

MANUAL de MÓDULO II BIOINGENIERÍA MOLECULAR y CELULAR

En este módulo práctico se abordarán distintas metodologías que forman parte de una estrategia de edición genómica basada en el sistema CRISPR-Cas9. A lo largo del módulo se utilizarán los distintos componentes recombinantes del sistema para diseñar, generar y evaluar herramientas de edición genómica. Como modelo experimental se utilizará una línea celular humana inmortalizada que expresa de forma estable la proteína fluorescente **mCherry**. Durante el práctico se generarán mutantes de pérdida de función de la proteína fluorescente **mCherry**. La disrupción de este gen produce la pérdida de fluorescencia roja, lo que permite su detección mediante microscopía óptica y/o citometría de flujo.

Cronograma de actividades organizado en cuatro secciones:

- I. **Herramientas de análisis y diseño de ácidos nucleicos para la edición mediante CRISPR-Cas9**
- II. Síntesis, análisis y purificación de ácidos nucleicos
- III. Expresión, purificación y análisis de proteínas recombinantes
- IV. Evaluación de actividad de nucleasa *in vitro* y edición genómica en células

Objetivos de la Sección I

- Diseñar ARN guía (sgRNA) para edición genómica.
- Evaluar eficiencia y especificidad de sgRNA utilizando herramientas bioinformáticas.
- Diseñar oligonucleótidos para generar moldes de transcripción *in vitro*.
- Diseñar *primers* para evaluar eventos de edición.
- Diseñar oligonucleótidos donantes (*donor*) para edición dirigida mediante HDR.

Sección I

Herramientas de análisis y diseño de ácidos nucleicos para la edición mediante CRISPR-Cas9.

CRISPR-Cas9 es un sistema de defensa bacteriano adaptado para la edición genómica. En su versión utilizada en biotecnología, el sistema consta principalmente de:

- una proteína nucleasa Cas9
- un ARN guía (sgRNA) que dirige la nucleasa hacia el ADN objetivo

Cuando el complejo Cas9-sgRNA reconoce una secuencia complementaria en el ADN, la nucleasa genera un corte de doble hebra (*Double Strand Break*, DSB). La reparación de este corte por los mecanismos celulares permite introducir mutaciones o modificaciones específicas en el genoma.

La edición del genoma basada en CRISPR/Cas en cualquier aplicación biológica requiere la identificación y evaluación de sitios blanco genómicos adecuados. Entre las principales consideraciones para el diseño de un ARN guía (**sgRNA**) se incluyen la evaluación de posibles sitios de edición fuera del blanco deseado (*off-target*), la predicción de la eficiencia de reconocimiento del sitio blanco (*on-target*) y el tipo de mutación/cambio que se busca generar. El diseño manual de sgRNAs considerando simultáneamente todos estos parámetros resulta bastante complejo. Por este motivo se han desarrollado herramientas computacionales que automatizan este proceso y permiten diseñar sgRNAs. Esto se puede hacer para regiones específicas o hasta bibliotecas a escala de genoma completo. Estas herramientas facilitan las distintas etapas del proceso de diseño.

En este práctico realizaremos el paso a paso para el diseño de sgRNAs utilizando la herramienta web CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), ampliamente utilizada para el diseño de sgRNAs individuales. Adicionalmente, el sitio CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/>) ofrece múltiples herramientas complementarias para el diseño y la evaluación de sgRNAs.

En la **Sección 1** del práctico realizaremos el diseño de sgRNAs capaces de dirigir un corte de doble hebra (en inglés, *double-strand break*, DSB) en las regiones de interés de los genes seleccionados.

Materiales:

- Computadora con conexión a Internet.
- Programas de edición de ácidos nucleicos: ApE (A plasmid Editor) o Serial Cloner (ambos de uso libre)
- Navegador web (por ejemplo: Chrome, Firefox, etc).
- Editor de texto (por ejemplo: Notepad++).

Parte 1

El diseño de ARN guía (sgRNAs) se realizará utilizando la plataforma web CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>, Concordet & Haeussler, 2018). CRISPOR es una herramienta que asiste en el diseño de estrategias de edición mediante CRISPR-Cas, evaluando posibles sgRNAs capaces de dirigir un corte en el ADN en un gen o región genómica de interés.

El software identifica regiones candidatas para el diseño de sgRNAs en función de la presencia de secuencias PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) reconocidas específicamente por la nucleasa Cas9 seleccionada. Las nucleasas Cas9 requieren la presencia de una secuencia corta denominada PAM

(Protospacer Adjacent Motif) inmediatamente adyacente al sitio de reconocimiento del sgRNA. La secuencia PAM depende de la variante de Cas9 utilizada.

En el navegador web de su preferencia, dirigirse al sitio:

<http://crispor.tefor.net/>



CRISPOR (citation) is a program that helps design, evaluate and clone guide sequences for the CRISPR/Cas9 system. [CRISPOR Manual](#)
Mar 2026: Hopefully better reliability and speed. Many new features will be coming soon. [Full list of changes](#)

Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use [CRISPOR Batch](#)

Sequence name (optional):

Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon

[Clear Box](#) - [Reset to default](#)

```
cttcctttgtcccaatctggcgcgccgcccctggcgccctaggactggcgcgccgaagtggccagggc
ggggcgacccgactcggctcacagcgccggcgtattctgcagctcaccatggATGATGATATCGCCGCTCGTCGTCG
ACAAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTTCGGGGCAGACGATGCCCCGGCCGCTCTCCCTCCATCGTGGGGCG
CC
```

Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.
Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

Step 2

Select a genome

Homo sapiens - Human - UCSC Feb. 2009 (GRCh37/hg19) + SNPs: 1000Genomes, ExAC

Note: pre-calculated exonic guides for this species are on the [UCSC Genome Browser](#).
We have 1456 genomes, but not yours? Search [NCBI assembly](#) and send a GCF/_GCA_ ID to [CRISPOR support](#).

Step 3

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

20bp-NGG - Sp Cas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1

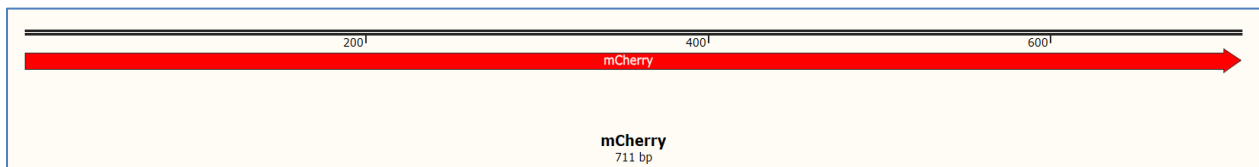
See [notes on enzymes](#) in the manual.

SUBMIT

Version 5.2 - [Documentation](#) - [Contact us](#) - [Downloads/local installation](#) - [Citation](#) - [License](#)

Figura 1. Portada de la página web del programa CRISPOR.

1. Ingresar en el programa *CRISPOR* la secuencia de ADN que se desea editar (ver recuadro **STEP1**, Figura 1). En este caso: la secuencia de interés para realiza el diseño de sgRNAs ingresar la secuencia de ADN correspondiente al gen mCherry (711 nt) que no está presente en el genoma humano.



2. Seleccionar el genoma del organismo en el cual se realizará la edición Homo sapiens (ver recuadro **STEP2**, Figura 1). Este paso es fundamental ya que permite evaluar posibles *off-targets* en el genoma humano (sitios de edición no deseados).
3. Seleccionar la nucleasa que se va a utilizar y por lo tanto, la correspondiente secuencia PAM de la proteína Cas9. En este caso, SaCas9 (21bp-NNG(A/G)(A/G)T - *Staphylococcus aureus* Cas9), su secuencia PAM es 5'-**NNGRRT**-3' (N = A,C,G,T; R = A,G) (ver recuadro **STEP3**, Figura 1 y 2).

CRISPOR (citation) is a program that helps design, evaluate and clone guide sequences for the CRISPR/Cas9 system. [CRISPOR Manual](#)
Mar 16 2023: A bot submitted dozens of jobs today, it was blocked but now the website is slowly catching up with the work queue. It will take 1-2 hours to get through all the currently scheduled CRISPOR jobs. should come online next week. [Full list of changes](#)

Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use [CRISPOR Batch](#)

Sequence name (optional):

Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon

[Clear Box](#) - [Reset to default](#)

```
>mCherry_complete_DNA_Sequence (711 bp)
ATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGT
GAACGGCCACGAGTTTCAGATCGAGGGCGAGGGCGGCCCTCTACGAGGGCACCCAGACCGCAAGCTGAAGGTGA
CCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCTTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTTCATGTACGGCTCCAAGGCTACGTGAAGCAC
CCCGCCGACATCCCGGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGGTGATGAAGTTTCGAGGACGG
CGCGGTGGTGAACCGTGAACGAGGACTCTCTCCGAGGAGCGGAGTTTCATCAAGGTGAAGTGGCGGCGACCAACT
TCCCTCCGAGCGCCCTAATGCAAGAGAGACATGGGCTGGGAGGCTCTCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGAGCGG
GCCTTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGAGCGGCGGCTACAGACGCTGAGGTCAAGACCACTACAA
GGCCAAAGGCGCGTGCAGTGCCTCCGGCGCTACACACTCAAGTTGGACATCACTCCCAACAGAGGACTACA
CCATCTGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCGCGCACTCCACCGGCGATGGACGAGCTGTACAAGTAG
```

is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.
Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

Step 2

Select a genome

Homo sapiens - Human - UCSC Dec. 2013 (GRCh38/hg38) + SNPs: dbSNP148, Kaviar

Note: pre-calculated exonic guides for this species are on the [UCSC Genome Browser](#).
We have 940 genomes, but not yours? Search [NCBI assembly](#) and send a GCF/_GCA_ ID to [CRISPOR support](#).

Step 3

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

21bp-NNG(A/G)(A/G)T - Cas9 S. Aureus

See [notes on enzymes](#) in the manual.

SUBMIT

Figura 2. Portada de la página *web* del programa CRISPOR con la selección de parámetros para el diseño de sgRNAs.

4. Una vez completamos los pasos anteriores ejecutamos el análisis presionando el botón **Submit**. El programa *CRISPOR* generará una lista de posibles sgRNAs candidatos ordenados según:

- Especificidad
- Eficiencia predicha
- Número de posibles off-targets

Ver Figuras 3 y 4.

Query sequence, not found in the selected genome, Homo sapiens (hg38)

Warning: The query sequence was not found in the selected genome. This can be a valid query, e.g. a GFP sequence. If not, you might want to check if you selected the right genome for your query sequence. Use a tool like [BLAT](#) to check if the sequence really has a 100% identical match in the target genome.

When reading the list of guide sequences and off-targets below, bear in mind that in case that the input sequence is really in the genome and just has a few differences, the software will use the first found match as the on-target as it cannot distinguish 0-mismatch off-targets from 0-mismatch on-targets. In this case, the specificity scores of guide sequences are too low. In other words, some guides may be fine, the problem may just be that the on-target is shown as an off-target. Because there is no flanking sequence available, the guides in your sequence that are within 50bp of the ends will have no efficiency scores. The efficiency scores will instead be shown as '---'. Include more flanking sequence > 50bp to obtain these scores.

Your input sequence is 711 bp long. It contains 13 possible guide sequences. Shown below are their PAM sites and the expected cleavage position located -3bp 5' of the PAM site. Click on a match for the PAM NNGRRT below to show its 21 bp-long guide sequence. (Need help? Look at the [CRISPOR manual](#)) Colors **green**, **yellow** and **red** indicate high, medium and low specificity of the PAM's guide sequence in the genome.

Input sequence not in genome, cannot show genome variants.

Position 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 Sequence ATGGTGACCAAGGCGGAGGAGATACATGCGCATCAAGGAGTTTCAGCTTCAAGTGCACATGAGGGCTCCGTGACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGCCCTACGAGGGCACCCGACCCGACCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCTCGCCCTTCGCGCTGGGACATCCCTGCTCAGT
 ---ACGAGT ---ACGAGT ACCCAG--- ---AAGGT

Download for: SerialCloner (free) - ApE (free) - GenomeCompiler - Benchling - SnapGene - Geneious - Vector NTI - LaserGene - Genbank - FASTA

Figura 3. Imagen de los resultados obtenidos luego de ejecutar el programa CRISPOR. Los colores *verde*, *amarillo* y *rojo* indican especificidad alta, media y baja del sgRNA.

Predicted guide sequences for PAMs						
Ranked by default from highest to lowest specificity score (Hsu et al., Nat Biot 2013). Click on a column title to rank by a score. If you use this website, please cite our paper in NAR 2018. Too much information? Look at the CRISPOR manual .						
Download as Excel tables: Guides / Off-targets / Saturating mutagenesis assistant						
Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes ☐ Only G- ☐ Only GG- ☐ Only A- ☐	MIT Specificity Score	Predicted Efficiency Najm 2018	Out-of-Frame	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score ☐ exons only No match, no chrom filter
239 / rev	TCAAGTAGTCGGGATGTCGG CGGGGT Cloning / PCR primers	100	78	45	0-0-0-1-0 0-0-0-0-0 1 off-targets	3:intron:ST6GAL1
677 / rev	ACAGCTCGTCCATGCCGCGG TGGAGT Enzymes: MspI, XcmI, LpnPI, Cfr10I, SgrAI Cloning / PCR primers	100	--	--	0-0-0-0-1 0-0-0-0-0 1 off-targets	4:intron:ZNF282
467 / rev	CGCCCTTCAGGCGCCGCTCT CGGGGT High GC content Enzymes: BmeT110I, Csp6I, BslI, BseDI, MraI Cloning / PCR primers	98	68	49	0-0-0-1-5 0-0-0-0-0 6 off-targets	3:intergenic:NFKBIA-RP11-561B11.6 4:exon:PCGF5 4:exon:PRSS36 show all...
459 / fw	GGGCTGGGAGGCTCTCTCGA GCGGAT High GC content Enzymes: Csp6I, BslI, Hpy188I, BtsCI Cloning / PCR primers	95	62	63	0-0-0-0-5 0-0-0-0-0 5 off-targets	4:exon:ALK 4:intron:CTD-3088G3.8 4:intron:TRPC7 show all...
136 / rev	GGTCACCTTCAGCTTGGCGGT CTGGGT Enzymes: Bsp1286I, BanI, BaeGI, NlaIV Cloning / PCR primers	79	53	56	0-0-1-2-5 0-0-0-0-0 8 off-targets	2:exon:CCDC88C 3:intron:RP11-399E6.1 3:intergenic:ZNF800-AC000124.1 show all...

Figura 4. Imagen de los sgRNAs predichos clasificados según la puntuación de especificidad según los parámetros establecidos en Hsu et al., Nat Biot 2013.

5. Seleccionar un sgRNA considerando los parámetros mencionados. Discutir en clase las ventajas y desventajas de las distintas opciones.
6. Una vez seleccionado el sgRNA, procedemos al diseño de oligonucleótidos para la generación del molde de ADN que permitirá la producir el sgRNA mediante transcripción *in vitro* (IVT) ver Figuras 5 y 6.

mCherry-Biolng2023: Guide sequence: TCAAGTAGTCGGGGATGTCGG CGGGGT

Contents:

- Cloning or expression of guide RNA
 - T7 *in vitro* expression from a plasmid
 - T7 *in vitro* expression from overlapping oligonucleotides
 - T7 expression with the GeneArt kit
 - U6 expression from an Addgene plasmid
 - Direct PCR for *C. intestinalis*
 - Lentiviral vectors: Cloning with Gibson assembly
 - Summary of main cloning/expression primers
- PCR to amplify the on-target site
- PCR to amplify off-target sites
- Guide mutations that minimize on-target activity
- Saturating mutagenesis using all guides

Figura 5. Imagen de los contenidos ofrecidos una vez que se selecciona un sgRNA. Secuencia de los oligonucleótidos para construir el molde de ADN para la transcripción *in vitro* del sgRNA con el promotor T7.

La transcripción *in vitro* es un método que permite sintetizar ARN a partir de un molde de ADN utilizando una ARN polimerasa. En este práctico se utilizará la ARN polimerasa T7, que reconoce el promotor: T7 promoter.

El molde de ADN que vamos a diseñar incluirá: promotor T7, secuencia guía y secuencia scaffold del sgRNA (Figura 6).

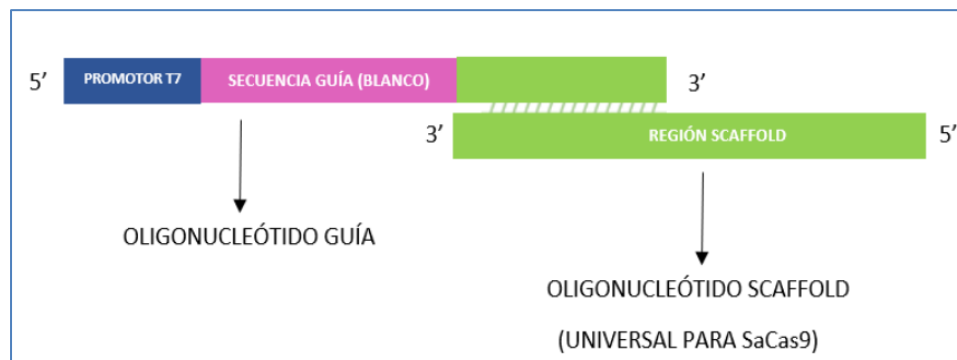


Figura 6. Esquema de la complementariedad de los dos oligonucleótidos de ADN utilizados para la síntesis *in vitro* del sgRNA. Cada una de las dos rectángulos representa una hebra de ADN, es decir, un oligonucleótido. El oligonucleótido directo contiene en su extremo 5' la secuencia del promotor T7 (en azul), la secuencia complementaria del sgRNA y en su extremo 3' una región solapante con el extremo 3' del oligo inverso. El oligonucleótido inverso contiene la secuencia del scaffold para la SaCas9 (Bassett *et al.*, 2013).

7. Los oligonucleótidos de ADN solapantes serán enviados a una compañía de síntesis de oligonucleótidos para su síntesis (*ejemplo*: Macrogen, <https://dna.macrogen.com/>). Evaluar las secuencias obtenidas por *CRISPOR* y verificar la capacidad de las mismas para la generación de un molde de ADN apto para la transcripción *in vitro* (IVT). Estos oligonucleótidos deben hibridar y se extienden mediante PCR para generar el molde de transcripción.

Name	Primer Sequence
mCherry-Biolng2023_guideRNA239rvT7crTarget	GAAATTAATACGACTCACTATAGTCAAGTAGTCGGGGATGTCGGGTTTATGACTCTGGAAACAGAA
mCherry-Biolng2023_guideRNAallT7common (constant primer used for all guide RNAs)	GTTTATGACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGCAAAATGCCGTGTTATCTCGTCAACTTGTGGCGAGATTTTTT

Figura 7. Secuencia de los oligonucleótidos de ADN para construir el molde de la transcripción *in vitro* del sgRNA. Se puede preparar un molde para la síntesis *in vitro* del sgRNA con ARN polimerasa T7 mediante hibridación y extensión de cebadores obtenidos.

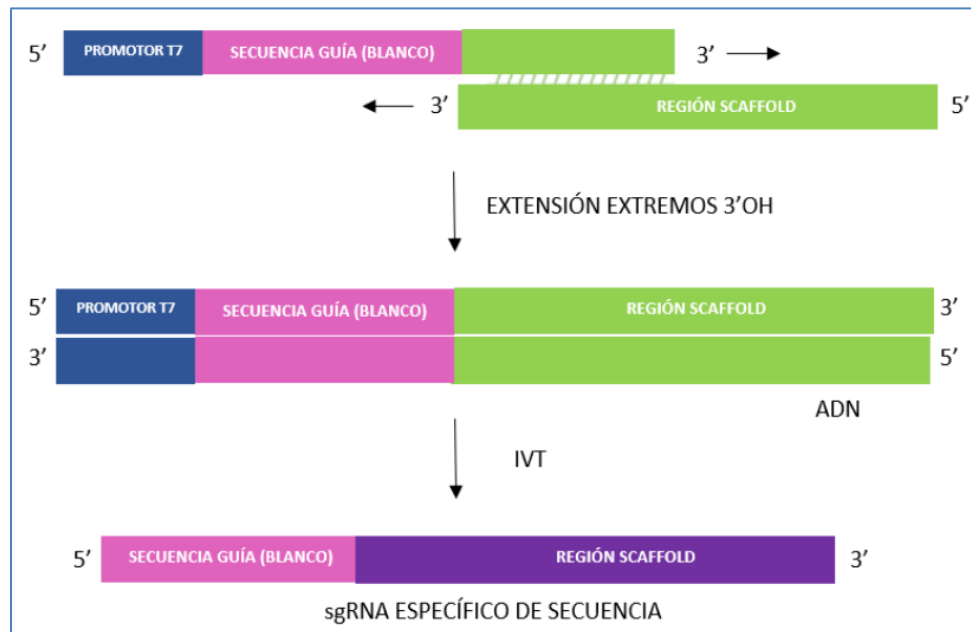


Figura 8. Esquema del proceso de extensión de oligonucleótidos de ADN solapantes para preparar el molde para la transcripción *in vitro* (IVT) del sgRNA.

- Repetir el procedimiento de diseño utilizando como objetivo el gen **BAX del genoma humano**. Comparar los resultados obtenidos con los del gen mCherry y discutir: diferencias en off-targets, número de sgRNA disponibles, posibles limitaciones y dificultades extra del diseño.

Parte 2

- Diseño de *primers/cebadores* para evaluar la edición mediante amplificación de la región genómica alrededor del sitio de corte, ver Figura 9. Estos *primers* se utilizarán posteriormente para evaluar si ocurrió edición en el gen. Discutir como realizar el diseño y que alternativas son posibles.

mCherry-BioIng2023: Guide sequence: TCAAGTAGTCGGGGATGTCGG CGGGGT

Contents:

- Cloning or expression of guide RNA
 - T7 *in vitro* expression from a plasmid
 - T7 *in vitro* expression from overlapping oligonucleotides
 - T7 expression with the GeneArt kit
 - U6 expression from an Addgene plasmid
 - Direct PCR for *C. intestinalis*
 - Lentiviral vectors: Cloning with Gibson assembly
 - Summary of main cloning/expression primers
- PCR to amplify the on-target site
- PCR to amplify off-target sites
- Guide mutations that minimize on-target activity
- Saturating mutagenesis using all guides

Figura 9. Imagen de los contenidos ofrecidos una vez que se selecciona un sgRNA. Primers/cebadores para amplificar la región genómica alrededor del sitio de corte.

10. Para evaluar la efectividad y especificidad de los *primers/cebadores* diseñados, realizar el análisis *in-silico* utilizando la herramienta online *UCSC In-Silico PCR* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) o *Primer-Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).
11. Cargar los *primers/cebadores* diseñados en las ventanas “**Forward primer**” y “**Reverse primer**” (Figura 10) o “**Primer Parameters**” (Figura 11) y seleccionar el genoma. Evaluar y discutir la especificidad y tamaño del fragmento amplificado.

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target:

Forward Primer: Reverse Primer:

Max Product Size: Min Perfect Match: Min Good Match: Flip Reverse Primer: ☐

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel.

Configuration Options

Genome and Assembly - The sequence database to search.
Target - If available, choose to query transcribed sequences.
Forward Primer - Must be at least 15 bases in length.
Reverse Primer - On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases.
Max Product Size - Maximum size of amplified region.
Min Perfect Match - Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15.
Min Good Match - Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match.
Flip Reverse Primer - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.

Figura 10. Imagen de portada de la página web del programa *In-Silico PCR*.

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template | **Primers common for a group of sequences**

PCR Template | Retrieve recent results | Publication | Tips for finding specific primers

Enter accessions, FASTA sequences or a Gene ID (A refseq record is preferred)

Range

Forward primer

Reverse primer

Or, upload FASTA file No file chosen

Query exclusion ☐ Exclude predicted transcripts (XML accessions)

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)

PCR product size

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Figura 11. Imagen de portada de la página web del programa Primer-BLAST.

Además de generar mutaciones por reparación imprecisa del ADN, el sistema CRISPR también permite introducir modificaciones específicas mediante reparación dirigida por homología (HDR). Edición dirigida mediante oligonucleótidos donador.

12. Discutir aspectos acerca de la elaboración de un “**Donor**” (oligonucleótido de ADN donante) para la edición dirigida de CRISPR. Evaluar ventajas, desventajas y consideraciones a tener en cuenta en la elaboración de un oligonucleótido de ADN donante.

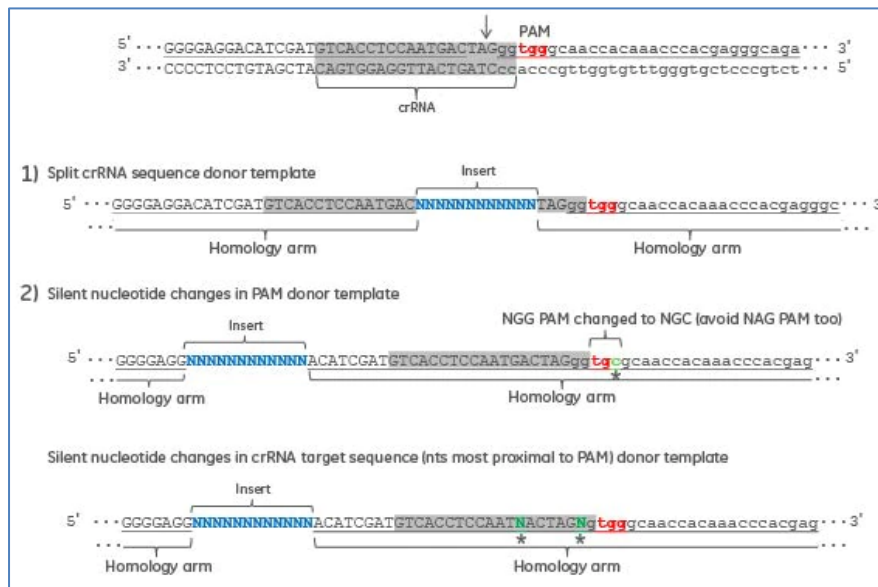


Figura 12. Esquema de estrategias de diseño de oligonucleótidos de ADN "donor" para evitar un nuevo corte de CRISPR-Cas9 luego de la edición mediada por HDR. Extraído de <https://horizondiscovery.com/>.

13. Elaborar un molde de ADN "**Donor**" (oligonucleótido de ADN donante) para utilizar en la edición de dirigida mediante HDR para el gen de mCherry.
14. Discutir y diseñar el inserto a colocar en el oligonucleótido donante para que provoque la terminación del producto del gen de mCherry y la incorporación de un sitio de corte de enzima de restricción único.
15. Incluir en el diseño regiones de homología con el genoma (brazos de homología) 70nt río arriba del **PAM** y 40nt río abajo de la secuencia blanco del sgRNA. Discutir acerca de la función de los brazos de homología y sus características.
16. Discutir y definir como evaluar su correcta incorporación/edición en el genoma.
17. Diseñar los **oligonucleótidos de ADN solapantes** para la generación del "**Donor**" que serán enviados a una compañía de síntesis de oligonucleótidos (ejemplo: Macrogen, <https://dna.macrogen.com/>).
18. Diseñar *primers/cebadores* para amplificar el sitio de edición de mCherry y comprobar el estado de la edición del mismo.
19. Explore otras herramientas web disponibles para el diseño de guías (sgRNAs) y secuencias *donor*, ejemplos:
 - Diseño de *sgRNAs*: <https://horizondiscovery.com/en/ordering-and-calculation-tools/crispr-design-tool>
 - Diseño de *donor* para edición genómica: <https://horizondiscovery.com/en/ordering-and-calculation-tools/edit-r-hdr-donor-designer>