

CONFIRMAÇÃO DA EDIÇÃO GÊNICA (NOCAUTEAMENTO)

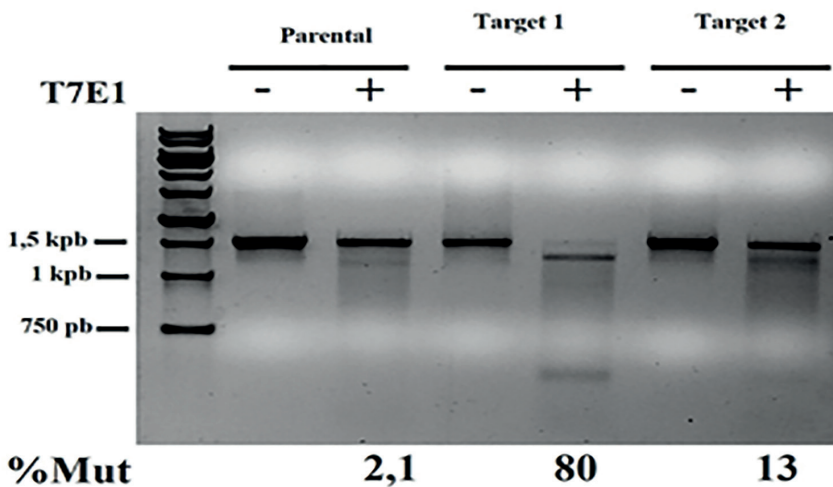
ENSAIO SURVEYOR, ENSAIO POR TIDE, PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR), PCR GENÔMICO, WESTERN-BLOTTING E SEQUENCIAMENTO DE SANGER

No tocante à ferramenta CRISPR/Cas9, é de extrema importância a realização de experimentos que confirmem a edição gênica pela endonuclease Cas9. As técnicas utilizadas para esse fim podem envolver o Ensaio Surveyor (que utiliza a enzima T7 endonuclease), o Ensaio por TIDE (*tracking of indels by decompositions*), o PCR do DNA genômico, o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), o *western blotting* e o Sequenciamento de Sanger.

Para confirmação do nocauteamento por inativação gênica, as técnicas de confirmação mais indicadas são o ensaio Surveyor e o ensaio por TIDE. O ensaio Surveyor, baseia-se no fato de que a enzima T7 endonuclease reconhece pareamentos errôneos de bases, clivando a sequência no sítio onde estes ocorrem. Após extrair o DNA genômico das células que sofreram a edição, o material é submetido à amplificação por PCR. Em seguida, o produto de PCR passa por vários ciclos de desnaturação e anelamento, juntamente com o DNA

amplificado a partir das células que não sofreram edição (células parentais). Espera-se que as regiões editadas não façam um pareamento perfeito com a sequência selvagem, gerando regiões de *mismatch*, que serão reconhecidas e clivadas pela T7 endonuclease. Os fragmentos gerados podem ser vistos através de eletroforese em gel de agarose (Figura 19).

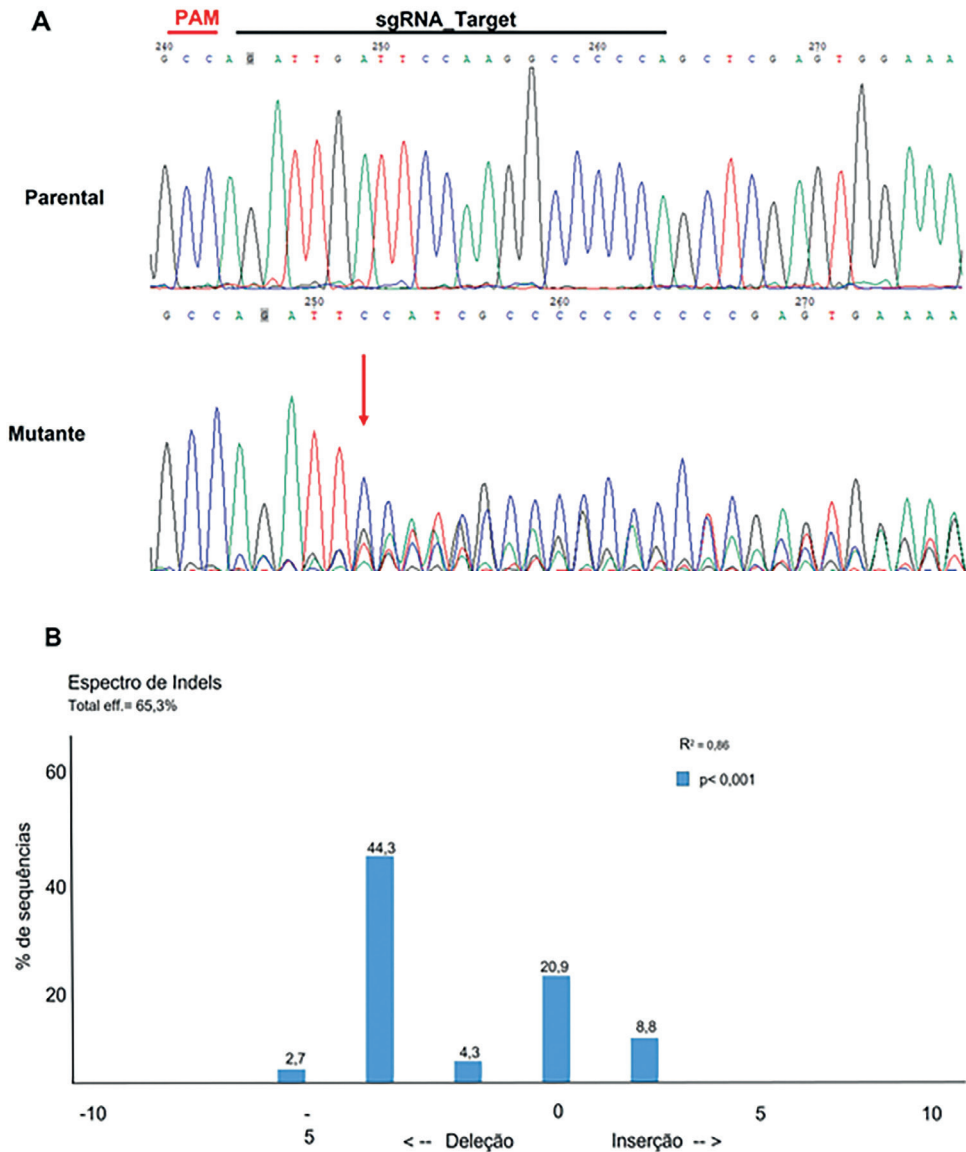
Figura 19. Confirmação da edição gênica através do tratamento com a enzima T7 endonuclease.



Dependendo das características da edição gênica, se as alterações forem muito homogêneas, por exemplo, a polimerase T7 tem dificuldade para reconhecê-las, gerando um falso-negativo. Para contornar esse problema, pode-se utilizar uma outra ferramenta de confirmação, o TIDE (*tracking of indels by decompositions*). Essa ferramenta é um *software* livre que utiliza algoritmos para analisar e decompor os cromatogramas advindos do sequenciamento, comparando os picos gerados pela análise das células parentais com aqueles gerados pela análise das células editadas (Figura 20A).

Com essa comparação, o *software* fornece a porcentagem e a natureza da edição, informando quantos nucleotídeos foram inseridos ou deletados (Figura 20B).

Figura 20. A) Comparação entre os cromatogramas das células parentais e editadas por TIDE. B) Porcentagem de inserções e/ou deleções (*indels*) propiciadas pelo TIDE.

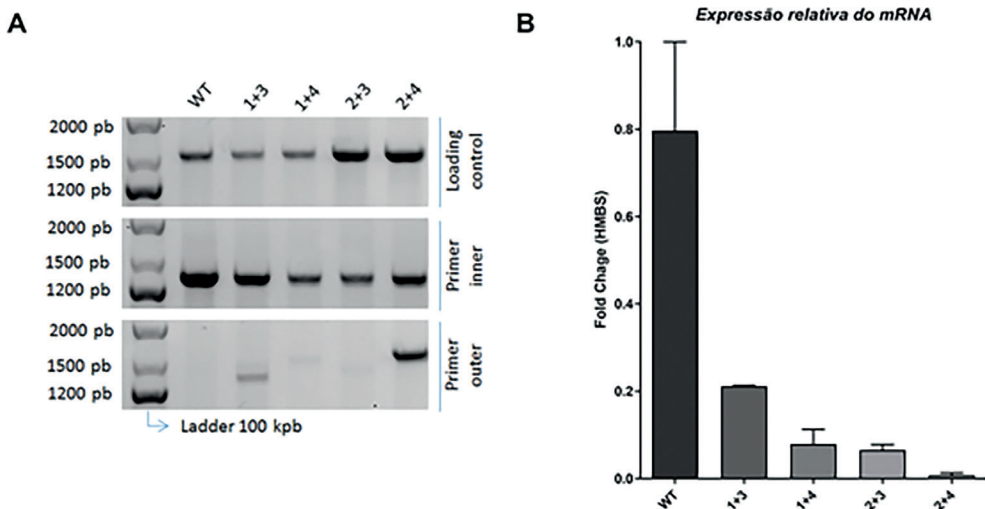


Para a confirmação do nocauteamento por deleção gênica, as técnicas mais indicadas são o PCR do DNA genômico, o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) e o *western blotting*. No PCR genômico, para verificar a integridade

da sequência genômica-alvo, o DNA genômico das linhagens parentais, controles e editadas é extraído utilizando-se kits específicos (*Ilustra Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare*, por exemplo) e a deleção gênica é confirmada submetendo as amostras a PCR genômico (95 °C por 4 min; 30 ciclos de 95 °C de 45 seg, 60 °C por 45 seg e 72 °C por 2 min; 72 °C por 5 min), utilizando-se três grupos de *primers*: um grupo de *primers* controles (F+R), referente a um gene de expressão constitutiva; um grupo de *primers inners* (F+R), desenhados na região interna do locus gênico alvo da edição; e, por fim, um grupo de *primers outers* (F+R), desenhados na região externa do locus gênico alvo da edição. A ausência de amplificação do *primer inner* e a presença de amplificação do primer outer na linhagem editada com a combinação de gRNAs confirmam a deleção gênica (Figura 21A).

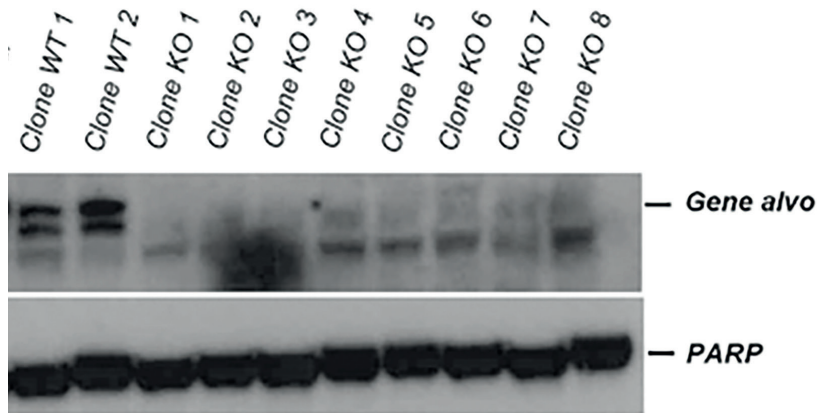
No PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), através do qual verifica-se a expressão do mRNA da sequência genômica-alvo, o RNA total das linhagens parentais, controles e editadas é extraído, utilizando-se kits específicos (*RNeasy Mini Kit – QIAGEN*, por exemplo) e reações de qRT-PCR são realizadas. Para isso, alíquotas do RNA extraído são submetidas à transcrição reversa e síntese de cDNA de fita simples, por meio da ação da enzima transcriptase reversa *SuperScript III* (Invitrogen). Os cDNAs sintetizados são então utilizados como *template* para as reações de qRT-PCR em um termociclador, em condições específicas e predeterminadas. A ausência de expressão do gene-alvo na linhagem editada é mais uma forma de confirmação da deleção gênica (Figura 21B).

Figura 21. A) PCR genômico do gene-alvo nas linhagens parental e editadas. B) Análise da expressão do gene-alvo por qRT-PCR nas linhagens parental e editadas.



Uma outra forma de confirmar o nocauteamento é através da técnica do *western blotting*, na qual verifica-se a expressão proteica da sequência genômica-alvo. A ausência da expressão da proteína, codificada pelo gene alvo, na linhagem editada é mais um indicativo de que a deleção gênica foi alcançada com êxito (Figura 22). Todas as técnicas citadas anteriormente possuem pontos positivos e negativos, mas é indiscutível que a mais eficaz e segura é o Sequenciamento de Sanger, técnica de rotina amplamente utilizada na Biologia Molecular que permite sequenciar os fragmentos de DNA individualmente, revelando a ordem exata da sequência de bases do mesmo.

Figura 22. Seleção de clones celulares *knockouts* por *Western-Blotting* do gene-alvo.



Nesse caso, a proteína PARP foi utilizada como controle interno.

PROTOCOLO 6

Para as etapas de validação utilizando o Ensaio Surveyor (1), Ensaio por TIDE (2) e validação por PCR genômico (3), o primeiro passo envolve a extração de DNA. Nessa etapa, pode-se utilizar kits de extração de DNA (sugestão: *Illustra Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare*). Alternativamente, apresentamos aqui um protocolo simples e de baixo custo que possibilita a extração e a purificação de DNA genômico sem a utilização de kits.

- Preparar 50 mL de tampão de lise de acordo com a tabela a seguir (a solução estoque pode ser mantida à temperatura ambiente por meses)

	Concentração inicial	Concentração final	Volume necessário
Tris HCl pH 8.0	1 M	100 mM	5 mL
EDTA	0,5 M	5 mM	0,5 mL
SDS	10%	0,2%	1 mL
NaCl	2,5 M	200 mM	4 mL
H ₂ O estéril			39,5 mL

- Extração de DNA bruto
 - Adicionar Proteinase K (estoque de 20 mg/mL) 1:100 (concentração final 200 µg/mL);
 - Ressuspender o pellet celular em 300 µL de tampão de lise + Pro K para 1-2x10⁶ células;
 - Homogenizar o pellet utilizando o vortex;
 - Incubar as células no termociclador a 60 °C por 2-4 h, 800 RPM;
 - Desativar a enzima a 95 °C por 5 minutos;
 - Nesse ponto, você pode partir diretamente para o PCR ou prosseguir para a purificação com etanol.
- Purificação de DNA
 - Adicionar 30 µL de acetato de sódio (NaOAc) 3 M a pH 5,6 (pH 4,5 também funciona);
 - Adicionar 1.000 µL de etanol a 95%;
 - Agitar vigorosamente por 30 segundos com a mão;
 - Armazenar em -80 °C por 30 minutos durante a noite (mais tempo = maior rendimento);
 - Centrifugar 30 minutos a 2 °C (se possível, ou 4 °C é bom) em velocidade total (14.000 RPM ou superior);

- Você deve ver o pellet de DNA;
- Descartar o sobrenadante (despejando-o);
- Adicionar 500 µl de EtOH 70% (temperatura ambiente) e despejar após 30 segundos;
- Colocar as amostras (invertidas) em papel absorvente para o etanol secar;
- Esperar alguns minutos até que o etanol desapareça completamente;
- Não se preocupar muito com a secagem excessiva;
- Adicionar 50 µl ddH₂O/tampão de eluição;
- Agitar por 30 minutos a 56 °C (800 RPM) para ressuspender;
- Se necessário, quantificar o DNA com auxílio de um espectrofotômetro.

1. Ensaio Surveyor (T7 Endonuclease I)

- Extrair o DNA genômico (gDNA) das células parentais, controles e editadas;
- Quantificar os gDNAs com auxílio de um espectrofotômetro;
- Avaliar o perfil de fragmentação dos gDNAs por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Obter sequência FASTA do gene-alvo no NCBI;
- Desenhar *primers forward* e *reverse* com auxílio do programa SnapGene, tendo, como base, a região da possível edição gênica;
- Amplificar a região alvo dos gRNAs através de PCR;
- Avaliar a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Extrair o DNA amplificado do gel (Sugestão de Kit: *QIAquick Gel Extraction Kit – Qiagen*);
- Submeter o produto da amplificação à hibridização, seguida por digestão com a enzima Surveyor, (Sugestão de Kit: *Surveyor Mutation Detection Kits – Integrated DNA Technologies*), de acordo com instruções do fabricante;

- Avaliar a digestão dos produtos por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Analisar a densitometria dos fragmentos através do programa Image-Quant (*Molecular Devices*);
- Calcular a porcentagem de eventos de NHEJ, indicativo de edição, utilizando a seguinte fórmula: % de eventos de corte = $100 \times [1 - (1 - \text{fração clivada})^{(1/2)}]$, onde a fração clivada é definida como (densidade dos produtos digeridos) / (densidade dos produtos digeridos + banda parental não digerida);
- A enzima Surveyor é capaz de clivar apenas os produtos de PCR das amostras que foram editadas.

2. Ensaio por TIDE

- Extrair o DNA genômico (gDNA) das células parentais, controles e editadas;
- Quantificar os gDNAs com auxílio de um espectrofotômetro;
- Avaliar o perfil de fragmentação dos gDNAs por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Amplificar a região alvo dos gRNAs por PCR, utilizando *primers* específicos;
- Avaliar a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Extrair o DNA amplificado do gel (Sugestão de Kit: *QIAquick Gel Extraction Kit – Qiagen*);
- Submeter as amostras ao Sequenciamento de Sanger;
- Comparar, utilizando a ferramenta online TIDE, os cromatogramas obtidos a partir do sequenciamento das células parentais e das células editadas. O *software* irá fornecer a porcentagem e a natureza da edição, informando quantos nucleotídeos foram inseridos ou deletados.

3. PCR Genômico

- Extrair o DNA genômico das células parentais, controles e editadas;
- Quantificar os gDNAs com auxílio de um espectrofotômetro;
- Avaliar o perfil de fragmentação dos gDNAs por eletroforese em gel de agarose 1%;
- Desenhar *primers Inner e Outer*;
- Submeter as amostras a PCR genômico (reação a seguir);
- Avaliar a amplificação dos produtos por eletroforese em gel de agarose 1%;
- A ausência de amplificação a partir do *primer inner* e a presença de amplificação a partir do *primer outer* na linhagem editada com a combinação de gRNAs confirmará a deleção gênica;

Reação para volume final de 25 uL:

- X uL do DNA (~100 ng do DNA genômico);
- 0,2 uL (1U) da enzima Taq Polimerase Invitrogen (5 U/uL);
- 2,5 uL (1x) do Buffer (10X);
- 1 uL (2 mM) do $MgCl_2$ (25 mM);
- 1 uL (0,4 uM) do *primer Forward* (10 uM);
- 1 uL (0,4 uM) do *primer Reverse* (10 uM);
- 0,5 uL (0,2 mM) do dNTPs (10 mM);
- X uL de água deionizada;
- Incubar as amostras no termociclador e submetê-las à seguinte programação: 95 °C por 4 min; 30 ciclos de 95 °C de 45 seg, 60 °C por 45 seg e 72 °C por 2 min; 72 °C por 5 min; 4 °C até a remoção da placa do termociclador).

4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

- Extrair o RNA total das células parentais, controles e editadas (Sugestão de Kit: *RNeasy Mini Kit – QIAGEN*);
- Quantificar os RNAs com auxílio de um espectrofotômetro;
- Sintetizar o cDNA fita simples utilizando a enzima SuperScript III (*Invitrogen*), de acordo com instruções do fabricante;
- Submeter as amostras a reações de qRT-PCR utilizando um termociclador (Sugestão: *Termociclador ViiA7 Real-Time PCR System – Applied Biosystems*);
- Determinar a eficiência dos *primers* (Ef);
- Determinar a diferença entre a média dos Cts da amostra referência e a média dos Cts da amostra estudada (ΔC_p);
- Calcular o fator de normalização através da análise da expressão dos genes endógenos utilizados no experimento;
- Confirmar a expressão diferencial utilizando a fórmula a seguir:

$$\text{Razão} = (\text{Ef}(\text{gene alvo})^{\Delta C_p(\text{gene alvo})}) / \text{Fator de normalização}$$

5. Western blotting

- Obter os extratos proteicos a partir das células parentais, controles e editadas, incubando as células em tampão de lise RIPA contendo inibidor de protease;
- Determinar a concentração de proteínas (Sugestão de método: Bradford, utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina);
- Fracionar alíquotas dos extratos proteicos por eletroforese em gel SDS-PAGE;
- Transferir o conteúdo do gel para membrana de nitrocelulose;
- Incubar a membrana em solução de bloqueio (5% leite desnatado ou solução vegetal, dependendo dos anticorpos que serão utilizados);

- Incubar a membrana com os anticorpos específicos e com o anticorpo contra a proteína endógena;
- Revelar a membrana utilizando conjugado IgG-Peroxidase (a membrana deve ser incubada com anticorpo conjugado à peroxidase, lavada 4X com tampão TBS-T, o substrato da peroxidase é adicionado e, por fim, a membrana pode ser revelada no equipamento Image Quant Las 4000 Mini).

