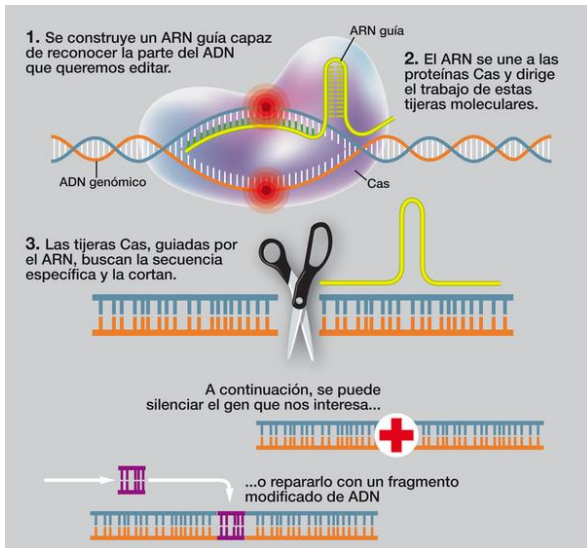


# Caracterización de clones positivos/negativos mediante Electroforesis Capilar de Alta Resolución para *CRISPR-Cas9*



## Introducción

La tecnología CRISPR/Cas9 es una herramienta molecular utilizada para “editar” o “corregir” el genoma de cualquier célula. Eso incluye, claro está, a las células humanas. Sería algo así como unas tijeras moleculares que son capaces de cortar cualquier molécula de ADN haciéndolo además de una manera muy precisa y totalmente controlada. Esa capacidad de cortar el ADN es lo que permite modificar su secuencia, eliminando o insertando nuevo ADN.



Las siglas CRISPR/Cas9 provienen de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, en español “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaaciadas.” La segunda es el nombre de una serie de proteínas, principalmente unas nucleasas, que las llamaron así por CRISPR associated system (es decir: «sistema asociado a CRISPR»).

CRISPR es una técnica de ingeniería genómica que utiliza proteínas para interactuar con el ADN. CRISPR normalmente utiliza una versión de la nucleasa Cas9 para cortar la doble cadena ADN en un punto específico del genoma, después del cual la maquinaria endógena reparará la rotura.

Bajo las circunstancias adecuadas, se puede hacer que la célula incorpore una secuencia de ADN donante en el sitio de rotura, permitiendo la inserción, modificación o eliminación de genes. CRISPR-Cas9 va dirigida a una ubicación genética específica determinada por un ARN homólogo (denominada ARN guía o ARNg).

A diferencia de la edición con TALENs (nucleasas efectoras tipo de activador de transcripción) o ZFNs (nucleasas dedos de Zinc), que utilizan un gRNA, significa que no se requiere una ingeniería de proteínas elaborada para lograr la especificidad de secuencia, y así es más fácil y más rápido.

## Caracterización de Clones positivos en *Crísp-Cas9*

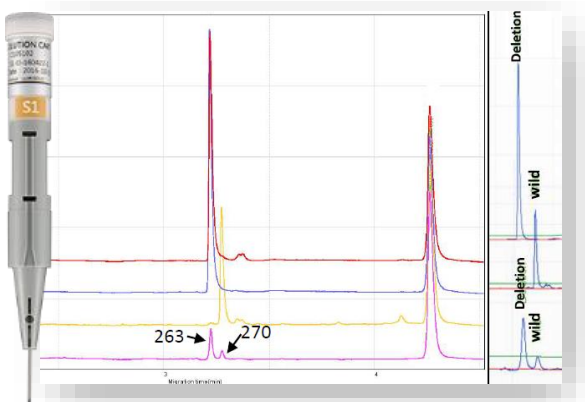
En el flujo de trabajo CRISPR, la clave más importante es la caracterización de clones positivos, mientras que los métodos de selección y el control de calidad del reactivo a menudo se pasan por alto.

Para caracterizar las líneas modificadas CRISPR se requiere secuenciación de Sanger o secuenciación masiva (NGS). La secuenciación **no es eficiente** como método de detección debido al coste, necesidad de recursos y tiempo.

El bioanizador automatizado de la serie Qsep proporciona detección de alta resolución en la aplicación CRISPR QC, que es de suma importancia para lograr resultados satisfactorios.

## CRISPR QC: Aplicación de Alta Resolución

- ◀ Heterocigotos con dificultad para definir por secuenciación
- ◀ La figura a la izquierda muestra un fragmento de gene *Knock Out* de 7 bp



## Aplicaciones

Cuando la comunidad científica se dio cuenta del potencial de CRISPR, el campo de la ingeniería genómica creció rápidamente. Desde entonces, CRISPR ha sido utilizado en una amplia gama de células y organismos, incluidas plantas, hongos, y mamíferos.

Esta tecnología se está utilizando para manipular genes en diferentes formas, alterando sus secuencias de nucleótidos o cambiando su expresión.

Algunos ejemplos de aplicaciones:

- KNOCK-OUTS
- KNOCK-INS
- CRISPRinterference (CRISPRi)
- CRISPRactivation (CRISPRa)
- CRISPR screening
- Anti-CRISPR
- Visualización de genes...

## Resumen

El sistema bioanalizador **Qsep** es una plataforma de alta calidad útil para el trabajo con CRISPR, ya que provee una solución simple para monitorizar la inserción/delección de los fragmentos de interés y su caracterización.

Con el cartucho de gel listo para usar, los usuarios pueden preparar el instrumento en 1 minuto, y obtener resultados entre 3-5 minutos. Los resultados se pueden imprimir en batch o individualmente con información detallada de cada experimento.



## Características del sistema

- Manejo de muestras automatizado
- Capacidad para procesar 96 pocillos
- Cartucho desechable. No requiere preparación de geles. Marcado con RFID para 100-300 runs.
- Análisis rápido: 2-7 minutos mediante electroforesis
- Sensibilidad de la detección: Detecta hasta 0,1 ng/ul
- Resolución: 1-4 bp DNA (fragmentos de 100-500 bp)
- Formato de los datos. Electroferograma y formato de imagen del gel.
- Software: Datos digitales para análisis cualitativo y cuantitativo.
- Diseño compacto
- Coste competitivo para el sistema y el consumible.



**Qsep1**

1-8 muestras  
5 min  
Monocanal

**Qsep100**

1-96 muestras  
5 horas  
Monocanal



**Qsep400**

1-96 muestras  
1,5 horas  
Multicanal



## Referencias

1. Michael A. Quail et al. A Large genome centres improvements to the Illumina sequencing system. Nat Methods 5, 1005-1010 (2008).
2. Michael L. Metzker. Sequencing technologies-the next generation. Nat Rev Genetics 11, 31-46 (2010).
3. Desai AN and Jere A. Next generations sequencing: ready for the clinics? Clin Genetics 81, 503-510 (2012).