

## MATERIAL SUPLEMENTAR: PROTOCOLO PARA GERAÇÃO DE MODELO CELULAR UTILIZANDO EDIÇÃO GENÔMICA POR CRISPR/Cas9

Edina Poletto<sup>1,2</sup> , Roselena Silvestri Schuh<sup>2,3</sup> , Guilherme Baldo<sup>2</sup> 

### REAGENTES:

#### Clonagem:

- pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene, plasmid # 48138)
- Oligonucleotídeos (para gRNA e primers) (Exxtend)
- T4 DNA Ligase (5 U/μL) (Thermo Scientific, Cat # EL0011)
- T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μL) (Thermo Scientific, Cat # EK0031)
- UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, Cat # 10977015)
- FastDigest Bpil (BbsI) (Thermo Scientific, Cat # FD1014)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μL) (Thermo Scientific, Cat # EF0654)
- Agarose (Ludwig Biotecnologia, Cat # 49)
- Tampão TAE 50X 500 ml (Ludwig Biotecnologia, Cat # 76)
- Ladder 1 kb (Ludwig Biotecnologia, Cat # 26)
- SYBR Safe DNA stain, 10,000× (Life Technologies, Cat# S33102)
- QIAquick gel extraction kit (Qiagen, cat# 28704)
- QIAprep spin miniprep kit (Qiagen, cat# 27106)
- QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Qiagen, cat# 12963)
- One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen, Cat # C404010)
- Meio LB (Sigma, Cat # L3022)
- Meio LB agar (Sigma, Cat. # L2897)
- Ampicilina, 100 mg/ml, filtrada (Sigma, Cat # A5354)
- Solução de Glicerol (50%) estéril (Abcam, cat# 285399)

#### Cultivo e transfecção de células eucarióticas:

- TrypLE Express Enzyme (1x), phenol red (Gibco, cat# 12605010)
- Penicilina-Estreptomicina-Glutamina (100x) (Gibco, cat# 10378016)
- Lipofectamine 3000 transfection reagent (Invitrogen, cat# L3000001)
- DMEM, high glucose (Gibco, cat# 11965092)

*Clin Biomed Res.* 2023;43(4):1-11

1 Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine. Stanford, CA, Estados Unidos.

2 Laboratório Células, Tecidos e Genes, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil.

#### Autor correspondente:

Edina Poletto  
epoletto@stanford.edu;  
edinapoletto@gmail.com  
Department of Pediatrics, Stanford University  
265 Campus Drive, G2055.  
Lorry Lokey Stem Cell Building  
94305, Stanford, CA, Estados Unidos

- PBS 1x (Gibco, cat# 70011044)
- Soro fetal bovino (FBS) (Gibco, cat# 12657029)
- Opti-MEM reduced-serum medium (Gibco, cat# 31985070)

#### Edição de células eucarióticas com RNP:

- HiFi Cas9 Nuclease (IDT, cat# 1081060)
- CRISPR-Cas9 sgRNA (IDT, Synthego, ThermoFisher)
- ssODN para reparo por HDR (Exxtend, IDT)

#### Biologia molecular:

- Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ $\mu$ L) (ThermoFisher Scientific, cat# F537S)
- Primers dessalinizados (Exxtend)
- QuickExtract™ DNA Extraction Solution (BioSearch Technologies, Cat # QE0905T)
- Exo-CIP™ Rapid PCR Cleanup Kit (New England BioLabs, cat# E1050S)

#### PLÁSTICOS ESPECÍFICOS

- Filtro cell strainer 70  $\mu$ m (Corning, cat# CLS431751)
- Tubo de ensaio fundo redondo com tampa (Falcon, cat# 352059)
- Filtro 0,22  $\mu$ m (Corning cat# 430767 ou cat# 431229)

#### SOLUÇÕES:

##### Meio para *single-cell*:

Meio condicionado + 50% soro fetal bovino (SFB), filtrado.

Plaqueie as células de interesse de modo que elas atinjam ~50 a 70% confluência em 24h. Após as 24h, colete o meio de cultivo e centrifugue a 500 g por 10 minutos. Transfira o sobrenadante para um novo tubo e congele. Repita a operação até obter meio suficiente para o restante do experimento (são necessários ao menos 5 ml de meio para cada placa de 96 poços). Descongele o meio, adicione 50% de SFB e filtre com membrana de 0,22  $\mu$ m.

! Os processos de centrifugação, congelamento e filtragem são importantes para evitar a presença de células no meio, que poderão contaminar as populações editadas.

! A filtragem também remove partículas que possam estar no soro e que podem atrapalhar na visualização das colônias na placa pela microscopia ótica.

##### Tampão 1M:

- 5 mM KCl
- 15 mM  $MgCl_2$
- 120 mM  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ , pH 7.2
- 50 mM manitol

##### Tampão MACS:

- 2mM EDTA
- 2% soro fetal bovino ou 0,5% albumina sérica bovina
- PBS 1x

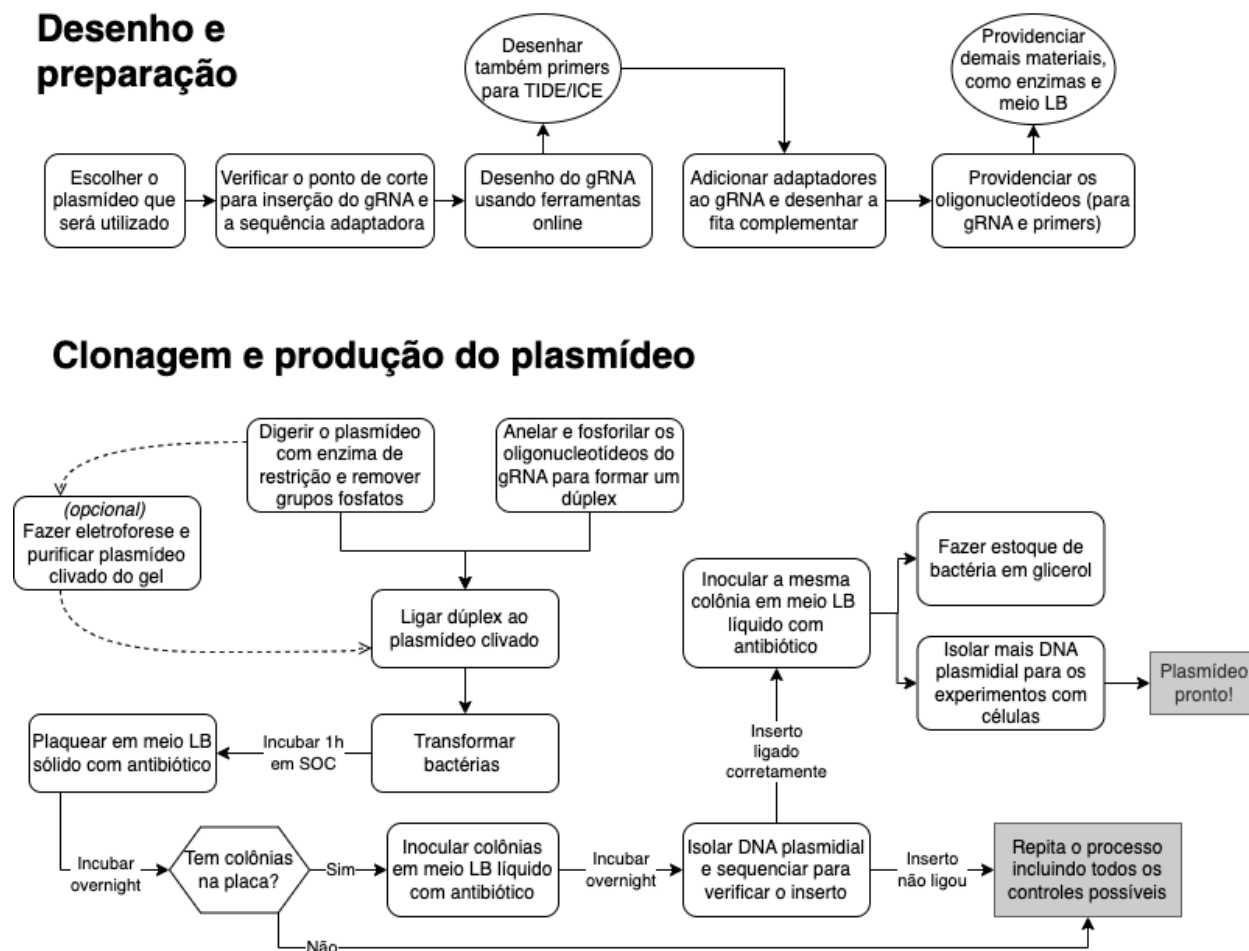
#### DESENHO DO gRNA

1. Desenhe o gRNA utilizando uma das ferramentas online disponíveis, escolhendo as sequências com predição de maior eficiência e menor potencial off-target.
  - Utilize o DNA genômico ou éxons individuais como *input* nos softwares. O uso de cDNA (com mais de um éxon) pode gerar gRNAs que se ligam nas junções éxon-éxon, o que o tornará inativo no genoma.
  - Confira a lista de ferramentas na Tabela 1 do artigo.
2. Com a sequência de 20 nucleotídeos obtida específica para o alvo, escolha uma das duas opções para obtenção do gRNA:
  - **Plasmídeo:** utilize a sequência de 20 nt para desenhar o inserto que será clonado no plasmídeo.
  - **RNP:** providencie a molécula de gRNA diretamente de um fornecedor. Nesse caso, opte pela molécula com modificações químicas, por ser mais estável e mais eficiente.
3. Providencie, também, os primers para amplificar a região genômica que será editada para quantificar e caracterizar as indels geradas. Os programas de desenho de gRNA, geralmente, já fornecem essas sequências (primers para análise TIDE/ICE/RFLP).

## PREPARAÇÃO E PRODUÇÃO DO PLASMÍDEO

O processo de construção de um plasmídeo contendo as sequências de gRNA e Cas9 para utilizar nos experimentos com células eucarióticas está ilustrado no fluxograma abaixo (Figura S1):

Figura S1: Fluxograma de preparação do plasmídeo para CRISPR/Cas9.



### A) Desenho do inserto contendo a sequência do gRNA

- Confira os adaptadores necessários para clonar/ inserir a sequência desenhada de 20 nt do gRNA no plasmídeo que vai expressar o guia e a Cas9. Esses adaptadores dependem do plasmídeo a ser utilizado e das enzimas de restrição necessárias para realizar a clonagem. Eles são fundamentais para a ligação do inserto no vetor (Figura S2A). Para o plasmídeo px458 (Addgene #48138), os adaptadores estão destacados abaixo, em negrito:

5' **CACC** NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'  
 3' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN **CAAA** 5'.

Onde N é o nucleotídeo que pertence ao guia. Portanto, a partir da sequência 5'-3' de 20 nt fornecida pelo software de desenho de gRNA,

devemos gerar a fita complementar e reversa e incluir os adaptadores em ambas, para gerar extremidades coesivas e facilitar a ligação no plasmídeo.

Caso a sequência do gRNA gerada não inicie com um G, inclua um G no início da sequência e no adaptador da fita reversa (para aumentar a eficiência do sistema):

5' **CACC G** NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'  
 3' C NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN **CAAA** 5'.

Exemplo de sequência:

Sequência de gRNA gerada pelo software de desenho: CTAGCTAGCCGTAGCTAGTT

Sequência de gRNA com os adaptadores necessários e fita complementar e reversa:

5' **CACC G** CTAGCTAGCCGTAGCTAGTT 3'  
 3' C GATCGATCGGCATCGATCAA **CAAA** 5'.

- Adquira ambas as sequências como oligonucleotídeos (primers) com método de purificação padrão dessalinizado. Considerando que as empresas solicitam as sequências sempre no sentido 5'-3', no exemplo acima, as sequências a serem solicitadas seriam:

5' **CACCG**CTAGCTAGCCGTAGCTAGTT 3'  
 5' **AAACA**ACTAGCTACGGCTAGCTAGC 3'.

## B) Preparando os oligonucleotídeos para clonagem no plasmídeo (~ 2:00 h) (Figura S2)

- Ressuspenda ambos oligonucleotídeos em água ultrapura a uma concentração de 100 µM.
- Fosforile e anele o par de oligonucleotídeos (para formar um dúplice) usando a seguinte reação:
  - 1 µl oligo senso (100 µM)
  - 1 µl oligo anti-senso (100 µM)
  - 1 µl T4 ligase tampão de reação (10×)
  - 1 µl T4 PNK
  - 6 µl ddH<sub>2</sub>O
  - Volume final: 10 µl
  - A adição de grupos fosfato nas extremidades dos oligonucleotídeos facilita a ligação no vetor (Figura S2D).
  - O tampão utilizado nesta etapa deve conter ATP, que serve de fonte de fosfato para a fosforilação dos oligos. Portanto, utilizamos o tampão que pertence ao kit da T4 ligase, que contém ATP. Alternativamente, ATP pode ser adicionado.
- Incube a reação em um termociclador com os seguintes parâmetros:
  - 30 min a 37 °C; 5 min a 95 °C;
    - Esta etapa fosforila os oligos, seguida de inativação da T4 PNK e completa desnaturação dos oligos.
  - Resfriamento a 25 °C a uma velocidade de 5 °C/min.
    - O resfriamento deve ser lento para garantir que o anelamento dos oligos e a formação do dúplice seja perfeita. Alguns termocicladores já possuem a opção de ajustar o "ramp rate" em °C/min (como o da BioRad, por exemplo). Outros devem ser verificados no manual do fabricante. No termociclador Veriti (Applied Biosystems), utilizamos 3% de "ramp down", que resulta em aproximadamente a taxa adequada.
- Dilua o dúplice 1:200 em água ultrapura.
  - Esta diluição conferirá a concentração adequada para ligação no plasmídeo, mas diluições diferentes podem ser utilizadas em clonagens diferentes.

- **PAUSA** O dúplice pode ser armazenado a 4 °C por até uma semana.

## C) Clonando o gRNA no plasmídeo (~2h – 4h)

Nesta etapa, vamos ligar o dúplice fosforilado (que contém a sequência do gRNA) no vetor plasmidial.

- Faça a digestão do plasmídeo px458 utilizando enzima de restrição (Figura S2B) e remova os grupos fosfatos das extremidades (Figura S2C) utilizando a seguinte reação:
    - 1 µg pX458
    - 1 µl FastDigest BbsI
    - 1 µl FastAP
    - 2 µl FastDigest buffer (10×)
    - 15 µl água ultrapura
    - Total volume: 20 µl
  - Incube por 30 min a 37 °C, e inative a FastAP por 5 min a 75 °C.
    - A remoção dos grupos fosfatos do plasmídeo reduz a possibilidade do plasmídeo se religar sem a adição do inserto (o dúplice) no local.
    - **PAUSA** o plasmídeo digerido pode ser armazenado a 4 °C por até uma semana.
  - (*opcional*) Faça uma eletroforese em gel de agarose para confirmar a digestão do plasmídeo e para purificar somente as moléculas de DNA digeridas.
    - Concentração do gel: 1% de agarose
    - Tampão: utilizar tampão TAE (Tris-acetato EDTA) na eletroforese para evitar inibição das enzimas utilizadas nas etapas seguintes.
    - Controles: Plasmídeo circular (ou seja, antes da digestão), plasmídeo linear/digerido.
  - (*opcional*) Purifique o plasmídeo digerido a partir da banda do gel.
    - A banda de interesse será a banda maior, de aproximadamente 9 kb, uma vez que o plasmídeo linearizado migra mais lentamente que o plasmídeo circular.
    - Para a purificação a partir do gel, utilize kit específico para remover componentes que possam inibir a ação das enzimas utilizadas no restante do protocolo.
- ! Esta etapa de eletroforese e purificação do gel pode ser opcional. Recomendamos que seja feita quando este protocolo for seguido pela primeira vez no laboratório para confirmar que

o plasmídeo está com qualidade adequada e está, de fato, sendo digerido eficientemente. Uma vez que este procedimento for concluído com sucesso no laboratório, esta etapa poderá ser removida na execução de outras clonagens com gRNAs diferentes.

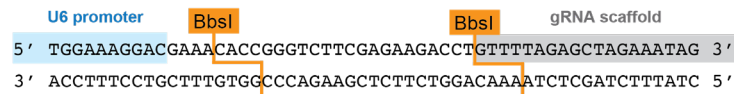
- Ligue o dúplice (inserto) no plasmídeo linearizado (Figura S2E), seguindo a seguinte reação:  
50 ng do plasmídeo pX458 (1 µl do plasmídeo digerido da reação acima)  
2 µl tampão T4 DNA ligase (10×)  
1 µl duplex de oligos anelados (diluição 1:200)

1 µl T4 DNA ligase  
Água ultrapura para volume final 20 µl

- A quantidade de vetor (px458) e inserto (dúplice) nesta reação foi calculada para corresponder a uma razão molar de aproximadamente 1:3 vetor para inserto. Essa quantidade pode ser ajustada para otimizar a reação, caso necessário.
- Incube no termociclador a 16 °C *overnight* ou em temperatura ambiente (25°C) por 10 a 60 minutos, seguido de inativação das enzimas a 65 °C por 10 min.

**Figura S2:** Etapas de clonagem do gRNA no plasmídeo CRISPR/Cas9. Uma vez que o plasmídeo tenha sido eficientemente clonado e seja transfectado na célula eucariótica, a célula irá transcrevê-lo e produzirá o gRNA completo, contendo a sequência específica do alvo a ser editado e o esqueleto do gRNA necessário para a atividade do sistema.

**A) PLASMÍDEO CIRCULAR**



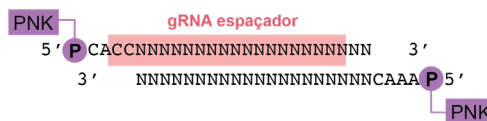
**B) CLIVAGEM DO PLASMÍDEO**



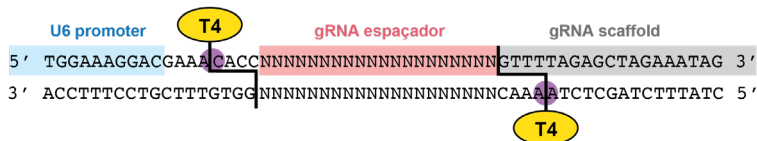
**C) REMOÇÃO DOS GRUPOS FOSFATOS NO PLASMÍDEO**



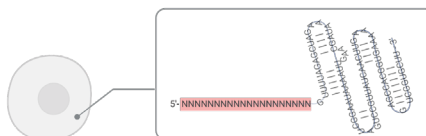
**D) FOSFORILAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ANELADOS**



**E) LIGAÇÃO DO OLIGONUCLEOTÍDEO NO PLASMÍDEO**



**F) TRANSCRIÇÃO NA CÉLULA EUCARIÓTICA**





- Recomendamos a inclusão de um vetor digerido/linearizado e ligase como controle. Este controle indicará se o tratamento com a fosfatase funcionou e se o vetor está se religando sem o inserto. Caso o tratamento com a fosfatase tenha sido eficiente, o vetor não será capaz de se religar somente com a ligase, e nenhum ou poucos clones crescerão a partir deste controle.
- **PAUSA** o plasmídeo ligado pode ser armazenado a -20 °C por, pelo menos, uma semana.

#### D) Transformando bactérias com o plasmídeo (2 dias)

! Todas as etapas envolvendo bactérias devem ser feitas de maneira asséptica, próximo ao fogo ou em cabine, para evitar contaminação com bactérias do ambiente.

1. Descongele um vial de bactérias no gelo.
  - Caso utilize as bactérias sugeridas nesse protocolo (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*), um vial de bactérias pode ser dividido em 2 reações (de 25 µl cada). Para dividir o vial, coloque um microtubo de 2 ml no gelo, para resfriá-lo. Assim que o vial com as bactérias descongelar, homogeneíze-o dando leves batidas na lateral do tubo e transfira 25 µl para o microtubo no gelo. Não homogeneíze com vórtex ou pipetagem *up-and-down*, pois as bactérias estarão frágeis e a viabilidade poderá diminuir significativamente.
2. Adicione 5 µl do plasmídeo ligado a um tubo de bactérias. Misture com leves batidas no tubo, sem vórtex ou pipetagem *up-and-down*.
3. Mantenha as bactérias no gelo por 15 min. Enquanto isso, prepare um banho-maria a 42 °C.
  - Na ausência de equipamento apropriado, pode-se preparar um banho-maria aquecendo água num copo e medindo a temperatura com termômetro, adicionando água fria ou quente até atingir exatos 42 °C.
- ! Não utilizar banho seco, pois a transferência de calor não é eficiente o suficiente para o choque térmico.
4. Incube o vial de bactérias no banho a 42 °C por 30 segundos. Ao término da incubação, transfira imediatamente o vial para o gelo por mais 2 minutos.
5. Adicione 250 µl de meio SOC (incluso no kit de bactérias competentes) em cada vial submetido ao choque térmico e incube a 37 °C com agitação (~200 rpm).

6. Incube os tubos deitados para que tenham oxigenação mais eficiente.
7. Coloque placas de meio LB sólido contendo o antibiótico adequado (ampicilina para o px458, a 100 µg/ml) em incubadora de bactérias a 37 °C para que sejam pré-aquecidas.
8. Plaqueie 100 µl das bactérias transformadas (inoculadas no meio SOC) em cada placa. Espalhe bem o meio líquido com auxílio de uma alça ou de *beads*, até que a placa absorva o líquido.
9. Incube as placas a 37 °C overnight.

! Lembre de incubar as placas com o meio voltado para cima e a tampa para baixo, para evitar a condensação de água na tampa.

10. Aproximadamente 16 horas depois, inspecione as placas para a presença de colônias. Espere-se que tenha poucas dezenas de colônias em um experimento bem-sucedido.

! Placas sem colônias podem indicar falha em qualquer uma das etapas do protocolo. Deve-se repetir do início e adicionar controles em todas as etapas para identificar onde está o problema.

! Placas cobertas de colônias podem indicar: a) possível contaminação com bactérias do ambiente; b) o plasmídeo está se religando sem o inserto.

- **PAUSA** As placas de bactérias podem ser vedadas com parafilm e armazenadas na geladeira por algumas semanas.

#### E) Conferindo a ligação correta do inserto (~2 dias)

- Para esta etapa, é importante verificar as recomendações do fabricante do kit de extração e purificação de plasmídeo. Caso necessário, adapte o protocolo para seguir as recomendações.

1. Prepare tubos de ensaio contendo de 2 a 5 ml de meio LB líquido contendo antibiótico (100 µg/ml de ampicilina).
  - Para crescimento de bactérias, é melhor utilizar tubos com tampa de 2 estágios, que fiquem semiabertos e permitam a troca de gases com o ambiente. Na ausência destes, tubos cônicos de 15 ml podem ser utilizados, desde que a tampa não seja fechada completamente (apenas coloque a tampa sobre o tubo e afixe-a com fita adesiva).

2. Colete de 3 a 5 colônias e inocule no meio líquido. Para a coleta, encoste uma ponteira estéril na colônia e despeje-a dentro do tubo contendo meio. Homogeneíze com vórtex por 2 s.
3. Incube por 12-16 h a 37 °C com agitação vigorosa (~250 rpm).
4. Proceda com a extração e purificação do plasmídeo utilizando o kit de miniprep, de acordo com o fabricante.
  - **PAUSA** O plasmídeo extraído pode ser armazenado a -20 °C indefinidamente.
5. Quantifique o plasmídeo e sequencie para verificar a inserção correta do inserto. Utilizamos o primer de sequência universal U6 forward (5' TTTAT GGCGAGGCGGCGG 3') para sequenciar o px458.
  - A figura S3 ilustra exemplos de sequenciamentos do vetor px458 com diferentes gRNAs clonados entre os sítios de reconhecimento da enzima BbsI.
6. Uma vez confirmada a inserção correta do inserto, o plasmídeo pode ser expandido para utilização nos experimentos. Recomendamos fazer um maxiprep para produção de plasmídeo em concentração adequada e purificado.

**Figura S3:** Exemplos de sequenciamentos do vetor com os insertos (gRNA) clonados. Observe os pontos de reconhecimento e clivagem da enzima BbsI. Nos plasmídeos clonados, a sequência original entre os pontos de clivagem foi removida e substituída pela sequência dos gRNAs de interesse.



#### F) Para estocar bactérias e plasmídeo:

1. A partir placa com as colônias de bactérias, colete mais bactérias da mesma colônia e inocule em maior volume de meio de cultivo.
2. Após a incubação, transfira 500 µl de bactérias para um criotubo e adicione glicerol a 50% (portanto, a concentração final de glicerol será de 25%).
3. Armazene a -80 °C por tempo indeterminado.
4. Para descongelar, adicione o conteúdo do criotubo em meio LB líquido contendo antibiótico e incube a 37 °C overnight.

## TRANSFEÇÃO E EDIÇÃO DAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS

### A) Cultivo celular

- O cultivo das células de interesse deve seguir as recomendações do fornecedor ou da literatura de referência. Utilizamos como exemplo neste protocolo as células HEK293, que podem ser cultivadas em meio DMEM (regular ou *high glucose*) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 1% penicilina/estreptomicina.
- Cultive pelo menos dois frascos T75 contendo células a 50-70% de confluência e com 15 ml de meio de cultivo para utilizar como fonte de meio condicionado (veja protocolo específico na seção “Soluções”. Troque o meio diariamente (ou seja, colete meio de 24h). Não utilize meio de cultivo proveniente de células com confluência acima de 70% para produção de meio condicionado.

### B) Entregando o CRISPR e editando as células

- Os componentes de CRISPR podem ser entregues por plasmídeo ou por RNP, e a entrega pode ser mediada por diversos mecanismos, incluindo lipofecção e eletroporação. Apresentamos a entrega de plasmídeo por lipofecção e de RNP por eletroporação, mas diferentes combinações podem ser desenvolvidas.

#### I. Transfecção de células HEK293 com plasmídeo por lipofecção

1. Plaqueie  $3 \times 10^5$  células em um frasco T25 contendo 2 ml de meio de cultivo e incube por 24 h. Para *single-cell sorting*, cada frasco rende 3 placas de 96 poços.
  - Esta quantidade de células foi otimizada para nossos experimentos em nosso laboratório, mas muitos protocolos sugerem densidades maiores do que esta. Sugerimos determinar a quantidade empiricamente.
2. Para transfecção utilizando Lipofectamine 3000, prepare o reagente:
  - a. Tubo A: 310  $\mu$ l de Opti-MEM + 9,4  $\mu$ l de Lipofectamine 3000;
  - b. Tubo B: 310  $\mu$ l de Opti-MEM + 6,25  $\mu$ g de plasmídeo + 12,5  $\mu$ l de P3000; Misture o Tubo A com o Tubo B e incube em temperatura ambiente por 15 minutos.

3. Troque o meio de cultivo do frasco T25 contendo as células e adicione meio novo.

4. Adicione o mix de transfecção ao frasco, espalhando-o em gotas por toda a área do frasco. Movimente o frasco com movimentos de vai-e-vem para misturar bem o mix ao meio.

5. Incube as células por 48 h.

! A lipofecção pode ser utilizada também para entrega do RNP, porém deve-se determinar as melhores condições empiricamente.

#### II. Transfecção de células com complexo RNP por eletroporação (Nucleofector)

1. Complexe o RNP adicionando 6  $\mu$ g de Cas9 com 3,2  $\mu$ g gRNA (razão molar de 1:2,5 Cas9/gRNA). Misture gentilmente pipetando *up-and-down* e incube por 15 minutos em temperatura ambiente.

- Outros protocolos na literatura ou sugeridos por fornecedores de Cas9 e gRNA sugerem quantidades e razões molares diferentes. Assim, outros protocolos podem ser testados.

2. Durante a incubação, conte as células, transfira  $1 \times 10^6$  células para um tubo de 1,5 ml e centrifugue a  $300 \times g$  por 5 min.

- O número de células pode variar dependendo do tipo celular e da cubeta utilizada. Em geral, a concentração do RNP é mais impactante na eficiência do processo do que a quantidade de células.

3. Remova o meio de cultivo completamente e ressuspenda o pellet de células em 20  $\mu$ l de tampão 1M.

4. Adicione o complexo RNP às células, pipetando *up-and-down* gentilmente para misturar.

5. Transfira o mix de células e RNP a um poço da cubeta-strip de 16 poços.

6. Selecione o tipo de container utilizado (strip ou cubeta) e o programa no Nucleofector.

- Tanto o Nucleofector quanto outros eletroporadores já possuem protocolos otimizados para os tipos celulares mais comumente utilizados. Pode-se selecionar o protocolo no equipamento de acordo com o tipo celular ou buscar o protocolo na literatura.

7. Eletropore as células.



8. Imediatamente após a eletroporação, transfira as células para uma placa de 6 poços contendo meio de cultivo e incube as células por 48 h.

! A eletroporação pode ser utilizada também para transfectar o plasmídeo pX458. Como ponto de partida para as condições da eletroporação, verifique o protocolo de transfecção com plasmídeo recomendado pelo fabricante.

### C) Conferindo a atividade do guia (~3 dias)

1. Pelo menos 48 h após a transfecção, colete uma alíquota de células e extraia o DNA genômico. Lembre de coletar também uma amostra de células não transfectadas para utilizar como controle.
2. Amplifique por PCR um fragmento de ~700 pb contendo a região onde o gRNA liga. O amplicon deverá conter, ao menos, 200 pb antes da sequência do gRNA.
3. Purifique o produto da PCR.
4. Sequencie o fragmento por Sanger.
5. Avalie os cromatogramas resultantes do sequenciamento: eles devem possuir sequências limpas, com picos claros e únicos antes do ponto de reconhecimento do gRNA.
6. Submeta os cromatogramas das células transfectadas e da amostra controle nos softwares ICE (<https://ice.synthego.com/>) ou TIDE (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>) para análise da frequência de indels.
7. A porcentagem de indels resultante é a medida indireta da atividade de clivagem do gRNA. Caso esteja comparando diferentes gRNA para o mesmo alvo, escolha o gRNA que produzir maior valor de indels.

### D) Editando por HDR (Knock-in)

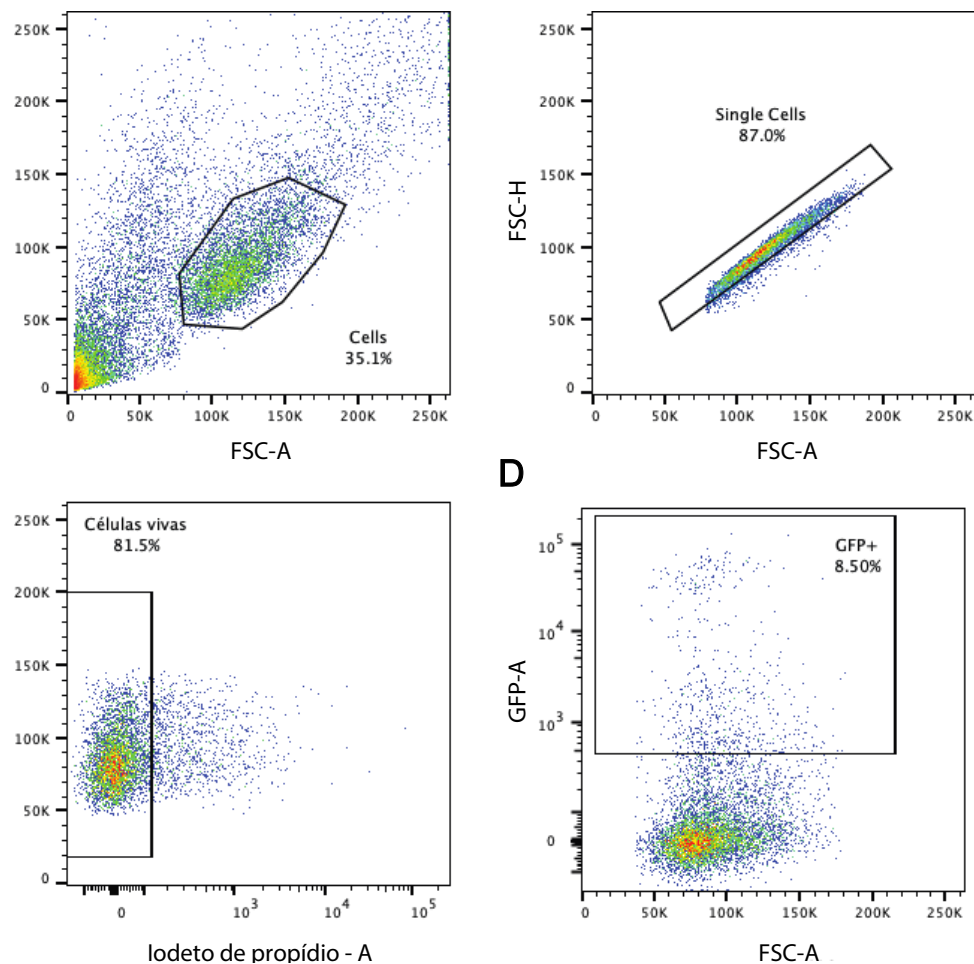
1. Para edição por HDR, repita o processo de edição eleito e inclua o DNA molde ao tubo B (para lipofecção) ou ao tampão 1M (para eletroporação). A quantidade de DNA a ser entregue deve ser otimizada e varia de acordo com o tamanho da sequência.

### E) Isolando os clones

#### 1. *Single-cell sorting*

1. Pelo menos 48 h após a edição, tripsinize as células e ressuspenda-as em tampão MACS.
2. Passe a solução de células por um filtro de 70 µm para remover grumos e garantir uma suspensão de células únicas.
3. Centrifugue a suspensão de células a 300 g por 5 min e remova o sobrenadante.
4. Ressuspenda o pellet de células em tampão MACS contendo iodeto de propídio ou outro marcador de viabilidade.
  - A inclusão de um marcador de viabilidade aumenta a eficiência da etapa, uma vez que somente células viáveis serão plaqueadas.
5. Prepare placas de 96 poços contendo 100 µl de meio para single-cell (meio condicionado + 50% FBS).
  - É recomendado preencher os poços mais externos da placa com água estéril. Esses poços costumam ter maior evaporação do que os demais, alterando as condições de cultivo caso sejam utilizados para plaquear células.
6. Selecione as células para o sorteamento:
  - a. Desenhe o gate SSC x FSC de modo a excluir debris e células potencialmente mortas (Figura S4-A).
  - b. Selecione os singlets (FSC-A x FSC-H), excluindo possíveis grumos (Figura S4-B).
  - c. Exclua as células mortas (Figura S4-C);
  - d. Caso esteja utilizando plasmídeo com GFP, selecione as células com expressão alta de GFP para serem sorteadas (Figura S4-D).
5. Sorteie 1000 células no primeiro poço e uma única célula nos demais. Esse poço com maior densidade celular será utilizado posteriormente para ajustar o foco do microscópio óptico para verificar o crescimento dos clones.
6. Incube as placas sorteadas por 7 dias.

**Figura 4:** Exemplo de estratégia de seleção de células para sorting. A) Seleccione a população de células de forma conservadora, excluindo possíveis grumos, células mortas e debris. B) Seleccione os singlets; C) Exclua as células mortas baseado no marcador de viabilidade; D) Caso haja expressão de marcador de seleção (como GFP), seleccione as células mais positivas.



### 1. *Plaqueamento de 0,5 células por poço*

1. Pelo menos 48 h após a edição, colete as células e conte o número de células viáveis (em contador automático ou hemocítômetro, com auxílio de azul de tripan).
2. Filtre as células por um filtro de 70  $\mu$ m para remover grumos e garantir uma suspensão de células únicas.
3. Dilua as células com meio de cultivo (preferencialmente condicionado) de modo a obter 12 ml de solução final a uma concentração de 5 células por ml.
  - Exemplo: uma solução a  $1 \times 10^4$  células por ml. Faça 3 diluições seriadas de 1:10 (1 ml de células + 9 ml de meio de cultivo), obtendo ao

final 10 ml de solução, contendo 10 células por ml. Dilua 7 ml dessa solução com mais 7 ml de meio, obtendo, finalmente, uma solução com 5 células por ml.

4. Distribua 100  $\mu$ l da solução de células por poço numa placa de 96 poços. Assim, virtualmente, metade da placa terá uma única célula por poço, enquanto a outra metade não terá células.
5. Incube a placa por 7 dias.

### **F) Mantendo e expandindo os clones a partir da placa de 96 poços.**

1. Cinco dias após o plaqueamento ou sorteamento, adicione 100  $\mu$ l de meio de cultivo completo. Incube as células novamente por mais ~5 dias.

2. Troque o meio de cultivo completamente a partir do 10º dia e comece a monitorar o crescimento das colônias. Dependendo do tipo celular, clones serão visíveis a partir do 10-20º dias.
3. Como haverá poucas células em cada poço, o meio de cultivo não precisa ser trocado completamente a cada 3 ou 4 dias, como seria para o cultivo de mais células. Sugerimos adicionar ou trocar o meio uma vez por semana e monitorar a possível mudança de cor do meio, o que vai sugerir que o poço possui número aumentado de células.
4. Em torno do 30º dia, as células estarão em número suficiente para serem expandidas para placas com área maior, como de 24 poços.
5. Remova completamente o meio de cultivo do poço.
6. Adicione 50 µl de tripsina ao poço e incube por 5 a 10 minutos na incubadora.
7. Enquanto isso, adicione 500 µl de meio de cultivo completo nos poços da placa de 24 poços.
8. Ao término da incubação, adicione 50 µl de meio de cultivo aos poços com a tripsina. Com uma pipeta automática a 80 µl de volume, pipete *up-and-down* o meio presente no poço de 96, com movimentos de modo a “lavar” toda a área do poço. Essa etapa de pipetar *up-and-down* ajudará a soltar completamente as células do poço.
9. Transfira o volume do poço de 96 para o poço de 24 contendo meio.
  - Na transferência do volume, pipete até o segundo estágio da pipeta, produzindo bolhas de ar no meio da placa de 24 poços. Assim, podemos visualizar prontamente quais poços já receberam as células e quais poços ainda não receberam. Com essa técnica, pode-se transferir múltiplos clones mais agilmente.
10. Incube e cultive a placa de 24 poços.
11. Quando os clones atingirem ~70% de confluência, solte as células da placa, centrifugue-as e ressuspense o pellet em 200 µl de PBS.
12. Plaqueie 100 µl em um poço de placa de 6, adicione 1 ml de meio de cultivo e incube a placa para expansão e manutenção do clone.
13. Transfira os 100 µl restantes para uma placa de PCR.
14. Centrifugue a placa a 350 g por 10 minutos. Remova o sobrenadante vertendo a placa rapidamente ou aspirando poço a poço.
15. Ressuspense o pellet em 20 µl de Quick Extract para isolar o DNA genômico e sele a placa.
16. Incube a 65 °C por 6 minutos, seguido de 2 minutos a 98 °C.
17. Proceda com o PCR e sequenciamento do DNA para verificar a edição.
  - Alternativamente, a alíquota de células pode ser submetida a extração de DNA genômico por outros métodos. Sugerimos utilizar o Quick Extract por ser um método muito mais ágil em relação aos protocolos de precipitação de DNA em excesso de sal ou aos convencionais kits de extração de DNA que utilizam colunas.

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Esse protocolo é um guia para ilustrar como fazer um experimento de edição genômica para alguém não familiarizado com a técnica. As etapas apresentadas aqui podem ser utilizadas para visualizar o fluxograma, estimando o material necessário e o tempo para a conclusão do projeto. Ressaltamos, novamente, que cada etapa pode ser modificada para acomodar protocolos específicos da literatura ou otimizações feitas pelo próprio laboratório. O tipo celular, o locus e a estratégia de edição gerarão variações importantes em cada etapa do processo e, por isso, este protocolo geral serve apenas como norteador para o pesquisador iniciante nesta área.