. De manera resumida, els sistemes CRISPR funcionen capturant petits fragments d'ADN del virus invasor, integrant-lo al genoma de la cèl·lula hoste i utilitzant aquests records moleculars per trobar i destruir virus coincidents.⁸ La paraula CRISPR prové de «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats», que es refereix a una secció de l'ADN dins del genoma bacterià on trobem dos components: repeticions i espaiadors.

⁸ Font: <https://innovativegenomics.org/es/crisprpedia/crispr-en-la-naturaleza/>



Font: <https://innovativegenomics.org/es/crisprpedia/crispr-en-la-naturaleza/>

Les **repeticions** són segments d'ADN amb la mateixa seqüència (al voltant de 30 parells de bases de longitud) que solen contenir un tram de bases seguit per les bases complementaries de la mateixa seqüència (palindròmiques) en ordre invers:



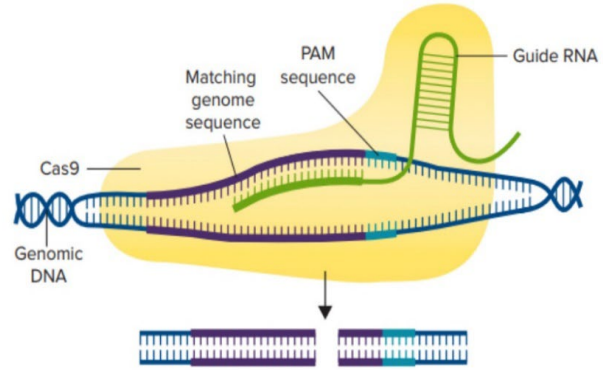
Font: <https://scienceprimer.com/palindromic-sequences>

Els **espaiadors** són petits segments d'ADN víric, cada un diferent, que s'intercalen entre les repeticions. Aquests fragments són restes d'infeccions prèvies que es transmeten de generació en generació.

L'any 2012, Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier van publicar a la revista *Science* un article demostrant com el sistema CRISPR-Cas9 podia utilitzar-se com una tècnica d'enginyeria genètica per modificar l'ADN.³ És a dir, amb aquest mètode es poden modificar els gens de qualsevol animal, fins i tot els gens humans. Doudna i Charpentier van aconseguir utilitzar adaptar aquest mètode per al seu ús al laboratori, per poder detectar específicament i modificar qualsevol gen de qualsevol organisme. Per fer-ho, necessitem:

1. Un **ARN guia**: aquesta molècula conté una seqüència nucleotídica d'ARN complementària al gen que vulguem editar. D'aquesta manera, l'ARN es pot unir a l'ADN.
2. La **proteïna Cas9**: és una endonucleasa encarregada de tallar l'ADN, un cop l'ARN guia recluti la proteïna cap al lloc indicat.

3. La **seqüència PAM**: l'ARN guia necessita reconèixer la seqüència PAM, una seqüència de 3 nucleòtids concrets (NGG) en l'ADN, que es localitza just al final de la seqüència complementària, i doncs la Cas9 efectuarà un tall de doble cadena. Sense la seqüència PAM, l'ARN guia no es podrà unir a l'ADN, i el tall no tindrà lloc.



Font: <https://www.moleculardevices.com/applications/gene-editing-with-crispr-engineering>

Aquest tall de doble cadena de l'ADN pot tenir diferents efectes, però en general, s'utilitza per:

- Silenciar un gen, i evitar que s'expressi.
- Modificar la seqüència gènica: Gràcies als mecanismes de reparació de l'ADN, després de fer un tall, poden inserir una altra seqüència d'ADN i expressar un nou gen.

CRISPR/Cas s'ha convertit en una eina d'enginyeria genètica es pot programar per a que faci talls específics en la regió genòmica d'interès per a tractar malalties, generar models i estudiar dianes de nous fàrmacs:

- **VIH**: l'any 2015 investigadors van utilitzar CRISPR per tallar el virus del VIH de cèl·lules vives de pacients al laboratori. Un any després, injectant CRISPR a les cues de rates infectades de VIH van aconseguir eliminar més del 50% del virus de les cèl·lules del seu cos.
- **Càncer**: el càncer es produeix quan les cèl·lules no moren i es segueixen multiplicant mentre s'amaguen del sistema immunitari. CRISPR ens permetria editar les nostres cèl·lules immunitàries, fent-les millors "caçadores" de càncer.
- **Malalties genètiques**: hi ha més de 3.000 malalties que són causades per una simple lletra incorrecta en l'ADN. CRISPR-Cas9 es podria utilitzar per "corregir" aquesta mutació i tractar aquestes malalties.

A diferència de les tècniques que s'utilitzaven anteriorment, aquesta és molt precisa, econòmica i barata. A més, CRISPR permet l'edició de cèl·lules vives, d'apagar o encendre gens i d'escollir seqüències d'ADN en particular. També funciona amb qualsevol tipus de cèl·lula, microorganismes, plantes, animals o humans.

Tot i això, CRISPR té certes **limitacions**:

- **Eficiència**: els diferents Cas9 i CRISPR no són capaços de modificar totes les cèl·lules que volem modificar i per tant, la solució a aquestes malalties no és completa només utilitzant aquestes tècniques.

- **Precisió:** s'ha descobert que l'ARN guia pot unir-se a altres regions de l'ADN que no són la que havíem escollit. Això s'anomena "off-target effects", i poden comportar canvis no buscats al genoma.
- **Canvis no heretables:** Totes les aplicacions mèdiques que hem anomenat tenen una cosa en comú, estan limitades a l'individu. Excepte, si s'utilitza cèl·lules reproductives o embrions molt joves.



3. Bioètica: l'edició genètica a debat

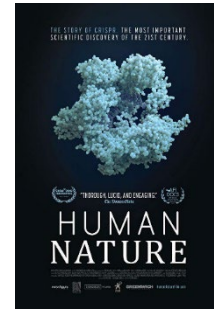
En aquesta part final de la classe de teoria, es realitzarà una debat amb temàtica de bioètica. Primer es dividirà la classe en 5 grups, als quals se'ls donarà una carta conversacional (Annex). Primer tindran 10 minuts per llegir la fitxa i discutir-la en petit grup. Tot seguit, es farà un debat (30-40 minuts) podem començar demanant que un representant de cada grup presenti el cas de la seva targeta, si aprovaren l'edició del genoma d'aquell individu i que defensi la posició ètica del grup, si és que han arribat a un consens. Mentre els grups van presentant es recomana que l'alumnat ompli la següent taula:

Utilitzant la següent taula⁹ per classifica cada un dels casos que s'exposen. Puntua de 1 a 4 cada categoria (on 1 equival a "gens", 2 equival a "poc", 3 equival a "bastant" i 4 equival a "molt").

<i>Cas clínic</i>	Seguretat	Importància del mal a evitar	Impacte futures generacions	Conseqüències socials	Puntuació final

També us proposem veure alguna d'aquestes pel·lícules o documentals sobre l'edició genètica.

⁹ Font: <https://www.iborjabioetica.url.edu/ca/blog-de-bioetica-debat/aspectes-etics-de-la-tecnica-dedicio-genetica-crispr>



Un cop explicats els diferents casos i el punt de vista de cada grup el/la docent demana:

- En cada cas, la persona que rebrà el tractament o els “beneficis d’aquest” pot expressar la seva opinió i donar el seu consentiment?
- On marcaríem el límit de quines edicions aprovem i quines no?
- Creus que només la comunitat científica hauria de participar en aquest debat o també la societat en general?
- Quins avantatges i inconvenients pot tenir que empreses comercialitzin aquest tipus de serveis?
- Quins riscos hi veieu en que es modifiqui el genoma humà amb intenció de “millorar” l’espècie?

Alguns especialistes⁹ han distingit els següents grups de qüestions ètiques que et poden ajudar a mencionar qüestions ètiques que encara no hagin sortit al debat:

Seguretat i eficàcia i Cal millorar els coneixements d’epigenètica per determinar i preveure els efectes fenotípics de l’edició genètica.

Ús i tipus de cèl·lules Cèl·lules somàtiques i cèl·lules embrionàries (la majoria): només afecta a l’individu, no a la seva descendència. Les qüestions ètiques tenen a veure amb la relació entre el risc i el benefici i el consentiment.

Cèl·lules germinals: poden generar modificacions en la descendència (prohibit a Europa) i planteja l’ús d’embrions en recerca científica que ja planteja problemes ètics pel seu compte. A més, implicaria el monitoratge, de per vida, dels individus resultants i no comptaria amb el seu consentiment i la decisió presa pels seus pares podria afectar la seva autonomia.

Finalitat S’han definit dues raons principals: teràpia, tractament o prevenció d’una malaltia concreta, o millora genètica, modificar una característica (o diverses característiques) d’un individu (o espècie) que no està (o estan) malalts. Aquesta segona raó podria conduir a que l’individu tingui menys importància que certes característiques físiques i cognitives. Això planteja certes preguntes: Quines malalties s’han d’erradicar o prevenir? S’han d’erradicar totes les discapacitats? Què és una malaltia? És bo èticament i socialment erradicar tot allò que es jutja com a “defectuós” (o qualsevol característica que es consideri així)?

Accessibilitat i justícia El cost financer de la teràpia és un factor clau quan es planteja la qüestió de la justícia. La comercialització d’una teràpia costosa podria agreujar de manera significativa les

desigualtats existents en els sistemes sanitaris, tant en els països pobres com rics. Per exemple, els països amb sistema sanitari públic podria suposar un encariment de la sanitat i amenaçar la sostenibilitat d'aquest. Una alteració genètica de la línia germinal podria generar desigualtats excessives entre diferents individus, comunitats i societats.

4. Taller pràctic: ús de CRISPR per tractar l'atrofia muscular espinal

El taller pràctic el centrarem en un dels casos que hem debatut prèviament, el cas d'en [Zac Cameron](#), un nen de tres anys amb atrofia muscular espinal.

Atròfia Muscular Espinal (AME)

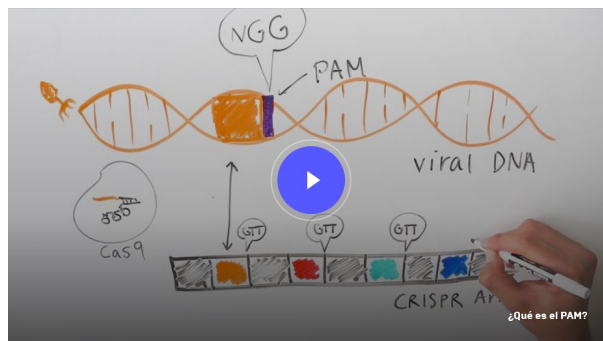
L'Atròfia Muscular Espinal (AME) és un grup de malalties musculars hereditàries que causen degeneració i debilitat muscular progressiva.¹⁰ És causada per la pèrdua de cèl·lules nervioses especialitzades, les neurones motores, que s'encarreguen de coordinar i enviar els estímuls al múscul per fer possible el moviment. Així, les persones que pateixen aquestes malalties tenen dificultats per gatejar, caminar, seure, controlar els moviments del cap i, en casos severes, els músculs per respirar i empassar.

La principal causa de AME és l'absència del gen *Survival Motor Neuron 1 (SMN1)*. Com menys còpies d'aquest gen es tinguin més severa serà la malaltia. Per sort, s'ha trobat una possible manera de tractar l'AME: existeix un gen molt similar l'*SMN2*. Aquest gen podria compensar la falta d'*SMN1* i realitzar les seves funcions, però hi ha un exó, una peça del gen, que de manera natural no es tradueix en la proteïna *SMN2* i això impedeix que actuï com a *SMN1*.

Ús de CRISPR per tractar l'AME

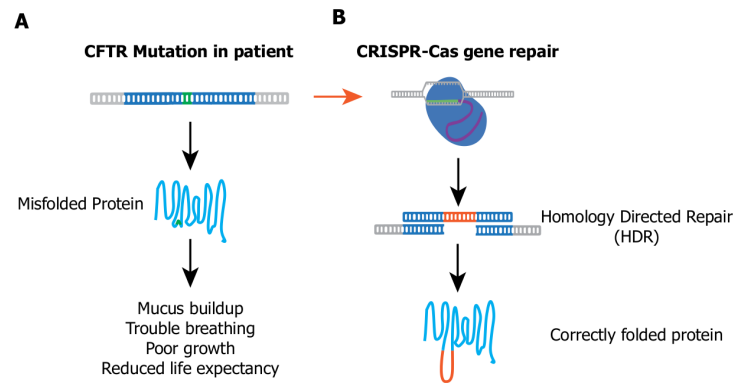
El que farem en aquesta pràctica és forçar la inclusió de l'exó 7 de *SMN2* a l'ARN que es traduirà en proteïna, permetent així la seva funció i recuperant la mobilitat dels pacients. Per aconseguir-ho utilitzarem CRISPR per modificar la seqüència i facilitar la seva inclusió.

A partir de mostres del pacient, demanarem a un laboratori extern que realitzin la modificació amb la tècnica CRISPR. El laboratori ens proporcionarà diferents mostres que corresponen a modificacions de l'ADN del pacient que s'han creat utilitzant diferents seqüències PAM.



¹⁰ Font: <https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/11864/atrofia-muscular-espinal>

Després, al nostre laboratori estudiarem el resultat de la transfecció de CRISPR amb diverses seqüències que ens han proporcionat: comprovarem l'efectivitat del tractament amb CRISPR mirant si s'ha produït el tall desitjat a la seqüència diana, mitjançant una tècnica anomenada electroforesi en gel d'agarosa.



Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

El contingut d'aquest taller experimental s'ha creat en base al material proporcionat en el [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Electroforesi en Gel d'Agarosa¹¹

En aquest mòdul, fareu servir l'electroforesi en gel per analitzar l'eficàcia de 5 gRNAs diferents que s'han dissenyat. Es va obtenir l'ADN del pacient i se'n va amplificar un segment de **4.300 pb** mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). A continuació, l'ADN amplificat es barreja amb la proteïna Cas9 i una de les 5 solucions de gRNA. Si el gRNA pot dirigir-se amb èxit al gen *SMN2*, serà tallat per l'enzim Cas9, i mitjançant l'electroforesi en gel, s'haurien de poder veure dues bandes diferents (si no talla, en canvi, només en veurem una).

Preparació del gel d'agarosa

1. DILUEIX el **tampó d'electroforesi** concentrat 50X amb aigua destil·lada (volem aconseguir una concentració final 1X).

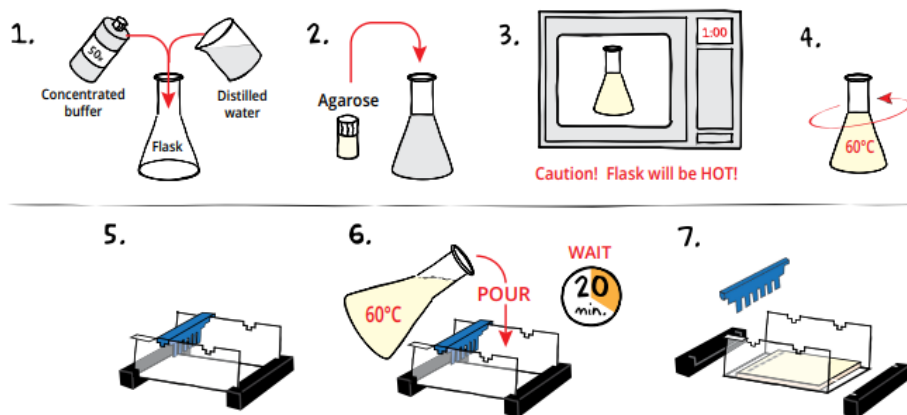
Volum Total (ml)	Tampó concentrat 50X (ml)	Aigua destil·lada (ml)
150 ml	3 ml	147 ml

¹¹ Font: https://transferencia.fundaciorecerca.cat/docs/Guio_docent_Fibrosi_Quistica.pdf

2. Per obtenir **gel d'agarosa al 0,8%** (0,8 g/100ml), **MESCLA** la pols d'agarosa amb la solució de tampó d'electroforesi en un matràs d'Erlenmeyer de 250 ml.

Tampó d'electroforesi 50X (ml)	Aigua destil·lada (ml)	Massa d'agarosa (g)	Volum TOTAL (ml)
0,9 ml	44,1 ml	0,36 g	45 ml

3. **DISSOL** la pols d'agarosa escalfant la solució al microones a potència màxima durant 1 minut. Amb cura, **TREU** el matràs d'Erlenmeyer del microones i remena. Continua **ESCALFANT** a solució en intervals de 15 segons fins que l'agarosa estigui completament dissolta (la solució ha de ser clara com l'aigua).
4. **REFREDA** l'agarosa remenant amb cura per dissipar la calor uniformement.
5. Mentre l'agarosa es refreda, **TANCA** bé els extrems e la safata per col·locar el gel amb les capses de coma. **COL·LOCA** la pinta amb 6 pouets al lloc adequat.
6. **BUIDA** la solució d'agarosa refredada a la safata preparada per col·locar el gel. El gel s'ha d'endurir completament al cap de 20 minuts, i es tornarà menys transparent a mesura que es solidifiqui.
7. Amb molta cura, **TREU** la pinta dels pouets i els extrems de gel.



Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Córrer el gel

8. **COL·LOCA** el gel (encara a la safata) dins de la cambra d'electroforesi. **COBREIX** el gel amb Tampó d'Electroforesi 1X, assegura't que estigui completament submergit.

Volum Total (ml)	Tampó concentrat 50X (ml)	Aigua destil·lada (ml)
1.000 ml		

Recordatori: Abans de carregar les mostres, assegura't que està ben orientat dins l'aparell.

9. Després de posar una punta a la pipeta, agafa tota la mostra (35 µL) del QuickStrip™, i CARREGA-LA al pou en l'ordre indicat a continuació:

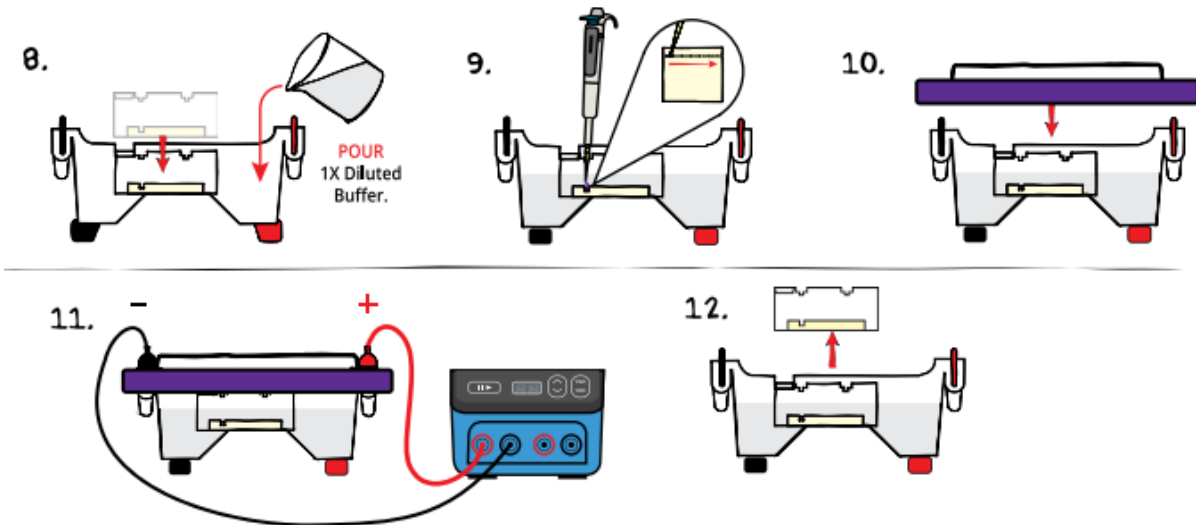
Carril 1	Tub A	Marcador de pes molecular
Carril 2	Tub B	gRNA #1
Carril 3	Tub C	gRNA #2
Carril 4	Tub D	gRNA #3
Carril 5	Tub E	gRNA#4
Carril 6	Tub F	gRNA #5

10. COL-LOCA la coberta de seguretat a la unitat i COMPROVA que el gel estigui orientat correctament.
11. CONNECTA els cables a la font d'alimentació perquè comenci l'electroforesi, i fins que el front (colorant de seguiment) migri almenys 30 cm des dels pous.

VOLTATGE: 150V | TEMPS: ~ 20/30 minuts

RECORDATORI: Les mostres d'ADN migraran cap a l'elèctrode positiu (vermell).

12. Després que l'electroforesi hagi finalitzat, TREU el gel i la safata de col·locació de l'electroforesi de la cambra.



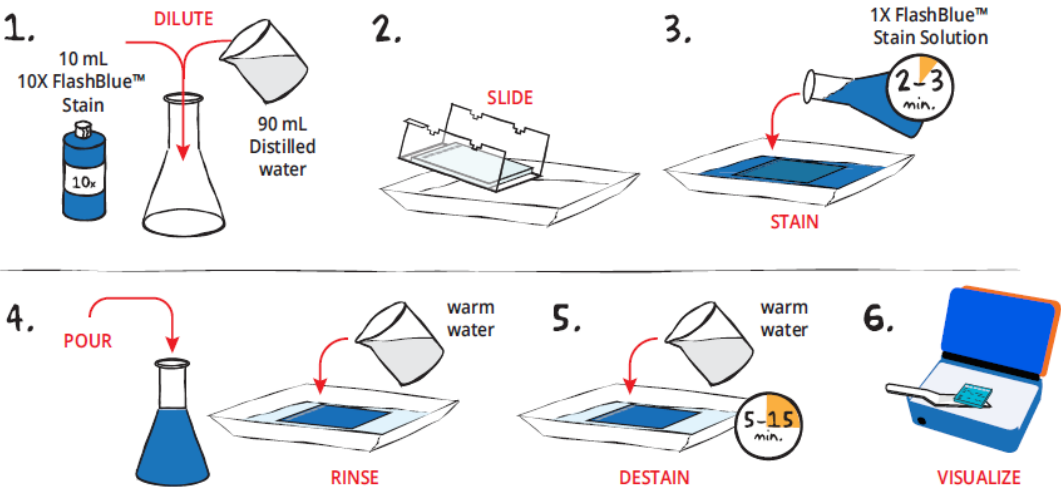
Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Tinció dels gels d'agarosa amb FlashBlue™

1. DILUEIX 10 ml de FlashBlue™ concentrat 10X amb 90 ml d'aigua destil·lada en un matràs d'Erlenmeyer per assolir FlashBlue™ a una concentració final 1X.
2. Treu el gel fora de la safata i col·loca'l en una safata petita i neta per tenyir gels.
3. COBREIX el gel amb la solució de tinció FlashBlue™ 1X, durant 2-3 minuts.
4. COBREIX el gel amb aigua calenta (40-45 °C), RENTA'L suaument durant 20-30 segons. Després, BUIDA l'aigua bruta.
5. COBREIX el gel amb aigua calenta (40-45 °C). DESTENYEIX durant 5-15 minuts amb agitació suau. Les bandes d'ADN començaran a aparèixer després de 5 minuts de destenyir.

NOTA: Canviar l'aigua freqüentment accelerarà el desat.

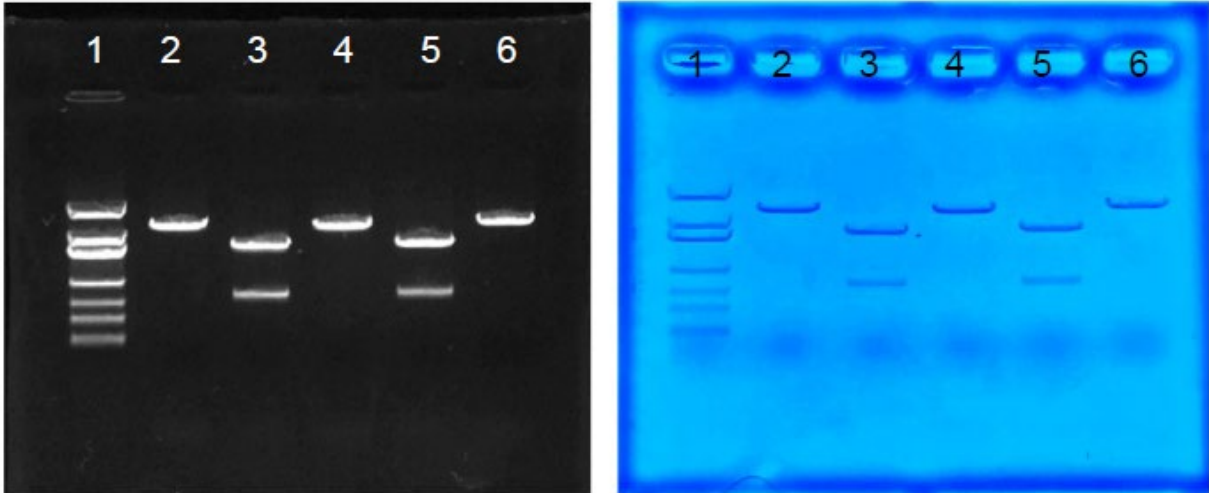
6. TREU amb cura el gel líquid de destenyir. VISUALITZA els resultats utilitzant un sistema amb llum blanca. L'ADN apareixerà com a bandes blaves fosques sobre un fons blau.



Font: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

5. Resultats, anàlisi i conclusions¹²

A continuació, completa l'esquema del gel d'electroforesi amb els resultats observats:



Els carrils 3 i 5 mostren dues bandes, el que resulta indicatiu que l'ADN ha estat digerit.

Carril	Mostra + gRNA	Resultat	Pes molecular (bp)
1	Marcador de pes molecular	----	----
2	gRNA #1	No ha tallat	4.300 pb
3	gRNA #2	Ha tallat	3.000 pb/1.300 pb
4	gRNA #3	No ha tallat	4.300 pb
5	gRNA #4	Ha tallat	3.000 pb/1.300 pb
6	gRNA #5	No ha tallat	4.300 pb

¹² Font: https://transferciencia.fundaciorecerca.cat/docs/Guio_docent_Fibrosi_Quistica.pdf

- En funció d'aquests resultats, quins són els millors candidats de gRNA per dirigir-se a la regió del gen *SMN2* del pacient?

- Quin seria el següent pas a realitzar per part dels metges i/o de les metgesses?