



FUNDAMENTOS Y APLICACIONES DE CRISPR-CAS EN PLANTAS

Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Iguá 4225 esq. Mataojo, Tel: 25258618 ext 7232.



Fecha: 27 de noviembre al 5 de diciembre de 2023.

Coordinadoras:

Sabina Vidal (svidal@fcien.edu.uy); Alexandra Castro (acastro@fcien.edu.uy).

Docentes:

Alexandra Castro, Sabina Vidal, Luciana Fleitas, Claudia Deluca

Carga horaria: 33,5 h (11,5 h teóricos y 16,6 h prácticos, 2,5 h talleres, 3 h seminarios)

Créditos: 4

Lugar: Facultad de Ciencias.

Modalidad: presencial

Público objetivo:

El curso está dirigido a estudiantes del Posgrado en Biotecnología o en Ciencias Biológicas de PEDECIBA, así como otros Posgrados.

Objetivos del curso:

El curso busca aportar las herramientas conceptuales y metodológicas para comprender y promover el uso del sistema CRISPR/Cas9 para la investigación y sus aplicaciones en el campo de la biología vegetal y agrobiotecnología.

Al finalizar el curso, los estudiantes deberán:

- conocer los fundamentos básicos, el mecanismo de acción, el potencial y las limitaciones de la edición genómica usando CRISPR/Cas9.
- ser capaces de diseñar los distintos componentes específicos de CRISPR/Cas9 e incorporar su uso en proyectos de investigación.
- ser capaces de analizar los resultados obtenidos mediante la tecnología CRISPR/Cas9.
- estar capacitados para comprender y adaptar próximos desarrollos en el campo de la edición genómica.

Contenido teórico:

Fundamentos básicos de la edición genómica.

- La edición genómica en el contexto del mejoramiento genético de las plantas y la investigación.
- Bases moleculares de la edición genómica.

- Mecanismos de reparación del ADN en plantas.
- Sistemas de edición genómica: ZFN, TALEN y CRISPR-Cas.
- CRISPR-Cas9: origen, función en la inmunidad adaptativa de procariontes, historia de la tecnología y usos.
- Manipulación de CRISPR-Cas para edición génica: diseño de sgRNAs y construcciones génicas para expresión del sistema en células vegetales.
- Edición génica libre de ADN.

Versatilidad del sistema CRISPR-Cas.

- Variantes naturales y sintéticas de sistemas CRISPR-Cas y sus aplicaciones.
- Base editing, prime editing, regulación transcripcional y epigenética.
- Edición genómica basada en recombinación homóloga: fundamentos, diseño de construcciones y estrategias para mejorar la eficiencia.

Desarrollos nacionales basados en edición génica:

- Mejoramiento de la calidad en pasturas
- Mejoramiento de la calidad en tomate
- Mejoramiento de la tolerancia al déficit hídrico y de la calidad de grano en soja.

Talleres:

Estrategias para la expresión de CRISPR-Cas en plantas.

- Diseño de construcciones génicas para expresión del sistema CRISPR-Cas9.
- Diseño de sgRNAs.

Detección eficiente de mutaciones en sitios blanco y no blanco.

- Estrategias para el genotipado de eventos editados.
- Programas para el análisis de secuencias editadas.

Contenido práctico:

- Producción y purificación de Cas9-GFP
- Síntesis de sgRNAs por transcripción *in vitro*. Purificación de sgRNAs
- Ensamblado de RNPs (Cas9-GFP/sgRNAs)
- Análisis de la actividad de los complejos RNPs *in vitro* mediante corte sobre ADN blanco.
- Análisis de la actividad de los complejos de RNPs *in vivo*: preparación de protoplastos de *P. patens* (OE GFP), transfección de protoplastos con RNPs, visualización de protoplastos editados.

Inscripción:

Las inscripciones se realizan a través de la página web de bedelía de la Facultad de Ciencias o enviando un mail de interés a las coordinadoras del curso. En el mail se debe explicitar el programa de estudios al que pertenece.

Modalidad de aprobación:

La ganancia del curso se obtiene con el 80 % de asistencia a los prácticos y la presentación de un seminario.

La aprobación del curso se obtiene por la presentación de un examen individual.

Calendario:

Lunes 27/11 Salón 109

13:30-15:30: Fundamentos de CRISPR-Cas (teórico).

15:45-16:30: Introducción a las actividades prácticas (teórico-práctico).

16:30-18:30: Diseño de ARNs guía (teórico-práctico).

Martes 28/11 Salón 308

13:30-14:30: Sistemas de expresión del sistema CRISPR/Cas (teórico)

14:30-18:30: Purificación de Cas9 por Cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) (práctico).

Miércoles 29/11: Salón 308

13:30-15:30: Versatilidad del sistema CRISPR-Cas: distintos sistemas y aplicaciones (teórico).

15:30-18:30: Síntesis de ARN guía mediante transcripción in vitro. Purificación de gARNs. Producción de protoplastos (práctico). Edición génica en raíces peludas (*hairy roots*), sistema transitorio.

Jueves: 30/11: Salón 308

13:30-18:30: Ensamblado de ribonucleoproteínas. Ensayo in vitro de actividad de ARNs guía. Transformación de protoplastos con ribonucleoproteínas (práctico).

Viernes 1/12: Salón 109

14:30-15:30: Visualización y conteo de protoplastos editados (práctico)

15:45-18:00: Genotipado de eventos editados (teórico-práctico)

18:00-18:30: Discusión de resultados (teórico-práctico).

Lunes 4/12 (virtual)

13:30-14:30: Edición génica de tomate para mejoramiento de calidad (teórico)

15:00-16:30: Edición génica en soja para calidad y tolerancia a sequía (teórico)

17:30-18:30: Edición génica en *Paspalum* (teórico).

Martes 5/12 (virtual y presencial) Salón 209

13:30-16:30: Presentación de seminarios.

16:30-17:30: Cierre