

**PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA
PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2017. Buenas Prácticas para la inserción
cromosómica de microorganismos de riesgo 2 por CRISPR-CAS9.**

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma Oficial Mexicana participaron:
Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Chihuahua
- Erwinions

ÍNDICE

0	INTRODUCCIÓN
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN
2	FUNDAMENTO
3	REFERENCIAS
4	DEFINICIONES
5	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS
6	REACTIVOS Y MATERIALES
7	APARATOS E INSTRUMENTOS
8	DISEÑO DE ARNSG
9	DISEÑO DE PLANTILLA DE ADN PARA LA INSERCIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA
10	ELECTROPORACIÓN
11	REPORTE DE RESULTADOS
12	EVALUACIÓN DE RIESGOS
13	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
14	BIBLIOGRAFÍA
15	OBSERVANCIA DE LA NORMA
16	VIGENCIA

0. Introducción

En los últimos años, la edición genómica ha sido catalogada como uno de los avances más importantes en las ciencias biológicas. Esto, presumiblemente, es un efecto del descubrimiento que ha permitido el progreso de desarrollos experimentales referentes al tema; la aplicación práctica o biotecnológica del sistema CRISPR-Cas9 en 2012.

CRISPR/Cas9 es un sistema inmune de células procariontas que, por sus siglas inglés, se refiere a las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas. Molecularmente, las secuencias interespaciadoras permiten la inserción de un pequeño fragmento de ADN viral para el reconocimiento de una infección. Cuando un procarionte es

atacado por un virus, éste inyecta su ADN con la intención de proliferar. No obstante, si la célula hospedera logra identificar e incorporar el genoma exógeno a CRISPR, ésta adquiere la habilidad de defensa frente al virus, conocida como Cas9.

Simbólicamente, Cas 9 es un complejo protéico de “tijeras moleculares” encargado de hacer cambios en el genoma de algún organismo, ya sea cortar, suprimir, modificar, interrumpir o incorporar nuevas secuencias genéticas. No obstante, este complejo requiere de la secuencia incorporada en CRISPR para ser programado y cortar la secuencia objetivo. Lo más característico de este mecanismo es su gran especificidad y exactitud en cuanto a la localización de los cortes y de las incorporaciones de genes al loci del genoma deseado.

Este proceso fue estandarizado por investigadores para su uso dentro de la ingeniería genética pretendiendo la modificación o inserción de nucleótidos en el genoma gracias a la unión permanente entre el ARNtracr y el ARNcr, secuencias genómicas dentro de CRISPR que permiten el reclutamiento y programación de Cas9, por medio de una horquilla. En la técnica de ingeniería genética, el corte que realiza Cas9 en la cadena a modificar, no provocará degradación. Por otro lado, en base a mecanismos de reparación de daños de ADN, como reparación por extremos homólogos y no homólogos, se pretende lograr la modificación del genoma original incorporando la secuencia deseada.

Es gracias a los beneficios que esta nueva técnica brinda y/o se espera que llegue a brindar (gran especificidad, control de enfermedades virales, terapia génica, activación o silenciamiento de genes, etc.) se establece dentro de esta Norma Oficial Mexicana las generalidades técnicas del desarrollo experimental para la modificación genómica utilizando CRISPR-Cas9.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método general para la inserción cromosómica de microorganismos de riesgo 2 por CRISPR-Cas9

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que busquen efectuar este método para ya sea para beneficio personal o general.

2. Fundamento

El método se basa en la inserción de material exógeno a un microorganismo por medio de nuevas tecnologías. CRISPR-Cas9 es un sistema utilizado en la ingeniería genética que permite, a diferencia de los métodos convencionales, realizar cortes para corrección, eliminación, o inserción al ADN genómico.

3. Referencias

Esta Norma se complementa con la siguiente:

PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA
PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2017. Buenas Prácticas para la transformación genética de microorganismos de riesgo 2 por métodos convencionales.

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

Célula hospedera: microorganismo o célula que sufrirá una alteración en su material genético normal.

DSB: una de las maneras de lesión del ADN que se da por el corte de cadena doble. La abreviación deriva de su nombre en inglés (double strand break)

CRISPR: secuencia inmuno-adaptativa de células procariontas.

Inserción cromosómica: modificación del ADN genómico de la célula hospedera por medio de la incorporación de ADN exógeno.

Material genético: macromolécula de origen animal, vegetal o microbiana que contiene información de uno o varios genes en forma de base nitrogenadas y puede ser transmitida de generación en generación.

Transformación: proceso en el que se realiza una inserción de un ADN externo a una célula hospedera alterando genéticamente a esta.

Cas9: tijeras moleculares que provocan cortes precisos de doble cadena en un genoma objetivo.

ARNcr: oligonucleótidos sintetizados dentro de la célula a partir del fragmento de genoma viral insertado.

ARNtracr: secuencia de oligonucleótidos responsable del reclutamiento del complejo proteico Cas9.

ARNsg: oligonucleótido de ARN sintetizado en el laboratorio con el que se logra la inserción. Combina la secuencia de CRISPR con la secuencia trans-activadora.

Vector de transformación: molécula acarreadora que trae dentro de sí un inserto de material genético de interés. Por medio de técnicas de ingeniería genética esta molécula es introducida a una célula con el clonar o expresar el vector.

5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a las siguientes abreviaturas y símbolos se entiende por:

mM milimolar

µL microlitros

mL mililitros

mm milímetros

g gramos

pg picogramos

pH potencial de hidrógeno

% por ciento

UFC unidades formadoras de colonias

h horas

min minutos

OD₆₀₀ densidad óptica a 600 nanómetros

LB Luria Bertani

°C grados centígrado

rpm revoluciones por minuto
pb pares de bases
G guanina
C citosina
A adenina
T timina
N cualquier base nitrogenada

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

Agua Ultrapura

Medio de Cultivo

Lennox Broth

FÓRMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Agua 1000 ml
Tryptona 10 g
Extracto de levadura 5 g
Cloruro de Calcio 5 g

PREPARACIÓN

En caso de utilizar los componentes, suspender estos en un litro de agua y hervir hasta su total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables a manera de que no se exceda tres cuartas partes de la capacidad volumétrica del mismo.

Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe de fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

Medio de Cultivo

Agar Lennox Broth

FÓRMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Agua 1000 ml

Triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

Cloruro de Calcio 5 g

Agar 20 g

PREPARACIÓN

En caso de utilizar los componentes, suspender estos en un litro de agua y hervir hasta su total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables a manera de que no se exceda tres cuartas partes de la capacidad volumétrica del mismo.

Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua.

Distribuir el volumen, aproximadamente 20 - 25 mL, en cajas petri.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

6.2 Materiales

Hielo triturado

Microtubos estériles 1.5 ml

Celda de electroporación 2 mm

7. Aparatos e instrumentos

Electroporador que permita descargas de hasta 3.0 kV y la selección del pulso en un rango de 1.0 a 4.0 ms con una precisión de $\pm .1$ ms.

Campana de seguridad biológica equipada con luz ultravioleta para la esterilización de la misma.

Micropipeta con rango de toma de muestra de entre 20 - 200 μ L.

Micropipeta con rango de toma de muestra de entre 0.2 - 20 μ L.

Computadora con mínimo 1GB de RAM, 250 MB disponibles en el disco duro y resolución de 1024*768.

8. Diseño ARNsg

8.1 Seleccionar el sitio a digerir por Cas9 dentro de la secuencia genómica de interés.

8.2 Identificar todas las combinaciones de secuencias de 23 pb, en sentido 5' a 3', que contengan la secuencia protoespaciadora PAM en el extremo 3'. Procurar que sea en un rango de +/- 50 pb a partir del sitio donde se desea hacer el corte.

8.3 De lo obtenido en 8.2, calcular el % de GC en las secuencias detectadas.

8.4 Escoger aquellas secuencias que tengan un contenido de entre 40 y 60% de GC. En caso de no encontrar, aumentar el rango a +/-100 pb.

8.5 Seleccionar una de las secuencias obtenidas del análisis y realizar una búsqueda de alineamiento local de secuencias contra una base de datos biológica para corroborar que dentro del genoma a modificar solo exista un fragmento igual. Repetir este paso hasta obtener solamente un resultado positivo. En última instancia, seleccionar aquella con menores coincidencias.

8.6 Incorporar el fragmento escogido en 8.4, dentro de un circuito genético para su expresión. El orden recomendado es: promotor U6, ARNsg, plantilla de ARN guía, terminador.

8.7 Sintetizar el circuito genómico.

9. Diseño de plantilla de ADN para la inserción por recombinación homóloga

El diseño de la plantilla de ADN para recombinación homóloga varía dependiendo del objetivo del desarrollo experimental. No obstante es importante tener en consideración los siguientes aspectos:

9.1 Establecer el tamaño del inserto.

9.2 Seleccionar secuencia homóloga ascendente y descendente a partir del sitio a digerir por Cas9.

9.2.1 En caso de ser un inserto pequeño de aproximadamente 100-200 pb, utilizar una monocadena de oligonucleótidos con 50 - 80 pb en cada brazo homólogo.

9.2.2 En caso de ser un inserto grande, utilizar un plásmido bicatenario con homología en cada brazo de aproximadamente 800 pb.

9.3 Contener la secuencia de ADN deseada que debe ser transformada en la célula hospedera al mismo tiempo que el ARNsg y el sistema proteico Cas9.

9.4 Evitar que la plantilla contenga la secuencia PAM.

10. Electroporación

Se deberá seguir el protocolo de electroporación establecido dentro del PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-000-SAGARPA/SEMARNAT-2017. Buenas Prácticas para la transformación genética de microorganismos de riesgo 2 por métodos convencionales.

11. Reporte de Resultados

El reporte de resultados debe ser emitido en base a lo establecido dentro del PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2012, QUE ESTABLECE LAS CARACTERÍSTICAS Y CONTENIDO DEL REPORTE DE RESULTADOS DE LA O LAS

LIBERACIONES REALIZADAS DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS, EN RELACIÓN CON LOS POSIBLES RIESGOS PARA EL MEDIO AMBIENTE Y LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y, ADICIONALMENTE, A LA SANIDAD ANIMAL, VEGETAL Y ACUÍCOLA.

12. Evaluación de Riesgos

12.1 Actividad fuera del blanco

El principal reto es la actividad fuera del blanco. Debido a que la actividad CRISPR-Cas9 DSB es modulada únicamente por un solo ARN guía (ARNg) de 20 nucleótidos y es tolerante con algunos desajustes de pares de bases entre ARNg y el ADN objetivo, existe la posibilidad de que pueda cortar en localizaciones genómicas sólo parcialmente complementarias al ARNg. Estas actividades fuera del blanco varían entre sitios de ADN objetivo diferentes debido a las variaciones de sus composiciones de nucleótidos y contexto genómico. Cualquier actividad fuera del blanco podría causar consecuencias indeseables y no es aceptable. Para abordar este problema, se han propuesto una serie de métodos, desde la selección de ARNsg a través de diversas herramientas bioinformáticas, como se dicta en el apartado 8 de este mismo oficio, hasta el uso de ARNg más cortos, y CRISPR-Cas9 inducibles, así como el uso de la proteína CRISPR-Cas9 directamente.

12.2 Variaciones de la eficiencia

La eficacia de las actividades de DSB dirigidas por CRISPR-Cas9 varía ampliamente dependiendo de las composiciones de nucleótidos y del contexto genómico de los sitios de ADN protoespaciador objetivo así como de la estructura secundaria de ARNsg. Se han identificado algunas características de secuencias de ARNg que afectan significativamente la eficiencia basándose en los análisis de más de 200 ARNgs. Resultados similares se obtuvieron también en otros estudios independientes, mostrando variaciones significativas en la eficiencia entre ARNgs dirigidos a sitios protoespaciadores adyacentes en el mismo plásmido. Desafortunadamente, hasta ahora, no existe un método bioinformático confiable para predecir ampliamente las eficiencias de ARNg y CRISPR-Cas9 en un sitio objetivo de ADN. En la actualidad, la eficacia de un ARNg puede ser determinada de forma realista solamente por métodos experimentales. Se han desarrollado varias tecnologías para el cribado de la eficacia y la especificidad del ARNg, incluidas las tecnologías integrales (NGS y GUIDE-Seq). Además, la eficiencia de edición del genoma también se ve afectada por la

unión de extremos no homólogos (por sus siglas en inglés NHEJ) (más alto) y HDR (por sus siglas en inglés Homology Directed Repair) (inferior) los mecanismos de reparación del ADN. Las eficiencias de HDR pueden aumentarse variando el tamaño de inserto/donante, modificando donantes de ADN inhibición de la actividad de NHEJ. Recientemente, se demostró que NHEJ también se puede utilizar para facilitar el gran número de fragmentos de ADN (IRES-GFP) knock-in con mayores eficiencias que HDR.

12.3 Restricciones del PAM

La precisión de la actividad CRISPR-Cas9 DSB requiere la presencia de un PAM, que sirve como sitio esencial para el aterrizaje del complejo CRISPR-Cas9-sgRNA en el ADN del protoespaciador e iniciar la interrogación del ADN objetivo. Se ha descubierto que los CRISPR-Cas9s de diferentes especies bacterianas tienen PAM diferentes con varias longitudes y composiciones de nucleótidos así como cada uno determina las diferentes frecuencias de corte del CRISPR-Cas9 para un genoma dado. Ninguno de los PAM identificados hasta el momento, ni siquiera la combinación de todos los PAM conocidos, podría cubrir secuencias de un genoma completo, lo que en algunos casos restringiría el uso de la tecnología CRISPR-Cas9. Para relajar tales limitaciones de PAM, se han hecho progresos para modificar los PAM de CRISPR-Cas9 mediante una evolución dirigida basada en la selección bacteriana o mediante un diseño racional basado en la estructura. Variantes del SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) se han creado para reconocer diferentes PAMs distintos de "NGG", incluyendo una variante que reconoce un PAM de 2 nucleótidos "YG". El PAM de 2 nucleótidos aumentaría significativamente la cobertura de edición del genoma. Sin embargo, muchos PAM anidados en un ADN objetivo son inhibidores de las actividades in vivo CRISPR-Cas9. La estrategia ideal sería personalizar una secuencia de PAM adaptada únicamente al sitio de ADN objetivo deseado a través de la alteración de los aminoácidos que interactúan con PAM, lo que se ha hecho posible mediante la identificación de los aminoácidos responsables del reconocimiento de PAM tanto en SpCas9 como en SaCas9 Cas9 de *Staphylococcus aureus*.

13. Concordancia con normas internacionales

La presente norma se realizó en concordancia con El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, emitida por la Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica de la Organización de las Naciones

Unidas, en específico con los artículos 1, 2, 4, 15, 16, 19 y el Anexo III del mismo instrumento, en virtud de que:

I.- El objetivo general del protocolo es contribuir a garantizar un nivel adecuado de prácticas seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos en la diversidad biológica, tomando en cuenta los riesgos para la salud humana. La presente NOM, se realizó en concordancia con estos principios, al listar dentro de sus objetivos el que se haga de forma biosegura y ética este método.

II.- La evaluación del riesgo elaborada en la presente NOM, se ajusta a los lineamientos establecidos en el artículo 15 y el anexo III del Protocolo dado que el mismo establece que las evaluaciones de riesgo se llevarán a cabo con arreglo a procedimientos científicos sólidos, punto que cumple nuestra NOM en el apartado de evaluación de riesgos gracias a que nuestra evaluación se realizó con fuentes que avalan que sus métodos ya han sido utilizados previamente, y han resultado exitosos.

III.- De acuerdo al párrafo quinto del artículo 16, se establece que las Partes deben “determinar los organismos vivos modificados o los rasgos específicos de organismos vivos modificados que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana”, mismo que se establece tanto en los párrafos introductorios de la presente NOM, como en el apartado de Evaluación de Riesgos en sus tres partes hablando de los microorganismos de riesgo 2 por CRISPR-Cas9. Por igual deben “adoptar las medidas adecuadas para el tratamiento de esos organismos vivos modificados o rasgos específicos”, lo cual igual es cumplido de acuerdo a lo que establece el apartado de Evaluación de riesgos, ejemplo en la idealización de CRISPR-Cas9, estableciendo que para una mejor realización se emplean variantes personalizadas para adaptarse específicamente al sitio de ADN objetivo, así como se establecen varios puntos a cubrir.

IV.- La presente NOM establece que para el cumplimiento del artículo 19 del Protocolo de Cartagena, las autoridades administrativas a cargo de las funciones y responsabilidades en materia genética son aquellas establecidas en el apartado de “Observancia de la norma”, lo cual es cumplido en la siguiente NOM, estableciendo la obligatoriedad de cumplir por parte de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Cada Parte designará un centro focal nacional que será responsable del enlace con la secretaría en su nombre.

V.- Para dar cumplimiento a lo establecido en el Anexo III del Protocolo de Cartagena, se han contemplado varios puntos aplicables a la presente NOM en el apartado de "Evaluación de riesgos", siendo el primero el objetivo de la evaluación de riesgos precisamente, el "determinar y evaluar los posibles efectos adversos de los organismos vivos modificados en la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica en el probable medio receptor, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana". En la presente NOM lo establecido anteriormente es cubierto en su evaluación de riesgos completa, dado que prevé lo que es necesario llevar a cabo para evitar efectos adversos al realizar el "Método para la recombinación homóloga en microorganismos de riesgo 2 por crispr-cas9", como lo sería el utilizar una serie de métodos, desde la selección de ARNsg a través de diversas herramientas bioinformáticas, como se dicta en el apartado 8 de este mismo oficio, hasta el uso de ARNsg más cortos, y CRISPR-Cas9 inducibles, así como el uso de la proteína CRISPR-Cas9 directamente.

Por igual cubre el primer principio general del Protocolo, que establece que la evaluación de riesgo deberá de realizarse de forma transparente y científicamente competente, así como el tener en cuenta el asesoramiento de expertos y las directrices establecidas por las organizaciones internacionales, puesto que se ha investigado a profundidad estos métodos sumamente complicados, y por medio de fuentes confiables que han avalado el método de recombinación homóloga en microorganismos de riesgo 2 por CRISPR-Cas9, lo cual demuestra el apoyo científico necesario para la realización de este método. Por igual cumple con sexto principio general del Protocolo, dado que la evaluación de riesgo de la presente NOM habla específicamente de las prevenciones que se deben tener en cuenta al momento de llevar a cabo el método, como por ejemplo la propuesta de estrategia de personalizar una secuencia de PAM adaptada únicamente al sitio de ADN objetivo deseado a través de la alteración de los aminoácidos que interaccionan con PAM responsables, a través de lo establecido en el apartado de evaluación de riesgos.

14. Bibliografía

Addgene. (2013). CRISPR/Cas9 Guide. 18/11/2016, de Addgene Sitio web: <https://www.addgene.org/crispr/guide/>

Barrangou R, *et al.* (2007, marzo 23). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.. Science, 135, 1709-1712. 2017, agosto 06, De Pubmed Base de datos.

Hsu, Patrick D. et al.. (05/06/2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. Cell, 157, 1262 - 1278. 09/11/2016. De: [http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(14\)00604-7.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(14)00604-7.pdf)

Jian-Hua Zhang, Poorni Adikaram, Mritunjay Pandey, Allison Genis & William F. Simonds. Pages 166-174 | Received 13 Apr 2016, Accepted 09 May 2016, Published online: 24 Jun 2016

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21655979.2016.1189039>

Redman, M; King, A; Watson, C. (2016). What is CRISPR/Cas9?. noviembre 18, 2016, de ABC education and practica Sitio web: <http://ep.bmj.com/content/early/2016/04/08/archdischild-2016-310459.full>

Wright, et al.. (2013, octubre 24). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature Protocols, 8, 2281–2308. 2017, agosto 06, De Pubmed Base de datos.

Yang, L. *et al.* (2014). CRISPR/Cas9-Directed Genome Editing of Cultured Cells. Wiley Online Library, 31.1.1-31.1.17.

15. Observancia de la norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

16. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana, entrará en vigor con carácter de obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.