

## Diseñar *in silico* los sgRNAs del gen VEGF-B

Juan Carlos Zavaleta López<sup>1</sup>, Juan Carlos Zavaleta Díaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Privada Antenor Orrego, Av. América Sur 3145, Trujillo, Perú

<sup>2</sup> Universidad Privada Cesar Vallejo, Av. Larco 1770, Trujillo, Perú

Recibido el 15 de junio del 2024. Aceptado el 24 de septiembre del 2024. Publicado el 12 de febrero del 2025

### Resumen

En el NCBI (nucleotide) se ingresó el gen VEGF-B, el artículo en estudio es Human vascular endothelial growth factor B 186 (VEGF-B) precursor, mRNA, complete cds. Por medio del ensembl se realizó la verificación de la secuencia génica se tiene la información de los codones. En ensembl, se observan las regiones exónicas (letras de color rojo más intenso) y lo que no está resaltado son los intrones. En el NCBI, se aprecian las regiones exónicas e intrones madurados, en el ensembl se observan los exones e intrones dispersos. Se ha realizado la verificación de la secuencia codificante completa y codón de inicio de la traducción (atg), teniendo la secuencia codificante completa (cds) se ha asegurado el diseño del sgRNA. Por medio de benchling se ha realizado el diseño del sgRNA, se ha creado un nuevo proyecto, se ha ingresado a crispr guide el gen VEGFB, se ha especificado para el organismo *Homo sapiens*, la secuencia PAM es NGG. Se ha considerado el score más alto (55.7), se ha considerado el off target más alto (52.6) y on target más alto (53.2). Por medio del nucleotide blast, se ha obtenido la secuencia **GTGCGGCGAGCAGCAGGCGG**, realizado el análisis se ha encontrado la complementariedad con el organismo en estudio, el E-value (0.009) y Query cover (100%), confirmando que la secuencia es altamente específica. Mediante el programa SnapGene se ha realizado la clonación, previamente a ello se han añadido a la secuencia (**GTGCGGCGAGCAGCAGGCGG**) en el sitio 5', la enzima BgLI (se incorporado la secuencia de AGATCT) y en el sitio 3' se ha añadido la enzima BamHI (se ha incorporado la secuencia GATCC). La secuencia final es 5' **AGATCTGTGCGGCGAGCAGCAGGCGG** GATCC 3'. Esta secuencia se ha ingresado a SnapGene, en New DNA File se ha copiado la secuencia. Luego de esta práctica, se ha obtenido como resultado final, la clonación del segRNA en el plásmido. Obteniendo un sgRNA de 25pb y un producto final de 5282pb.

**Descriptor:** *gen 1, exones 2, intrones 3, secuencia 4, clonación 5*

### Abstract

The VEGF-B gene was entered into the NCBI (nucleotide), the article under study is Human vascular endothelial growth factor B 186 (VEGF-B) precursor, mRNA, complete cds. Through the ensembl, the verification of the gene sequence was carried out and the information on the codons was available. In ensembl, the exonic regions are observed (deeper red letters) and what is not highlighted are the introns. In the NCBI, the exonic regions and matured introns are seen, in the ensemble the dispersed exons and introns are observed. Verification of the complete coding sequence and translation start codon (atg) has been carried out, having the complete coding sequence (cds) the design of the sgRNA has been ensured. Through benching, the design of the sgRNA has been carried out, a new project has been created, the VEGFB gene guide has been entered into crispr, it has been specified for the *Homo sapiens* organism, the PAM sequence is NGG. The highest score has been considered (55.7), the highest off target has been considered (52.6) and the highest on target (53.2). By means of the nucleotide blast, the **GTGCGGCGAGCAGCAGGCGG** sequence has been obtained. The analysis has found complementarity with the organism under study, the E-value (0.009) and Query cover (100%), confirming that the sequence is highly specific. Cloning was carried out using the SnapGene program. Previously, the enzyme BgLI was added to the sequence (**GTGCGGCGAGCAGCAGGCGG**) at the 5' site (the AGATCT sequence was incorporated) and the enzyme was added to the 3' site. BamHI (GATCC sequence has been

incorporated). The final sequence is 5'AGATTCTGTGCGGCGAGCAGCAGGCGGGATCC 3'. This sequence has been entered into SnapGene, in New DNA File the sequence has been copied. After this practice, the final result was the cloning of the segRNA in the plasmid. Obtaining a 25bp sgRNA and a final product of 5282bp.

**Keywords:** gene 1, exons 2, introns 3, sequence 4, clonig 5

**1. Introducción**

Este gen codifica un miembro de la familia PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas)/VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). Los miembros de la familia VEGF regulan la formación de vasos sanguíneos y participan en la fisiología de las células endoteliales. Este miembro es un ligando para VEGFR-1 (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular) y NRP-1 (neuropilina-1). Los estudios en ratones demostraron que este gen se coexpresaba con genes mitocondriales codificados nuclearmente y la proteína codificada controlaba específicamente la absorción endotelial de ácidos grasos. Se han identificado variantes de transcripción empalmadas alternativamente que codifican distintas isoformas. El término VEGF engloba a varias proteínas pertenecientes a dos familias, que son el resultado del empalme de ARN alternativo del ARNm de un único gen de VEGF con 8 exones. [1, 2, 3, 4]. A esta inquietud académica, se ha propuesto Diseñar *in silico* los sgRNAs del gen VEGF-B y realizar la clonación del sgRNA en un plásmido.

**2. Metodología**

**2.1. Búsqueda del gen VEGF-B en el NCBI.**

Para buscar un gen específico se ha ingresado al apartado Nucleotide, se ha ubicado el gen VEGF-B, factor de crecimiento endotelial vascular del humano. Al diseñar el sgRNA se va a silenciar el en estudio. En el presente estudio no se quiere curar ninguna enfermedad. Identificado el gen, se procede a abrir el NCBI. Para inactivar el gen, ingresamos en el NCBI, al apartado nucleotide. Human vascular endothelial growth factor B 186 (VEGF-B) precursor, mRNA, complete cds).

Es importante informar, si Ud. quiere realizar la replicación del trabajo, se sugiere que, al elegir un gen y realizar el mismo procedimiento, es importante que elija un artículo que tenga la secuencia codificante completa, si no tiene la cds, quiere decir que no está secuenciado completamente, no sería factible diseñar el segRNA.

```

/tissue_type="fibrosarcoma HT-1080"
gene 1..755
/ene="VEGF-B"
CDS 5..628
/ene="VEGF-B"
/codon_start=1
/product="vascular endothelial growth factor B 186"
/protein_id="AAC50721.1"
/translation="MSPLLRLLLAALLQLAPAQAPVSPDAPGHQRKVVSWIDVYTR
ATCQPREVVPLTVELMGTVAQLVPSCTVQRCCGCCDDGLECVPTGQHVRMQIL
MIRYPSSQLGENSLEHSQCCECRPKKDSAVKPDRAATPHRPPRSPVPGWDSAPGAP
SPADITHPTPAPGPSAHAAPSTTSALTTPGPAAAAADAASSVAKGGA"
ORIGIN
1 caccatgagc cctctgtccc gccgctgct gctcgcgca ctctgcagc tggccccgc
61 ccaggcccc gtctcccagc ctgatcccc tggccaccag aggaagtggt tgcattggt
121 agatgtgat actcgcgcta cctgccagcc cgggaggtg gtggtgccct tgactgtga
181 gctcatggc accgtggcca aacagctggt gccagctgc gtgactgtc agcctgtgg
241 tggctgtgc cctgacgatg gcctggagtg tgtgccact gggcagcacc aagtcggat
301 gcagatcctc atgatccggt accgagcag tcagctgggg gagatgtccc tggagaaca
361 cagcagatgt gaatgcagc ctaaaaaaa ggacagtgtc gtgaagccag acaggctgc
421 cactccccac caccgtccc agcccgttc tttccgggc tgggactctg ccccggagc
481 accctcccca gctgacatca ccatccccc tccagccca gcccctctg cccagctgc
541 acccagcacc accagcgccc tgacccccg acctgccgc gccgctgcc acgcccagc
601 ttctccggt gccaaaggcg ggccttagag ctcaaccag acacctgcag gtgccggaag
661 ctgcgaaggt gacacatggc ttttcagact cagcaggggt acttgccca gaggctatat
721 cccagtgggg gaacaagag gagcctgta aaaaa
    
```

Figura 1: gene del gen VEGF-B. atg es el codón de inicio de la traducción

```

ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U52819.1
gene 1..755
/ene="VEGF-B"
CDS 5..628
/ene="VEGF-B"
/codon_start=1
/product="vascular endothelial growth factor B 186"
/protein_id="AAC50721.1"
/translation="MSPLLRLLLAALLQLAPAQAPVSPDAPGHQRKVVSWIDVYTR
ATCQPREVVPLTVELMGTVAQLVPSCTVQRCCGCCDDGLECVPTGQHVRMQIL
MIRYPSSQLGENSLEHSQCCECRPKKDSAVKPDRAATPHRPPRSPVPGWDSAPGAP
SPADITHPTPAPGPSAHAAPSTTSALTTPGPAAAAADAASSVAKGGA"
ORIGIN
1 caccatgagc cctctgtccc gccgctgct gctcgcgca ctctgcagc tggccccgc
61 ccaggcccc gtctcccagc ctgatcccc tggccaccag aggaagtggt tgcattggt
121 agatgtgat actcgcgcta cctgccagcc cgggaggtg gtggtgccct tgactgtga
181 gctcatggc accgtggcca aacagctggt gccagctgc gtgactgtc agcctgtgg
241 tggctgtgc cctgacgatg gcctggagtg tgtgccact gggcagcacc aagtcggat
301 gcagatcctc atgatccggt accgagcag tcagctgggg gagatgtccc tggagaaca
361 cagcagatgt gaatgcagc ctaaaaaaa ggacagtgtc gtgaagccag acaggctgc
421 cactccccac caccgtccc agcccgttc tttccgggc tgggactctg ccccggagc
481 accctcccca gctgacatca ccatccccc tccagccca gcccctctg cccagctgc
541 acccagcacc accagcgccc tgacccccg acctgccgc gccgctgcc acgcccagc
601 ttctccggt gccaaaggcg ggccttagag ctcaaccag acacctgcag gtgccggaag
661 ctgcgaaggt gacacatggc ttttcagact cagcaggggt acttgccca gaggctatat
721 cccagtgggg gaacaagag gagcctgta aaaaa
    
```

Figura 2: cds del gen VEGF-B. atg es el codón de inicio de la traducción. NCBI.

**2.2. ensambl. Verificación de la secuencia génica. ENSEMBL.**

Es una base de datos que contiene algunas secuencias, solamente las secuencias codificantes, a veces de algunos genes se tiene las secuencias no codificantes. Hay que realizar una doble verificación, si no se realiza la doble verificación, lo peor de todo, si la secuencia que reportaron de la base de datos está incompleta o está mal secuenciada, se va a diseñar mal el

segRNA. ENSEMBL, no es una base tan completa como el NCBI. En el presente estudio, mi interés es el organismo humano, por esto le doy filtrar y solamente aparezca en el humano. Luego ingreso el gen VEGF-B.

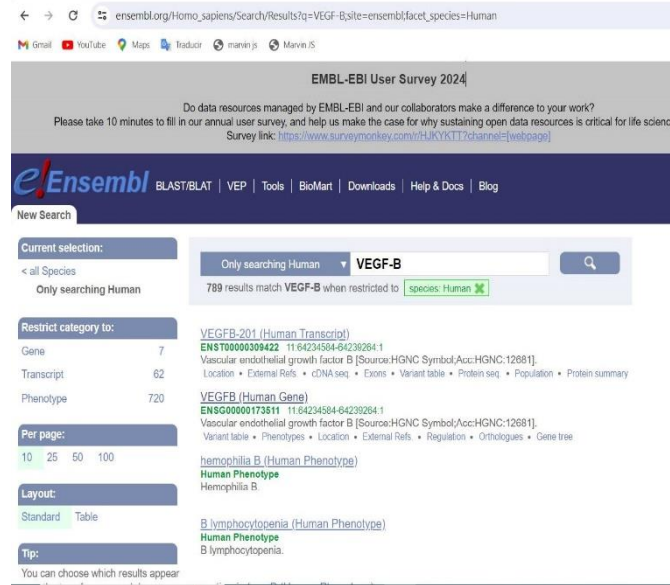


Figura 3: Ingreso del gen VEGF- B. Gene Human

Cuando ingreso a la secuencia génica me va a dar la información de los codones de la proteína. Si voy a sequence y le doy un clip para que me despliegue la secuencia, se aprecia VEGFB exons en rojo más intenso son los exones, lo que no está seleccionado son intrones.

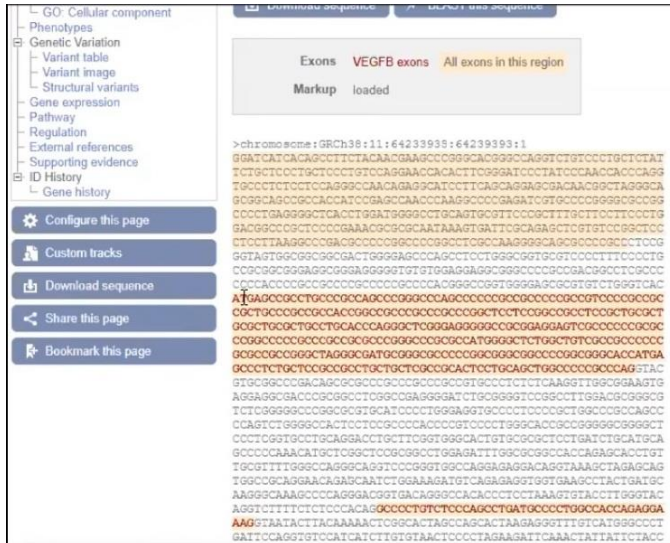


Figura 4: Regiones exónicas (letras resaltadas con rojo más intenso) e intrones (letras no resaltadas con colores) del gen VEGF- B observadas por medio del programa ensembl.

Lo que está seleccionado como resaltadito, son todas las regiones exónicas, pero los verdaderos exones son los que están en letras rojas fuertes. Lo que no está seleccionado son los intrones.

2.3. Observaciones de las regiones exónicas e intrones por medio del programa NCBI y ensembl. Si vamos al NCBI, el programa registra que la información de la secuencia codificante, es decir, el cds, es la secuencia madurada, es decir la secuencia que ya ha pasado por el corte y el empalme de los intrones y exones, en este caso ya está pegado todos los exones.

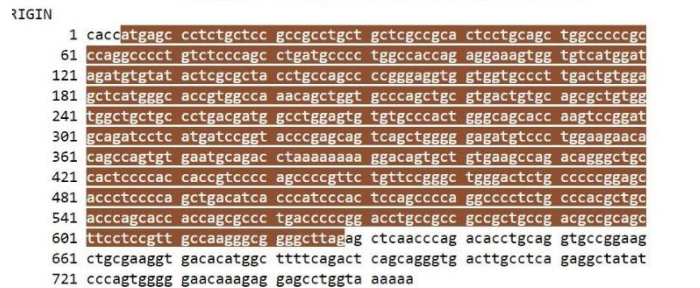
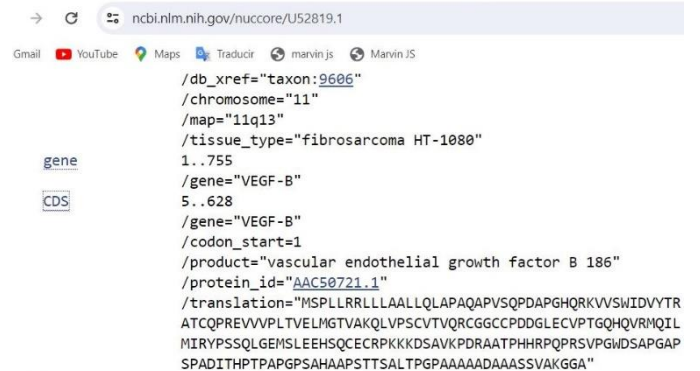


Figura 5: Regiones exónicas observadas en el NCBI, luego del corte y empalme de los exones e intrones.

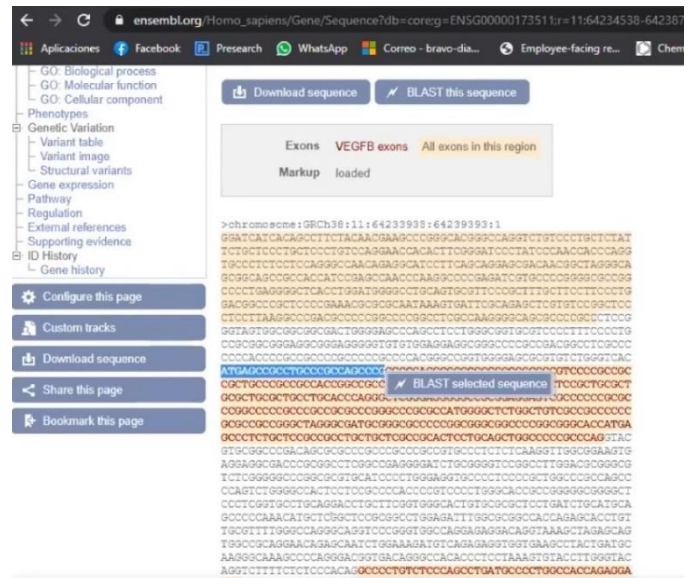


Figura 6: Regiones exónicas e intrones observados en el ensembl.

Las regiones exónicas son las que están resaltadas con rojo, las regiones que no están resaltadas son los intrones (se aprecian los intrones dispersos. Quiere decir, que aún los exones e intrones no han pasado por el corte y el empalme).

**2.4. Verificación de la secuencia y codón de inicio de la traducción.** Es conveniente utilizar la información del NCBI, pero a veces la secuencia del NCBI, hay que realizar una verificación, porque no falta que, estén ahí mal, sobremodo, si no tienen la secuencia codificante completas. Si no son secuencias codificantes completas hay que tener muchísimo cuidado, porque muy posiblemente está solamente un pedacito del gen secuenciado, y no esté la parte de la secuencia que se necesite para la investigación en sí. Lo que se necesita es verificar el codón atgagccc.

```

/map="11q13"
/tissue_type="fibrosarcoma HT-1080"
gene 1..755
/ gene="VEGF-B"
CDS 5..628
/ gene="VEGF-B"
/ codon_start=1
/product="vascular endothelial growth factor B 186"
/protein_id="AAC50721.1"
/translation="MSPLLRLLLAALLQLAPAPVSPDAPGHQRKVVSIIDVYTR
ATCPREVVPLTVELMGTVAQLVPSCVTVQRCCGCPDGLCEVPTGQHQVRMQL
MIRYPSSQLGEMSLIEHSQCECRPKKDSAVKPDRAATPHRRQPRSPVGNDSAPGAP
SPADITHPTAPGPSAAHAAPSTTSALTPGPAADAAAASVAKGGA"
ORIGIN
1 caccatgagc cctctgctcc gccgcctgct gctcgcgca ctcctgagc tggcccccg
61 ccaggccctt gtcctccagc ctgatgccc tggccaccag aggaagatg tctcatgat
121 agatgtgat actgcgcta cctgccagc ccggagggtg gtggtccct tgaactgga
181 gctcatggg accgtggcca aacagctggt gccacgctg gtagctgac agcctgtgg
241 tggctgctg cctgacgat gctggagtg tggcccaat ggcagcacc aagtcggat
301 gcagatcctc atgatccgt acccgagcag tcagctggg gagatgccc tgaagaaca
361 cagccagtgt gaatcgagc ctataaaaaa ggacagtgt gtgaagcag acagggctg
421 cactccccc cactgccc agccccgtt tgtccgggc tggactctg cccccggag
481 accctccca gctgacatca ccatccca cccagccca gcccctctg cccagctgc
541 acccagacc accagccccc taccccccg acctgcgcc cccctgccc acgcccagc
601 ttctccgtt gccaaaggg gggcttagg ctcaaccag acactgagc gtcgggaag
661 ctgggaaggt gacacatggc ttttcagact cagcaggtg acttgcccta gaggtatat
721 cccagtggg gaacaagag gagcctgta aaaaa
    
```

Figura 7: Verificación en el NCBI de la cds y codón de inicio de la traducción del gen VEGF-B

Figura 8: Verificación de la secuencia codificante mediante el programa ensembl.

**2.5. Diseño del segRNA mediante el programa benchling.** En benchjeling se va a crear un proyecto nuevo. Al desglozar crear project se ingresa a crispr guides que son los segRNA. Al ingresar a crispr segRNA. Lo más fácil es ingresar el gen VEGF-B, pero para ingresar al Programa Benchling es necesario quitar el guion y sea reconocido el gen VEGFB. El gen en estudio es el VEGFB, al ingresar el dato de genome, tiene que ser para H. sapiens. Luego de ingresar la información dar next.)

Figura 9: Diseño CRISPR Guides. VEGFB. Organismo: Homo sapiens.

Acá ingresar al RNA como tal. Tenemos segRNA simple con un largo de 20 pares de bases porque es el promedio del largo de la secuencia cripr. El genoma en estudio, es el humano. La secuencia PAM es NGG . Los sitios NGG son unos nucleótidos específicos depende si es NGG, NAG, NG . En la presente investigación, estamos trabajando con las cas9 y por tanto se eligen NGG (los sitios NGG son unos nucleótidos específicos). Si estamos trabajando con cas9. La cas9 normal trabaja con sitios NGG. Luego le doy finish. Luego de dar finish me va arrojar el exón, es decir, la secuencia codificante que está en la parte de arriba.

En el momento que le di más ---el programa ha iniciado a diseñar secuencias, estas secuencias corresponden al segRNA, en teoría deben tener de largo 20 pares de bases. Se aprecia la región PAM es muy variable (GGG, AGG, CGG,...). Si yo hubiera seleccionado una región más grande---las

secuencias PAM variarían de región en región---no es lo mismo que yo reconozca un pedazo de una secuencia en comparación a una secuencia más grande. En este caso me va a dar la posición en la que te a reconocer ese segRNA. Es conveniente seleccionar muchísimas más bases que las 20 pb de bases del segRNA.

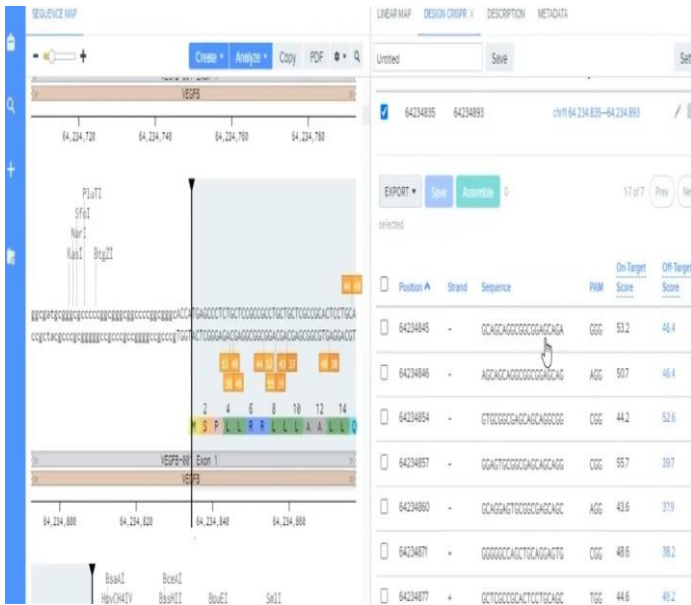


Figura 10: Diseño de secuencias, la secuencia PAM varía de región en región.

Estos numeritos que me está poniendo aquí, son los segRNA, si yo los voy seleccionando se aprecia al lado derecho ---donde va a identificar posición y cadena (straid). Así sucesivamente me los va a ir acomodando en donde me va a identificar la posición y la cadena. Las cadenas que tengan negativa, quieren decir que, se me va a pegar a la cadena antisentido, es decir, la que está en 3'-5'. Las cadenas que tengan positivo, se van a pegar a la cadena sentido, es decir 5'-3'. También se obtiene la secuencia del segRNA, la secuencia PAM para ese segRNA, un score on target y un score of target.

Si yo selecciono la on target---me va a dar una descripción---es un score optimizado de este estudio, la reseña bibliográfica, es un score para 20 pares de bases, con un NGG PAM. El score es de 0-100. Mientras más alto sea el score, es mejor.

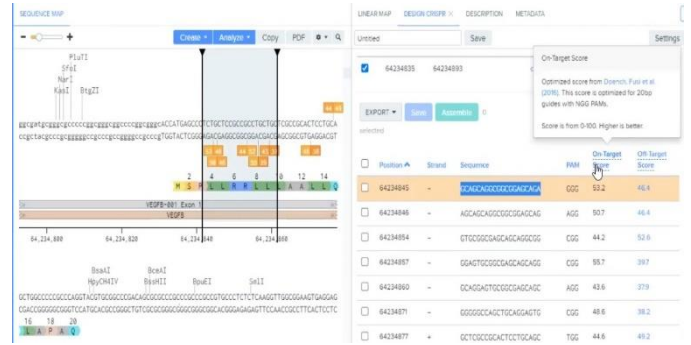


Figura 11: Selección del on target más alto (53.2)

Si selecciono el score más alto. Quiere decir que este segRNA tiene el mejor score para que me pueda reconocer esta secuencia y el corte sea efectivo.



Figura 12: Selección del score más alto (55.7).

En referencia al of target, también, dice que es un score de especificidad, que va de un rango de 0-100. Entre más alto es mejor. En base a lo que se está trabajando, 52.6 es el of target más alto. Pero si verifico el on target es menor.

Hay que procurar cuando se seleccione los segRNA fijarse primero en el off target, es mejor que no haga cortes aleatorios a lo que mejor me reconozca con un poquito de menos especificidad la secuencia PAM.

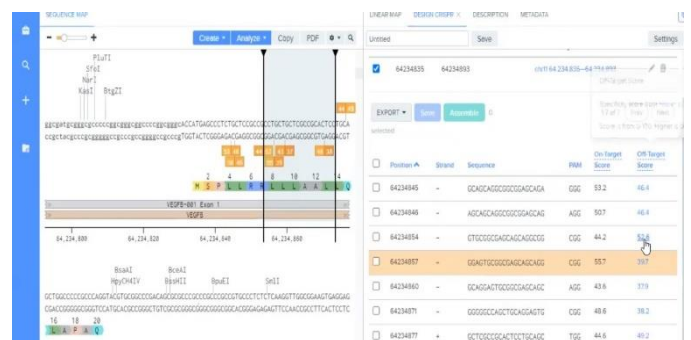


Figura 13: Selección del of target más alto (52.6)

**2.6. verificación de la secuencia por medio de la herramienta blast.** Blas, es una herramienta del NCBI. El blast permite comparar una secuencia con otra---el blast las pega---esta secuencia se va a pegar en esta secuencia y son tanto por ciento complementario.

Como estoy diseñando un nucleótido que es un segRNA y lo estoy diseñando a partir de otra cadena de nucleótidos voy a realizar un nucleotide BLAST, que va de nucleótido a nucleótido.

Voy a pegar la secuencia del segRNA que se ha seleccionado: **GTGCGGCGAGCAGCAGGCGG**

Lo voy a dar la orden que me compare con todo el genoma porque hipotéticamente lo voy a ingresar a una célula. Lo voy a ingresar a un organismo humano que no solamente tiene esta secuencia si no que todo el genoma. Le voy a decir que me haga una megablast. Que es el blast con mayor especificidad para encontrar secuencias similares. Al momento de seleccionar, verificar el organismo --en este caso es el humano y evitar error el experimento.

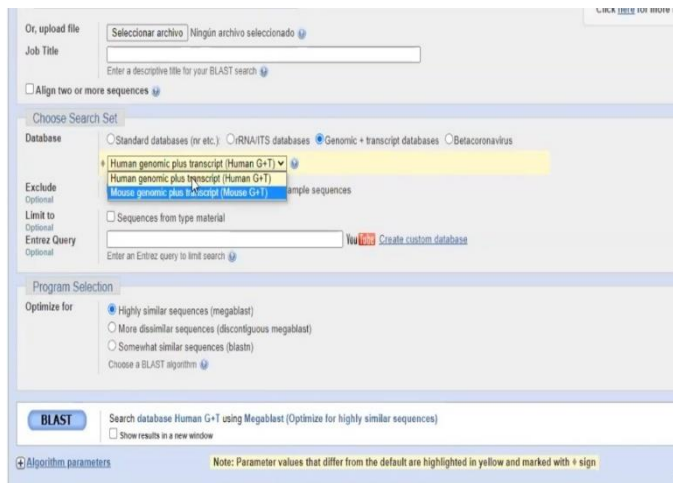


Figura 14. Comparación de secuencias por medio de la herramienta blast

Ubicar título al archivo. Luego de ello, correr el blast. Luego va a iniciar a buscar las secuencias. Lo primero que se obtiene son secuencias de transcritos.

Si analizamos la parte derecha se tiene que ---en Query cover es 100% compatible con el segRNA del transcrito de esta proteína. Hemos verificado que en el primer y segundo lugar está el gen (VEGFB) que estamos trabajando. Y más hacia abajo, están otros tipos de genes.

Lo importante es, hay que, es el E-value. Un E-value más cercano a cero, quiere decir que esta secuencia es supremamente específica para reconocer mi transcrito x.

A pesar del Query cover (la homología de esas bases) es alta. Lo que me interesa en el estudio es un Evalue que esté más cerca a cero o muy cercano a cero, y un Query cover a 100%

En la presente investigación, no se ha considerado a los transcritos, debido a que no son de importancia en la presente investigación.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Homo sapiens vascular endothelial growth factor B (VEGFB), transcript variant VEGFB-105, mRNA	40.1	40.1	100%	0.009	100.00%	NM_003377.4
Homo sapiens vascular endothelial growth factor B (VEGFB), transcript variant VEGFB-167, mRNA	40.1	40.1	100%	0.009	100.00%	NM_01243733.1
PREDICTED: Homo sapiens signal regulatory protein alpha (SRPA), transcript variant X4, mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	XM_006723545.4
PREDICTED: Homo sapiens signal regulatory protein alpha (SRPA), transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	XM_024451036.1
PREDICTED: Homo sapiens immunoglobulin superfamily member 21 (IGSF21), transcript variant X4, mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	XM_011542119.3
Homo sapiens signal regulatory protein alpha (SRPA), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	NM_01330728.1
PREDICTED: Homo sapiens signal regulatory protein alpha (SRPA), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	XM_052626278.3
Homo sapiens trophoblast glycoprotein like (TPGL), mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	NM_01195520.1
Homo sapiens immunoglobulin superfamily member 21 (IGSF21), mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	NM_032888.4
Homo sapiens signal regulatory protein alpha (SRPA), transcript variant 3, mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	NM_00792.2
Homo sapiens signal regulatory protein alpha (SRPA), transcript variant 2, mRNA	32.2	32.2	80%	2.3	100.00%	NM_018490023.1

Figura 15. E-value es más cercano a cero (0.009) y Query cover (100%). Esto confirma que, la secuencia es altamente específica para reconocer el transcrito x.

En la presente investigación, voy a modificar un gen. A mí, lo que me interesa son las secuencias genómicas.

En primera posición también me pone mi gen, me dice que es un transcrito primario que está en el cromosoma 11, en el brazo corto, en la región 12.

Genomic sequences	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p14 Primary Assembly	40.1	1524	100%	0.010	100.00%	NC_000011.10
Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p14 Primary Assembly	34.2	2491	100%	0.61	100.00%	NC_000001.11
Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p14 Primary Assembly	34.2	1544	100%	0.61	100.00%	NC_000004.12
Homo sapiens chromosome 6, GRCh38.p14 Primary Assembly	34.2	1174	100%	0.61	100.00%	NC_000006.12
Homo sapiens chromosome 5, GRCh38.p14 Primary Assembly	32.2	1045	100%	2.4	100.00%	NC_000005.10
Homo sapiens chromosome 8, GRCh38.p14 Primary Assembly	32.2	1310	100%	2.4	100.00%	NC_000008.12
Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p14 Primary Assembly	32.2	1217	100%	2.4	100.00%	NC_000016.10
Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p14 Primary Assembly	32.2	956	95%	2.4	100.00%	NC_000020.11
Homo sapiens chromosome 16 genomic scaffold, GRCh38.p14 alternate locus group ALT_REF_LOCL1	32.2	32.2	80%	2.4	100.00%	NT_187807.1
Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p14 Primary Assembly	30.2	2095	100%	9.6	100.00%	NC_000002.12

Figura 16. Secuencias genómicas del transcrito. En primer lugar está Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p14 Primary Assembly.

Al dar un clip a la región seleccionada y cuando se abre, se aprecia al gen VEGFB.

Lo seleccionado es el segRNA (Query). La parte que está debajo indica la región que se está pegando de ese gen que va desde la posición 287 a 268. Así mismo se aprecia que tiene un 100% de

identidad con esa secuencia que no tiene gaps y que tiene Evalue de 0.09

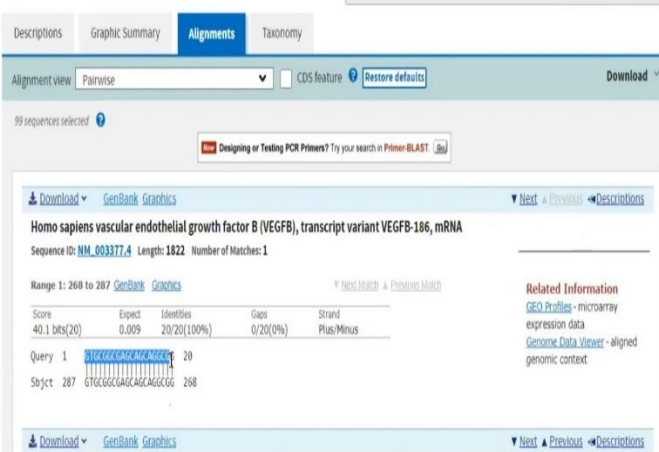


Figura 17. Selección del segRNA (Query).

Ya teniendo este análisis. Se verifica que los E value siguientes siguen subiendo. Si los Evaluate inician a subir, quiere decir que el segRNA no se va a pegar ahí a pesar de la homología la probabilidad que me corte es menor es casi nula a pesar de las homologías de las secuencias, la probabilidad que me corte es menor. Es casi nula. A pesar de la homología de las secuencias.

Seguidamente se va a copiar esta secuencia a un word o block de notas. Lo importante es tener esta secuencia en mente:

**GTGCGGCGAGCAGGCGG**

**2.7. SnapGene.** SnapGene ofrece la forma más rápida y sencilla de planificar, visualizar y documentar la clonación de ADN y la PCR.

Al segRNA se tiene que insertar los sitios de restricción enzimática para las enzimas para las que estamos cortando, crear un archivo en snapgene e insertar.

Esta secuencia GTGCGGCGAGCAGGCGG está en el sentido 5´-3´ siempre las secuencias se van a sacar así:

5´ GTGCGGCGAGCAGGCGG 3´

En el lado 5´ tengo que añadirle sitios de restricción para la enzima BgLI, copio las secuencias seleccionadas (AGATC) y las paso, lo tengo que clonar en el sentido correcto. Es decir en el lado

5´ **AGATCT GTGCGGCGAGCAGGCGG** 3´

Luego, al lado izquierdo voy a pegar el otro sitio de restricción, es decir la enzima BamHI, de ellas, copio las secuencias seleccionadas (GATCC)

5´ **AGATCTGTGCGGCGAGCAGGCGG**GATCC 3´

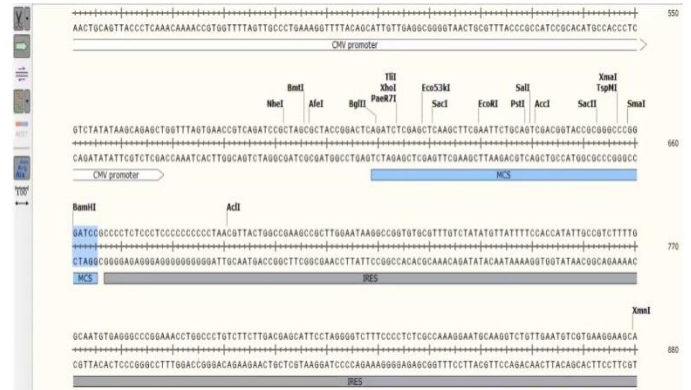


Figura 18. En el SnapGene. Ubicación de los sitios de restricción (BgLI y BamHI).

Esta secuencia (5´ **AGATCTGTGCGGCGAGCAGGCGG**GATCC 3´) ya está apta para que se habrá un nuevo archivo en snapgene.

Al ingresar al SanpGene. Abrimos file, seguido vamos a New DNA File...

Luego de ingresar a New DNA File se copia la secuencia (AGATCTGTGCGGCGAGCAGGCGG GATCC). En la parte de File Name voy a escribir sgRNA.dna. Luego doy ok.

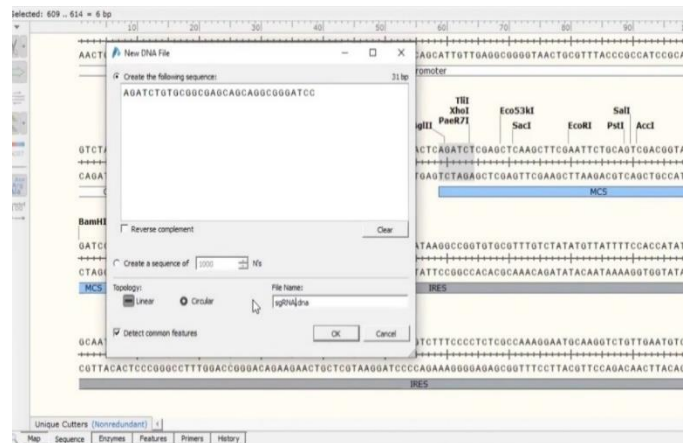


Figura 19. Ingreso de la secuencia (AGATCTGTGCGGCGAGCAGGCGG GATCC)

Seguidamente se verifica que esté correctamente mis sitios de corte. Al lado izquierdo se observa BgLI. A lado derecho se observa el otro sitio de corte BamHI

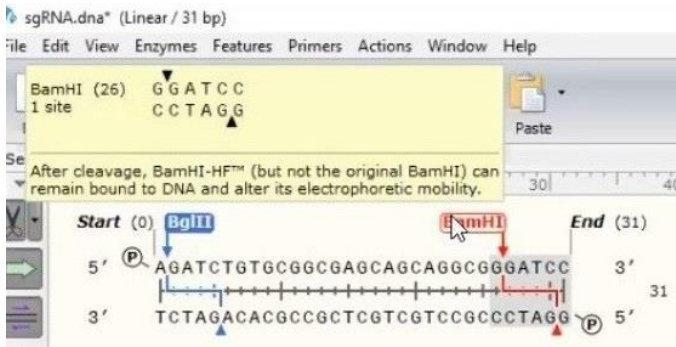


Figura 20. Verificación de las enzimas de restricción con sus respectivas secuencias.

Verificados los sitios de corte, se tiene el conocimiento que, mi inserto, va ser el segRNA. Si verificamos el número de bases, se tiene 31pb, por tanto se va a cortar esta base. Luego doy un play a please chose the fragment to ligate. Me creo un sgRNA de 25 pb, en total tengo un producto final de 5282 pb. Luego dar un nombre: plasmidoclonado. Luego le doy guardar

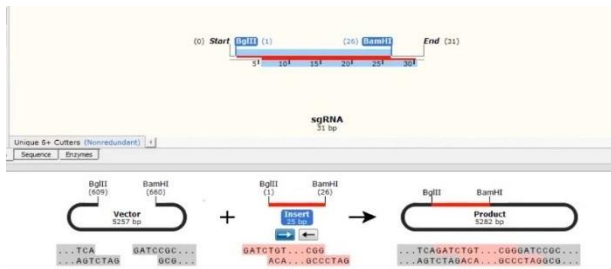


Fig. 21. Proceso para quitar la base excedente. El inserto es del segRNA.

**3. Resultados.** Se ha realizado la clonación del sgRNA en el plásmido.

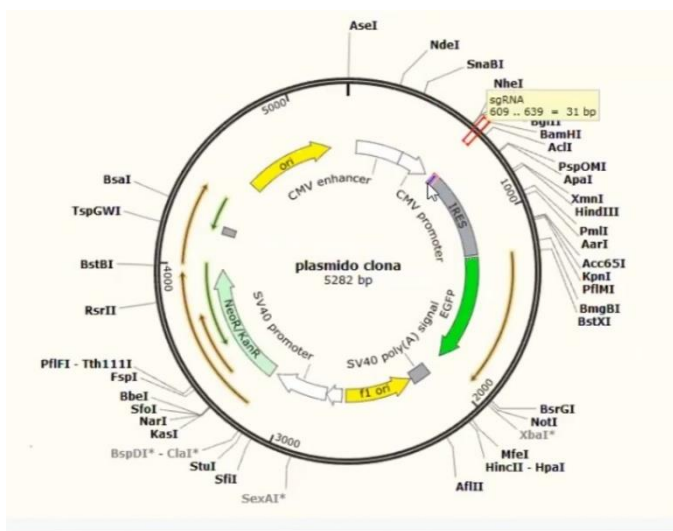


Fig. 22. sgRNA clonado en plásmido.

**4. Conclusiones.**

Realizada la clonación del sgRNA, se ha obtenido un sgRNA de 25pb y un producto final de 5282pb.

**Agradecimientos.** A la Dra. Diana Marcela Bravo Estupiñan por su apoyo académico.

**Referencias**

- [1] Y. Wei, et al. Increased Serum VEGF-B Level Is Associated With Renal Function Impairment in Patients With Type 2 Diabetes Front Endocrinol (Lausanne). 2022. PMID 35399943
- [2] MI Zafar, et al. The role of vascular endothelial growth factor-B in metabolic homeostasis: current evidence. 2017. Aug 31. PMID 28798193
- [3] A. Raissadati A et al. Vascular Endothelial Growth Factor-B Overexpressing Hearts Are Not Protected From Transplant-Associated Ischemia-Reperfusion Injury. 2017.Exp Clin Transplant, Apr. PMID 27588416
- [4] F. Cheng F et al. Serum vascular endothelial growth factor B is elevated in women with polycystic ovary syndrome and can be decreased with metformin treatment. Clin Endocrinol (Oxf), 2016 Mar. PMID 26387747