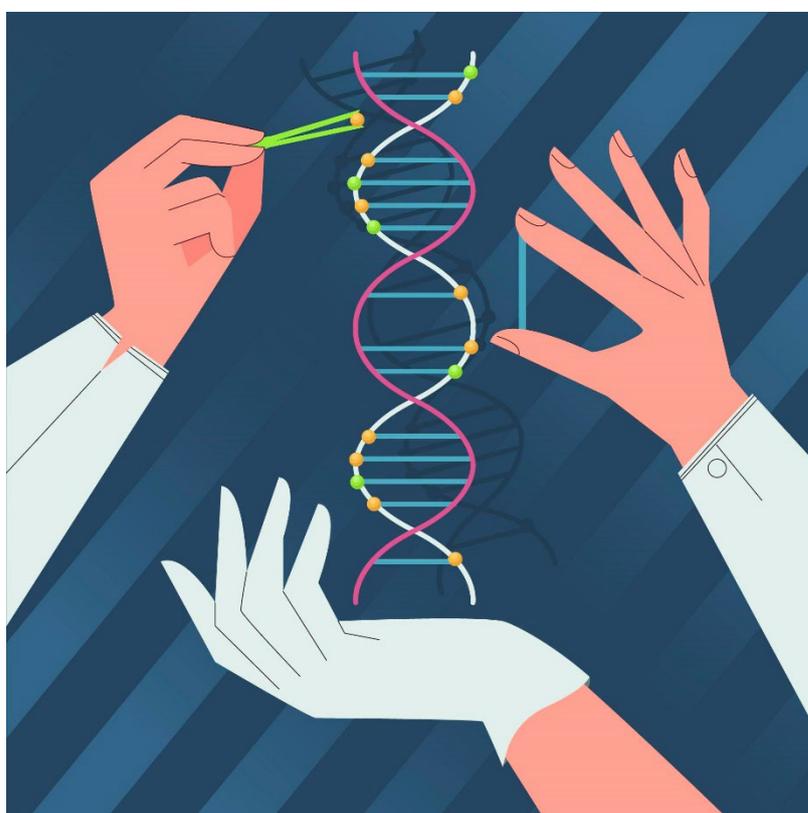

Ingeniería genética y tecnología CRISPR

¿Qué es? ¿De dónde venimos? ¿A dónde vamos?



Guion docente

Estos materiales didácticos son para uso docente y de investigación. Queda prohibida su comercialización o modificación.

Fuente imagen: https://www.freepik.es/vector-gratis/cientificos-moleculas-adn_8356407.htm#fromView=search&page=4&position=29&uid=4348c5e4-dfe7-4a62-8479-ca6bf3d110d1

1. Contexto

Imagina que vivieras en los años 80 y te dijeran que los ordenadores lo conquistarían todo, desde hacer compras, buscar pareja o invertir en bolsa; que billones de personas estarían conectadas a través de un tipo de red; que utilizarías cada día un dispositivo móvil mucho más poderoso que los súper ordenadores.

Te habría parecido absurdo, pero ha pasado. La ciencia ficción se ha convertido en nuestra realidad y no vamos ni a pensarlo.

Nos encontramos en un punto similar con la ingeniería genética.

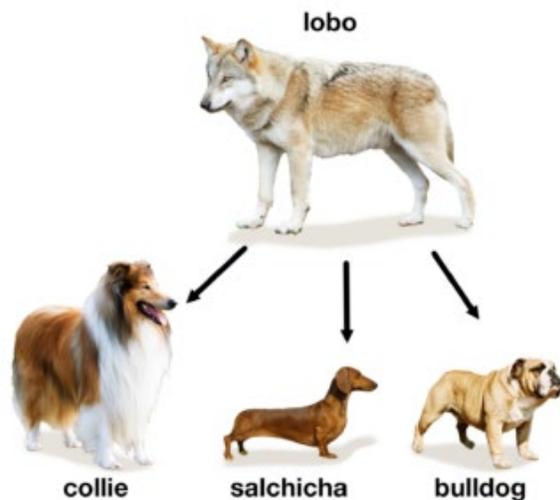
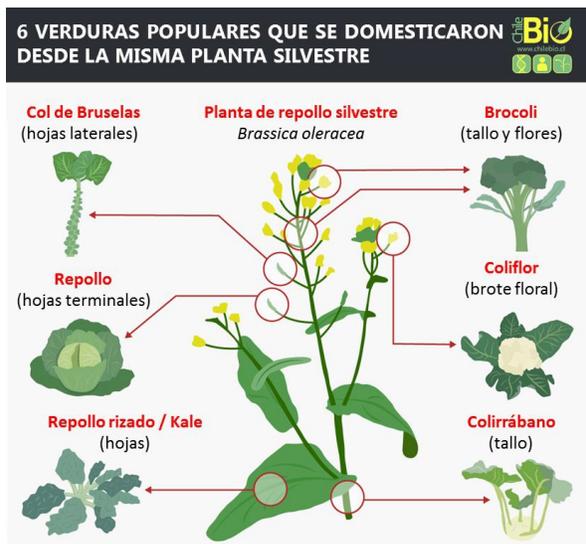
1. ¿Sabes que son las herramientas de edición genética? ¿Conoces alguna herramienta de edición genética? ¿Puedes citar alguna?

2. ¿Qué utilidad pueden tener todas las herramientas de edición genética?

2. (Muy) breve e incompleta historia de la ingeniería genética

Mejora tradicional

Los humanos han modificado organismos desde hace millones de años. Mediante la selección artificial, hemos fortalecido rasgos útiles en plantas y animales. Con la cría y el cultivo de estos organismos, se eligen como reproductores a los individuos que se consideran mejores, los que tienen las características más valoradas.¹ Se conseguían grandes resultados, como en el caso de los perros y muchas plantas comestibles, pero no se entendía realmente cómo funcionaba hasta que se conoció el código de la vida: el ácido desoxirribonucleico (ADN).



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

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

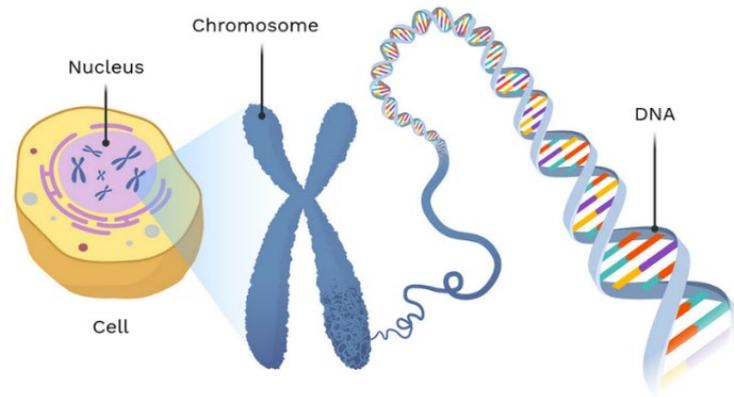
Historia de la ingeniería genética

El ADN es una compleja molécula del interior de las células que contiene la información genética necesaria para que la mayoría de organismos crezcan y se desarrollen y se reproduzcan.² El ADN está formado por cuatro nucleótidos: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C), unidos formando la cadena de DNA. Dos cadenas de ADN se unirán de manera complementaria, es decir, la A se une a la T, y la G a la C, y las dos cadenas se enrollarán sobre sí mismas formando un hélix, y a medida que la hélix se vaya condensando, se formarán los cromosomas.³

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

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

³ Fuente: https://transferencia.fundacionrecerca.cat/docs/Ficha_estudiante_CRISPR.pdf



Fuente: Django-wiki

Cuando las células se dividen, el ADN se duplica, de manera que cada una de las copias pase a cada célula hija. El ADN es pues como un libro de instrucciones, pero si éstas cambian el organismo que lo contiene también puede cambiar. Por ejemplo, si el proceso de duplicación del ADN puede dar lugar a errores, también llamados mutaciones. Estos errores son muy abundantes, y la mayoría son corregidos o eliminados por nuestro propio cuerpo. Cuando nuestro cuerpo no es capaz de corregir o eliminar estas mutaciones, pueden originar un mal funcionamiento de la célula.³

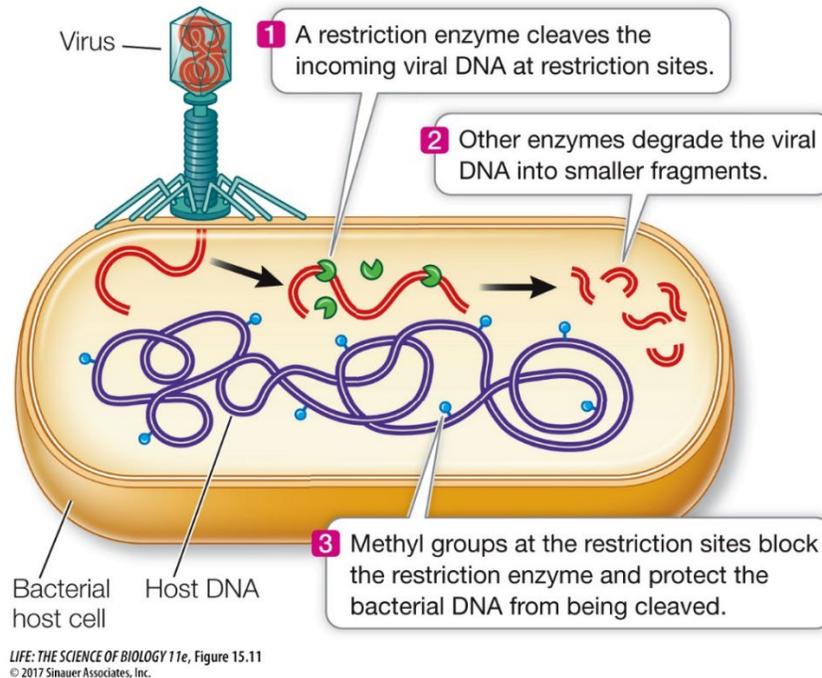
Con la mejora tradicional de animales y plantas los cambios acostumbraban a ser lentos e imprecisos, con cambios secundarios no deseados y difíciles de controlar. Aun así, estos cambios podían llegar a ser rápidos en el caso de la hibridación, cruce sexual entre dos especies cercanas con el fin de obtener un híbrido, o el injerto entre plantas. Estas técnicas permiten transmitir cloroplastos, ADN mitocondrial y todo el núcleo celular para crear potencialmente una nueva especie.

Un gran avance fue cuando se descubrió que las mutaciones se podían inducir mediante **mutágenos físicos y químicos** (agentes que modifican el material genético de un organismo, utilizado principalmente en plantas)⁴. Los mutágenos físicos suelen producir cambios cromosómicos y deleciones en el ADN de mayor envergadura, mientras que los mutágenos químicos suelen dar lugar a mutaciones puntuales. En la **década de 1960** se comenzó a experimentar con rayos gamma, mutágenos físicos, que pueden aumentar la tasa de mutación natural de 1.000 a 1 millón de veces, y han dado lugar a más del 70% de las variedades de cultivos mutantes actuales.⁴

Pero a partir del descubrimiento de las **enzimas de restricción**, proteína de origen procariota, que forma parte del sistema de defensa de las bacterias para defenderse de ADN ajeno. Las

⁴ Fuente: <https://www.iaea.org/es/temas/inducccion-de-mutaciones>

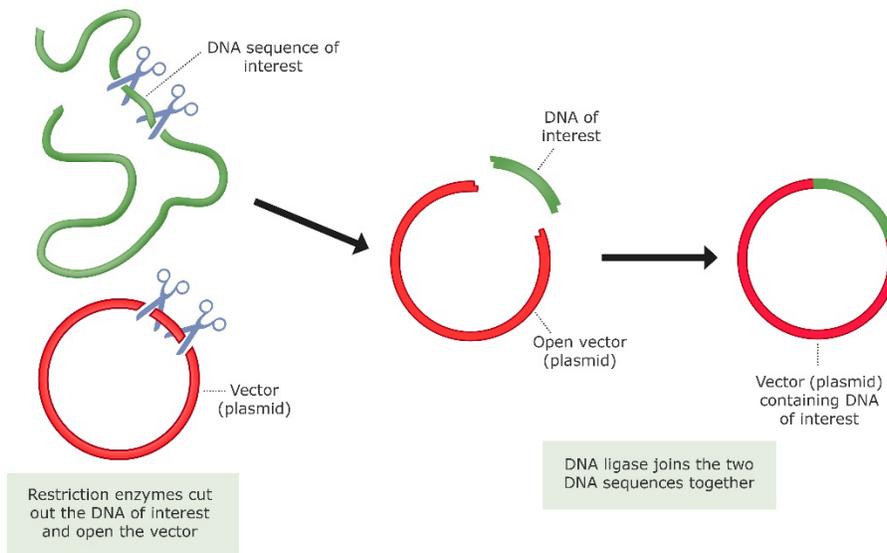
enzimas de restricción reconocen secuencias cortas de ADN vírico determinadas y pueden digerirlas, cortarlas, para prevenir que el virus se reproduzca en la célula bacteriana.⁵



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

La posibilidad de manipular las moléculas de ADN surgió al darse cuenta de que dos de estas secuencias cortas de ADN idénticas dentro de moléculas diferentes, digeridas con la misma enzima de restricción, poseían extremos complementarios. Así pues, era posible volver a juntarlas aprovechando la complementariedad de las secuencias, y sellar las uniones gracias a las ligas (enzimas). Este descubrimiento permitió a los biólogos moleculares cortar y conectar fragmentos de ADN de orígenes diferentes, incluso de organismos diferentes.

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



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

Esta innovación técnica se convirtió en rutina y se popularizó en todos los laboratorios de biología molecular del mundo, en ese momento nació la ingeniería genética. La tecnología del ADN recombinante permitió, en la **década de 1970**, la **modificación genética animal**, y en 1974 nació el primer ratón transgénico.⁵ **En los años 80** se empezaron a crear **aplicaciones de la ingeniería genética en biotecnología para la sociedad**, una de las primeras fue la obtención de una bacteria capaz de producir **insulina** humana, después de haberle insertado en un plásmido bacteriano el gen humano que codifica esta hormona. Convirtiéndose en el primer producto terapéutico obtenido gracias al ADN recombinante, derivado de un **organismo transgénico**.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

Fuente: elaboración propia

En la **década de 1990** se comercializó el primer **alimento modificado genéticamente**, el tomate "Flavr Savr", al que introdujeron un gen que suprimía la acumulación de una enzima de putrefacción, lo que alargaba mucho su vida. Fue también en esta década, en que la ingeniería genética se utilizó para tratar la **infertilidad materna a partir de la transferencia ooplasmática**

(**introducción de ADN mitocondrial de un 3er individuo**), dando lugar a **bebés de 'tres padres'**. Posteriormente, se desarrollaron diferentes técnicas el objetivo de prevenir enfermedades genéticas, principalmente enfermedades metabólicas causadas por mitocondrios defectuosos.⁶ Pero en los años 2000, los estudios de sustitución mitocondrial en animales dieron resultados contradictorios, como envejecimiento acelerado o una disminución de la función cognitiva en la edad adulta, mientras que otros estaban aparentemente sanos y eran capaces de reproducirse. Los resultados también son inciertos en cuanto a hasta qué punto estas técnicas podrían prevenir la herencia de la enfermedad mitocondrial.⁷

En este momento la ingeniería genética sufrió una explosión de ideas y nuevas aplicaciones de las modificaciones genéticas:

Ranas transparentes



Pollos sin plumas



Peces fluorescentes



Los organismos modificados genéticamente (OMG) son muy útiles, especialmente los animales, en investigación sobre el cáncer, enfermedades cardiovasculares, etc.; en el caso de los cultivos, ha permitido crear variedades resistentes a enfermedades, sequías o plagas y producir alimentos mejorados nutricionalmente. También han permitido la producción de insulina, medicamentos, hormonas, vacunas, anticancerígenos. Pero hay un gran problema en el desarrollo de estas variantes: tienen un alto coste económico, de tiempo y el porcentaje de éxito es bajo.

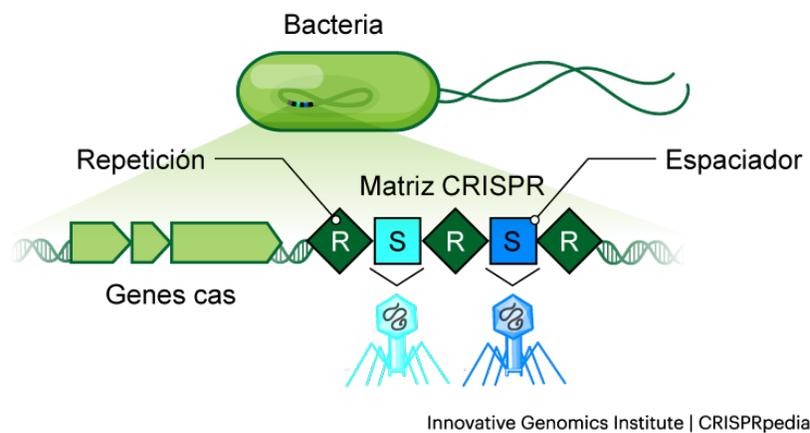
La guerra más antigua del mundo: el origen de CRISPR

Las bacterias y los virus se han peleado desde el inicio de la vida. Los virus bacteriófagos cazan bacterias e insertan su genoma en las bacterias para poder reproducirse.

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

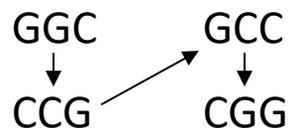
⁷ Fuente: <https://www.britannica.com/science/three-parent-baby>

Pero, como ya sabemos, las bacterias tienen mecanismos de defensa, como las enzimas de restricción. Además de los diversos sistemas de defensa innatos de las bacterias, algunos también tienen un mecanismo inmunitario adaptado llamado CRISPR-Cas.⁸ Este sistema les permite generar, rápidamente, inmunidad contra nuevos bacteriófagos y fue descubierto, en 2005 por Francisco Mojica, investigador de la Universidad de Alicante. De manera resumida, los sistemas CRISPR funcionan capturando pequeños fragmentos de ADN del virus invasor, integrándolo en el genoma de la célula huésped y utilizando estos recuerdos moleculares para encontrar y destruir virus coincidentes.⁸ La palabra CRISPR proviene de «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats», que se refiere a una sección del ADN dentro del genoma bacteriano donde encontramos dos componentes: repeticiones y espaciadores.



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

Las **repeticiones** son segmentos de ADN con la misma secuencia (alrededor de 30 pares de bases de longitud) que suelen contener un tramo de bases seguido por las bases complementarias de la misma secuencia (palindrómicas) en orden inverso:



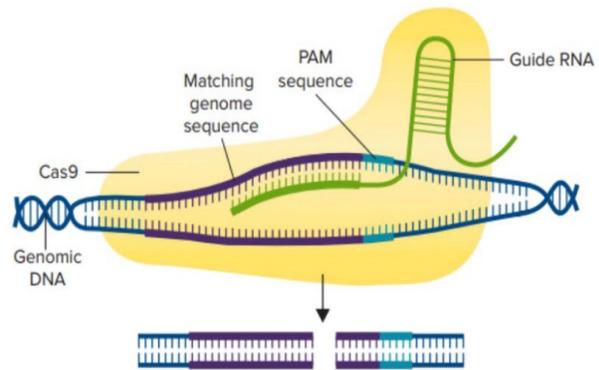
Fuente: <https://scienceprimer.com/palindromic-sequences/>

Los **espaciadores** son pequeños segmentos de ADN vírico, cada uno diferente, que se intercalan entre las repeticiones. Estos fragmentos son restos de infecciones previas que se transmiten de generación en generación.

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

En el año 2012, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier publicaron en la revista *Science* un artículo demostrando cómo el sistema CRISPR-Cas9 podía utilizarse como una técnica de ingeniería genética para modificar el ADN.³ Es decir, con este método se pueden modificar los genes de cualquier animal, incluso los genes humanos. Doudna y Charpentier consiguieron utilizar este método para su uso en el laboratorio, para poder detectar específicamente y modificar cualquier gen de cualquier organismo. Para hacerlo, necesitamos:

1. Un **ARN guía**: esta molécula contiene una secuencia nucleotídica de ARN complementaria en el gen que queremos editar. Así, el ARN se puede unir al ADN.
2. La **proteína Cas9**: es una endonucleasa encargada de cortar el ADN, una vez el ARN guía reclute a la proteína hacia el lugar indicado.
3. La **secuencia PAM**: el ARN guía necesita reconocer la secuencia PAM, una secuencia de 3 nucleótidos concretos (NGG) en el ADN, que se localicen justo al final de la secuencia complementaria, y pues la Cas9 efectuará un corte de doble cadena. Sin la secuencia PAM, el ARN guía no se podrá unir al ADN, y el corte no tendrá lugar.



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

Este corte de doble cadena del ADN puede tener diferentes efectos, pero en general se usa para:

- Silenciar un gen, y evitar que se exprese.
- Modificar la secuencia génica: Gracias a los mecanismos de reparación del ADN, después de hacer un corte, pueden insertar otra secuencia de ADN y expresar un nuevo gen.

CRISPR/Cas se ha convertido en una herramienta de ingeniería genética se puede programar para que haga cortes específicos en la región genómica de interés para tratar enfermedades, generar modelos y estudiar dianas de nuevos fármacos:

- **VIH**: en el año 2015 investigadores utilizaron CRISPR para cortar el virus del VIH de células vivas de pacientes en el laboratorio. Un año después, inyectando CRISPR en las colas de ratas infectadas de VIH lograron eliminar más del 50% del virus de las células de su cuerpo.
- **Cáncer**: el cáncer se produce cuando las células no mueren y se siguen multiplicando mientras se esconden del sistema inmunitario. CRISPR nos permitiría editar nuestras células inmunitarias, haciéndolas mejores "cazadoras" de cáncer.

- **Enfermedades genéticas:** hay más de 3.000 enfermedades que son causadas por una simple letra incorrecta en el ADN. CRISPR-Cas9 se podría utilizar para "corregir" esta mutación y tratar estas enfermedades.

A diferencia de las técnicas que se utilizaban anteriormente, esta es muy precisa, económica y barata. Además, CRISPR permite la edición de células vivas, de apagar o encender genes y de escoger secuencias de ADN en particular. También funciona con cualquier tipo de célula, microorganismos, plantas, animales o humanos.

Sin embargo, CRISPR tiene ciertas **limitaciones**:

- **Eficiencia:** los diferentes Cas9 y CRISPR no son capaces de modificar todas las células que queremos modificar y, por lo tanto, la solución a estas enfermedades no es completa solo utilizando estas técnicas.
- **Precisión:** se ha descubierto que el ARN guía puede unirse a otras regiones del ADN que no son la que habíamos escogido. Esto se llama "off-target effects", y pueden conllevar cambios no buscados en el genoma.
- **Cambios no heredables:** Todas las aplicaciones médicas que hemos llamado tienen algo en común, están limitadas al individuo. Excepto, si se utiliza células reproductivas o embriones muy jóvenes.



3. Bioética: la edición genética a debate

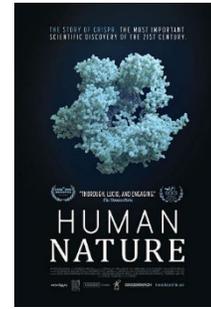
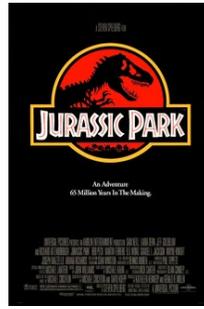
En esta parte final de la clase de teoría, se realizará un debate con temática de bioética. Primero se dividirá la clase en 5 grupos, a los que se les dará una carta conversacional (Anexo). Primero tendrán 10 minutos para leer la ficha y discutirla en pequeño grupo. Acto seguido, se hará un debate (30-40 minutos) podemos empezar pidiendo que un representante de cada grupo presente el caso de su tarjeta, si aprobasen la edición del genoma de aquel individuo y que defiendan la posición ética del grupo, si es que han llegado a un consenso. Mientras los grupos van presentando se recomienda que el alumnado llene la siguiente tabla:

Utilizando la siguiente tabla⁹ para clasificar cada uno de los casos que se exponen. Puntúa de 1 a 4 cada categoría (donde 1 equivale a "genes", 2 equivale a "poco", 3 equivale a "bastante" y 4 equivale a "mucho").

<i>Caso clínico</i>	Seguridad	Importancia del mal a evitar	Impacto futuras generaciones	Consecuencias sociales	Puntuación final

También os proponemos ver alguna de estas películas o documentales sobre la edición genética.

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



Una vez explicados los diferentes casos y el punto de vista de cada grupo el/la docente pide:

- ¿En cada caso, la persona que recibirá el tratamiento o los "beneficios del mismo" puede expresar su opinión y dar su consentimiento?
- ¿Dónde marcaríamos el límite de qué ediciones aprobamos y cuáles no?
- ¿Crees que sólo la comunidad científica debería participar en este debate o también la sociedad en general?
- ¿Qué ventajas e inconvenientes puede tener que empresas comercialicen este tipo de servicios?
- ¿Qué riesgos veis en que se modifique el genoma humano con intención de "mejorar" la especie?

Algunos especialistas⁹ han distinguido los siguientes grupos de cuestiones éticas que te pueden ayudar a mencionar cuestiones éticas que aún no hayan salido al debate:

Seguridad y eficacia	Hay que mejorar los conocimientos de epigenética para determinar y prever los efectos fenotípicos de la edición genética.
Uso y tipo de células	<p>Células somáticas y células embrionarias (la mayoría): sólo afecta al individuo, no a su descendencia. Las cuestiones éticas tienen que ver con la relación entre el riesgo y el beneficio y el consentimiento.</p> <p>Células germinales: pueden generar modificaciones en la descendencia (prohibido en Europa) y plantea el uso de embriones en investigación científica que ya plantea problemas éticos por su cuenta. Además, implicaría la monitorización, de por vida, de los individuos resultantes y no contaría con su consentimiento y la decisión tomada por sus padres podría afectar a su autonomía.</p>
Finalidad	Se han definido dos razones principales: terapia, tratamiento o prevención de una enfermedad concreta, o mejora genética, modificar una característica (o varias características) de un individuo (o especie) que no está (o están) enfermos. Esta segunda razón podría conducir a que el individuo tenga menos importancia que ciertas características físicas y cognitivas. Esto plantea ciertas preguntas: ¿Qué enfermedades deben erradicarse o prevenirse? ¿Se deben erradicar todas las discapacidades? ¿Qué es una enfermedad? ¿Es bueno ética y socialmente erradicar todo aquello que se juzga como "defectuoso" (o cualquier característica que se considere así)?

Accesibilidad y justicia El coste financiero de la terapia es un factor clave cuando se plantea la cuestión de la justicia. La comercialización de una terapia costosa podría agravar de manera significativa las desigualdades existentes en los sistemas sanitarios, tanto en los países pobres como ricos. Por ejemplo, los países con sistema sanitario público podrían suponer un encarecimiento de la sanidad y amenazar la sostenibilidad del mismo. Una alteración genética de la línea germinal podría generar desigualdades excesivas entre diferentes individuos, comunidades y sociedades.

4. Taller práctico: uso de CRISPR per tratar la atrofia muscular espinal

El taller práctico lo centraremos en uno de los casos que hemos debatido previamente, el caso de [Zac Cameron](#), un niño de tres años con atrofia muscular espinal.

Atrofia Muscular Espinal (AME)

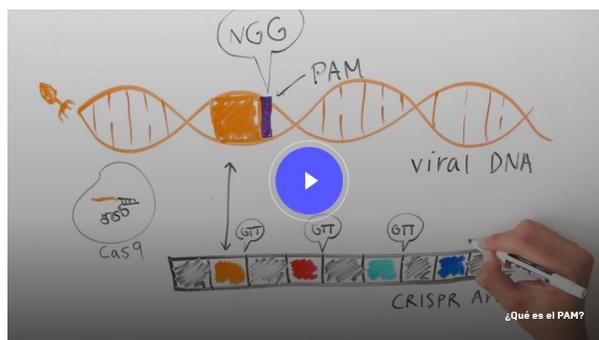
La Atrofia Muscular Espinal (AME) es un grupo de enfermedades musculares hereditarias que causan degeneración y debilidad muscular progresiva¹⁰. Es causada por la pérdida de células nerviosas especializadas, las neuronas motoras, que se encargan de coordinar y enviar los estímulos al músculo para hacer posible el movimiento. Así, las personas que padecen estas enfermedades tienen dificultades para gatear, caminar, sentarse, controlar los movimientos de la cabeza y, en casos severos, los músculos para respirar y tragar.

La principal causa de AME es la ausencia del gen *Survival Motor Neuron 1 (SMN1)*. Cuantas menos copias de este gen se tengan más severa será la enfermedad. Por suerte, se ha encontrado una posible manera de tratar la AME: existe un gen muy similar el *SMN2*. Este gen podría compensar la falta de *SMN1* y realizar sus funciones, pero hay un exón, una pieza del gen, que de manera natural no se traduce en la proteína *SMN2* y eso impide que actúe como *SMN1*.

Uso de CRISPR para tratar la AME

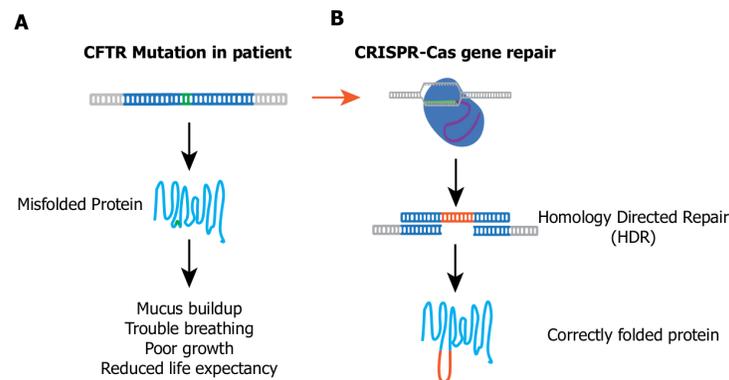
Lo que haremos en esta práctica es forzar la inclusión del exón 7 de *SMN2* en el ARN que se traducirá en proteína, permitiendo así su función y recuperando la movilidad de los pacientes. Para conseguirlo utilizaremos CRISPR para modificar la secuencia y facilitar su inclusión.

A partir de muestras del paciente, pediremos a un laboratorio externo que realicen la modificación con la técnica CRISPR. El laboratorio nos proporcionará diferentes muestras que corresponden a modificaciones del ADN del paciente que se han creado utilizando diferentes secuencias.



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

Después, en nuestro laboratorio estudiaremos el resultado de la transfección de CRISPR con varias secuencias que nos han proporcionado: comprobaremos la efectividad del tratamiento con CRISPR mirando si se ha producido el corte deseado en la secuencia diana, mediante una técnica llamada electroforesis en gel de agarosa.



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

El contenido de este taller experimental se ha creado en base al material proporcionado en el [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Electroforesis en gel de agarosa¹¹

En este módulo, utilizaréis la electroforesis en gel para analizar la eficacia de 5 gRNA diferentes que se han diseñado. Se obtuvo el ADN del paciente y se amplificó un segmento de **4.300 pb** mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación, el ADN amplificado se mezcla con la proteína Cas9 y una de las 5 soluciones de gRNA. Si el gRNA puede dirigirse con éxito al gen *SMN2*, será cortado por la enzima Cas9, y mediante la electroforesis en hielo, se deberían poder ver dos bandas diferentes (si no corta, en cambio, sólo veremos una).

Preparación del gel de agarosa

1. DILUYE el **tampón de electroforesis** concentrado 50X con agua destilada (queremos conseguir una concentración final 1X).

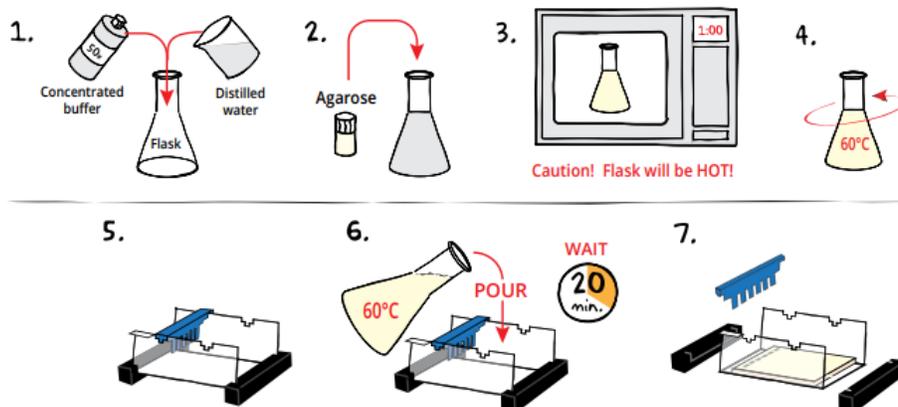
Volumen total (ml)	Tampón concentrado 50X (ml)	Agua destilada (ml)
150 ml	3 ml	147 ml

¹¹ Fuente: https://transferencia.fundacionrecerca.cat/docs/Guion_docente_Fibrosis_Quistica.pdf

2. Para obtener **gel de agarosa al 0.8%** (0,8 g/100ml), MEZCLA el polvo de agarosa con la solución de tampón de electroforesis en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml.

Tampón de electroforesis 50X (ml)	Agua destilada (ml)	Masa de agarosa (g)	Volum en TOTAL (ml)
0,9 ml	44,1 ml	0,36 g	45 ml

3. DISUELVE el polvo de agarosa calentando la solución al microondas a potencia máxima durante 1 minuto. Con cuidado, SACA el matraz de Erlenmeyer del microondas y agítalo. Continúa CALENTANDO a solución en intervalos de 15 segundos hasta que la agarosa esté completamente disuelta (la solución debe ser clara como el agua).
4. ENFRÍA la agarosa revoloteando con cuidado para disipar el calor uniformemente.
5. Mientras la agarosa se enfría, CIERRA bien los extremos de la bandeja para colocar el gel con las cajas de coma. COLOCA la pinta con 6 pozos en el lugar adecuado.
6. VACÍA la solución de agarosa enfriada en la bandeja preparada para colocar el hielo. El hielo se endurecerá completamente a los 20 minutos, y se volverá menos transparente a medida que se solidifique.
7. Con mucho cuidado, SACA el peine de los pocillos y los extremos de gel.



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

Correr el gel

8. COLOCA el hielo (aún en la bandeja) dentro de la cámara de electroforesis. CUBRE el hielo con Tampón de Electroforesis 1X, asegúrate de que esté completamente sumergido.

Volumen total (ml)	Tampón concentrado 50X (ml)	Agua destilada (ml)
1.000 ml		

Recordatorio: Antes de cargar las muestras, asegúrate de que está bien orientado dentro del aparato.

9. Tras poner una punta en la pipeta, coge toda la muestra (35 μ L) del QuickStrip™, y CARGARLA en el pocillo en el orden indicado a continuación:

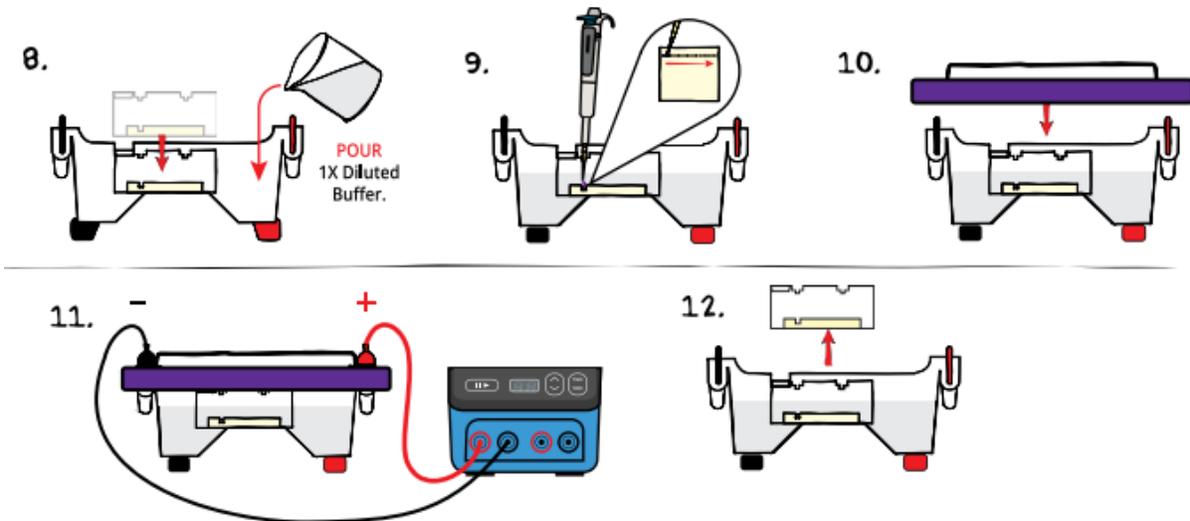
Carril 1	Tubo A	Marcador de peso molecular
Carril 2	Tubo B	gRNA #1
Carril 3	Tubo C	gRNA #2
Carril 4	Tubo D	gRNA #3
Carril 5	Tubo E	gRNA#4
Carril 6	Tubo F	gRNA #5

10. COLOCA la cubierta de seguridad en la unidad y COMPRUEBA que el gel esté orientado correctamente.
11. CONECTA los cables a la fuente de alimentación para que comience la electroforesis y hasta que el frente (colorante de seguimiento) migre al menos 30 cm desde los pocillos.

VOLTAJE: 150V | TIEMPO: ~ 20/30 minutos

RECORDATORIO: Las muestras de ADN migrarán hacia el electrodo positivo (rojo).

12. Una vez haya finalizado la electroforesis, SACA el gel y la bandeja de colocación de la electroforesis de la cámara.



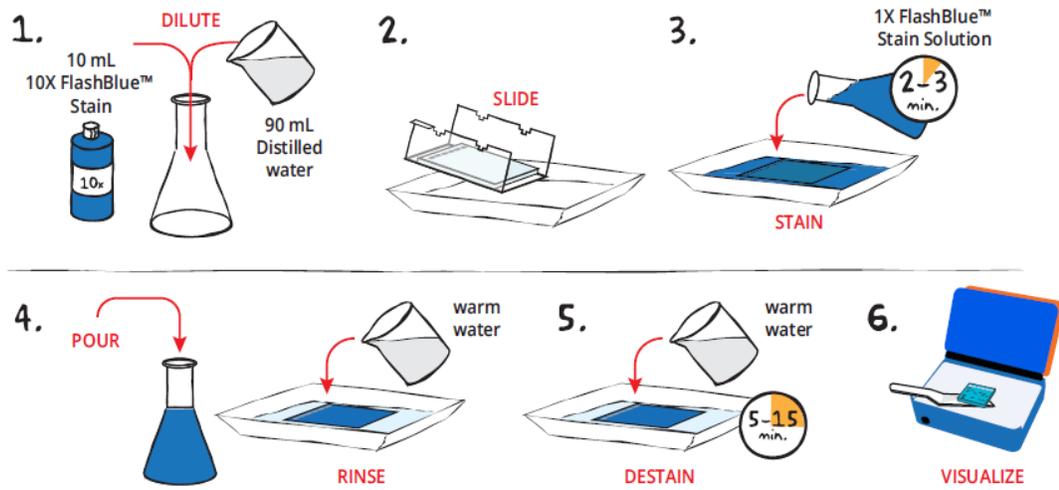
Fuente: [KIT Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis \(Edvo-Kit#135\), from EDVOTEK](#)

Tinción de los geles de agarosa con FlashBlue™

1. DILUYE 10 ml de FlashBlue™ concentrado 10X con 90 ml de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer para alcanzar FlashBlue™ a una concentración final 1X.
2. Saca el gel fuera de la bandeja y colócalo en una bandeja pequeña y limpia para teñir geles.
3. CUBRE el gel con la solución de tinción FlashBlue™ 1X, durante 2-3 minutos.
4. CUBRE el gel con agua caliente (40-45 °C), LAVALO suavemente durante 20-30 segundos. Después, VACÍA el agua sucia.
5. CUBRE el gel con agua caliente (40-45 °C). DESTIÑE durante 5-15 minutos con agitación suave. Las bandas de ADN empezarán a aparecer después de 5 minutos de desteñir.

NOTA: Cambiar el agua frecuentemente acelerará su almacenamiento.

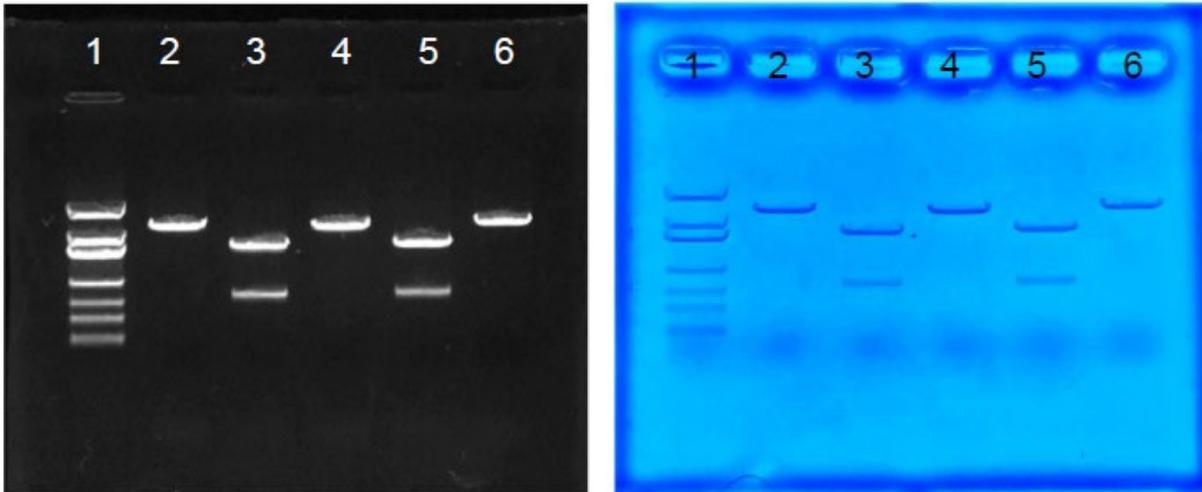
6. SACA con cuidado el gel líquido de desteñir. VISUALIZA los resultados utilizando un sistema con luz blanca. El ADN aparecerá como bandas azules oscuras sobre un fondo azul.



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

5. Resultados, análisis y conclusiones¹²

A continuación, completa el esquema del gel de electroforesis con los resultados observados:

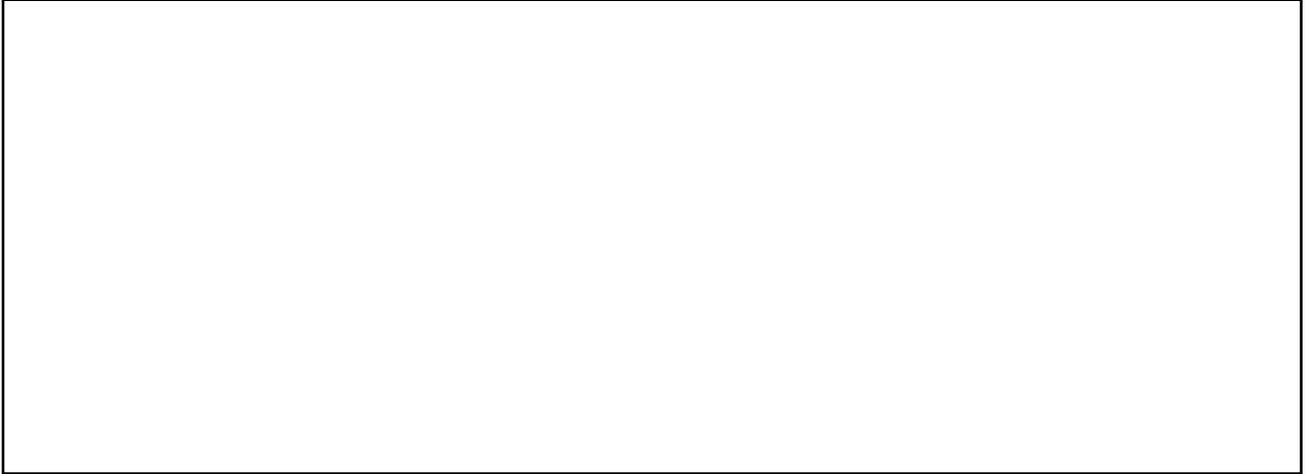


Los carris 3 y 5 muestran dos bandas, lo que resulta indicativo de que el ADN ha sido digerido.

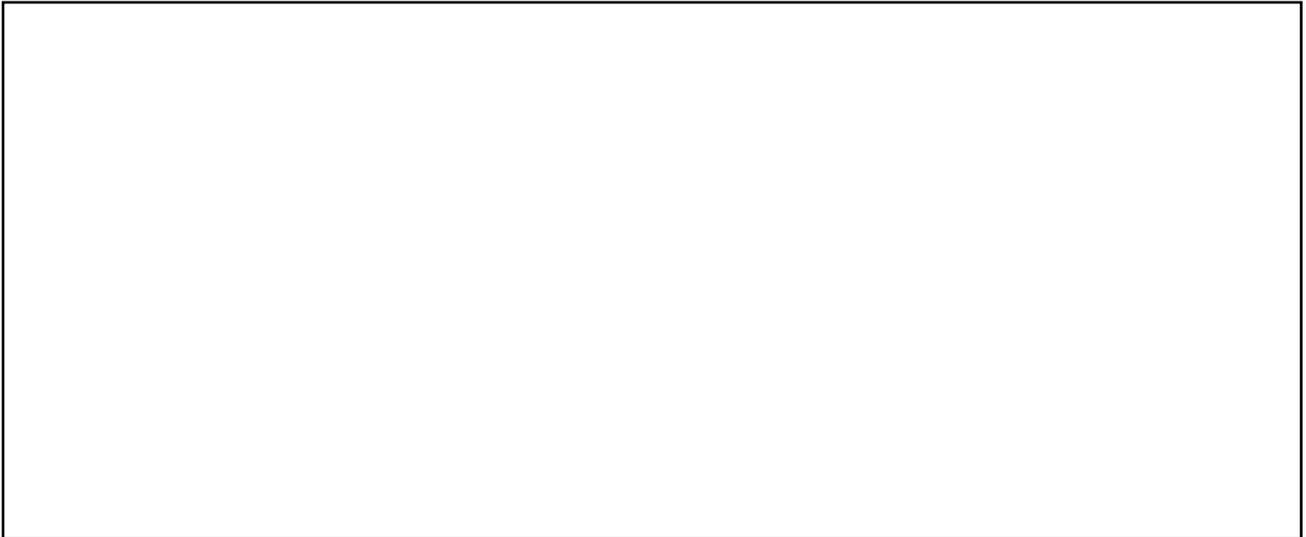
Carril	Muestra + gRNA	Resultado	Peso molecular (bp)
1	Marcador de peso molecular	----	----
2	gRNA #1	No ha cortado	4.300 pb
3	gRNA #2	Ha cortado	3.000 pb/1.300 pb
4	gRNA #3	No ha cortado	4.300 pb
5	gRNA #4	Ha cortado	3.000 pb/1.300 pb
6	gRNA #5	No ha cortado	4.300 pb

¹² Fuente: https://transferencia.fundaciorecerca.cat/docs/Guion_docente_Fibrosis_Quistica.pdf

- En función de estos resultados, ¿cuáles son los mejores candidatos de gRNA para dirigirse a la región del gen *SMN2* del paciente?

A large, empty rectangular box with a black border, intended for the user to provide an answer to the question above.

- ¿Cuál sería el siguiente paso a realizar por parte de los médicos y/o de las médicas?

A large, empty rectangular box with a black border, intended for the user to provide an answer to the question above.