

EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR/CAS9
da Teoria à Prática

CONSELHO EDITORIAL

André Costa e Silva

Cecilia Consolo

Dijon de Moraes

Jarbas Vargas Nascimento

Luis Barbosa Cortez

Marco Aurélio Cremasco

Rogério Lerner



MARI CLEIDE SOGAYAR
RAQUEL ARMINDA CARVALHO MACHADO
(coordenadoras)

EDIÇÃO GÊNICA POR CRISPR/CAS9
da Teoria à Prática

AUTORES PRINCIPAIS

Mariele Santos Moraes-Almeida | Henrique César Jesus-Ferreira

AUTORAS CORRESPONDENTES

Mari Cleide Sogayar | Raquel Arminda Carvalho Machado

DEMAIS AUTORAS

Camila Leal-Lopes | Ana Claudia Oliveira Carreira

2022

Edição Gênica por CRISPR/Cas9: da Teoria à Prática

© 2022 Mari Cleide Sogayar e Raquel Arminda Carvalho Machado (coordenadoras)
Editora Edgard Blücher Ltda.

Publisher Edgard Blücher

Editor Eduardo Blücher

Coordenação editorial Jonatas Eliakim

Produção editorial Kedma Marques

Diagramação e capa Laércio Flenic

Revisão de texto Samira Panini

Imagem da capa iStockphoto

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo Novo Acordo Ortográfico, conforme 5. ed.
do Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa,
Academia Brasileira de Letras, março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer
meios, sem autorização escrita da Editora.

Todos os direitos reservados pela Editora
Edgard Blücher Ltda.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Angélica Ilacqua CRB-8/7057

Edição gênica por CRISPR : CAS9 da teoria à prática /
coordenado por Mari Cleide Sogayar, Raquel Arminda Carvalho
Machado; autores principais: Mariele Santos Moraes-Almeida,
Henrique César Jesus-Ferreira; autora correspondente: Raquel
Arminda Carvalho Machado; demais autoras: Camila Leal-Lopes,
Ana Claudia Oliveira Carreira. - São Paulo : Blucher, 2022.

78 p. : il.

Open access

Bibliografia

ISBN 978-65-5550-126-1 (impresso)

ISBN 978-65-5550-127-8 (eletrônico)

1. Genética 2. Biologia molecular I. Sogayar, Mari Cleide II.
Machado, Raquel Arminda III. Moraes-Almeida, Mariele Santos
IV. Jesus-Ferreira, Henrique César V. Machado, Raquel Arminda
Carvalho VI. Leal-Lopes, Camila VII. Carreira, Ana Claudia Oliveira

22-1296

CDD 572.8

Índices para catálogo sistemático:

1. Genética

PREFÁCIO

Este livro surgiu a partir de uma atividade do nosso grupo de pesquisa durante o Curso Avançado de Inverno, realizado em 2019, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, para o qual nós nos comprometemos a montar um módulo de treinamento teórico e prático sobre a tecnologia de Edição Gênica CRISPR/Cas9, a qual havia sido implementada em nosso laboratório pelo Dr. Carlos DeOcesano-Pereira e a Dr^a. Raquel A. C. Machado e que vem sendo utilizada, desde então, em diversos projetos de pesquisa.

Como o treinamento envolvia alunos de Pós-graduação de outros estados do país e de diferentes níveis de conhecimento sobre as tecnologias de Biologia Molecular e Engenharia Genética, a então mestranda Mariele de Almeida e o doutorando Henrique Cesar de Jesus Ferreira elaboraram um Roteiro dos Experimentos contendo as bases teóricas e detalhando os procedimentos práticos da tecnologia. Dessa iniciativa, surgiu um Manual que foi extremamente útil para o treinamento do grupo participante de alunos.

A importância crescente da Edição Gênica tanto na pesquisa básica como na terapêutica de diversas doenças, a ponto de se tornar o motivo da premiação do Nobel de Química em 2020 às duas pesquisadoras que mais contribuíram

para o estabelecimento da tecnologia de CRISPR/Cas9 (Emmanuele Charpentier e Jennifer Doudna), nos motivaram a transformar o Manual utilizado no Curso de Inverno num material que pudesse ser utilizado por qualquer pessoa que desejasse utilizar esta tecnologia. Outros membros do nosso grupo de pesquisa aderiram então à desafiante tarefa de transformar o Manual original num livro, com utilidade mais ampla. O resultado desse esforço é aqui apresentado, esperando que possa instrumentar pós-graduandos e professores na utilização da Edição Gênica para estudos de Genômica Funcional.

Portanto, é com grande satisfação e orgulho que apresentamos aqui o resultado do esforço conjunto de um grupo de pesquisadores que não pouparam esforços para compartilhar generosamente seus conhecimentos.

Agradecemos o papel pioneiro do Dr. Carlos DeOcesano-Pereira no estabelecimento da tecnologia em nosso laboratório e o apoio irrestrito do Departamento de Bioquímica, da Comissão de Coordenação do Programa de Bioquímica (CCP-Bioq) e da Comissão de Pós-graduação (CPG) do Instituto de Química da USP e as agências de fomento que apoiam nossas iniciativas de Ensino, Pesquisa e Inovação (BNDES, CAPES, CNPq, FAPESP, FINEP, MS-DECIT e MCTI).

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
CFU	Unidades formadoras de colônias (<i>colony-forming units</i>)
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
crRNA	RNA CRISPR
CTNBio	Comissão técnica nacional de biossegurança
ddNTP	Didesoxinucleotídeos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	Desoxinucleotídeos
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green fluorescent protein</i>)
gRNA	RNA-guia

HR	Recombinação homóloga (<i>Homologous recombination</i>)
KI	<i>Knock-in</i>
KRAB	<i>Krüppel-associated box</i>
LSD1	<i>Lysine-specific methylase 1</i>
M.O.I	Multiplicidade de infecção (<i>Multiplicity of infection</i>)
mRNA	RNA mensageiro
NB2	Nível de biossegurança 2
NCBI	Centro Nacional de informação biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas (<i>Non-homologous end joining</i>)
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PBSA	Tampão salina fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA (<i>RNA interfering silencing complex</i>)
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
shRNA	Pequenos grampos de RNA (<i>Short hairpin RNA</i>)
SID	<i>SIN3-interaction domain</i>
siRNA	Pequeno RNA de interferência (<i>Small interfering RNA</i>)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
TALENs	Nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>)
TIDE	<i>Tracking of indels by decompositions</i>
tracrRNA	RNA CRISPR transativador (<i>Transactivating CRISPR RNA</i>)
ZFNs	Nucleases de dedo de zinco (<i>Zinc finger nucleases</i>)

SUMÁRIO

SILENCIAMENTO E EDIÇÃO GÊNICA	11
SISTEMA DE EDIÇÃO GÊNICA CRISPR/CAS9	15
HISTÓRICO.....	15
CLASSIFICAÇÃO E MECANISMO.....	16
FORMAS ADAPTADAS DA ENZIMA CAS9.....	20
APLICAÇÕES DO SISTEMA CRISPR/CAS9.....	21
ETAPA 1 - INÍCIO DA EDIÇÃO GÊNICA: ESCOLHA DO ALVO, DA ESTRATÉGIA DE EDIÇÃO GÊNICA E DESENHO DOS RNAS GUIAS (GRNAS)	27
PROTOCOLO 1.....	30
ETAPA 2 - PRODUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES: DIGESTÃO E DESFOSFORILAÇÃO DO PLASMÍDEO, ANELAMENTO E FOSFORILAÇÃO DOS RNAS GUIAS E REAÇÃO DE LIGAÇÃO AO VETOR	31
PROTOCOLO 2.....	37
ETAPA 3 - MINIPREPARAÇÃO DE DNA DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES: ELETROPORAÇÃO DE BACTÉRIAS, MINIPREPARAÇÃO BACTERIANA E DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	41
PROTOCOLO 3.....	45
ETAPA 4 - CONFIRMAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE: PREPARO DE AMOSTRAS DE DNA PLASMÍDEAL PARA SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS	47
PROTOCOLO 4.....	49
ETAPA 5 - GERAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES NOCAUTEADAS: TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS 293T, TITULAÇÃO VIRAL, CÁLCULO DA MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO (M.O.I) E TRANSDUÇÃO DA CÉLULA-ALVO ...	51
PROTOCOLO 5.....	55

ETAPA 6 - CONFIRMAÇÃO DA EDIÇÃO GÊNICA (NOCAUTEAMENTO): ENSAIO SURVEYOR, ENSAIO POR TIDE, PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR), PCR GENÔMICO, WESTERN-BLOTTING E SEQUENCIAMENTO DE SANGER 59

PROCOLO 6..... 63

REFERÊNCIAS..... 71

AUTORES 77