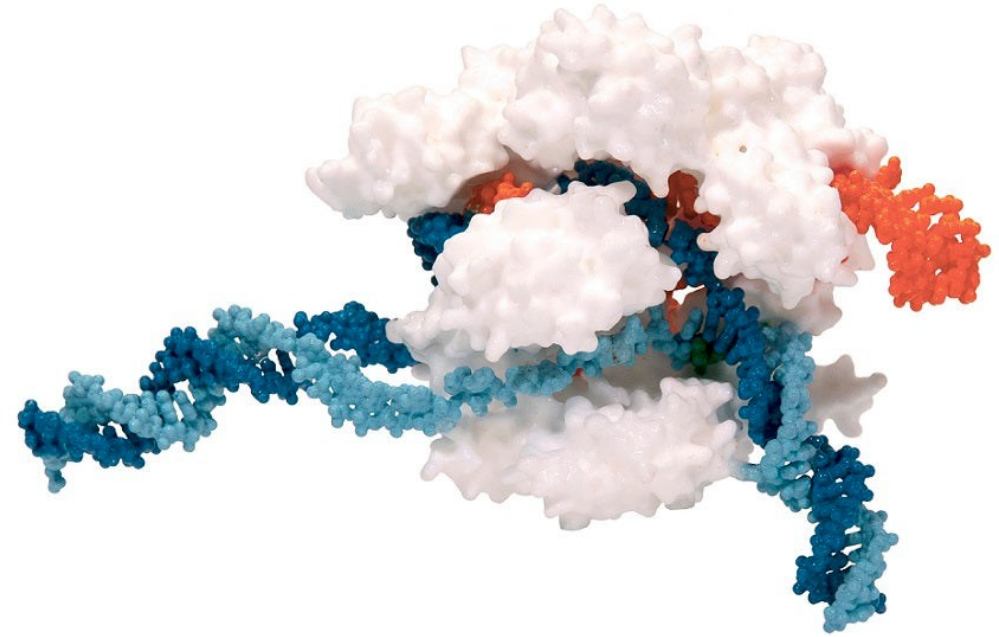


Bioingeniería Celular y Molecular

Módulo II - Experimental



Rafael Fort
rfort@fcien.edu.uy



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Equipo docente:

- Dr. Rafael Fort
 - Doctor en Ciencias en Biológicas
 - Grado 2 FCIEN
- Mag. Lucía Bilbao
 - Lic. en Bioquímica / Mag. en Ciencias Biológicas: Biología Celular y Molecular
 - Grado 1 FCIEN / Técnica de la plataforma de NGS del IIBCE
- Lic. Felipe Castro
 - Lic. en Bioquímica / Estudiante de Maestría en Ciencias Biológicas
 - Grado 1 FCIEN / Becario Maestría ANII
- Lic. Paola Sosa
 - Lic. en Bioquímica / Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas
 - Grado 2 FCIEN / Becaria Doctorado ANII
- Lic. Jake D. Sheppard
 - Lic. en Ciencias Biológicas / Estudiante de la Maestría en Bioinformática
 - Grado 1 FCIEN / Becario Maestría ANII

Información General

Prácticos presenciales:

salón 303 de 14 a 17 hs (recuerden traer túnica)

Sección Genómica Funcional

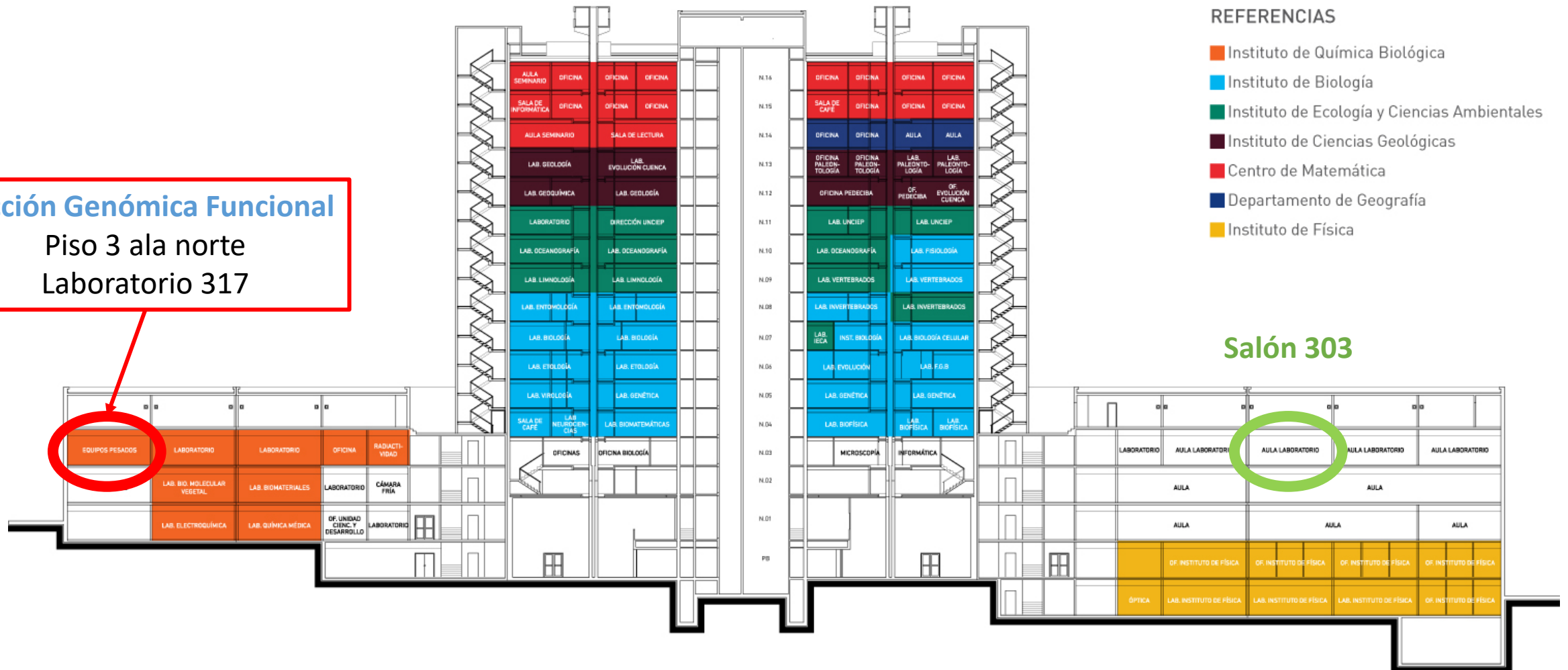
Piso 3 ala norte

Laboratorio 317

REFERENCIAS

- Instituto de Química Biológica
- Instituto de Biología
- Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales
- Instituto de Ciencias Geológicas
- Centro de Matemática
- Departamento de Geografía
- Instituto de Física

Salón 303



Ciencias Biológicas

Sección Genómica Funcional

Estudio de las interacciones moleculares que intervienen en la regulación de la expresión génica mediante análisis teóricos y experimentales (bioquímico, molecular, fisicoquímico, genómico y bioinformático).

Interacciones Ácidos Nucleicos-Proteína en Trypanosoma cruzi.

Análisis genómicos estructurales y funcionales en Trypanosomas y Leishmania

Estudio de microARNs involucrados en el cáncer de próstata.

Estudios genéticos por NGS de cáncer de colon hereditario

Estudio de los mecanismos moleculares de acción de quimioterápicos para tratamiento de parasitosis y cáncer.

Dependencia académica con el Instituto de Química Biológica

Responsable: Maria Ana Duhagon (Gr 3)

Tel: +589 2 5258618 int. 237



Información General del Curso

Sistema de GANANCIA:

a) Características de las evaluaciones:

Exoneración del curso:

Se requerirá la realización y entrega en tiempo de **4 informes individuales** (Puntuados entre 0-100%) (relativos a las 4 secciones experimentales del curso), los **informes deberán individualmente superar el 25%** y el **examen será exonerado** en el caso de que el **promedio de los 4 informes supere el 50%**.

Ganancia del derecho a rendir examen final:

Tendrá lugar cuando el **promedio de los 4 informes sea mayor al 25% pero menor al 50% (individualmente superen el 25%)**, será catalogado "*sin concepto*" y habrá aprobado el curso y ganado el derecho a examen. También se valorará la **participación activa, efectiva y predisposición en clase del estudiante** que podrá sumar un **10% extra del puntaje total**, siempre que no supere el 100%.

b) Porcentaje de asistencia requerido para ganar la unidad curricular: Deberán contar con un **75% de asistencias** a las instancias prácticas presenciales que son 12 en total, por tanto **deberán asistir al menos a 9 instancias**.

Información General

Bioingeniería Molecular y Celular: Módulo II 2026

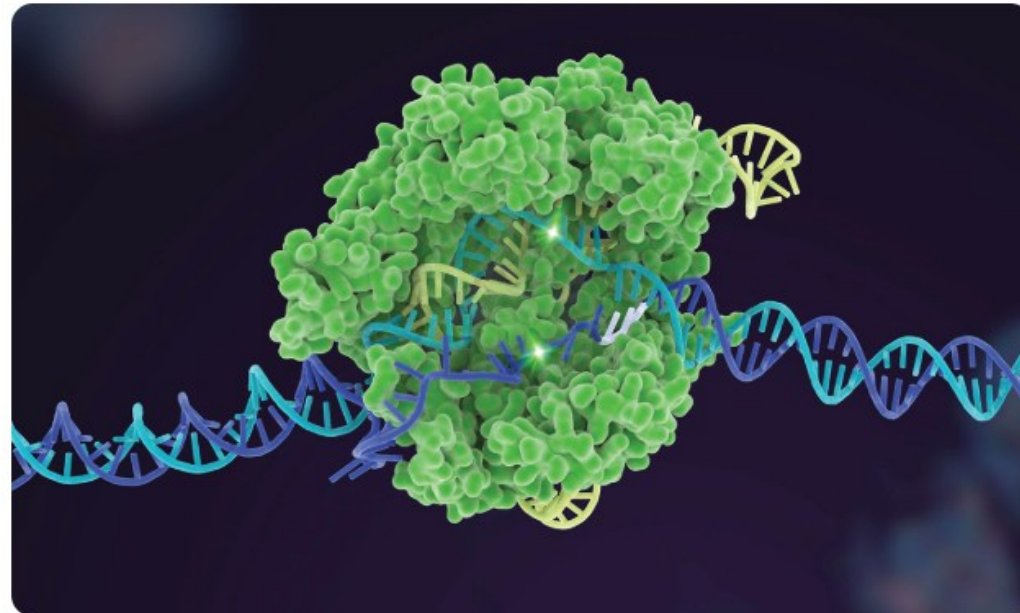
[Curso](#) [Configuración](#) [Participantes](#) [Calificaciones](#) [Informes](#) [Más](#) ▾

▾ ¡Bienvenidas y bienvenidos a Bioingeniería Molecular y Celular – Módulo 2! [Colapsar todo](#)

Durante este semestre trabajaremos de forma práctica en herramientas fundamentales de biología celular y molecular, con **foco en la tecnología CRISPR/Cas9 y su aplicación en edición génica en células eucariotas**.

A lo largo de **12 instancias presenciales** combinaremos instancias experimentales, discusiones conceptuales y análisis crítico de resultados, integrando diseño experimental, trabajo de laboratorio e interpretación de datos.

Salón 303 - martes de 14 a 17hr





Normas mínimas de comportamiento y seguridad en el laboratorio práctico

Durante el desarrollo de las actividades prácticas, es fundamental mantener una **conducta responsable** que garantice la seguridad individual y colectiva, así como el correcto desarrollo del trabajo experimental.

El **uso de túnica es obligatorio** durante toda la permanencia en el laboratorio.

El **uso de teléfonos celulares** debe **limitarse estrictamente a fines académicos**. No está permitido manipular el celular con guantes puestos, ya que esto puede provocar contaminación cruzada. En caso de necesitar utilizarlo, deberán retirarse los guantes previamente.

Se deben seguir en todo momento las indicaciones del docente, **mantener el área de trabajo ordenada y limpia, y manipular los reactivos y equipos con cuidado**. Está prohibido comer, beber o almacenar alimentos dentro del laboratorio.

Las **actividades prácticas culminan únicamente cuando el área de trabajo y los materiales utilizados quedan limpios, ordenados** equivalentes a las condiciones iniciales.

El cumplimiento de estas normas es indispensable para asegurar un entorno de trabajo seguro y adecuado para todos.

Información General

▼ Lecturas recomendadas

A lesson in failure – Jennifer Lanni (Science, 2021)

Un ensayo breve sobre una experiencia docente en la que un experimento falla y se convierte en una oportunidad para que los estudiantes reflexionen sobre cómo funciona realmente la investigación científica. El texto invita a pensar en el papel del error, la interpretación de datos y la resiliencia en la práctica de la ciencia.

Student interaction with ChatGPT can promote complex critical thinking skills – Suriano et al. (Learning and Instruction, 2025)

El factor que más influye en el desarrollo del pensamiento crítico no es cuánto sabés, sino cuánto te involucrás activamente con la herramienta.



A lesson in failure – Jennifer Lanni (Science, 2021)



Student interaction with ChatGPT can promote complex critical thinking skills – Suriano et al. (Learning and Instruction, 2025)



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

El práctico comenzará con un módulo de trabajo en computadora dedicado al **diseño de sgRNAs** y otros elementos necesarios para la edición génica con CRISPR-Cas9.

Para esta actividad se utilizarán las laptops disponibles en el laboratorio de prácticos. No obstante, quienes lo prefieran pueden traer su propia computadora portátil para realizar las actividades.



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



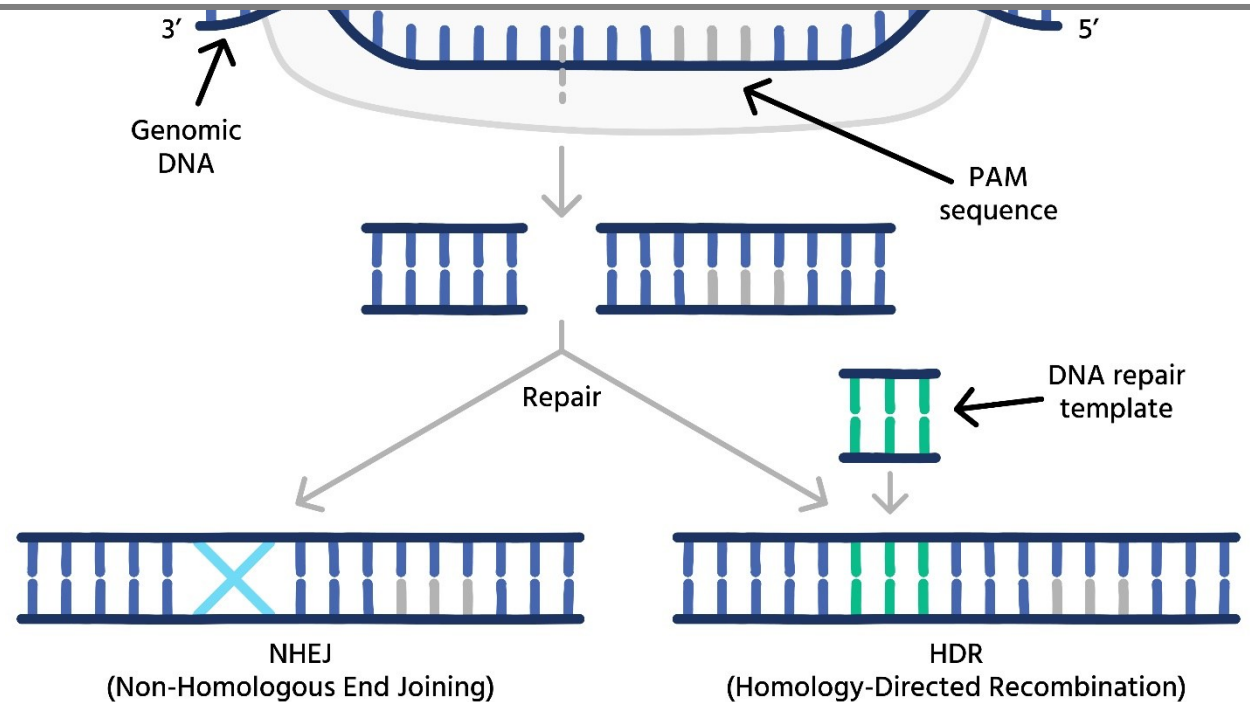
Fasta - mCherry_complete_DNA_Sequence

Temática del Curso



CRISPR (en inglés: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, en español: **repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas²**)

for the development of a method
for genome editing"
THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES



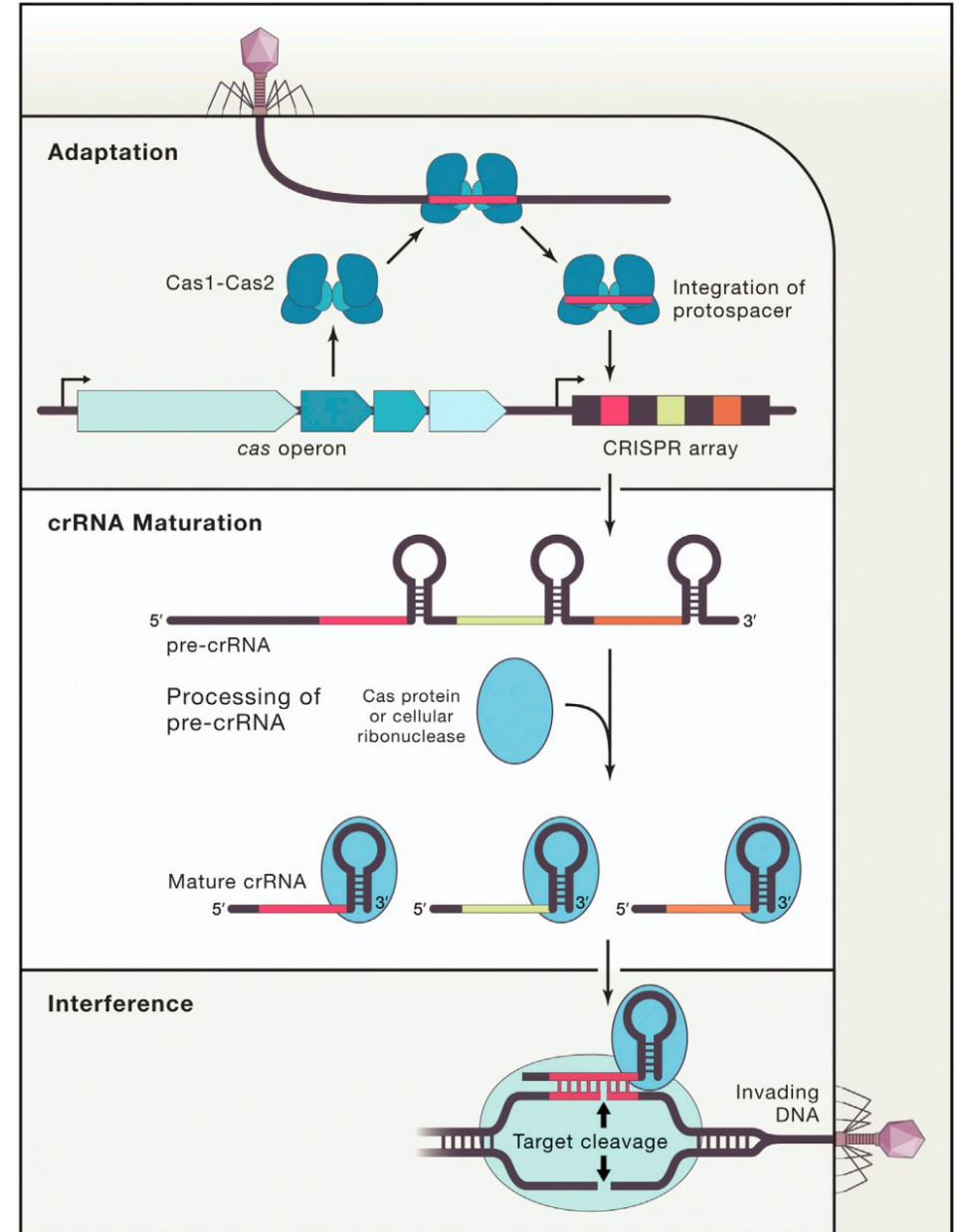
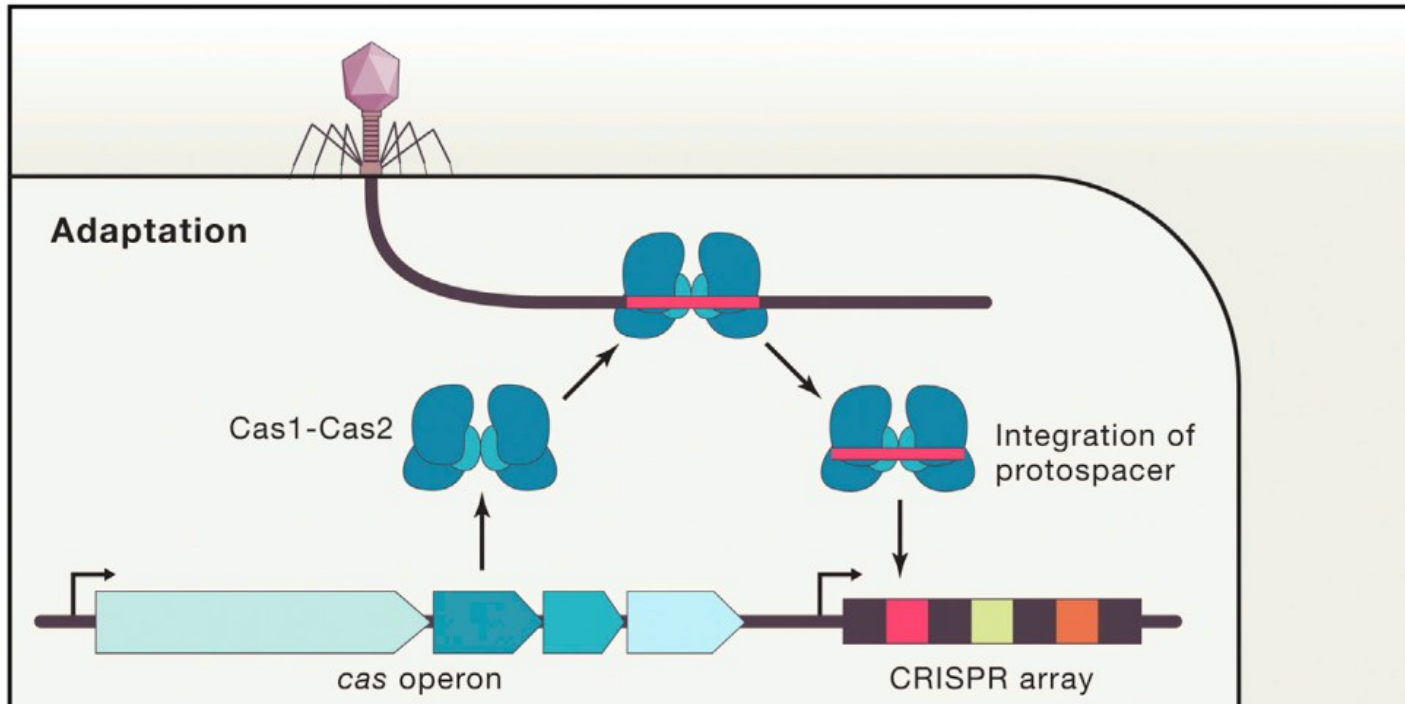
Objetivos y expectativas del Curso

1. **Comprender los fundamentos de CRISPR-Cas9:** Explorar los mecanismos moleculares que permiten la edición genética y su aplicación en biología celular y molecular.
2. **Diseñar estrategias de silenciamiento génico:** Aprender a seleccionar genes de interés, diseñar guías de ARN (sgRNA) y evaluar su eficacia.
3. **Implementar metodologías de edición genética en mamíferos:** Cultivar células de mamíferos y aplicar protocolos experimentales para la introducción del sistema CRISPR-Cas9.
4. **Analizar los efectos del silenciamiento génico:** Evaluar la eficiencia de la edición mediante técnicas como PCR, y análisis de células por citometría de flujo.

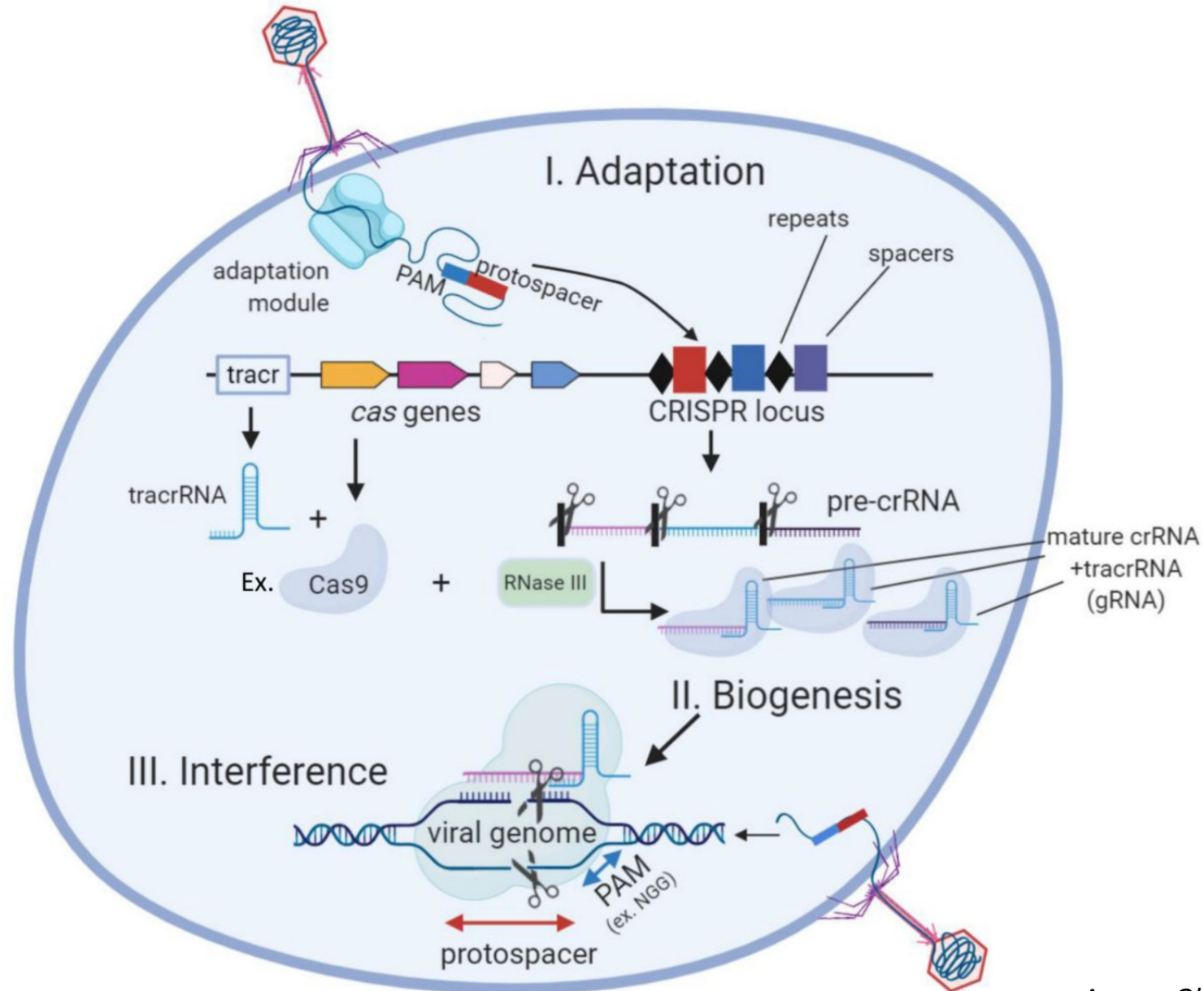
Expectativas del Curso

- Desarrollar habilidades prácticas en biología molecular y edición genética.
- Adquirir criterio para diseñar experimentos robustos y reproducibles.
- Aprender a interpretar y comunicar resultados de edición génica.

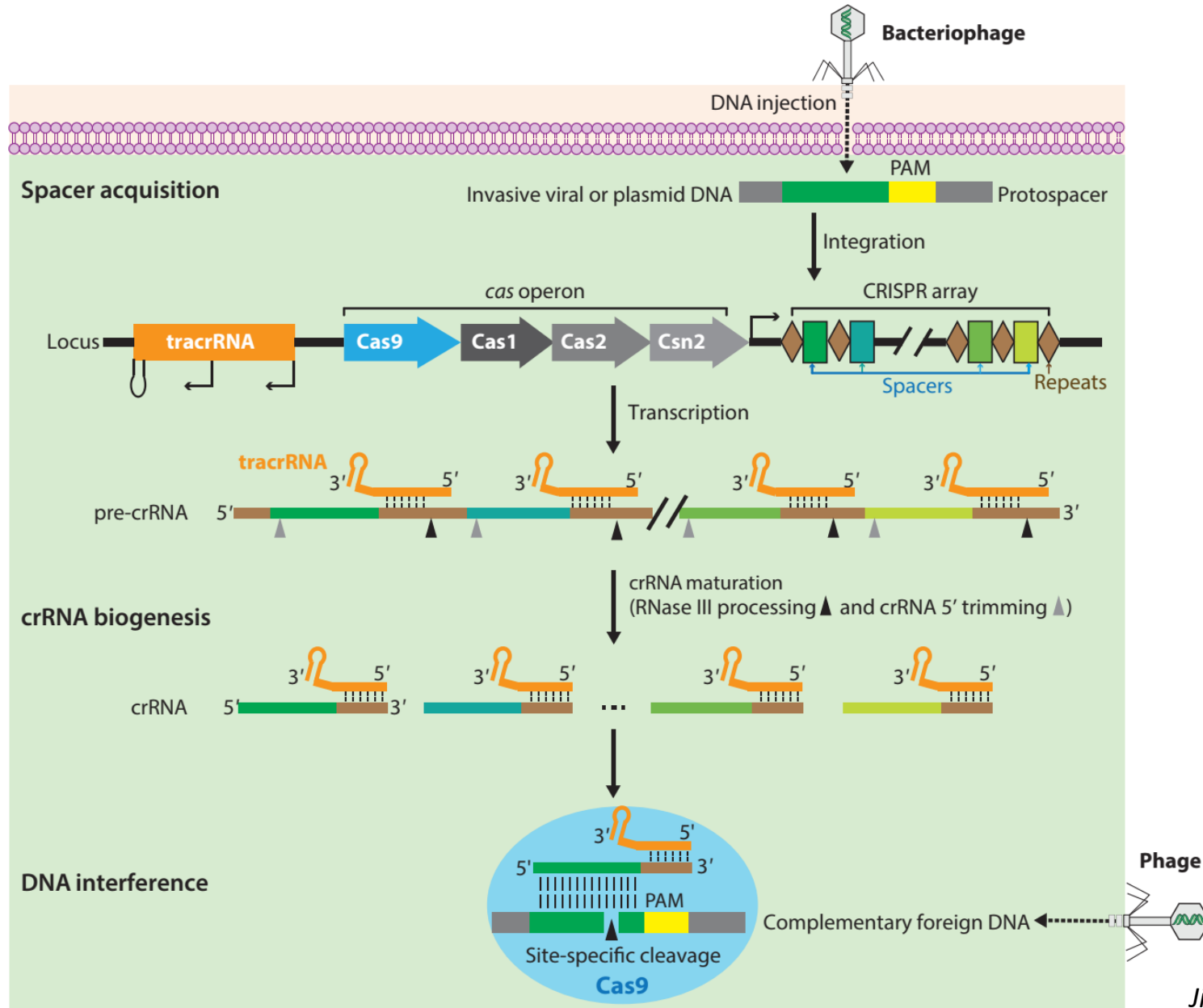
El sistema CRISPR/Cas y la inmunidad en procariotas



El sistema CRISPR/Cas y la inmunidad en procariontas

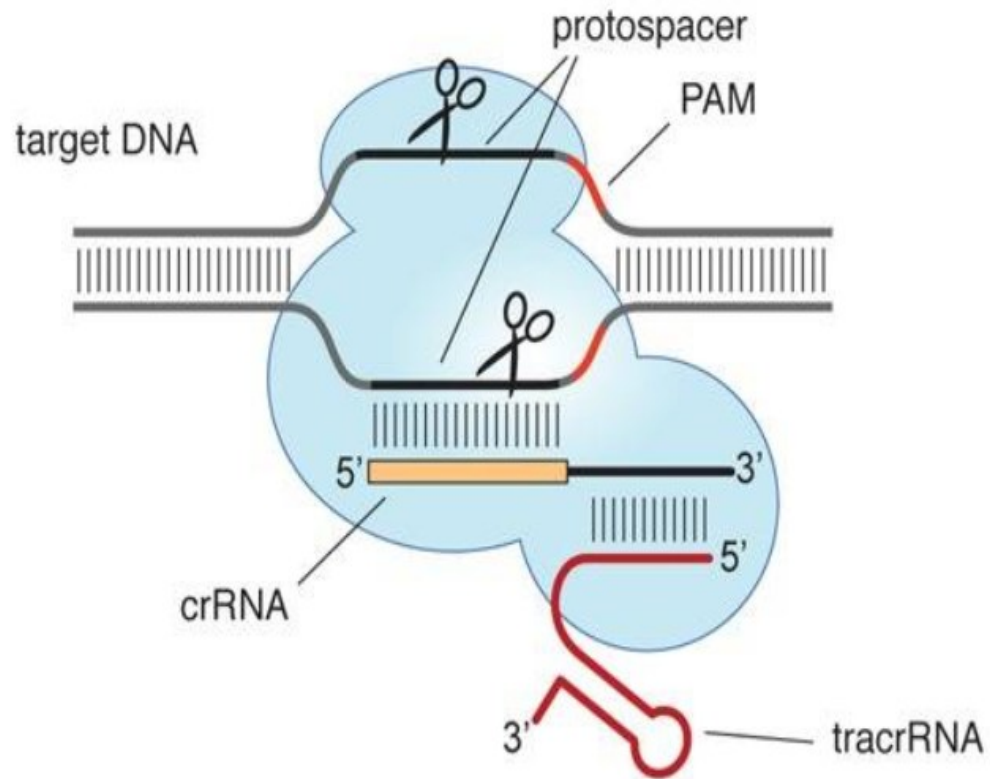


El sistema CRISPR/Cas y la inmunidad en procariontas

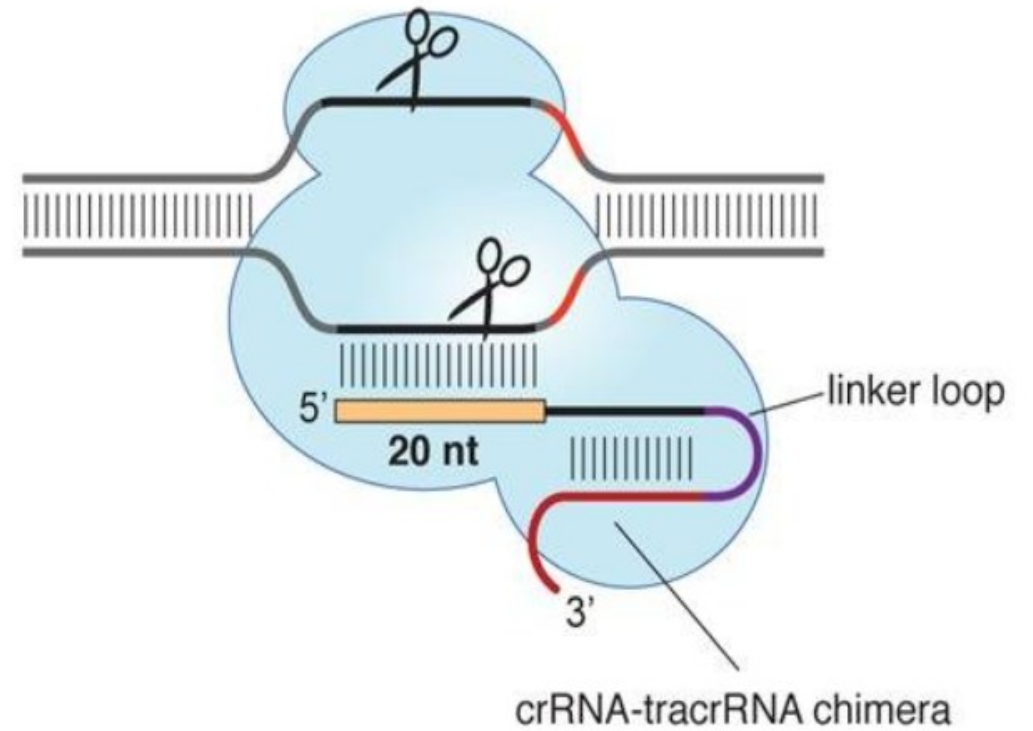


El sistema CRISPR/Cas y el ARN guía (crRNA y tracrRNA)

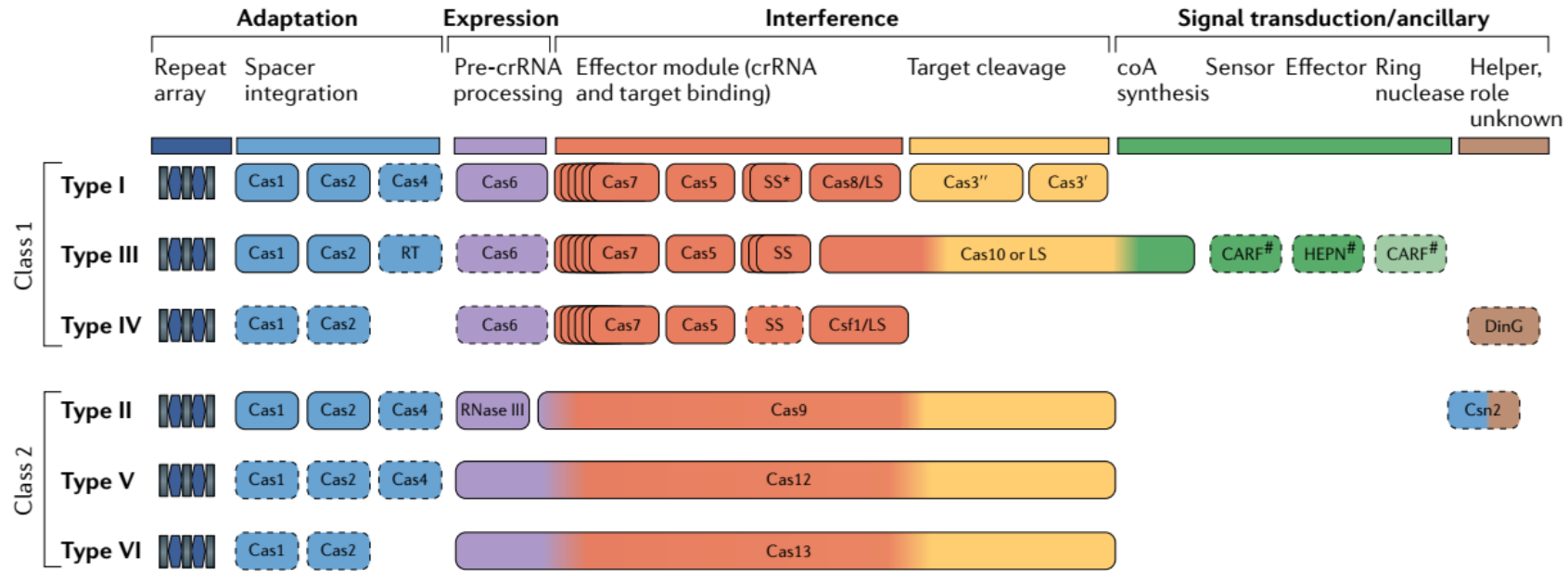
Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



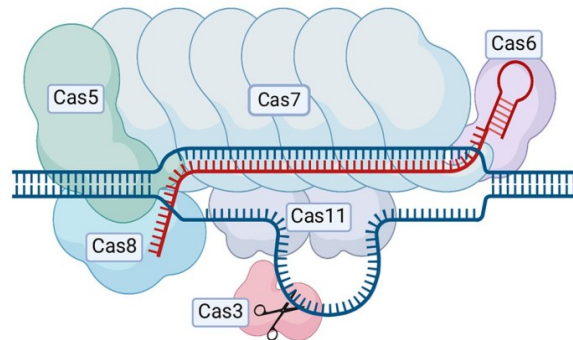
Cas9 programmed by single chimeric RNA



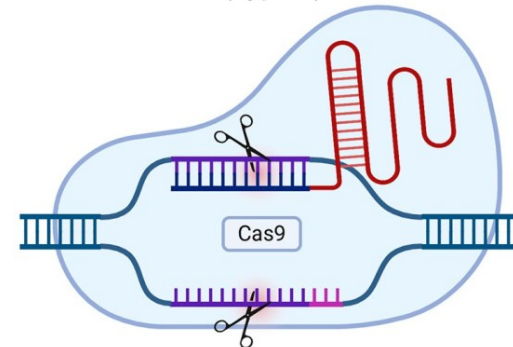
El sistema CRISPR/Cas y las proteínas efectoras



Example Class 1 (Type 1)



Example Class 2 (Type 2)

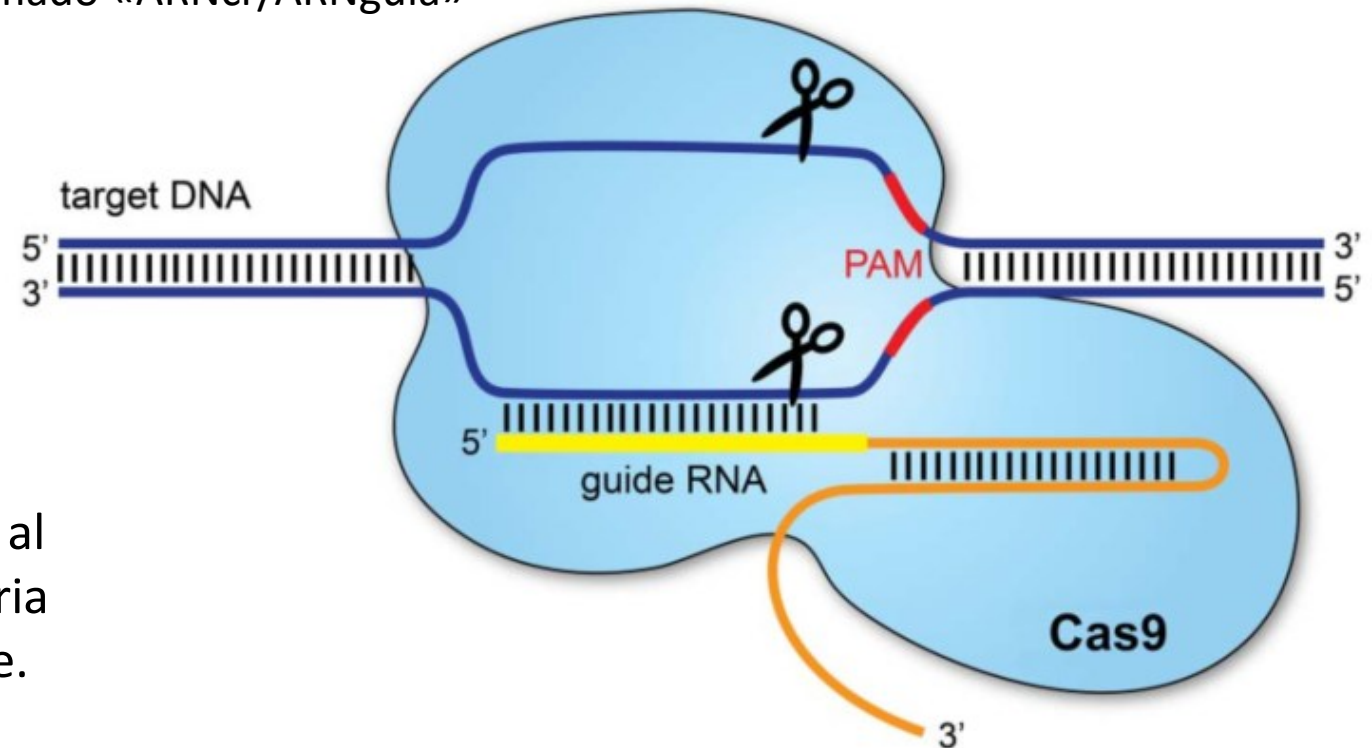


El sistema CRISPR/Cas componentes básicos

CRISPR/Cas es un mecanismo de defensa en bacterias y arqueas análogo al silenciamiento con ARN interferente en eucariotas, que identifica y degrada secuencias de ácidos nucleicos exógenos.

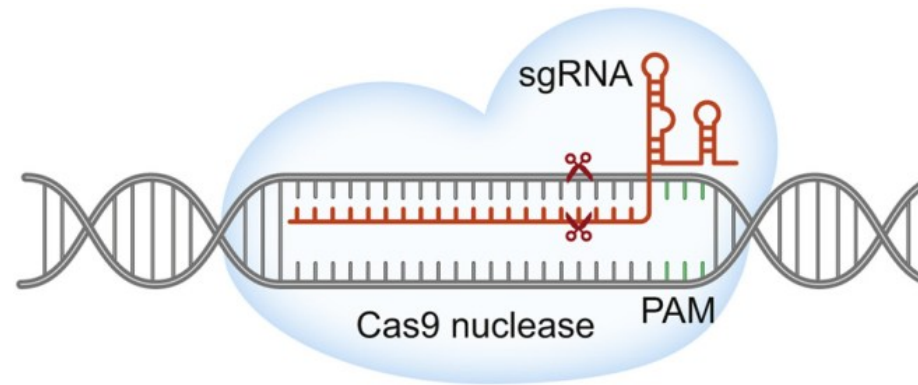
Se compone de dos elementos esenciales:

- Un ARN proveniente de la secuencia CRISPR, llamado «ARNcr/ARNguía»
- La endonucleasa Cas.



El ARNcr (guide RNA) es el encargado de dirigir al complejo Cas hacia su secuencia complementaria (target DNA), donde la misma realizará el corte.

El sistema CRISPR/Cas en mamíferos



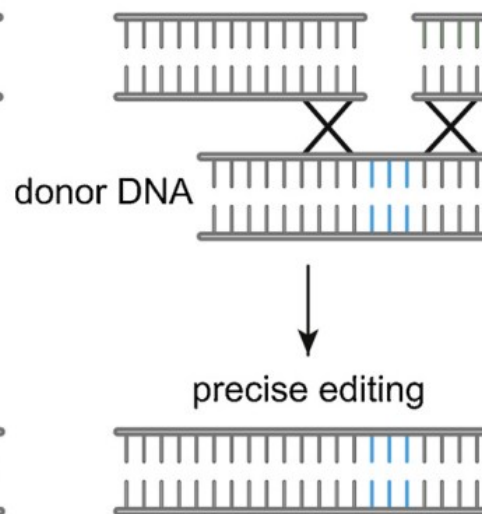
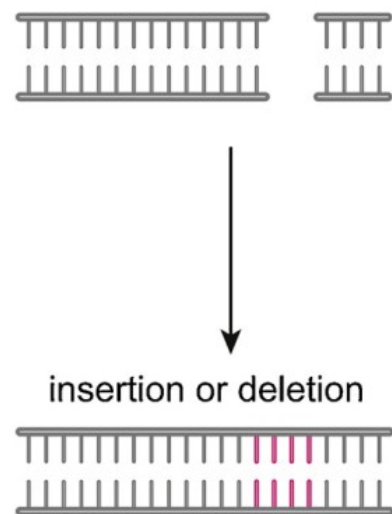
NHEJ

repair mechanism

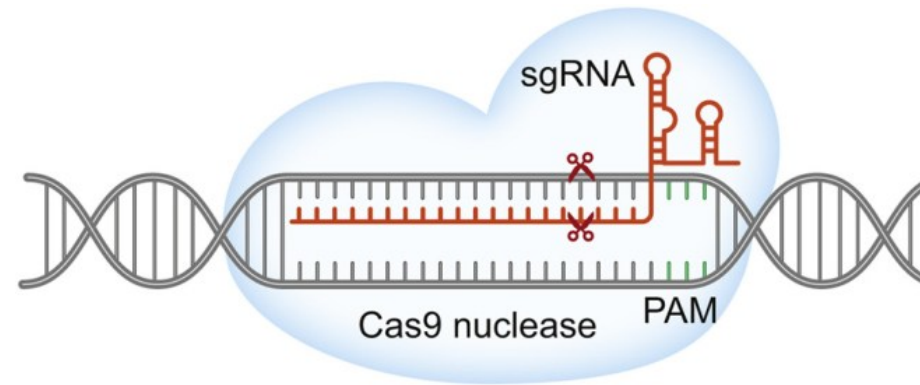
HDR

Non-Homologous End
Joining (NHEJ)

Homology Directed
Repair (HDR)



El sistema CRISPR/Cas en mamíferos: **Aplicaciones?**



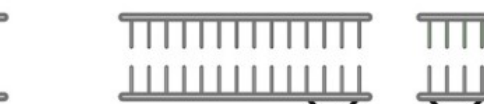
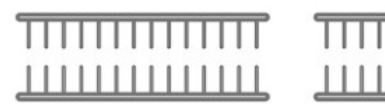
NHEJ

repair mechanism

HDR

Non-Homologous End
Joining (NHEJ)

Homology Directed
Repair (HDR)



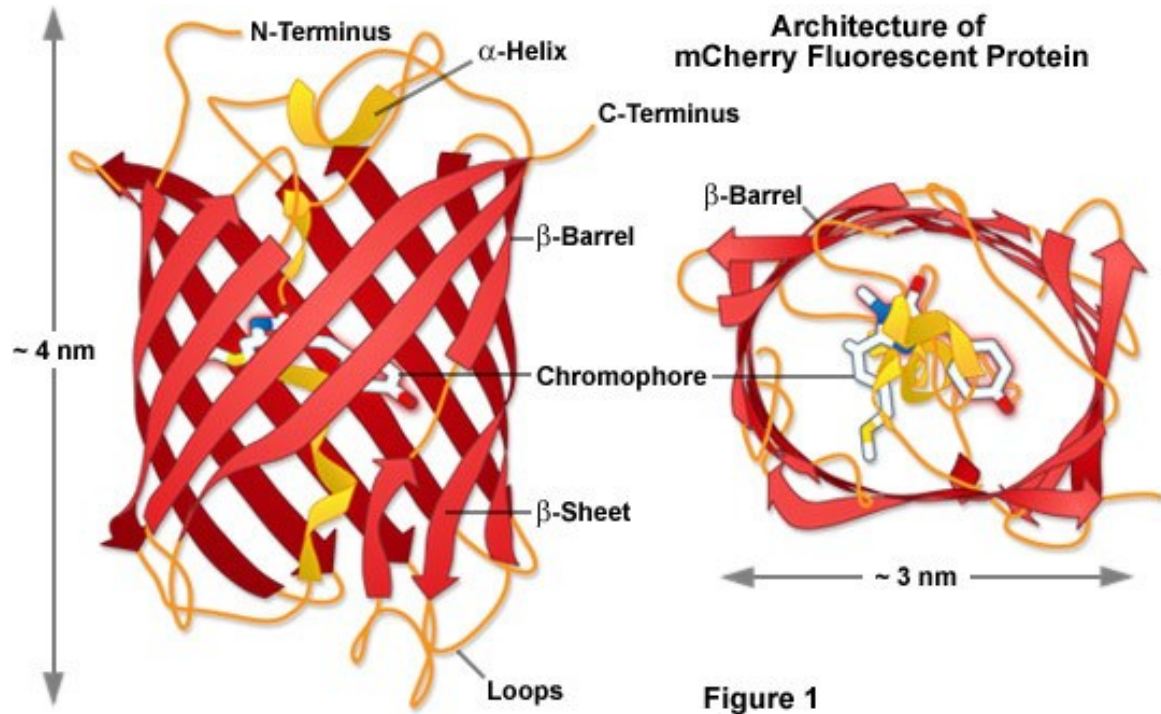
insertion or deletion

precise editing

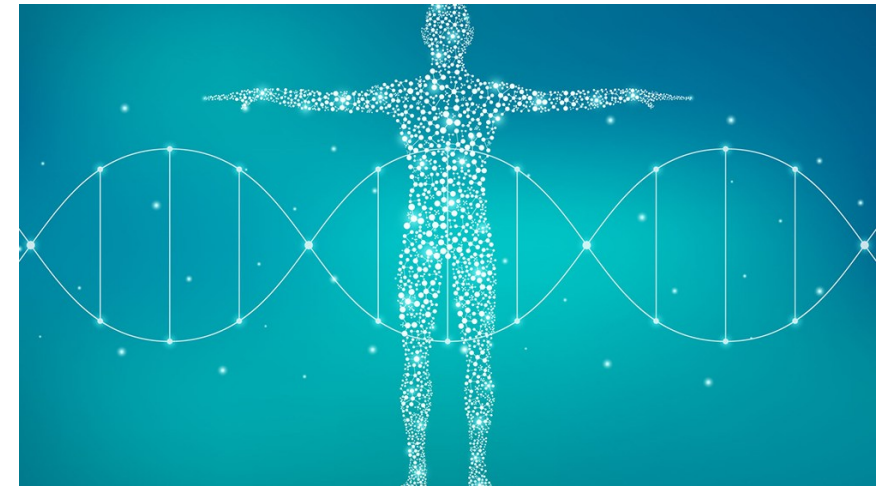
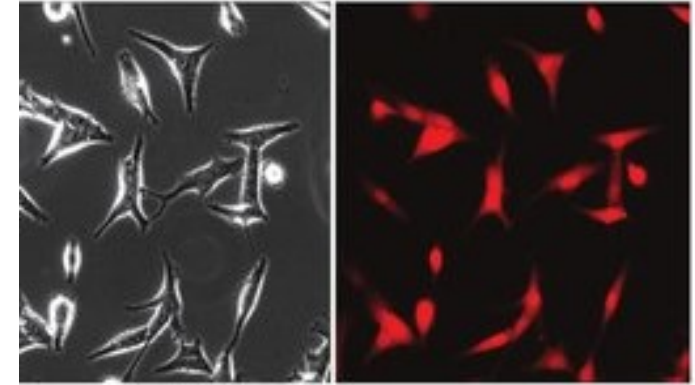


Silenciamiento Génico - mCherry

mCherry

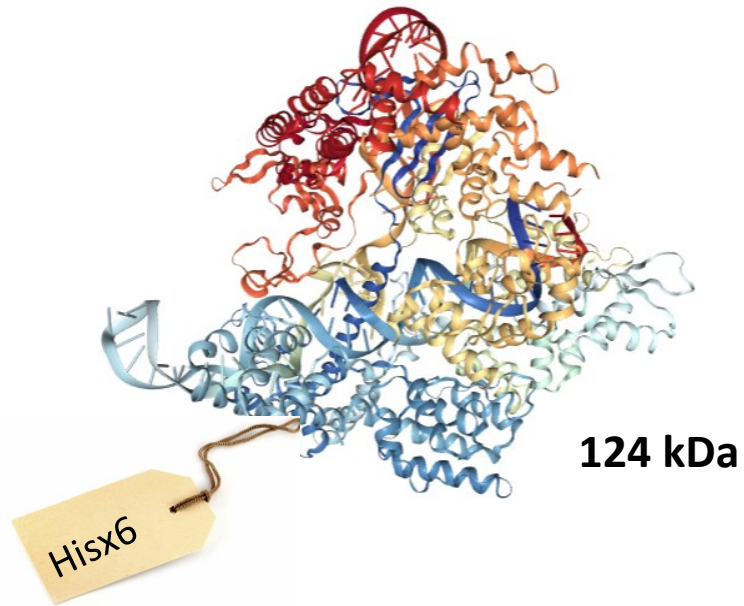


mCherry

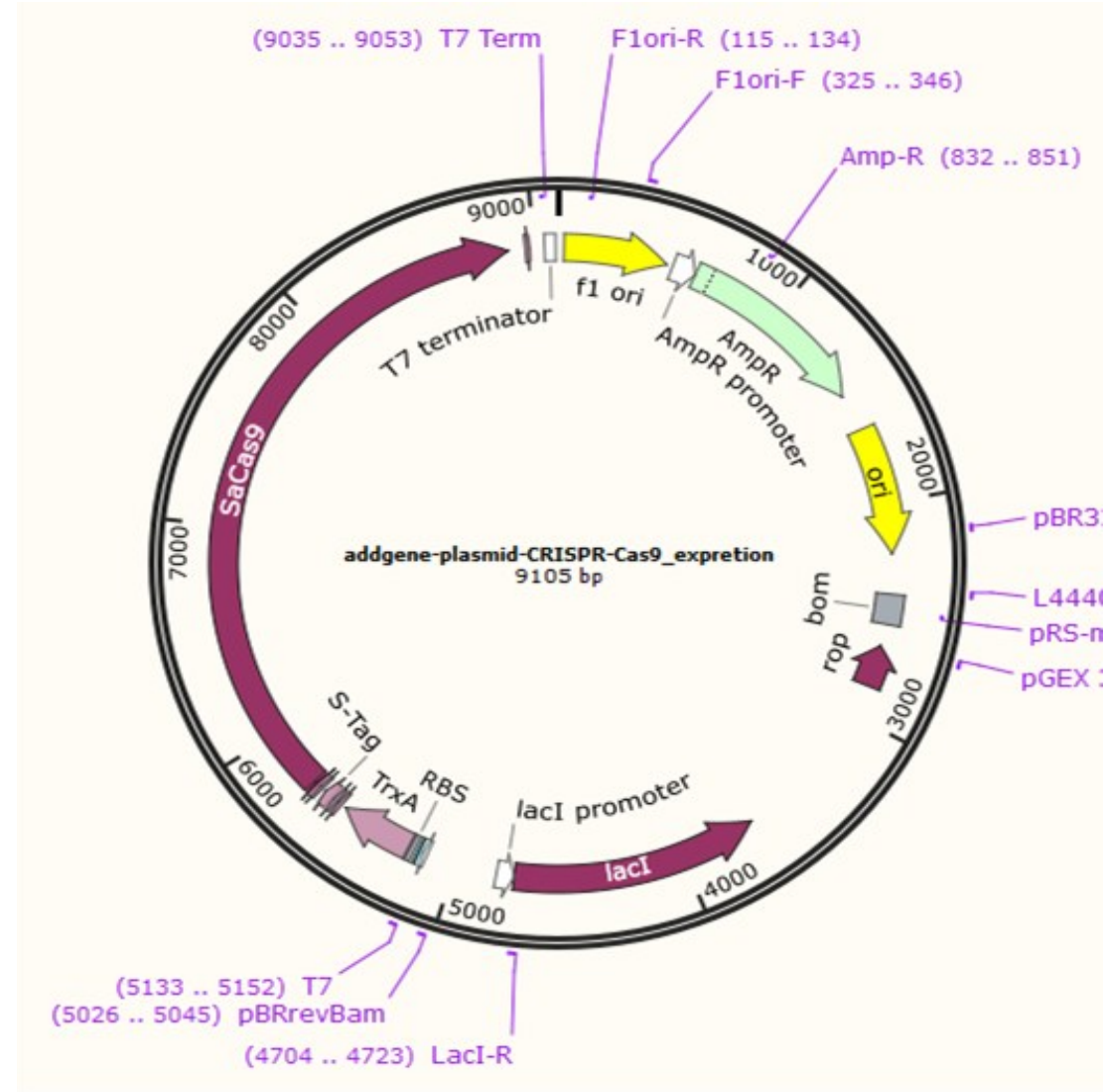
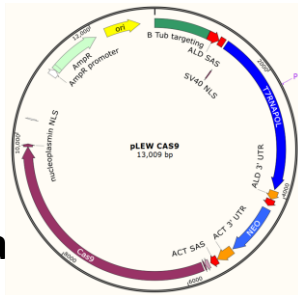


Silenciamiento Génico – SaCas9

S. aureus CAS9 (SaCas9)

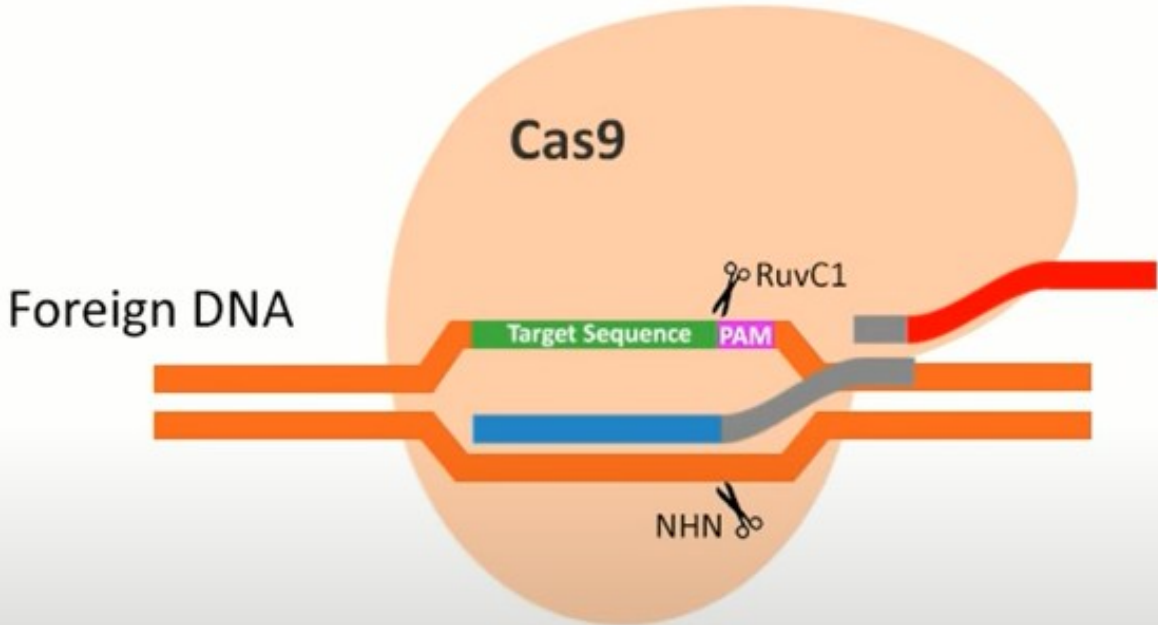


SpCas9
▶ 165 kDa

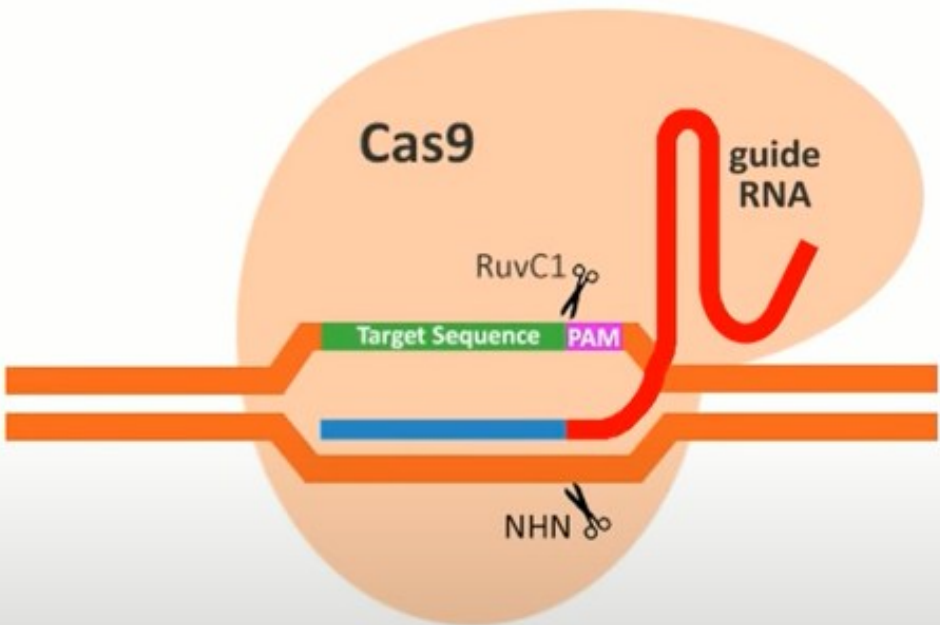


El sistema CRISPR/Cas – diseño de sgRNA (ARN guía)

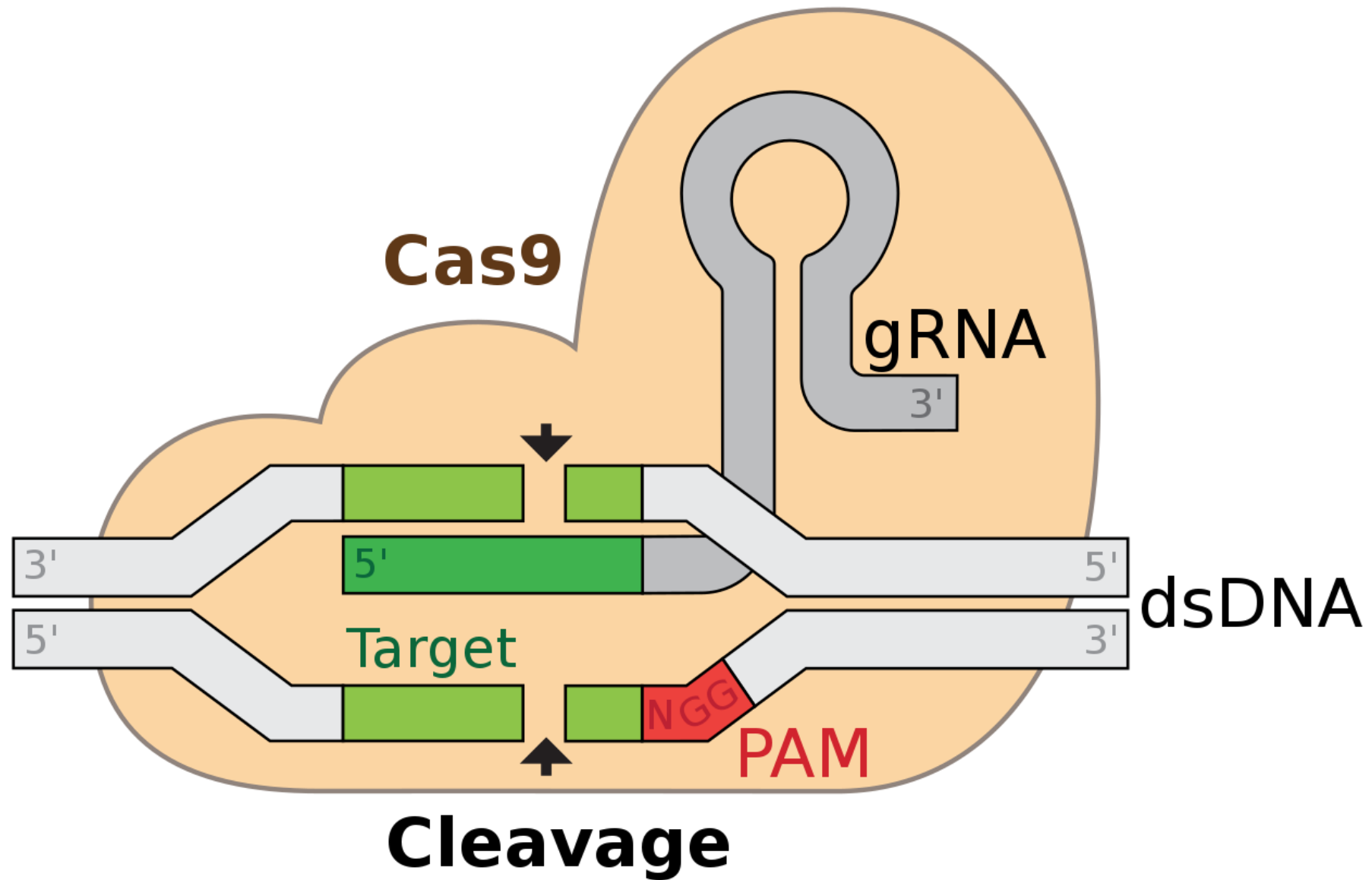
crRNA + tracrRNA



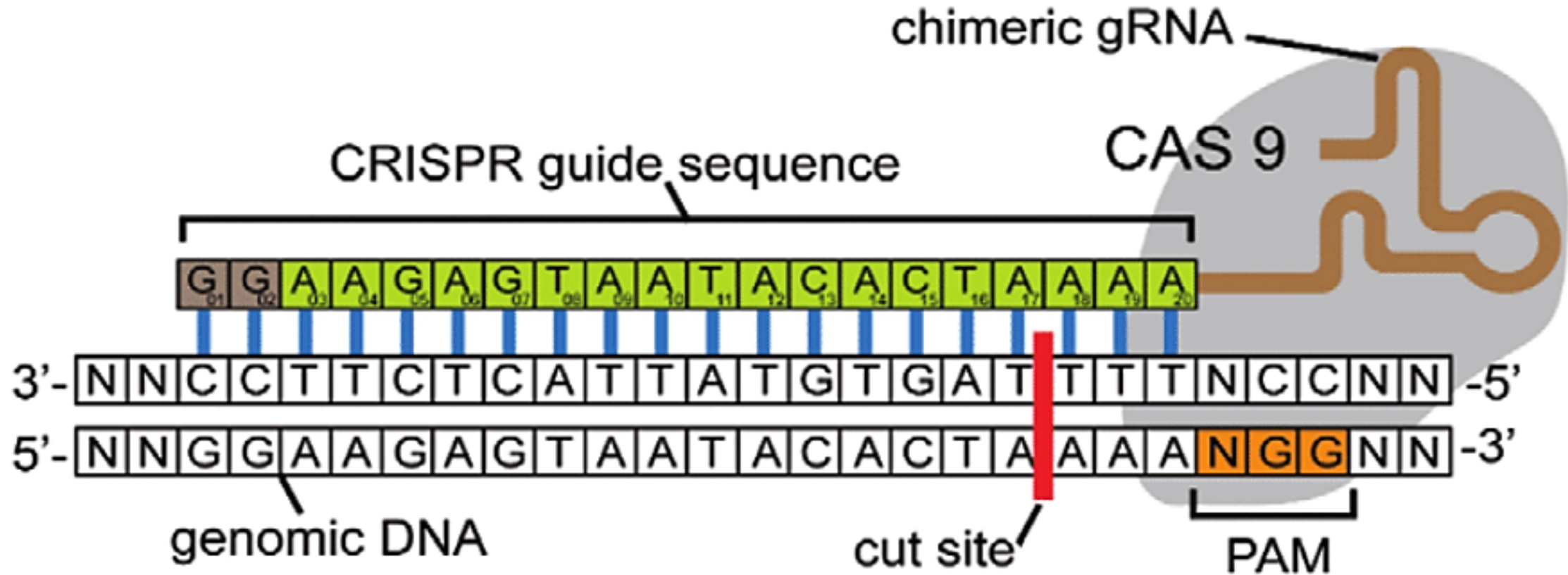
sgRNA



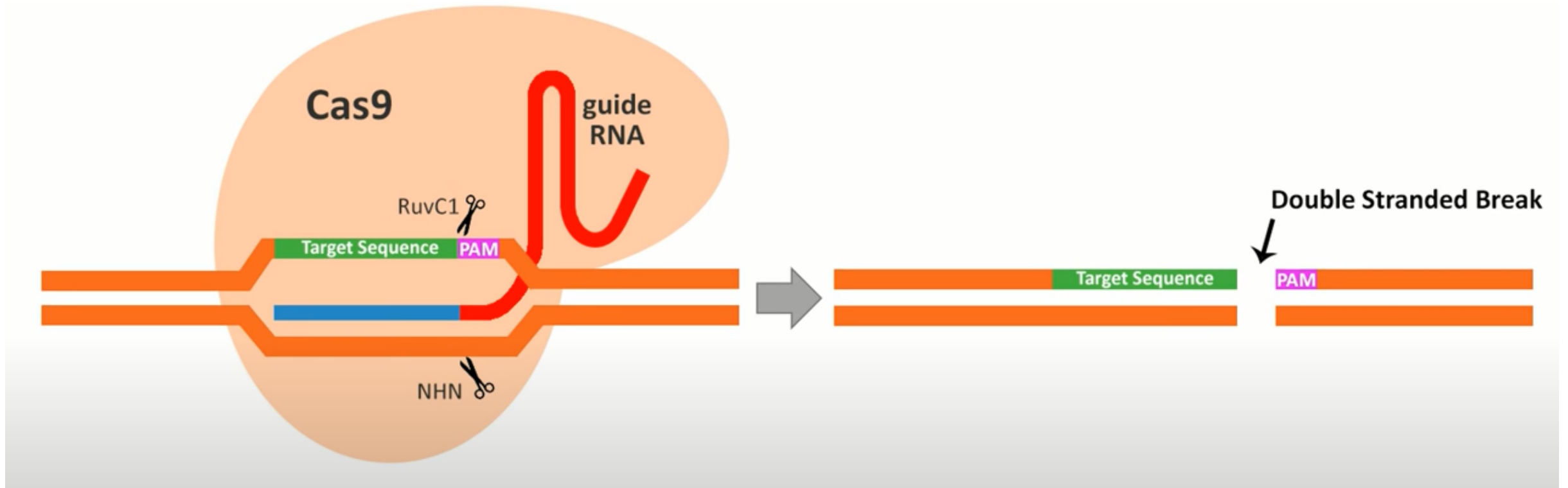
Complejo CAS9 - sgRNA y ADN target



Complejo CAS9 - sgRNA y ADN target



Complejo CAS9 - sgRNA + ADN target + DSB



Complejo CAS9 - Consideraciones básicas para el diseño de sgRNAs

GC Content

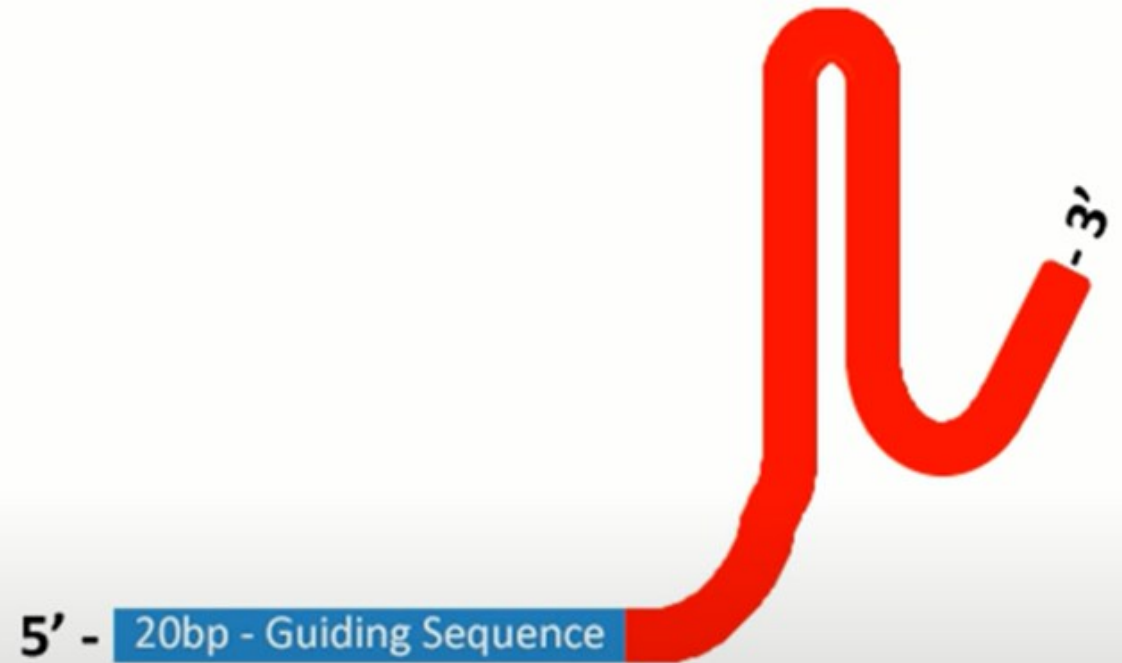
40%-80%

Length

17-24 Base Pairs

Potential Off-Target Effects

17-24 Base Pairs



Complejo CAS9 - Consideraciones básicas para el diseño de sgRNAs

GC Content

40%-80%

Length

17-24 Base Pairs

Potential Off-Target Effects

17-24 Base Pairs

- Posición del MM
- N° de MM
- Concentración del sgRNA

5' - 20bp - Guiding Sequence



Complejo CAS9 - Consideraciones básicas para el diseño de sgRNAs

- ***Knock-out***

- sgRNA que se dirige a un sitio cercano al 3' del ATG de una secuencia de ADN en el primer exón de codificante que comparten todas las isoformas. Apuntar a una región o motivo de secuencia del ADN que sabemos es fundamental para su expresión.

- ***Knock-in***

- sgRNA que corte lo más cerca posible de la mutación, idealmente dentro de 10 pb. Cuanto mayor sea la distancia entre la sgRNA y el sitio blanco de inserción/mutación, menor será la frecuencia de la reparación dirigida por homología.

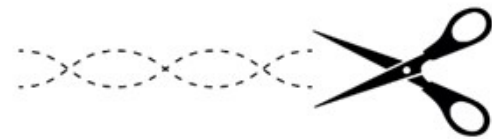
Complejo CAS9 - Herramientas para el diseño de sgRNAs

- CRISPOR – sgRNA design
- CHOPCHOP – sgRNA design
- UCSC genome browser
- BLAST
- IN-SILICO PCR
- PRIMER BLAST
- Vienna RNAfold
- APE – plasmid editor



CRISPOR

CHOPCHOP

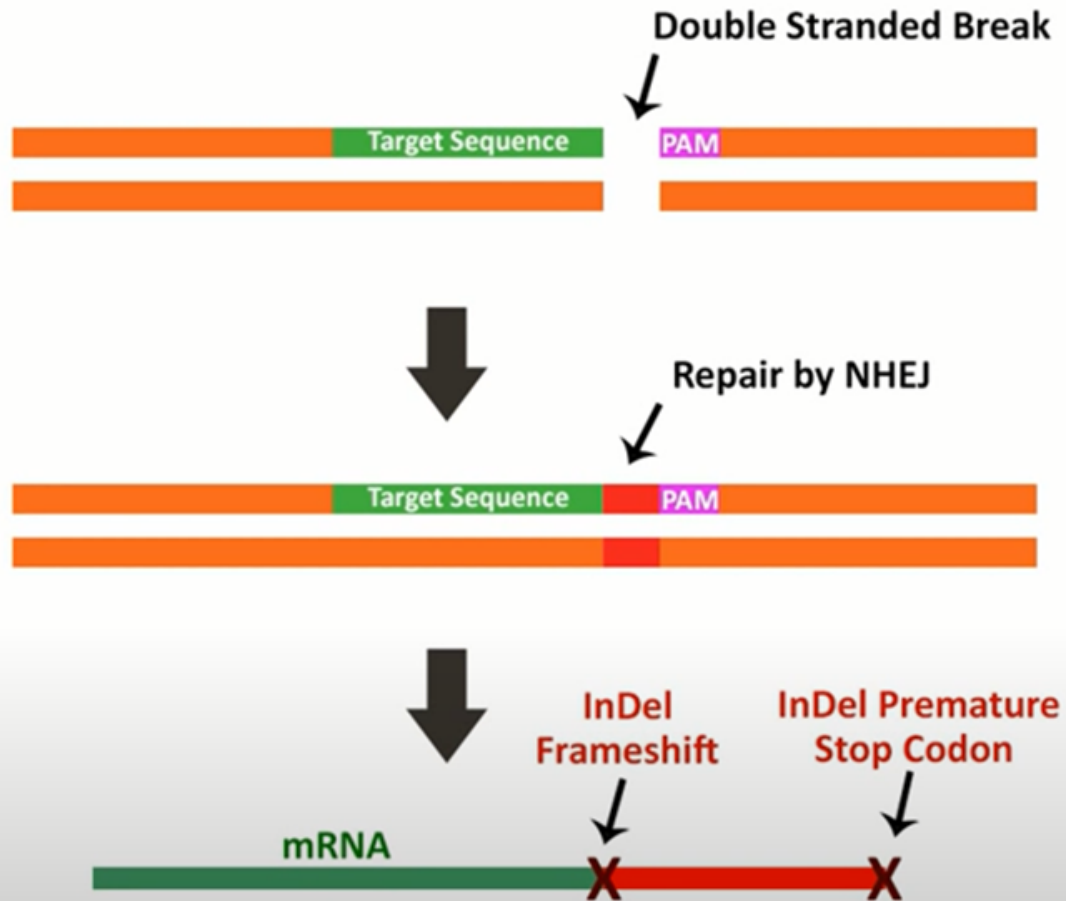


Primer-BLAST

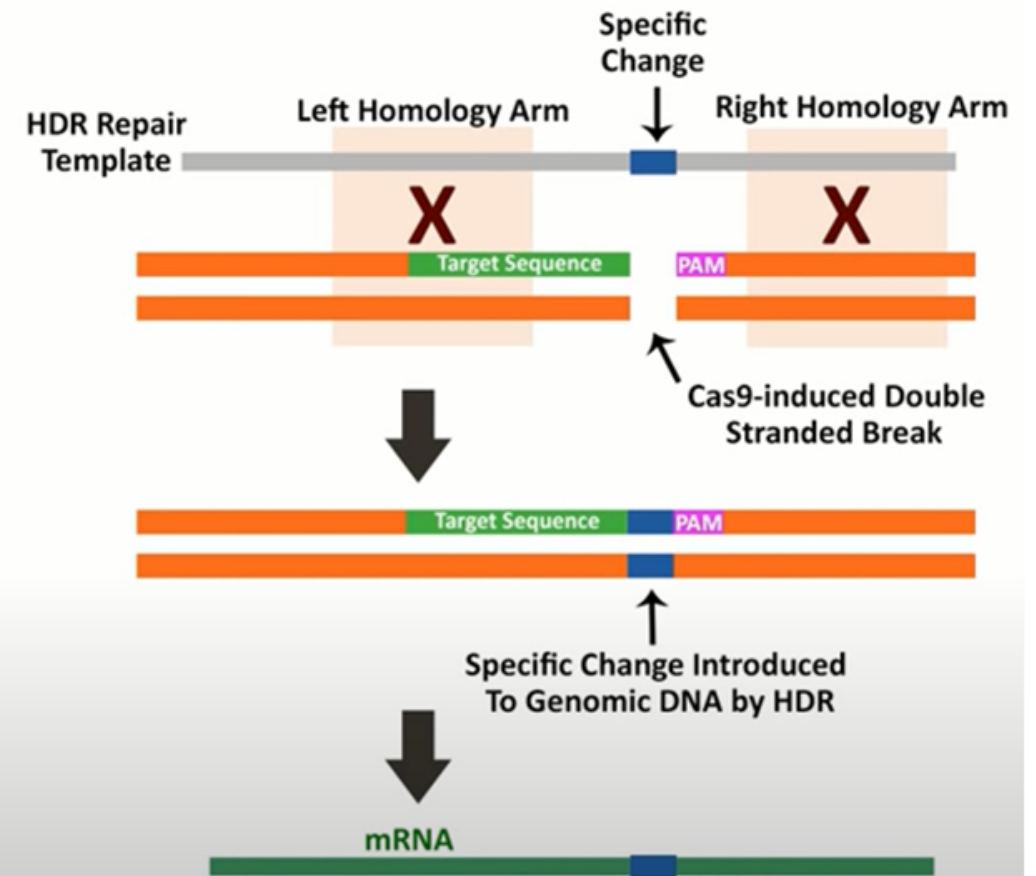
RNAfold WebServer

Complejo CAS9 - Consideraciones básicas para la edición

NHEJ



HDR



Complejo CAS9 - Consideraciones básicas para la edición

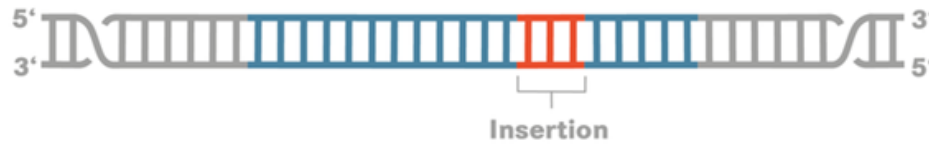
NHEJ

HDR

DSB



**Non-Homologous End
Joining (NHEJ)**

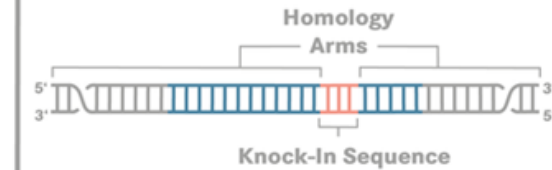


OR

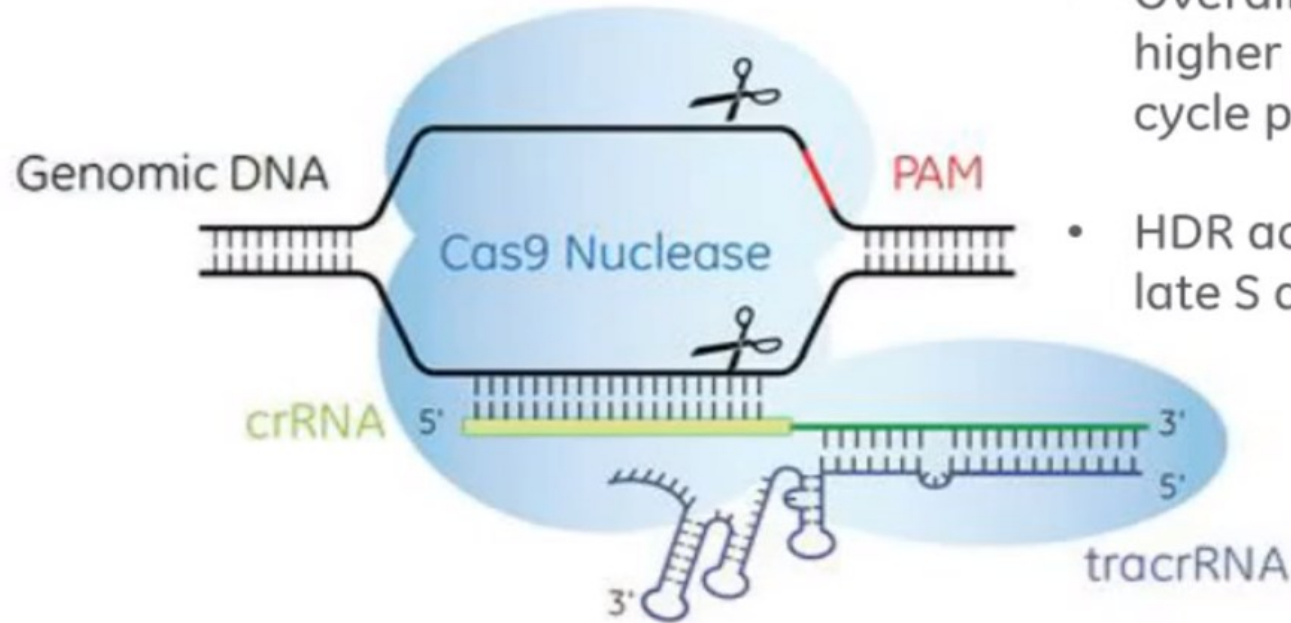


**Homology-Directed
Repair (HDR)**

DNA Donor Template

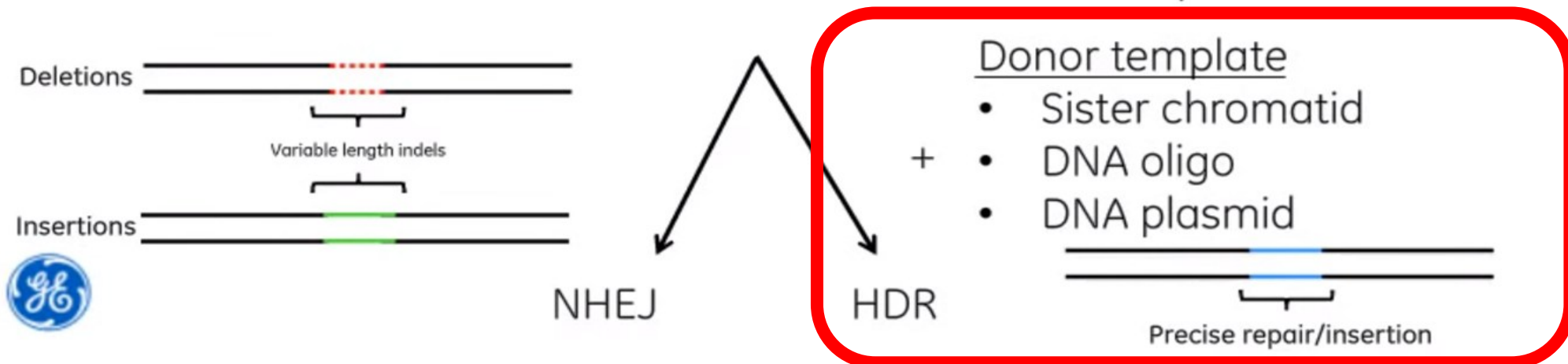


Complejo CAS9 - Consideraciones básicas para la edición

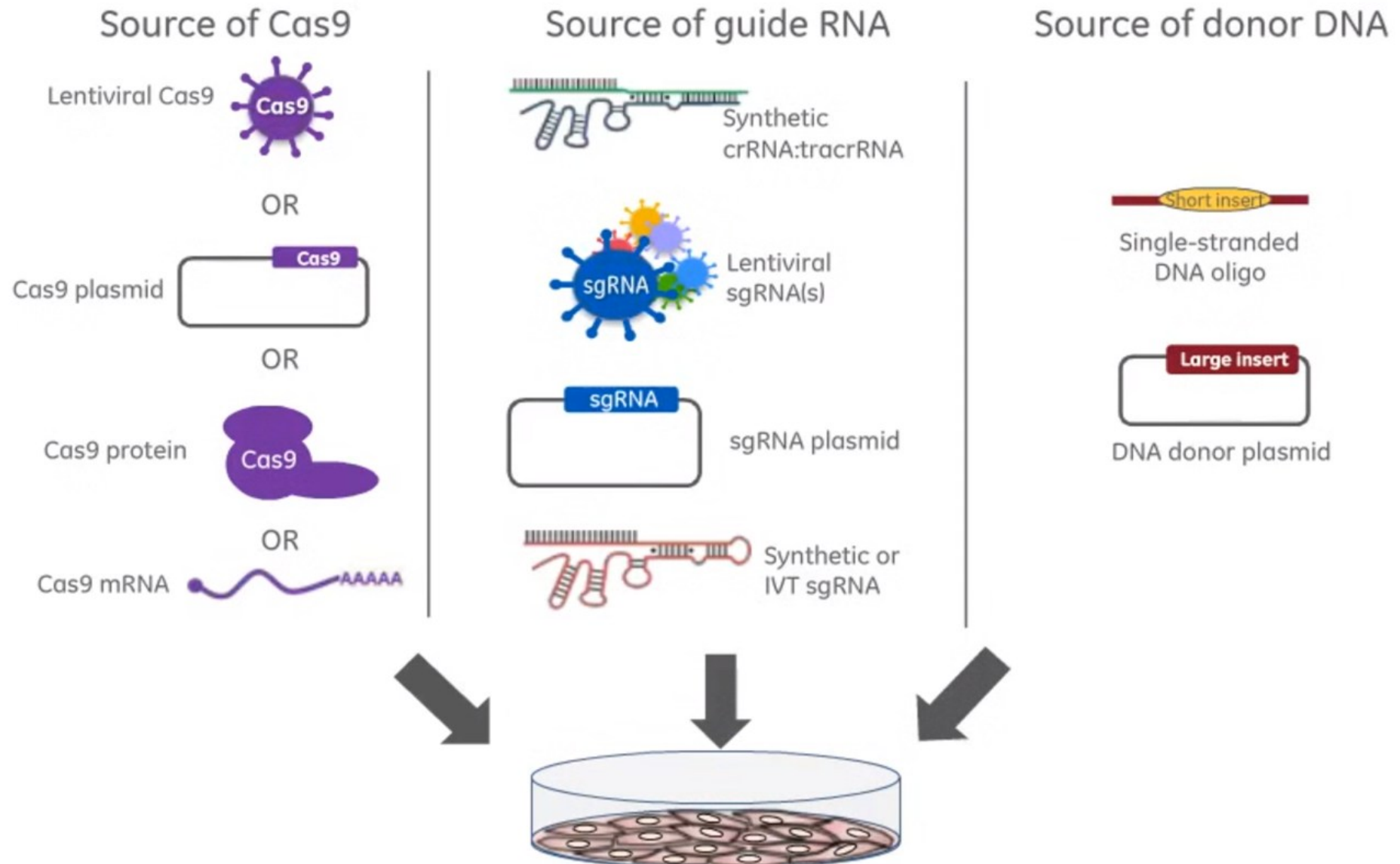


- Overall efficiency of NHEJ is higher than HDR in all cell cycle phases
- HDR activity is restricted to late S and G2 phases

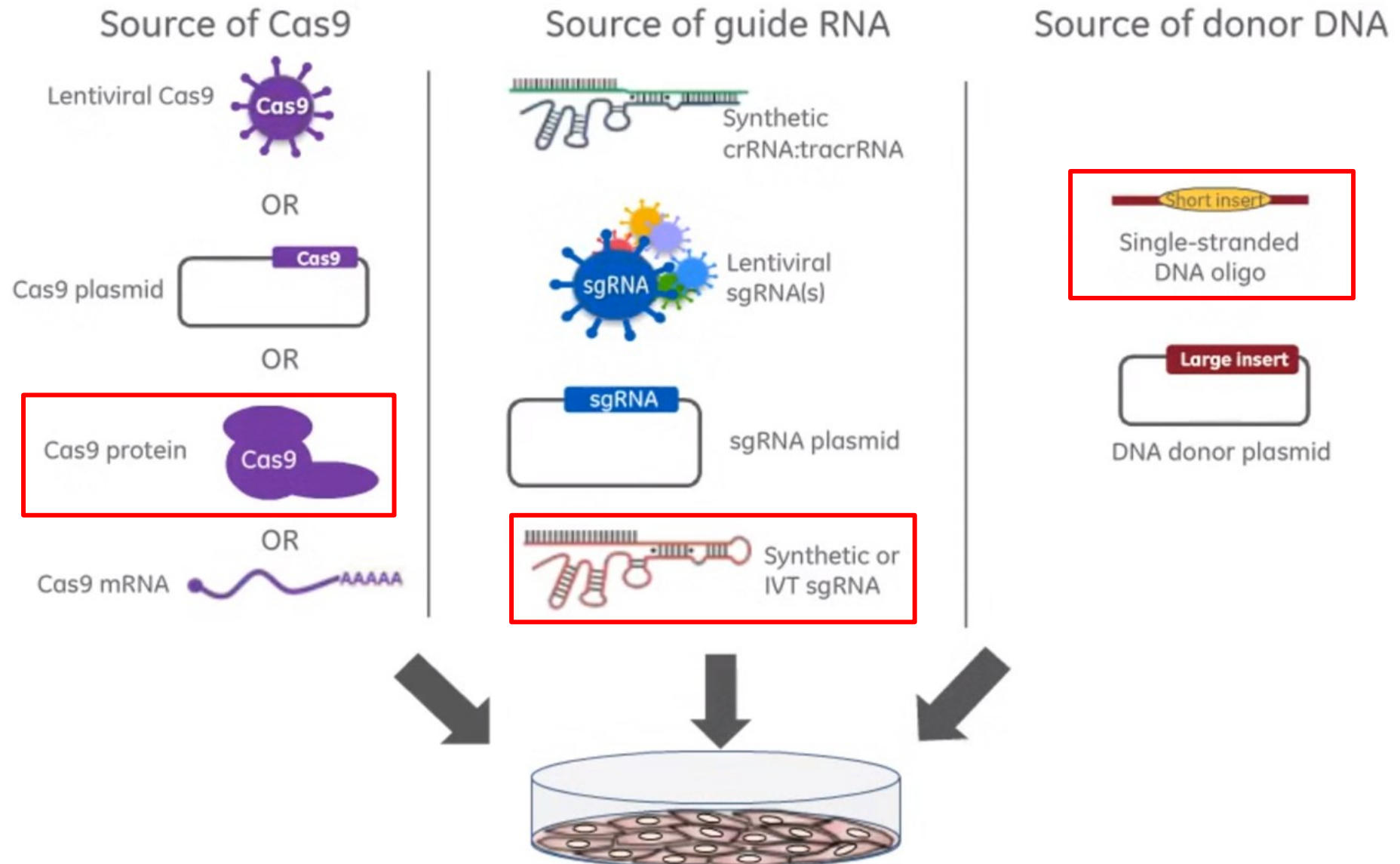
Cas9-induced double-strand break/ DNA Repair



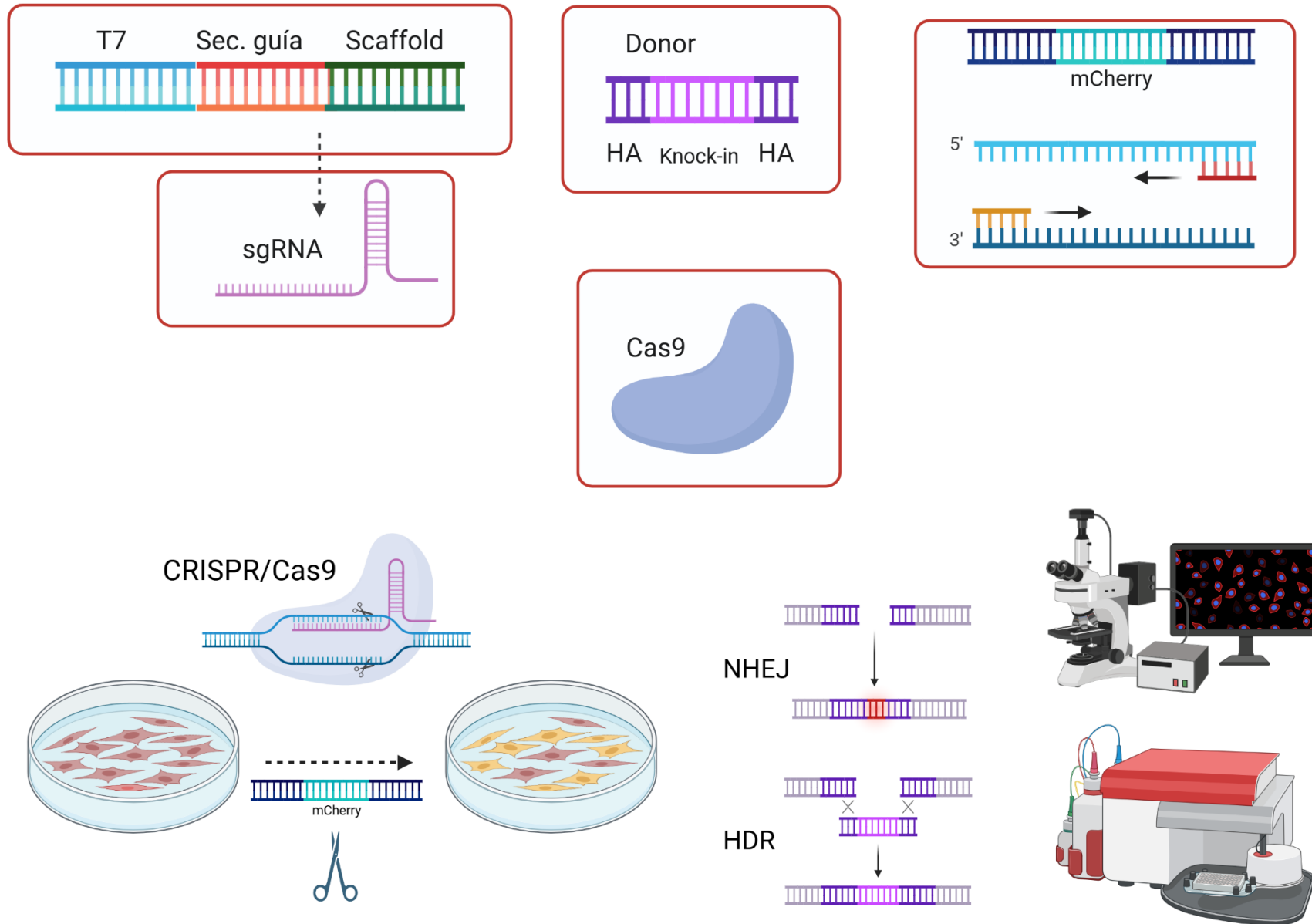
Complejo CAS9 - Flujo de trabajo experimental para HDR



Complejo CAS9 - Flujo de trabajo experimental para HDR



Edición CRISPR/Cas9 de células humanas - componentes



Edición CRISPR/Cas9 de células humanas - componentes

> Primer 1 para IVT sgRNA mCherry - solapante

GAAATTAATACGACTCACTATAGTCAAGTAGTCGGGGATGTCGGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAA

> Primer 2 para IVT sgRNA mCherry - solapante

GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTT

> Los 2 Primers

5' GAAATTAATACGACTCACTATAGTCAAGTAGTCGGGGATGTCGGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAA 3'

5' GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTT 3'

> Primer 1 igual y el Primer 2 complementario Constructo solapante

5' GAAATTAATACGACTCACTATAGTCAAGTAGTCGGGGATGTCGGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAA 3'

3' CAAAATCATGAGACCTTTGTCTTAGATGATTTTGTTCGGTTTTACGGCACAAATAGAGCAGTTGAACAACCGCTCTAAAAAAA 5'

#Encargo a síntesis

> Primer 1 para IVT sgRNA mCherry - solapante 5' -> 3'

GAAATTAATACGACTCACTATAGTCAAGTAGTCGGGGATGTCGGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGA

T7p TAATACGACTCACTATAG

sgRNA TCAAGTAGTCGGGGATGTCGG

> Primer 2 para IVT sgRNA mCherry - solapante 5' -> 3'

AAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGATAAACACGGCATTGTCCTGTTTTAGTAGATTCTGTTCCAGAGTACTAAAAC

>T7 sgRNA completo

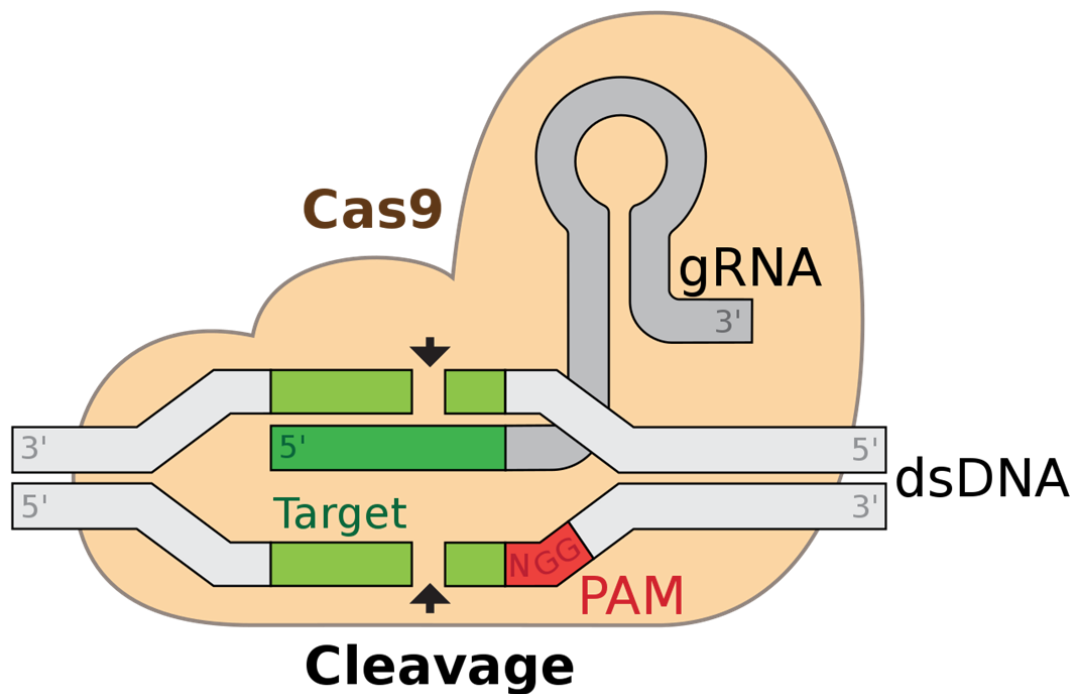
GAAATTAATACGACTCACTATAGTCAAGTAGTCGGGGATGTCGGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTTTT
CTTTAATTATGCTGAGTGATATCAGTTCATCAGCCCCTACACCCAAAATCATGAGACCTTTGTCTTAGATGATTTTGTTCGGTTTTACGGCACAAATAGAGCAGTTGAACAACCGCTCTAAAAAAA

Diseño del Donor (oligonucleótido donante)

Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA

Xiquan Liang, Jason Potter*, Shantanu Kumar, Namritha Ravinder, Jonathan D. Chesnut

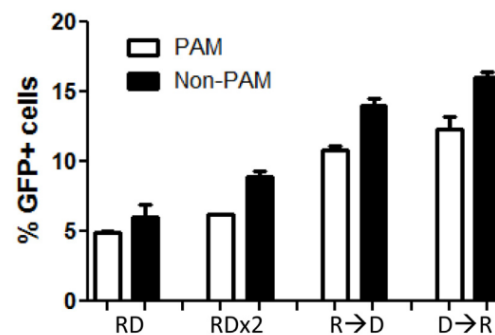
Thermo Fisher Scientific, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA



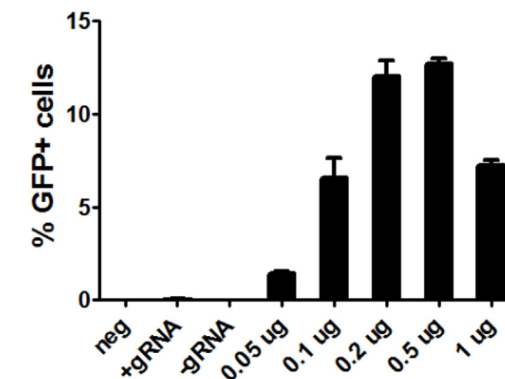
(A) Definition of PAM or non-PAM ssDNA donor



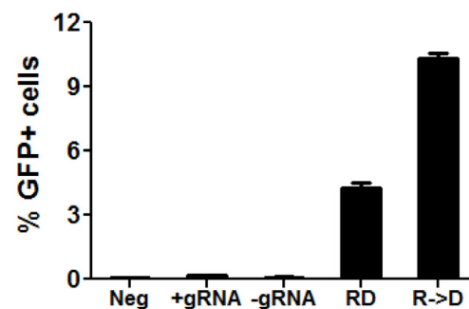
(B) PAM or non-PAM ssDNA (6 nt insertion)



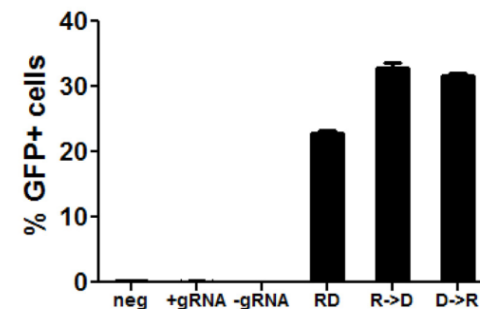
(C) PAM ssDNA dose (6 nt insertion)



(D) dsDNA donor (6 nt insertion)



(E) PAM ssDNA (1 nt substitution)

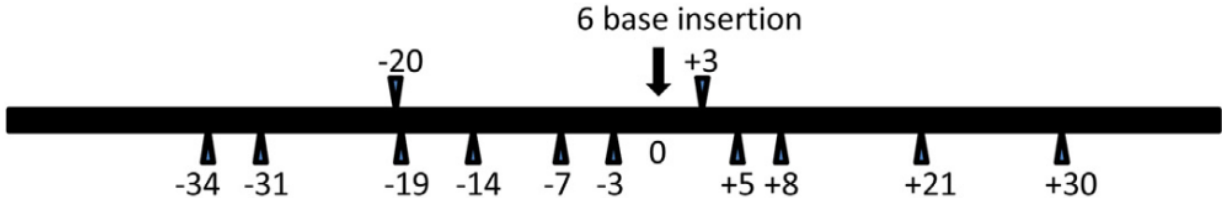
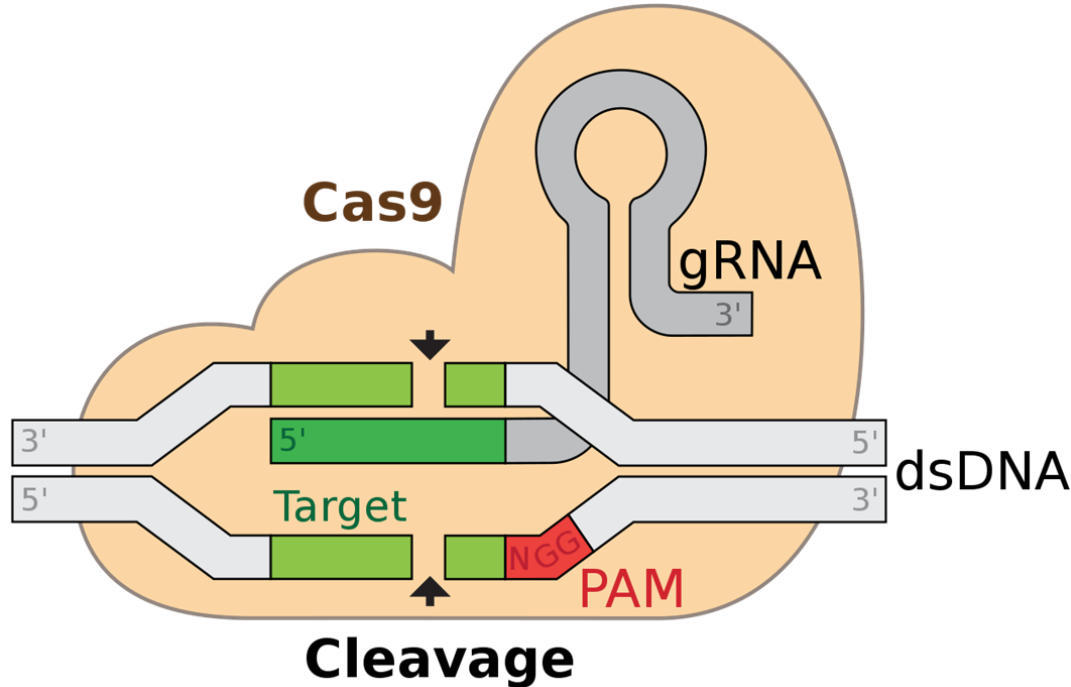


Diseño del Donor (oligonucleótido donante)

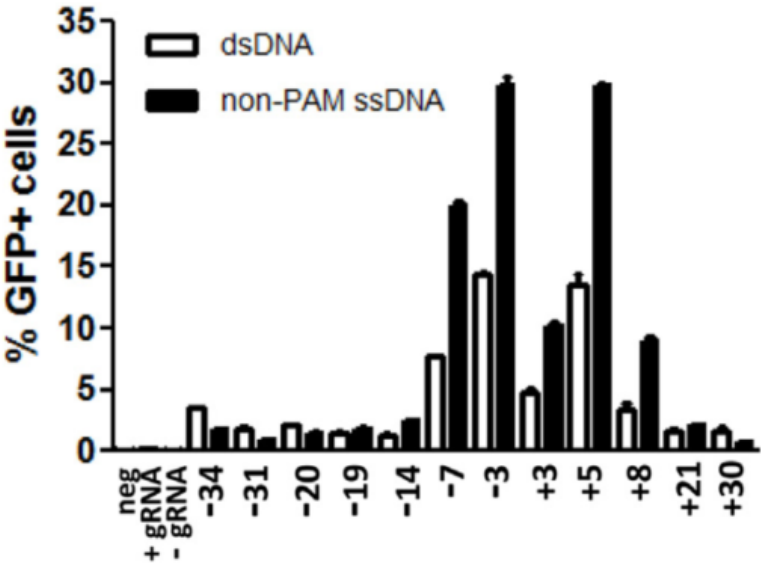
Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA

Xiquan Liang, Jason Potter*, Shantanu Kumar, Namritha Ravinder, Jonathan D. Chesnut

Thermo Fisher Scientific, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA



(C) dsDNA or ssDNA donors



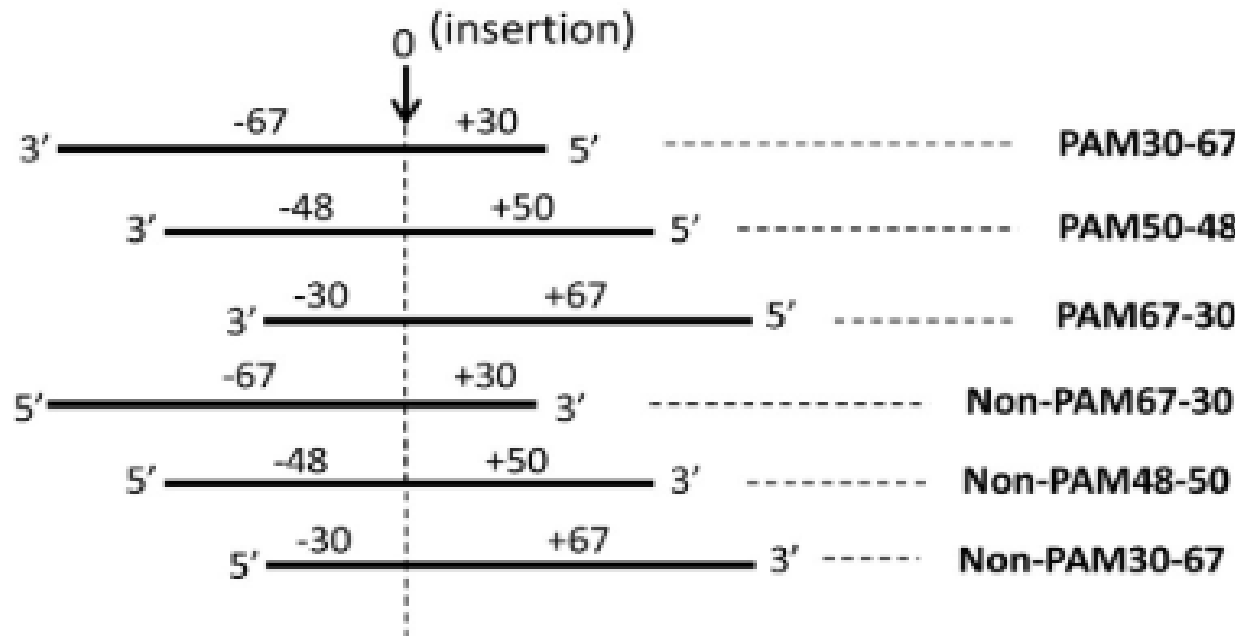
Diseño del Donor (oligonucleótido donante)

Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA

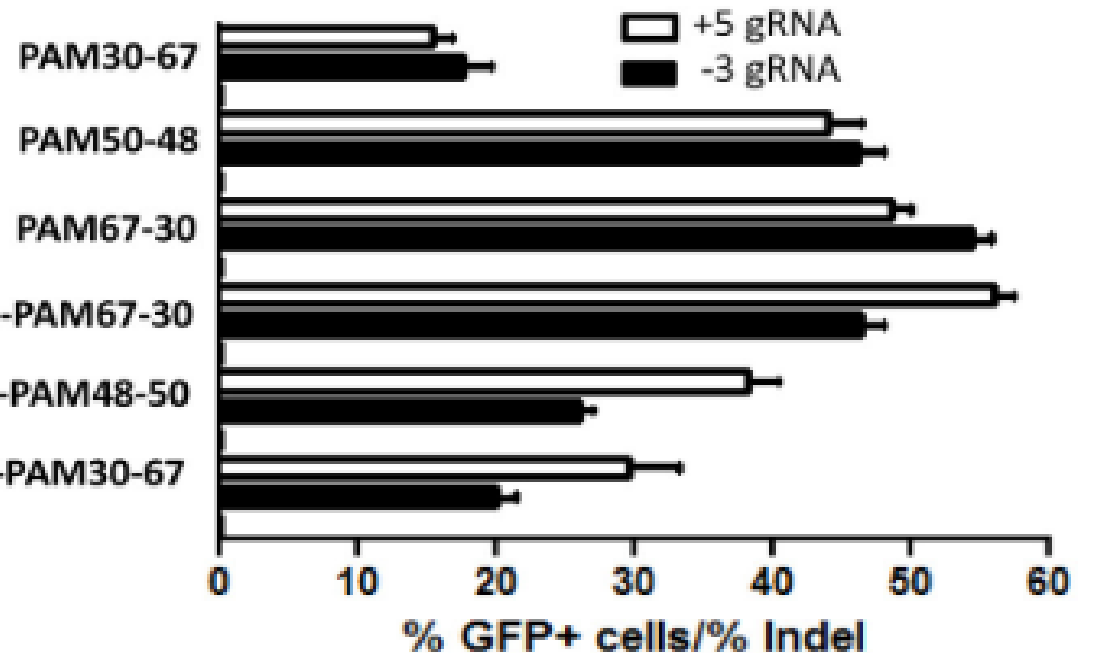
Xiquan Liang, Jason Potter*, Shantanu Kumar, Namritha Ravinder, Jonathan D. Chesnut

Thermo Fisher Scientific, 5781 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA

(B) Asymmetric donor design



(C) Normalized HDR efficiencies



Designing the HDR repair template

WT sequence **TTACGCTGATGAATATTCTA**
TATTCTAAGGCGTTACGCTGATGAATATTCTACGGAATTGCCATAGGCGTTGAACGCTAC
|||||
ATAAGATTCCGCAATGCGACTACTTATAAGATGCCTTAACGGTATCCGCAACTTGCGATG



Desired edit (stop codon)
TATTCTAAGGCGTTACGCTGATGAATATT**AA**ACGGAATTGCCATAGGCGTTGAACGCTAC
|||||
ATAAGATTCCGCAATGCGACTACTTATA**TT**TGCCTTAACGGTATCCGCAACTTGCGATG

HDR template **TTACGCTGATGAATATTCTA**
TATTCTAAGGCGTTACGCTGATGAATATT**AA**ACGGAATTGCCATAGGCGTTGAACGCTAC
← 30–60 base arm mutation 30–60 base arm →



Designing the HDR repair template

WT sequence **TTACGCTGATGAATATTCTA**
TATTCTAAGGCGTTACGCTGATGAAT**ATT**CTACGGAATTGCCATAGGCGTTGAACGCTAC
|||||
ATAAGATTCCGCAATGCGACTACTTAT**A**AAGATGCCTTAACGGTATCCGCAACTTGCGATG



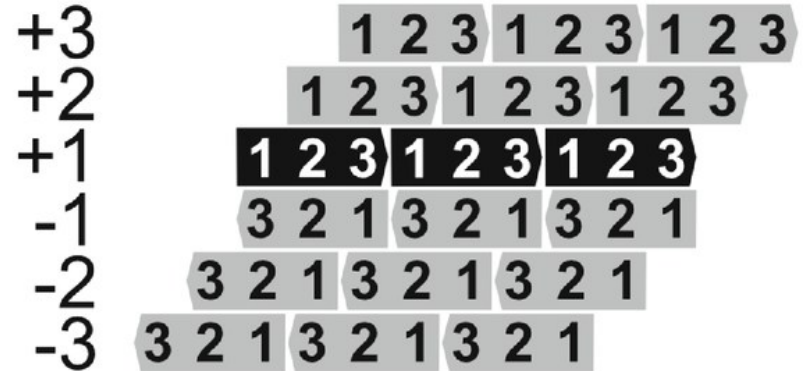
Desired edit (stop codon)
TATTCTAAGGCGTTACGCTGATGAATA**A** **TT**CTACGGAATTGCCATAGGCGTTGAACGCTAC
||||| 33 bp insert |||||
ATAAGATTCCGCAATGCGACTACTTAT**T** **A**AAGATGCCTTAACGGTATCCGCAACTTGCGATG

HDR template **TTACGCTGATGAATATTCTA**
TATTCTAAGGCGTTACGCTGATGAATA **XXX** **TT**AACGGAATTGCCATAGGCGTTGAACGCTAC
← 30–60 base arm 33 nt insert 30–60 base arm →

Diseño del Donor (oligonucleótido donante)

		Second Letter				
		T	C	A	G	
First Letter	T	TTT } Phe TTC } TTA } Leu TTG }	TCT } TCC } Ser TCA } TCG }	TAT } Tyr TAC } TAA Stop TAG Stop	TGT } Cys TGC } TGA Stop TGG Trp	T C A G
	C	CTT } CTC } Leu CTA } CTG }	CCT } CCC } Pro CCA } CCG }	CAT } His CAC } CAA Gln CAG }	CGT } CGC } Arg CGA } CGG }	T C A G
	A	ATT } ATC } Ile ATA } ATG Met	ACT } ACC } Thr ACA } ACG }	AAT } Asn AAC } AAA Lys AAG }	AGT } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	T C A G
	G	GTT } GTC } Val GTA } GTG }	GCT } GCC } Ala GCA } GCG }	GAT } Asp GAC } GAA Glu GAG }	GGT } GGC } Gly GGA } GGG }	T C A G

Frame



Frame 1 → 5'...CCG ATG CTG AAT AGC GTA GAG GTT AGG **TAA** TCA TCA... 3'

Frame 2 → 5'... CGA TGC **TGA** ATA GCG **TAG** AGG TTA GGT AAT CAT CA... 3'

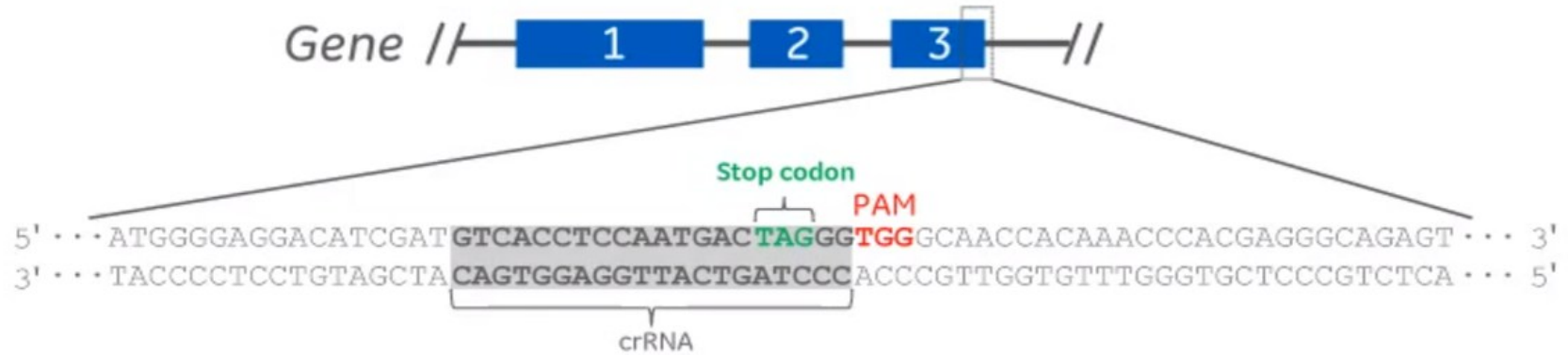
Frame 3 → 5'... GAT GCT GAA **TAG** CGT AGA GGT **TAG** GTA ATC ATC A... 3'

3'...GGC TAC GAC TTA TCG CAT CTC CAA TCC ATT **AGT AGT**... 5' ← Frame 4

3'...GG CTA CGA CTT ATC GCA TCT CCA ATC CAT TAG TAG ... 5' ← Frame 5

3'...G GCT ACG ACT TAT CGC ATC TCC **AAT** CCA TTA GTA ... 5' ← Frame 6

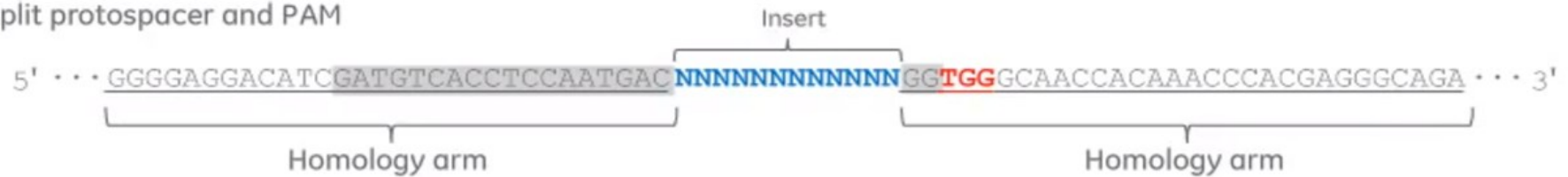
Consideraciones básicas para el diseño del Donor



Modifying the Cas9 target sequence to prevent cleavage

Design options:

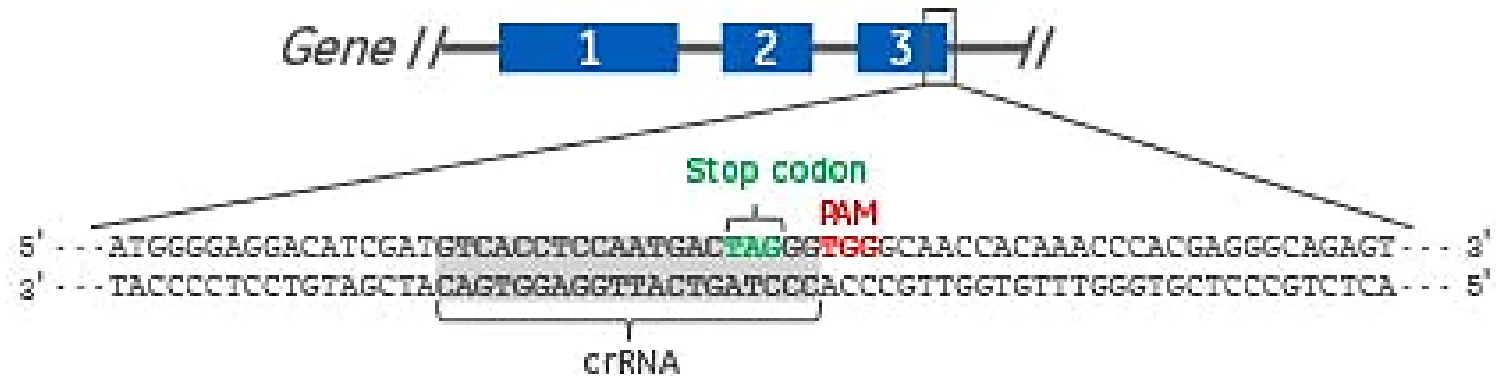
- 1) Split protospacer and PAM



- 2) Silent SNP(s) in crRNA target and/or PAM



Consideraciones básicas para el diseño del Donor

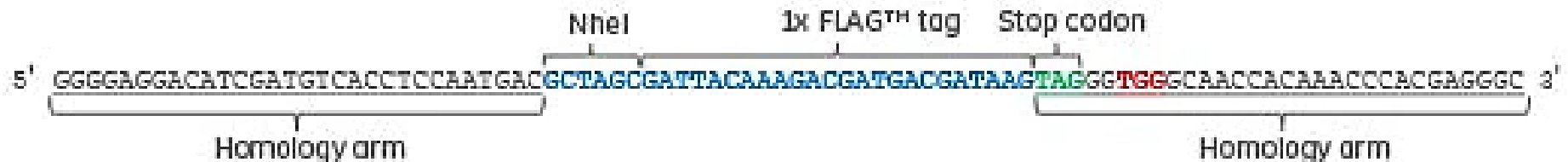


Insertion types

Replacing a nucleotide:




Inserting an epitope tag:



Consideraciones básicas para el diseño del Donor


HDR Donor Designer

Single Strand Donor

Organism 

Human (Homo sapiens)




Gene target 

581

Transcript 

NM_138761.3 (+) chr19:48954859



Guide RNA target sequence 

ACTCGGAAAAAGACCTCTCGGG

Staphylococcus aureus Cas9 - PAM:NNGRRT



PAM relative to target After

Repeat Sequence GUUUUAGUACUCUGGAAACAGA

Relative to Guide 3

Target sequence length 22

Cut relative to target 5' start Sense 19 • Anti-sense 19

<https://horizondiscovery.com/en/ordering-and-calculation-tools/edit-r-hdr-donor-designer>

Consideraciones básicas para el diseño del Donor

Display target region

Select modification location ?

chr19:48,956,184 chr19:48,956,272

CCTCTCTCCTGCAG GATGATGCGCCGTGGACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTCTGACGG

R M I A A V D T D S P R E V F F R V A A D M F S D G

5' homology arm length ? Sequence to insert ? 3' homology arm length ?

Sequence to remove ?
unlock and drag slider to select

Consideraciones básicas para el diseño del Donor

Display target region

Select modification location ?

chr19:48,956,184 chr19:48,956,272

CCTCTCTCCTGCAG GATGATTGCCGCCGTGGACACAGACTCCCCCGAGAGGTCTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGG

R M I A A V D T D S P R E V F F R V A A D M F S D G

5' homology arm length ? Sequence to insert ? 3' homology arm length ?

Sequence to remove ?
unlock and drag slider to select

Generate DNA donor

Consideraciones básicas para el diseño del Donor

Generate DNA donor

Native donor sequence [?](#)

TGATTGCCGCCGTGGACACAGACTCCCCC**TAGTAGTAC**GAGAGGTCTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAACTTC

M I A A V D T D S P L V V R E V F F R V A A D M F S D G N F

Recommended donor sequence [?](#)

(89) TGATTGCCGCCGTGGACACAGACTCCCCC**TAGTAGTAC**GAGAGGTCTTTTCCGAGTGGCAGCTGACATGTTTTCTGACGGCAACTTC

Name [?](#)

Scale

Please Select

Purification [?](#)

None

Include stabilizing modifications [?](#)

Post Synthesis: Desalt