

MANUAL de MÓDULO IV BIOINGENIERÍA MOLECULAR y CELULAR

En este módulo práctico se abordarán distintas metodologías vinculadas a la edición génica mediante CRISPR-Cas9 utilizando componentes recombinantes. Como sistema modelo, se generarán mutantes de pérdida de función de la proteína fluorescente mCherry, expresada de manera estable como transgén en una línea celular humana inmortalizada. La disrupción de este gen resulta en una pérdida de fluorescencia lo que permite su detección mediante microscopía de fluorescencia y 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 III

- Expresar la proteína SaCas9 recombinante en *Escherichia coli* mediante un sistema de inducción controlado por IPTG.
- Comprender los fundamentos del uso de sistemas de expresión bacterianos y el rol de los distintos elementos del plásmido (promotor, tags de fusión, marcadores de selección, etc.).
- Aplicar técnicas de lisis bacteriana para la obtención de fracciones solubles e insolubles de proteínas recombinantes.
- Purificar la proteína SaCas9 mediante cromatografía de afinidad utilizando resinas de Ni-Sepharose basadas en interacción con el tag 6xHis.
- Analizar las distintas fracciones obtenidas durante la purificación (lisado, percolado, lavados y eluato) para evaluar la eficiencia del proceso.
- Preparar y correr geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para la separación de proteínas según su peso molecular.
- Evaluar la expresión y pureza de la proteína recombinante mediante tinción con azul de Coomassie.
- Integrar los conceptos de expresión, purificación y análisis de proteínas en el contexto de la generación de herramientas funcionales para edición génica.

Sección III

III. Expresión, purificación y análisis de proteínas recombinantes SaCas9

Se expresará la proteína SaCas9 recombinante en bacterias *Escherichia coli* (cepa Rosetta™ 2(DE3) pLysS), transformadas con el plásmido p6xHis-NLS-SaCas9 (Addgene), cuyo mapa se muestra en la Figura 1. La proteína SaCas9 se encuentra fusionada a un tag de 6 histidinas (6xHis) en el extremo C-terminal, lo que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel. Además, presenta un tag de tioredoxina (TrxA) en el extremo N-terminal, que mejora la solubilidad y el correcto plegamiento de la proteína recombinante. La tioredoxina es una proteína con funciones redox que favorece el plegamiento correcto de proteínas recombinantes, mejorando su estabilidad y solubilidad. La incorporación del tag TrxA en la proteína recombinante permite que la proteína se pliegue correctamente y que se mantenga en su estado reducido, lo que mejora su estabilidad y solubilidad. Además, el tag TrxA se utiliza como una etiqueta para la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad, ya que se une específicamente a las resinas de afinidad que contienen ligandos para la tioredoxina. La expresión de la proteína de fusión se da a partir de un promotor T7lac (no mostrado en la Figura 1). En este sistema, la purificación se realiza principalmente mediante el tag 6xHis, mientras que el tag TrxA cumple un rol estructural.

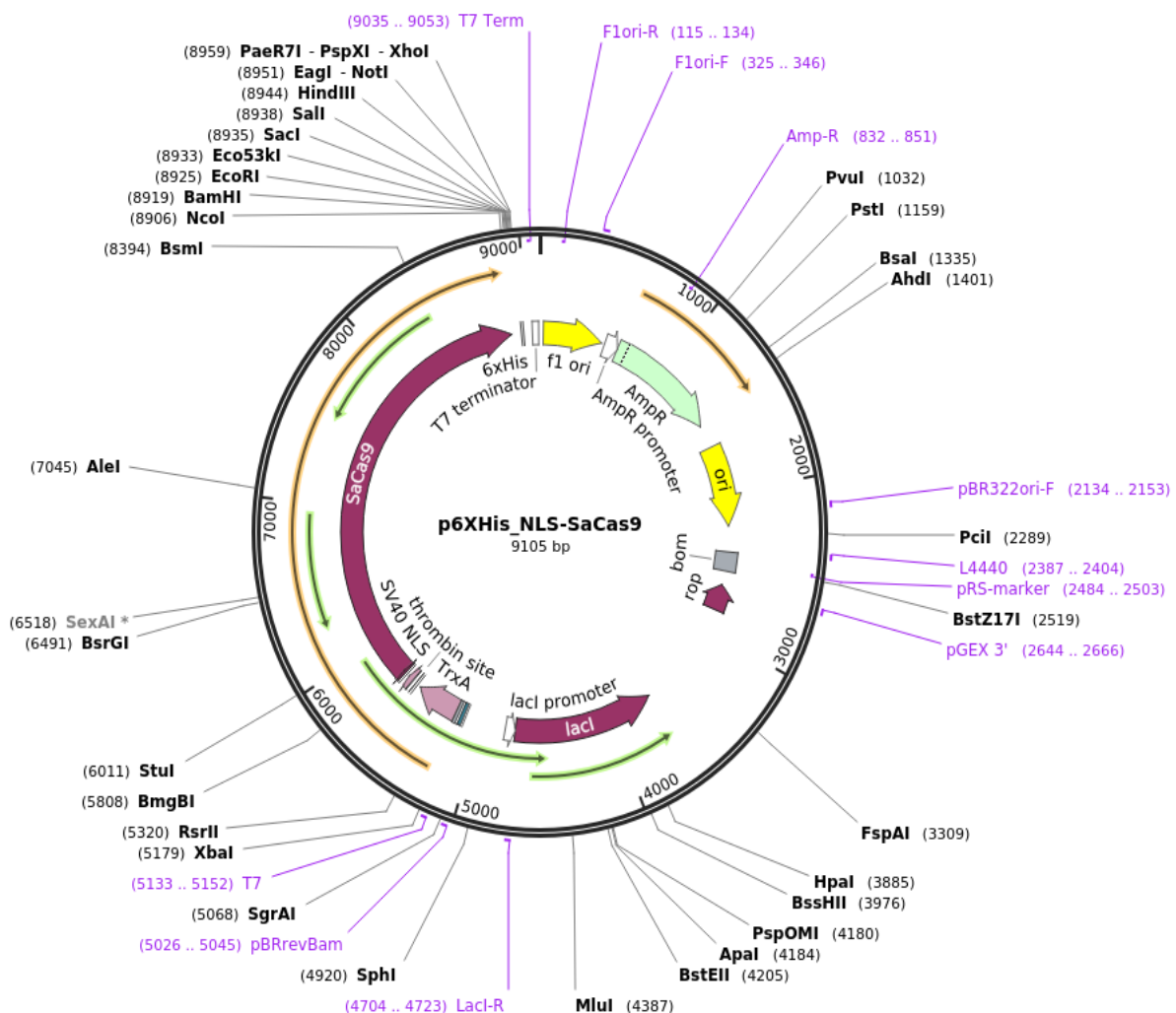


Figura 1. Plásmido conteniendo el gen codificante para la proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus*. El gen SaCas9 se encuentra en fase con una región de 6 Histidinas (6xHis) en su extremo C-terminal y con el péptido TrxA en su extremo N-terminal. SV40 NLS: señal de localización nuclear. lacI: gen codificante para el represor lacI. T7 terminator: secuencia necesaria para la terminación efectiva de la transcripción del gen de interés. f1ori: origen de replicación del bacteriófago f1. ori: origen de replicación. bom: secuencia de ADN importante para la segregación de los cromosomas en las células hijas durante la división celular. rop: región codificante de la proteína represora de la replicación Rop, que controla el número de plásmidos en la célula. thrombin site: sitio de corte con trombina. AmpR: gen de resistencia a ampicilina.

Metodología

Inocular 25mL del medio 2xYT suplementado conteniendo 25µL de Ampicilina de concentración 100mg/mL, con 25µL del Stab Rosetta 2(DE3) y crecer las bacterias a 37°C, con agitación a 200rpm durante toda la noche. (Esta tarea fue realizada por el equipo docente)

Parte 1

1. Inducción de la expresión de la SaCas9

Pasar 7 mL del precultivo preparado por los docentes a un matraz de 1L conteniendo 250mL de medio 2xYT suplementado con 250 µL de ampicilina de concentración 100mg/mL y dejar crecer a 37°C con agitación a 200 rpm, hasta una densidad óptica a 600nm (DO 600nm) de 0,4-0,6 UA.

Tomar 1 mL de cultivo sin inducir, centrifugar a 10.000 rpm durante dos minutos, resuspender el pellet en agua Milli-Q hasta ajustar la muestra a una densidad óptica equivalente a 5 unidades de absorbancia (UA) y se guarda a -80°C.

Inducir la expresión de SaCas9 mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, y luego se incuba con agitación 200 rpm a 18°C durante 24hs.

A las 24 horas, tomar 1 mL de cultivo inducido, centrifugar a 10.000 rpm durante dos minutos y resuspender el pellet en agua mQ (Milli- Q) hasta llevarlo a 5UA. Se guarda a -80°C (Esta última actividad la realizará el equipo docente).

Parte 2

2. Purificación de SaCas9 por cromatografía de afinidad

Resuspender cada pellet del cultivo inducido en 6 mL de PBS 1X, mezclar con abundante pipeteo.

Una vez homogeneizado el pellet en PBS 1X, agregamos a cada tubo de 6mL:

- 12 µL de PMSF 100mM
- 100 µL de Lisozima 50mg/mL
- 5 µL de DNAsa 1U/µL
- 3 µL de RNAsa 10mg/mL

Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

Durante la incubación de 30 minutos, preparamos la columna de Ni-Sepharose como se indica a continuación.

Preparación de resina Ni-sepharose

- lavar 200 µL de Ni-sepharose con 600 µL de agua destilada.
- Equilibrar la resina con 400 µL de PBS.
- Repartir en cuatro tubos de 100 µL.

Luego de pasados los 30 minutos, centrifugar a 12.000 × g durante 10 minutos y guardar el sobrenadante (Fracción soluble). Guardar 500 µL para su análisis posterior por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida).

Resuspender el pellet en 500 µL de agua mQ (Fracción insoluble)

3. Purificación de la SaCas9

Incubar la resina con la fracción soluble del lisado bacteriano durante 30 min.

Centrifugar a **baja velocidad (500 × g)** y guardar 300 µL del sobrenadante (**Percolado**)

Lavar la resina con 1,5 mL PBS 1X durante 5 min y luego con 1,5 mL PBS 1X/50mM imidazol durante 5 min.

Centrifugar a **baja velocidad (500 × g)** y guardar 100 µL de cada lavado (**Lavados I y II**)

Incubar la resina Ni-sepharose conteniendo la SaCas9 con 300 µL de PBS 1X conteniendo 500 mM imidazol durante 15 min (paso de elución). Centrifugar a **baja velocidad 500 xg** y guardar el **Eluato** conteniendo la SaCas9 purificada.

Actividad: Dibuje que espera ver en el gel

Parte 3

4. Análisis de la Inducción y purificación de la Cas9

Preparar 1 gel de poliacrilamida al 10%

	gel separador 10% (2 geles)
Acrilamida:Bisacrilamida 29:1	3,2 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8.8 SDS 0,4%	2,6 mL
Agua destilada	4,2 mL
APS 10%	60 µL
TEMED	10 µL

	gel concentrador 4% (2 geles)
Acrilamida:Bisacrilamida 29:1	487 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8 SDS 0,4%	937 µL
Agua destilada	2,28 mL
APS 10%	25 µL
TEMED	5 µL

Preparar 20 µL de cada muestra mezclando con el volumen necesario de Buffer de carga 4X y hervir las muestras durante 5 minutos a 95 °C.

Cargar las muestras en el gel junto con un marcador de peso molecular de proteínas y correr el gel a 140 V hasta que el frente de corrida alcance el extremo inferior.

Teñir el gel durante una hora con azul de Coomassie.

Desteñir el gel con agua destilada hasta obtener un fondo claro

Tomar una fotografía del gel.