



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

Protocolo Experimental

Edición genómica en levadura por CRISPR/Cas9

Material por equipo

1) Cas9 y gRNAs.

Cada equipo recibirá dos plasmidos de DNA, los cuales albergan la secuencia de DNA para la expresión de Cas9 en levadura y la secuencia para la transcripción del RNA guía (hay 4 versiones). Estos plasmidos tienen resistencia para penicilina en bacteria y contienen el gen de selección URA para levadura.

Equipo 1: pG1+ pEmpty_Control

Equipo 2: pG2+ pEmpty_Control

Equipo 3: pG3+ pEmpty_Control

Equipo 4: pG4+ pEmpty_Control

Para una transformación se necesita de 1500 ng a 2000 ng de DNA plasmidico

2) Donador DNA

Para preparar el DNA donador, se utilizan los oligos: **Fw_donador_ADE2** y **Rv_donadorADE2**. Estos oligos tienen un tamaño de 60 mers y se sobrelapan entre ellos en la región 3' en 21 nucleótidos complementarios, lo que genera un producto de 129 bp cuando se extienden por una polimerasa (reacción de PCR). *Se necesitan 1500 ng del DNA donador.*

Cada equipo recibirá 1 tubo con el DNA donador listo para usarse

3) Celulas de levadura competentes

- 3 alícuotas de 100 µL de células competentes por equipo (mantener a -80°C hasta su uso)

4) Reactivos para transformar levadura

- 1.5 mL de 50% PEG MW 3350 (esterilizado por autoclave)

- 150 uL de 1M LiOac (esterilizado por autoclave)
- 50 uL de 10 mg/mL Salmon Sperm DNA
- 70 uL de DMSO
- 3 placas de SD-URA

Transformación de Levadura a partir de células competentes congeladas (frozen cells)

Para 1 transformación se necesita preparar 360 uL de **Transformation Master Mix**, la cual se prepara a partir de 296 uL de PLM + 64 uL de DSM.

PEG-Litio mix (PLM).

260 uL de 50% PEG MW 3350

36 uL de 1M LiOac

DNA-Sperm Mix (DSM)

10 uL de 10 mg/mL Salmon Sperm DNA ^{Nota1}

54 uL Plásmido + Donor DNA ^{Nota 2}

- 1) Etiquete 4 tubos de la siguiente manera:
 - a) PC (pEmpty Control)
 - b) pG (plasmido pG)
 - c) pGD (plasmido pG + DNA donador)
 - d) PLM (PEG-Litio mix)

- 2) Prepare la mezcla de **PEG-Litio Mix (PLM)** suficiente para 4 reacciones .
 - a) Al tubo etiquetado como PLM agregue 1040 uL de 50%PEG + 144 uL de 1M LiOac.
 - b) Mezcle con vortex y mantenga el tubo a temperatura ambiente.

- 3) Prepare la mezcla **de DNA-Sperm Mix (DSM)** para 3 diferentes condiciones como se indica en la siguiente tabla. ****Si necesita ayuda para llenar la tabla consulte el ejemplo en la parte final de este protocolo****

Tubo	pEmptyControl	Plasmido PG	DNA Donador	Salmon Sperm DNA (uL)	Agua MQ (uL)
PC	1500-2000 ng	0	0	10	c.b.p. 64 uL
PG	0	1500-2000 ng	0	10	c.b.p. 64 uL
PGD	0	1500-2000 ng	1500 ng	10	c.b.p. 64 uL

**Note que el volumen total de DNA (sin incluir el Salmon Sperm DNA) puede ser hasta 54 uL*

Mezcle con vortex y mantenga el tubo a temperatura ambiente.

- 4) A cada uno de los 3 tubos que contienen la **mezcla DSM** (preparados en el punto 3) agregue **296 uL de la mezcla PLM** que preparó en el punto 2. Mezcle en vortex y mantenga el tubo a temperatura ambiente. Estos tubos ahora continenen el **Transformation Master Mix**, cuyo volumen en cada tubo es de 360 uL.
- 5) Una vez listos los tubos los 3 tubos con el transformation master mix, proceda a descongerlar 3 alicuotas de **100 uL** de celulas competentes en un baño maria a 37°C por 15-30 s.
- 6) Centrifugar las celulas a 4000 rpm en una microcentrifuga por 2 minutos. Remueva el sobrenadante.
- 7) Resuspenda cada pellet con 360 uL de la mezcla de transformacion correspondiente.
- 8) Incubar cada tubo a 30°C por 45 min (sin agitacion) en un **baño de agua** y mezclar en vortex cada 10 min.
- 9) Añada a cada tubo 20 uL de DMSO, y de un choque termico a 42°C por 15 min en BAÑO de agua.
- 10) Centrifuge 2 min a 4000 rpm en una centrifuga de mesa.
- 11) Remueva el sobrenadante y resuspenda cada pellet en 100 uL de agua esteril desionizada.
- 12) Plaquear los 100 uL en una caja (**SD-URA plates**) ^{Nota 3}

13) Incubar las 3 placas de 3 a 4 días a 30°C.

Notas

1. Antes de mezclar con el DNA plasmídico y el DNA donador. Hervir en heatblock el stock de 10 mg/mL Salmon Sperm DNA por 5 min. Posteriormente, enfriar 3 min en hielo.
2. Usar de 1500 -2000 ng de plásmido y 1500 ng de DNA donador por transformación. Completar con agua MQ en caso de ser necesario, para tener un volumen de **54uL** de la mezcla de plasmido + DNA donador.
3. Recuerde que las placas de SD-URA NO deben contener Adenina hemisulfato.

Ejemplo para preparar la mezcla DSM.

Suponiendo que le fue entregado el siguiente material a la concentracion indicada:

pEmptyControl [485 ng/uL]

Plasmido PG [370 ng/uL]

DNA Donador [300 ng/uL]

Para tener el volumen equivalente de 1500 a 2000 ng de pEmpty control debera agregar al tubo correspondiente un volumen de 4 uL del pEmptyControl [485 ng/uL] lo que equivale a 1940 ng.

Para tener el volumen equivalente de 1500 a 2000 ng del plasmido PG debera agregar al tubo correspondiente un volumen de 5 uL del plasmido pG [370 ng/uL] lo que equivale a 1850ng.

Para tener el volumen equivalente de 1500 ng de DNA donador debera agregar al tubo correspondiente un volumen de 5 uL del plasmido pG [300 ng/uL] lo que equivale a 1500ng.

Por lo tanto la tabla debera llenarse de la siguiente manera:

Tubo	pEmtyControl (uL)	Plasmido PG (uL)	DNA Donador (uL)	Salmon Sperm DNA (uL)	Agua MQ (uL)
PC	4	0	0	10	50 uL
PG	0	5	0	10	49 uL
PGD	0	5	5	10	44 uL

Notese que el volumen final en todos los casos debe ser de 64 uL.

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 Transferancia 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-García.
- Se agradece la donación de la cepa BY4741 a la **Dra. Soledad Funes**, investigadora del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.