



Material
Didáctico
para Estudiantes

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS:
INGENIERÍA GENÉTICA Y
GENÓMICA /
MANIPULACIÓN GENÉTICA
Y GENÓMICA

FQByF



Universidad Nacional
de San Luis

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guías de Trabajos Prácticos: INGENIERÍA GENÉTICA Y GENÓMICA / MANIPULACIÓN GENÉTICA Y GENÓMICA

Licenciatura en Biología Molecular

Curso Optativo: Lic. en Biotecnología (Plan 7/17)

y Lic. en Ciencias Biológicas (Plan 8/13).

Dr. Maximiliano JURI AYUB

Dra. María Jimena MANZUR

Dra. Ludmila CAMPOS

Dra. Meliana CASTRO

Lic. Belén JEREZ

FACULTAD DE
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2019

Decana

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

Vice Decana

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

Secretaria académica

Dra. Estela Isabel GASULL

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Integrantes

Departamento de Bioquímica

y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. Yamina A. DÁVILA

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N° 269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudios dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acorde al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

GUÍA DE ESTUDIO

La presente guía de estudios se ha desarrollado para los estudiantes del curso de grado de “Ingeniería genética y Genómica”, dictado para la carrera de Lic. en Biología Molecular (Plan 15/14), y el curso optativo de grado “Manipulación genética y Genómica” para las carreras de Lic. en Biotecnología (Plan 7/17) y Lic. en Ciencias Biológicas (Plan 8/13).

El objetivo general del curso es formar a los y las estudiantes en los aspectos fundamentales de la manipulación genética, sus principales usos y aplicaciones, y también sus limitaciones. Se transmitirá también a los y las estudiantes cómo la explosión reciente de las metodologías genómicas (primero a través de la secuenciación clásica y posteriormente mediante estrategias de secuenciación masiva) modificó radicalmente las posibilidades de manipulación genética y sus alcances.

Además, se discutirán aspectos éticos, epistemológicos y políticos relacionados con la disciplina, y nuevos conflictos que surgen del avance técnico disciplinar.

Finalmente, se abordarán textos que interpelen a futuros egresados y egresadas como sujeto social y político. Para cumplimentar los objetivos propuestos, esta guía de estudio comprende un marco teórico de cada temática abordada en el desarrollo de las clases teóricas y actividades a desarrollar en el marco de los trabajos prácticos de aula, de laboratorio y de bioinformática.

INDICE

NORMAS DE SEGURIDAD Y TRABAJO EN EL LABORATORIO

TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO

Trabajo Práctico N° 1: Metilación de ADN plasmídico.

I. Objetivos	1
II. Introducción	1
III. Actividades a Desarrollar	1

Trabajo Práctico N° 2: Clonado de productos de PCR.

I. Objetivos	4
II. Introducción	4
III. Actividades a Desarrollar	5

Trabajo Práctico N° 3: Generación de una variante truncada de una proteína.

I. Objetivos	9
II. Introducción	9
III. Actividades a Desarrollar	10

Trabajo Práctico N° 4: Mutagénesis sitio dirigida mediante PCR.

I. Objetivos	19
II. Introducción	19
III. Actividades a Desarrollar	20

TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA.

TEMA 1: Enzimas de restricción

I. Objetivos	24
II. Introducción	24
III. Clasificación de las enzimas de restricción	25
IV. Cálculo de la frecuencia de corte	29
V. Actividades a Desarrollar	30

TEMA 2: Metilación del ADN

I. Objetivos	34
II. Introducción	34
III. Importancia de la metilación del ADN en ingeniería genética	36
IV. Clasificación de enzimas de restricción	37

V. Actividades a Desarrollar	39
TEMA 3: Clonado	
I. Objetivos	43
II. Introducción	43
III. Cómo realizar un clonado?	43
IV. Sistemas de Expresión	52
a. Sistemas de expresión bacterianos	53
b. Levaduras como sistemas de expresión	57
c. Cultivos celulares como sistemas de expresión	60
V. Actividades a Desarrollar	63

NORMAS DE SEGURIDAD Y TRABAJO EN EL LABORATORIO

1. Dentro del laboratorio, como regla de seguridad general, siempre deben permanecer como mínimo dos personas.
2. El uso de bata (por debajo de las rodillas) es obligatorio dentro del laboratorio, al igual que el uso de barbijo y guantes cuando las actividades a desarrollar así lo requieran.
3. No se permitirá la entrada a los laboratorios con faldas, pantalones cortos, zapatos abiertos y cabello largo suelto, si así lo requieren las condiciones de trabajo en dicha área.
4. Algunos desperdicios líquidos podrán tirarse por las piletas con un rango de pH 6-8, dejando correr agua suficiente.
5. Todos los desperdicios sólidos y papeles deberán colocarse en los botes de basura. El material de vidrio roto deberá descartarse en forma especial para ese efecto se deberá avisar al JTP o auxiliares.
6. Al usar cualquier tipo de reactivos, asegúrese que es el correcto y lea bien su etiqueta. Si es transferido de recipiente etiquételo de nuevo, colocando nombre de reactivo, fecha y propietario. Asegúrese de utilizar marcadores indelebles para el rotulado.
7. Usar guantes apropiados para el manejo de reactivos corrosivos y/o altamente tóxicos.
8. Gafas protectoras para evitar la exposición a los rayos UV.
9. Todos los reactivos deberán manejarse con el material perfectamente limpio. Todos los sólidos deberán manejarse con espátula.
10. No utilizar reactivos sin haber registrado sus propiedades en el cuaderno de laboratorio, enterándose de los riesgos de su uso y tomando las precauciones pertinentes.
11. No pipetear con la boca ácidos, álcalis o cualquier producto corrosivo, inflamable o tóxico, use una pera o propipeta para extraer cualquier tipo de líquido. Si algún reactivo es accidentalmente ingerido, avise de inmediato.
12. No manipular sustancias inflamables (benceno, tolueno, éter, etc.) en presencia de mecheros encendidos. Utilizar la campana para materiales volátiles.
13. Dilución de ácidos: añadir lentamente el ácido al agua contenida en un vaso, agitando constantemente y enfriando el vaso receptor. Nunca añadir agua al ácido.
14. Cuando requiera una agitación vigorosa por inversión del recipiente, tápelo con un tapón de vidrio esmerilado o de goma. Nunca lo haga con la mano.
15. Al calentar soluciones y/o reactivos, hágalo en recipientes adecuados para ese efecto (vidrio PYREX). Al calentar una solución en un tubo de ensayo, debe hacerse bajo el

nivel del líquido y constantemente agitando. No debe apuntarse con el tubo al compañero o a sí mismo, pues puede proyectarse.

16. No se debe oler ningún líquido poniendo directamente la nariz donde está contenido, debe abanicarse con la mano los vapores hacia la nariz.
17. Todas las operaciones que desprendan gases tóxicos y/o irritantes deberán efectuarse bajo una campana con extractor.
18. Nunca devuelva al recipiente original una sustancia que se ha sacado del mismo, pues podría contaminarla.
19. No ingiera alimentos o bebidas en el laboratorio. Recuerde que las bromas o juegos dentro del área de trabajo no están permitidas, evite disgustos o llamadas de atención.
20. Al terminar de usar su equipo desconéctelo de la electricidad.
21. Tomar sólo las cantidades de reactivos necesarios para el trabajo experimental.
22. No lleve sus manos sin lavar a la boca u ojos cuando haya utilizado productos químicos.
23. Lavarse las manos antes y después de haber finalizado las tareas en el laboratorio.
24. **Todo el material utilizado para cultivar *E. coli* debe ser descontaminado con lavandina al 10 % o autoclavado antes de ser descartado.**
25. **Todo el material que estuvo en contacto con solventes orgánicos (como por ejemplo benceno, cloroformo, fenol, etc.), debe ser descartado en los recipientes adecuados.**
26. **Todas las prácticas deberán realizarse en forma ordenada y al terminar, toda el área de trabajo deberá quedar limpia, ordenado el material usado y mecheros apagados.**
27. **ANTE DUDAS EN CÓMO MANIPULAR MATERIALES O REACTIVOS, PREGUNTE A LOS AUXILIARES O JTP PRESENTES.**

SEÑALIZACIÓN DE SEGURIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS:

Rombo NFPA (*Nacional Fire Protection Agency*) creado por la Agencia Nacional de Protección del Fuego de los Estados Unidos.



Figura 1: rombo NFPA

Algunos reactivos para tener en cuenta y de uso frecuente en el laboratorio:

- **Acrilamida/Bisacrilamida**

La acrilamida/bisacrilamida es cancerígena, mutagénica, tóxica por inhalación e ingestión, irritante, tóxico para la reproducción. Irrita los ojos y la piel. Posible riesgo de perjudicar la fertilidad.

- **BCIP/NBT**

Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto. Nocivo por inhalación y en contacto con la piel. Irrita los ojos.

- **Triton X-100**

Tóxico si se ingiere. Riesgo de daño severo para los ojos.

NFPA ratings (escala 0 - 4)

Salud = 2 Inflamabilidad = 1 Reactividad = 0

- **Azida Sódica**

Irritaciones en vías respiratorias, ojos, en mucosas de la boca, garganta, esófago y tracto intestinal. Efectos sistémicos: efectos en el sistema nervioso central, taquicardias, hipotensión, dificultades respiratorias, dolores de cabeza, vómitos, náuseas.

- **β -Mercaptoetanol**

Nocivo por ingestión, tóxico en contacto con la piel, provoca quemaduras y lesiones oculares.

- **Metanol**

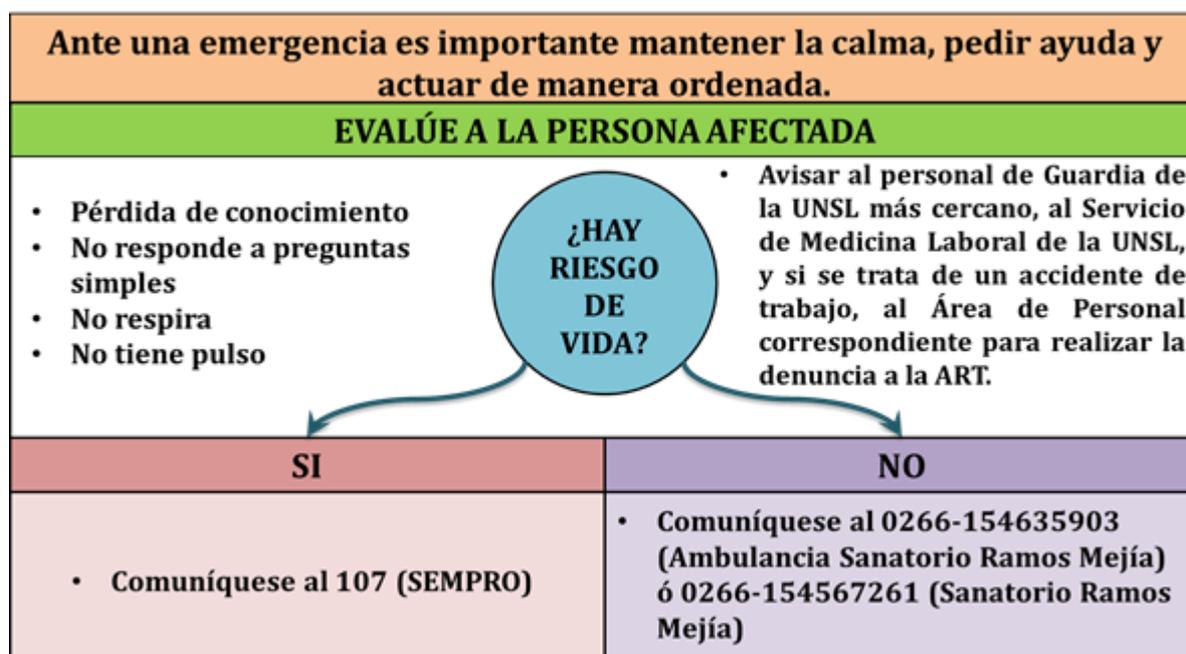
Irrita las mucosas nasales y oculares. Produce asfixia, vértigo, tos, dolor de cabeza, náuseas, vómito, trastornos oculares, convulsiones e inconsciencia. En casos graves: coma, paro respiratorio, ceguera, convulsiones, acidosis metabólica severa y muerte.

- **Ácido acético glacial**

Los vapores producen irritación en vías respiratorias. Sustancia muy corrosiva. Puede provocar bronconeumonía, edemas en el tracto respiratorio. Quemaduras de piel. Trastornos de visión, ceguera (lesión irreversible del nervio óptico). Quemaduras en mucosas, en esófago y estómago. Espasmos, vómitos, por ingestión. Riesgo de perforación intestinal y de esófago. No se descarta: shock, paro cardiovascular, acidosis, problemas renales.

- **Radiación UV (usada en el transiluminador)**

La exposición a radiaciones UV puede producir quemaduras de retina, conjuntivitis, queratitis y cataratas. Y en piel puede producir eritemas.



**GUÍA DE
TRABAJOS PRÁCTICOS
DE LABORATORIO**

TP n°1: METILACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

I. OBJETIVOS:

- Entender la importancia de los sistemas de metilación bacterianos para el diseño de estrategias en Ingeniería Genética.

II. INTRODUCCIÓN

La metiltransferasa codificada por el gen Dam (ADN-adenina metiltransferasa) es una enzima que agrega un grupo metilo a la adenina de la secuencia 5'-GATC-3' en el ADN recién sintetizado. Esta enzima participa (entre otras cosas) indirectamente en la regulación de la expresión de genes, la reparación de desajustes y la replicación bacteriana. Debido a que algunas enzimas de restricción son sensibles a la metilación de adeninas, la enzima Dam puede interferir en algunas técnicas de biología molecular, razón por lo cual se han seleccionado cepas de bacterias sin actividad Dam (cepas Dam-) para ser utilizadas en Ingeniería Genética.

III. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

PARTE I: RESOLUCIÓN DE PROBLEMA

Usted desea emplear el vector pLP-EGFP-C1 (ver secuencia debajo) para realizar diversos ensayos que requieren como paso previo, digestión con enzimas de restricción. El problema es que tiene dos preparaciones del plásmido, una ha sido obtenida a partir de una cepa bacteriana que no posee el sistema de metilación Dam (cepa Dam⁻) y otra a partir de una que si lo posee (cepa Dam⁺), pero no sabe cuál es cada una.

Para evaluar esto, cuenta con las siguientes enzimas: BspEI, XbaI, XhoI, StuI, NcoI y AfeI (ver tabla), cuyos sitios de corte se marcan en la secuencia de pLP-EGFP-C1. Los siguientes *links* poseen información acerca del efecto de la metilación que puede serle de ayuda:

<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/dam-dcm-and-cpg-methylation>
<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/dam-and-dcm-methylases-of-e-coli>

A partir de toda la información que dispone:

1. Analice cuáles enzimas son insensibles y cuáles potencialmente sensibles a metilación Dam.

- De las enzimas potencialmente sensibles a metilación Dam, analice cuál o cuáles serían inhibidas de acuerdo a la secuencia contexto.
- Diga que enzima sería la más adecuada para confirmar que ambas muestras corresponden al mismo vector.
- Diga que enzima emplearía para distinguir entre los vectores metilado y no metilado en sitios Dam.

Tabla. Enzimas de restricción que cortan en el plásmido pLP-EGFP-C1

Enzima	Nº de cortes en pLP-EGFP-C1	Sitio de corte en pLP-EGFP-C1	Secuencia que reconoce
BspEI	1	1330	t/ccgga
XbaI	1	1533	t/ctaga
StuI	1	2707	agg/cct
AfeI	1	596	agc/gct
XhoI	1	1343	c/tcgag
NcoI	4	360, 611, 2615, 3318	c/catgg

Secuencia del plásmido pLP-EGFP-C1

>pLP-EGFP-C1

```

TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCCG CGTTACATAA
CTTACGGTAA ATGGCCCCC TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG
TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA
CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC
GCCTGGCATT ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC TACTTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
TCGCTATTA CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG ACTCACGGGG
ATTTCCAAGT CTCCACCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA
AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA
GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC CGTCAGATCC GCTACGGCTA CCGGTCGCCA CCATGGTGAG CAAGGGCGAG
GAGCTGTTCA CCGGGGTGGT GCCCATCCTG GTCGAGCTGG ACGGCGACGT AAACGGCCAC AAGTTCAGCG
TGTCCGGCGA GGGCGAGGGC GATGCCACCT ACGGCAAGCT GACCCTGAAG TTCATCTGCA CCACCGCAA
GCTGCCCGTG CCCTGGCCCA CCCTCGTGAC CACCCTGACC TACGGCGTGC AGTGCTTCAG CCGTACCCC
GACCACATGA AGCAGCACGA CTTCTTCAAG TCCGCCATGC CCGAAGGCTA CGTCCAGGAG CGCACCATCT
TCTTCAAGGA CGACGGCAAC TACAAGACCC GCGCCGAGGT GAAGTTCGAG GGCGACACCC TGGTGAACCG
CATCGAGCTG AAGGGCATCG ACTTCAAGGA GGACGGCAAC ATCCTGGGGC ACAAGCTGGA GTACAACCTAC
AACAGCCACA ACGTCTATAT CATGGCCGAC AAGCAGAAGA ACGGCATCAA GGTGAACCTC AAGATCCGCC
ACAACATCGA GGACGGCAGC GTGCAGCTCG CCGCACAATA CCAGCAGAAC ACCCCATCG CGCAGCCGCC
CGTGCTGCTG CCGGCAACC ACTACCTGAG CACCCAGTCC CCCTGAGCA AAGACCCCAA CGAGAAGCGC
GATCACATGG TCCTGCTGGA GTTCTGAGC GCGCCGGGA TCACTCTCGG CATGGACGAG CTGTACAAGT
CCGGAATCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA TAACCTCGTA TAGCATACAT TATACGAAGT TATAGATCCA
ATATTATTGA AGCATTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAT
AAACAAATAG GGGTTCGGCG CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT GGATCCACCG GATCTAGATA
ACTGATCATA ATCAGCCATA CCACATTTGT AGAGGTTTTA CTTGCTTTAA AAAACCTCCC ACACCTCCCC
CTGAACCTGA AACATAAAAT GAATGCAATT GTTGTGTTA ACTTGTTTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA
AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTACAA ATAAAGCATT TTTTTCCTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTC
AAACTCATC AATGTATCTT AACCGTAAA TTGTAAGCGT TAATATTTG TTAATAATTC CTTATAAATC AAAAGAATAG
TTGTTAAATC AGCTCATTTT TTAACCAATA GGCCGAAATC GGCAAAATCC CTTATAAATC AAAAGAATAG
ACCGAGATAG GGTTGAGTGT TGTTCCAGTT TGGAACAAGA GTCCACTATT AAAGAACGTG GACTCCAACG
TCAAAGGGCG AAAAACCGTC TATCAGGGCG ATGGCCCACT ACGTGAACCA TCACCCTAAT CAAGTTTTTT
GGGGTTCGAG TGCCGTAAAG CACTAAATCG GAACCCTAAA GGGAGCCCC GATTTAGAGC TTGACGGGGA
AAGCCGGCGA ACGTGGCGAG AAAGGAAGGG AAGAAAGCGA AAGGAGCGGG CGCTAGGGCG CTGGCAAGTG
TAGCGGTCAC GCTGCGCGTA ACCACCACAC CCGCCGCGCT TAATGCGCCG CTACAGGGCG CGTCAGGTGG
CACTTTTTCGG GGAAATGTGC GCGGAACCCC TATTTGTTTT TTTTCTAAA TACATTCAA TATGTATCCG
CTCATGAGAC AATAACCTG ATAAATGCTT CAATAATATT GAAAAAGGAA GAGTCCTGAG GCGGAAAGAA
CCAGCTGTGG AATGTGTGTC AGTTAGGGT TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA
    
```

```

AGCATGCATC TCAATTAGTC AGCAACCAGG TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC AGAAGTATGC
AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA TAGTCCC GCCA TACTCCG CCCATCCC GCCTAACTCC
GCCAGTTCC GCCATTCTC CGCC CCATGG CTGACTAATT TTTTTTATTT ATGCAGAGGC CGAGGCCGCC
TCGGCCTCTG AGCTATTCCA GAAGTAGTGA GGAGGCTTTT TTGG AGGCCT AGGCTTTTGC AAAGATCGAT
CAAGAGACAG GATGAGGATC GTTTCGCATG ATTGAACAAG ATGGATTGCA CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT
GGGTGGAGAG GCTATTCCGC TATGACTGGG CACAACAGAC AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG
GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTCAA
GACGAGGCAG CGCGGCTATC GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA
CTGAAGCGGG AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTGAT CTCACCTTGC
TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC GGCTACCTGC
CCATTTCGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT GGAAGCCGGT CTGTGCGATC
AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGCC TCGCGCCAGC CGAAGTGTTT GCCAGGCTCA AGGAGAGCAT
GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGAC CCA TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAAAATGGC
CGTTTTCTCG GATTTCATCGA CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA CCGTTGGCTA
CCCGTGATAT TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC
TCCCATTTCG CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT CTGGGGTTCG
AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCACGAGA TTTTCGATTCC ACCGCCGCTT TCTATGAAAG
GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG
TTCTTCGCC ACCCTAGGGG GAGGCTAACT GAAACACGGA AGGAGACAAT ACCGGAAGGA ACCCGCGCTA
TGACGGCAAT AAAAAGACAG AATAAACGC ACGGTGTGG GTCTGTTGTT CATAAACCGG GGGTTCGGTC
CCAGGGCTGG CACTCTGTCC ATACCCACC GAGACCCAT TGGGGCCAAT ACGCCGCGT TTCTTCCTTT
TCCCCACCC ACCCCCAAG TTCGGGTGAA GGCCAGGGC TCGCAGCCAA CTGCGGGGCG CGAGGCCCTG
CCATAGCCTC AGGTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA
GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTTCGTTCCA CTGAGCGTCA
GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA
CAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT
AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAA TACTGTCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG CCACCACTTC
AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG
ATAAGTCGTG TCTTACCGGG TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC
GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGG GCGAACGACC TACACCGAAC TGAGATACCT ACAGCGTGAG
CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCCGAA
    
```

PARTE II: EXPERIMENTAL

A) Reacción de digestión del plásmido pLG-EGFP-C1

	Digestión con Enzima I		Digestión con Enzima II	
	Control sin digerir (ND)	Digerido (D)	Control sin digerir (ND)	Digerido (D)
H₂O	17 µl	16,5 µl	17 µl	16,5 µl
Buffer*	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Plásmido (1ug)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Enzima	-	0,5 µl	-	0,5 µl
Volumen final	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Incubación	1 hora a 37°C		1 hora a 37°C	
Inactivación	20 minutos a 65°C		20 minutos a 65°C	

* usar el *buffer* adecuado para c/enzima.

B) Visualización de los productos de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% peso en volumen (p/v).

TP n°2: SUBCLONADO DE FRAGMENTOS DE PCR EN UN VECTOR CON T OVERHANGS.

I. OBJETIVOS:

- Comprender el fundamento del clonado en un vector para clonado directo de productos de PCR.
- Comprender el fundamento de selección fenotípica y genotípica.
- Llevar a cabo el clonado de productos de PCR en el vector pGEM-T Easy.
- Realizar un *screening* de los clones obtenidos.
- Realizar una extracción de ADN plasmídico.
- Realizar un mapeo de restricción para corroborar el clonado.

II. INTRODUCCIÓN:

Esta metodología se basa en la inserción de un producto amplificado por PCR (inserto) en un vector plasmídico mediante un proceso denominado ligación. Para que esta construcción (DNA recombinante) persista en el tiempo y se amplifique *in vivo*, es necesario introducirla en una célula hospedadora como *E. coli* (que previamente se ha hecho “competente” para favorecer la entrada del DNA recombinante) y seleccionar aquellas células portadoras del DNA recombinante.

Haciendo uso de la particularidad de la *Taq* polimerasa de adicionar en el extremo 3' una adenosina protruyente, utilizaremos un vector con una timina 3' sobresaliente (pGem-T-Easy) que mejorará la eficiencia de la ligación del producto de PCR, impidiendo la recircularización del vector y generando un extremo compatible con el producto de PCR.

Para la selección de bacterias que han incorporado el vector se utilizará el antibiótico ampicilina, ya que el vector de clonado (pGEM-T Easy) contiene un gen de resistencia para este antibiótico. Este método de selección no nos permitirá identificar las bacterias portadoras del vector recombinante, para ello se utilizará el gen de β -galactosidasa presente en el sitio de clonado múltiple del vector.

El sitio de clonado múltiple está flanqueado por el gen de β -galactosidasa, la cual es capaz de hidrolizar el sustrato orgánico X-Gal y convertirlo en un compuesto azul insoluble. Esta característica nos permitirá seleccionar los vectores recombinantes de aquellos que no lo son, ya que mediante la ligación del inserto al vector se producirá la inactivación del gen

de β -galactosidasa permitiéndonos realizar un *screening* de colonias blancas y azules en un medio conteniendo X-Gal e IPTG.

En la siguiente gráfica se ejemplifica la reacción de ligación:

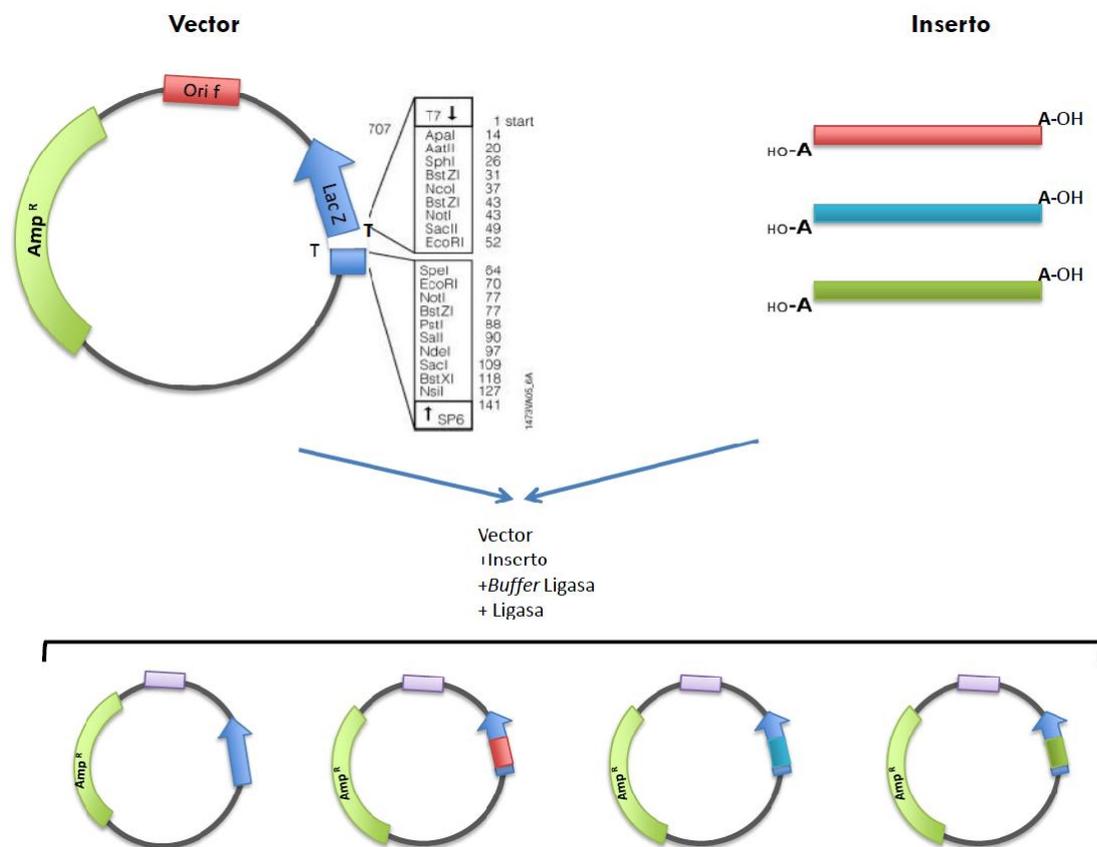


Figura 1: Esquema de ligación

IV. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

DIA 1

1) Reacción de Ligación utilizando vector pGEM-T Easy

- Agitar vigorosamente el *buffer* de ligación rápida 2X antes de cada uso.

	TbL19 f μ II	TbL19 ∇ C	Adh	Ctrol
2X RLBuffer	2,5	2,5	2,5	2,5
pGEM-T Easy vector 50 ng/ μ l	0,5	0,5	0,5	0,5
Producto de PCR	1	1	1	-
Inserto control	-	-	-	1
T4 DNA ligase	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O mQ	0,5	0,5	0,5	0,5

- Mezclar la reacción por pipeteo. Dar un *spin* en microcentrífuga e incubar 1 hora a temperatura ambiente.

2) Transformación de células Top10 competentes con los productos de ligación

1. Poner los productos de ligación en hielo.
2. Descongelar bacterias competentes sobre hielo. No sacar del hielo.
3. Agregar 100 µl de bacterias competentes a la reacción de ligación.
4. Mezclar suavemente
5. Incubar 30 minutos en baño de hielo
6. Transferir los tubos a un baño de agua a 42°C durante 45 segundos. Evitar agitar los tubos.
7. Transferir rápidamente los tubos a un baño de hielo e incubar durante 5 minutos.
8. Adicionar 0,6 ml de medio LB **SIN ANTIBIÓTICO** a cada tubo e incubar 45 minutos en estufa a 37°C.
9. Preparar las placas: agregar a cada placa 40 µl de X-gal 2% en DMF y 20 µl de IPTG 100 mM. Rastrillar y dejar secar.
10. Centrifugar la suspensión a 4.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante dejando aproximadamente 100 µl de medio LB y resuspender el *pellet*.
11. Plaquear en placas LB-Agar-Ampicilina (50 µg/ml).
12. Incubar toda la noche a 37°C.

La siguiente imagen grafica la transformación:

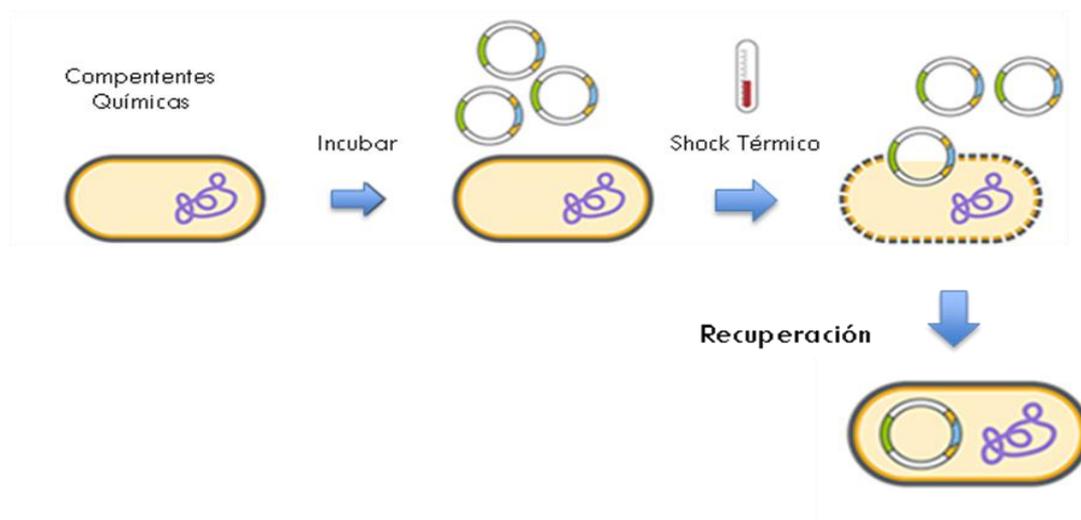


Figura 2: Imagen tomada y modificada de la página de *Thermo Fisher Scientific*. <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html>

DIA 2

3) Análisis de placas de células transformadas

1. Analizar las placas. Anotar observaciones.

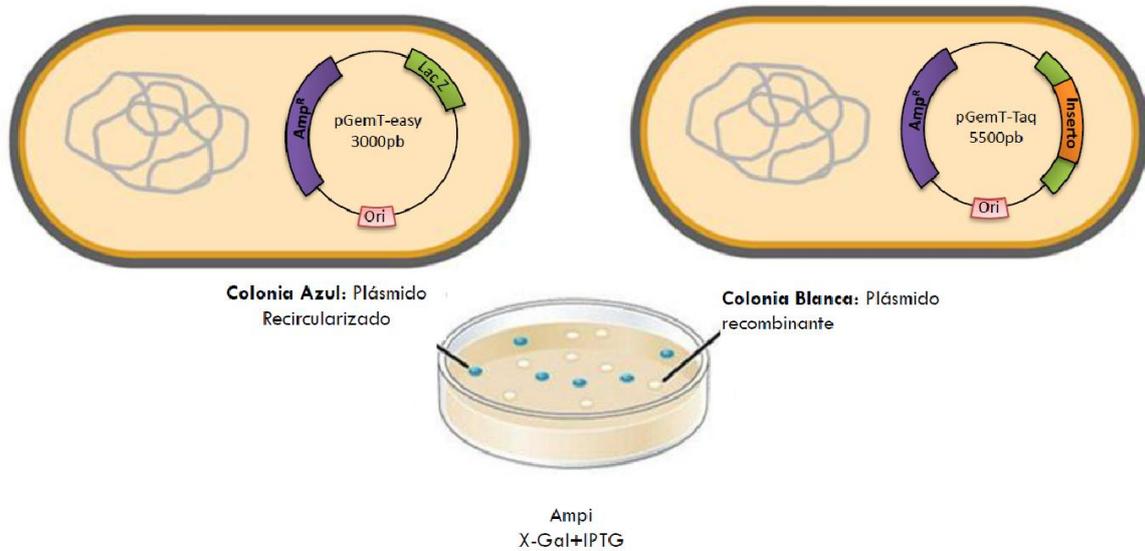


Figura 3: Selección Fenotípica

DIA 3

4) Análisis de cultivos mediante preparación rápida de ácidos nucleicos.

- Tomar 100 μ l de cada cultivo y transferirlo a un tubo *ependorf*
- Agregar 10 μ l de Buffer de muestra para DNA 6X.
- Agregar 50 μ l de Fenol: Cloroformo (1:1) equilibrado a pH 8.0.
- Agitar vigorosamente con vortex.
- Centrifugar a 5000 rpm x 5 minutos.
- Sembrar 20 μ l de la fase acuosa (superior) en un gel de agarosa 1 % (p/v).

5) Minipreparación de ADN plasmídico

Tomar 1,5 ml de cada uno de los cultivos seleccionados en el paso anterior y colocarlo en un tubo *ependorf*.

- Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos.
- Volcar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 300 μ l de **Solución I**.
- Agregar 300 μ l de **Solución II** preparada recientemente. Mezclar por inversión **SIN VORTEXEAR**.
- Agregar 300 μ l de solución III. Mezclar por inversión. Incubar en hielo 15 minutos.

- Centrifugar a 13.200 rpm durante 15 minutos. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo con 3 µl de RNAsa (20mg/ml) e incubar 2 horas a 37 °C.
- Realizar extracción con Cloroformo: Isoamílico (24:1)
 - Agregar 600 µl de Cloroformo: Isoamílico (24:1). Vortexear.
 - Centrifugar a 13.200 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos.
 - Recuperar el sobrenadante.
- Precipitación
 - Agregar 600 µl de Isopropanol 100%. Mezclar por inversión en incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
 - Centrifugar a 13200 rpm durante 15 minutos.
- Descartar el sobrenadante (SN) y lavar con 500 µl de etanol 70%. Centrifugar a 13.200 rpm por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- Resuspender en 40 µl de H₂O mQ.

Solución I

Tris-HCl	25 mM	pH=8
Glucosa	50 mM	
EDTA	10 mM	

Solución II

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Solución III

AcK	3 M	pH=5,2
-----	-----	--------

6) Digestión de plásmidos con EcoRI para identificar colonias recombinantes.

Agregar en un tubo:

H₂O	7,5 µl
Buffer 10X EcoRI	1 µl
Plásmido (1µg)	1 µl
Enzima EcoRI	0,5 µl
Volumen final	10 µl
Incubación	1 hora a 37 °C

-Analizar los productos de digestión en un gel de agarosa 2 % (p/v).

TP n°3: GENERACIÓN DE UNA PROTEÍNA TRUNCADA

I. OBJETIVOS:

- Obtener a partir del vector que contiene la proteína **P0 wild type**, un vector con una variante truncada (**P0 truncada**).
- Expresar la proteína P0 truncada.
- Analizar la expresión de P0 truncada mediante SDS-PAGE.

II. INTRODUCCIÓN:

En este práctico de laboratorio, se trabajará con el vector de expresión pRSETA que contiene clonado en su sitio de clonado múltiple (MCS) la secuencia de la proteína ribosomal P0 (pRSETA – P0 wt). El objetivo central de esta experiencia es la obtención de una variante truncada de la proteína P0 utilizando técnicas de ingeniería genética. Para ello, aprovecharemos que el vector en su MSC y la secuencia de la proteína P0 contienen un sitio de corte para la enzima de restricción PstI (Figura 1).

Luego de la digestión del vector **pRSETA – P0 wt** con la enzima PstI, que genera extremos cohesivos, se realizará la religación del vector empleando una ligasa y posteriormente la transformación de bacterias competentes *E. coli top 10* (cepa de clonado) para obtener el vector modificado **pRSETA – P0 truncada**. Para la selección de bacterias transformadas se utilizará Ampicilina, ya que el plásmido utilizado confiere resistencia a la misma (ver figura 1).

Cumplida esta primera etapa de trabajo, se verificará si realmente se obtuvo una variante truncada de la proteína P0. Para ello se transformarán bacterias competentes *E. coli BL21* (cepa de expresión) con los vectores pRSETA-P0 wt y pRSETA-P0 truncada obtenidos mediante minipreparación de ADN plasmídico. A continuación, utilizando el inductor IPTG, se podrá inducir la expresión de la proteína P0 truncada y P0 wt (utilizado como control). Luego de la inducción, se lisarán las bacterias por sonicación con el objetivo de liberar las proteínas citosólicas que contienen. El análisis de la expresión de P0 truncada y wt se realizará mediante SDS-PAGE. Esta técnica nos permitirá separar las proteínas de la bacteria y distinguir las variantes P0 wt y P0 truncada por diferencia en su peso molecular. Eventualmente, la identidad de P0 puede ser corroborada mediante *western blot*.

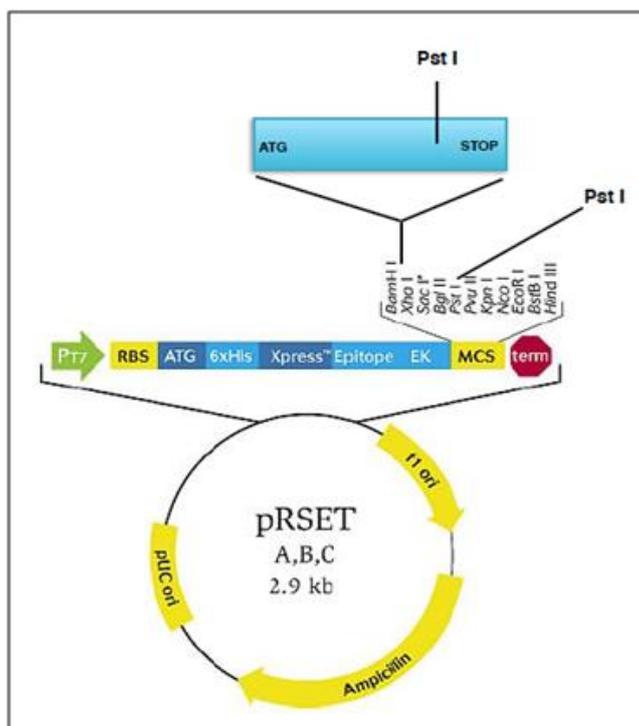


Figura 1: Representación esquemática del plásmido pRSETA (Imagen tomada y editada a partir de la página de Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V35120>). El rectángulo superior representa el ADNc de la proteína P0 wt y su ubicación dentro del MCS del vector. Se identifican los sitios de corte de la enzima PstI.

III. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

DÍA 1: Transformación de Top10 con pRSETA – P0 wt y pRSETA – P0 truncada

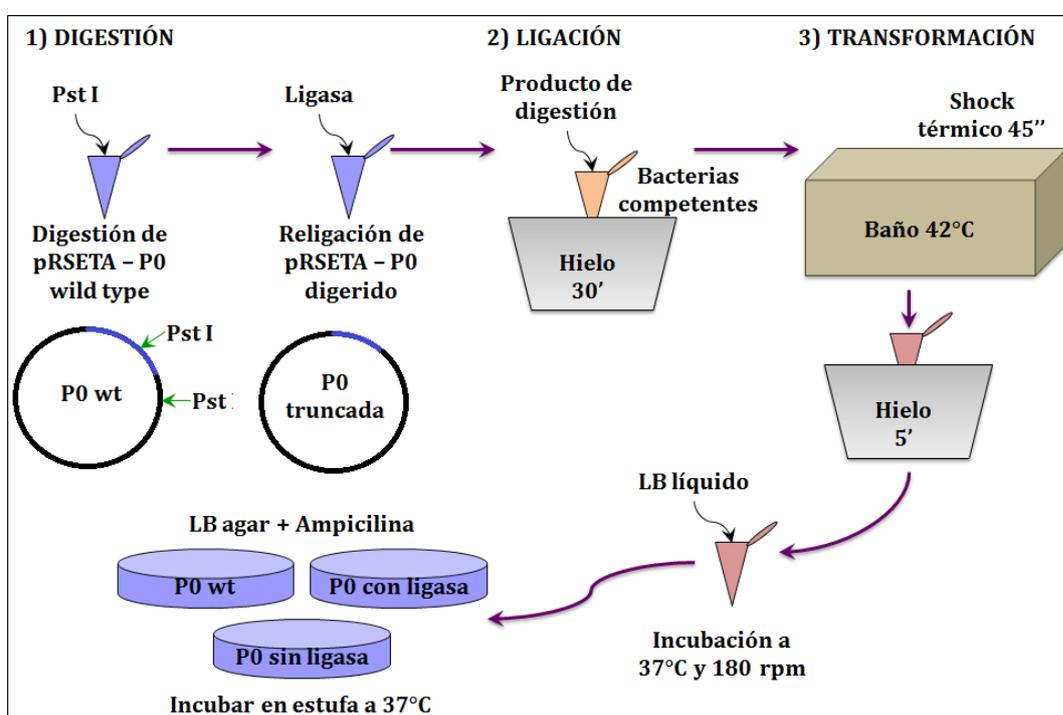


Figura 2: Representación esquemática del DÍA 1 de trabajo

1. Digestión del plásmido pRSETA – P0 wild type con Pst I

- H₂O mQ ----- 7 µl
- Buffer de reacción 10X ----- 1 µl
- Plásmido ----- 1 µl
- Pst I ----- 1 µl

Incubar 3 horas a 37°C (en baño). Inactivar la enzima calentando a 80°C durante 20 min (también en el baño). Correr los productos de digestión en un gel de agarosa al 1% (p/v) para evaluar la eficiencia de la digestión.

2. Ligación de pRSETA-P0 digerido

Hacer dos tubos:

	Con ligasa	Sin ligasa
H ₂ O mQ	6 µl	7 µl
Buffer ligasa 10X	1 µl	1 µl
Producto de digestión	2 µl	2 µl
Ligasa	1 µl	-
Volumen Final	10 µl	10 µl
Incubación	2 horas a temperatura ambiente	

3. Transformación de bacterias competentes con el producto de ligación.

Transformar 50 µl de bacterias competentes con 1 µl del producto de ligación anterior, siguiendo el mismo protocolo que para el clonado en pGEM-T easy.

- 1) Descongelar bacterias competentes *E. coli top10* sobre hielo (cepa de clonado). **No sacar del hielo.**

- 2) Poner los productos de ligación en hielo. **P0 wt, P0 truncada (con ligasa y sin ligasa)**
- 3) Agregar 100 µl de bacterias competentes.
- 4) Mezclar suavemente por rotación sin sacar del hielo.
- 5) Incubar 30 min en baño de hielo.
- 6) Transferir los tubos a un baño de agua a 42°C durante 45 segundos. **Evitar agitar los tubos.**
- 7) Transferir rápidamente los tubos a un baño de hielo e incubar durante 5 min.
- 8) Adicionar 600 µl de medio LB **SIN ANTIBIÓTICO** a cada tubo e incubar 45 min en estufa a 37°C y 180 rpm.
- 9) Centrifugar la suspensión a 4.000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante dejando aproximadamente 100 µl de medio LB y resuspender el pellet.
- 10) Plaquear en placas LB-Agar-Ampicilina (50 µg/mL) con suavidad para no romper el agar. **OJO: enfriar bien la espátula!!**
- 11) Incubar las placas invertidas a 37°C toda la noche.

NOTA: las bacterias *E. coli Top10* son una **cepa de clonado** empleada para amplificar un plásmido de interés.

DÍA 2: Análisis de colonias y crecimiento de cultivos

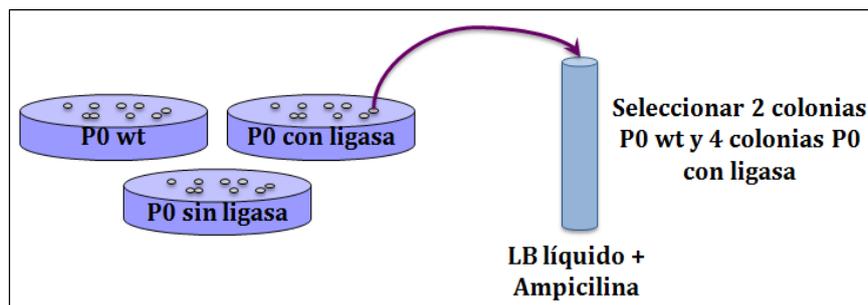


Figura 3: Esquema de trabajo del DÍA 2

1. Analizar las placas. Comparar el número de colonias en cada una. Anotar observaciones.
2. Seleccionar 4 colonias de la placa transformada con ligasa (**P0 con ligasa**) y 2 colonias de una placa transformada con el plásmido original sin digerir (**P0 wt**). Marcar y numerar las colonias con fibra indeleble en la base de la placa.
3. Tomar una colonia con un tip estéril e inocular un tubo con medio LB líquido con ampicilina (100 µg/mL).

4. Crecer los cultivos toda la noche a 37°C con agitación.

DÍA 3: Transformación de BL21 con pRSETA – P0 wt y pRSETA – P0 truncada

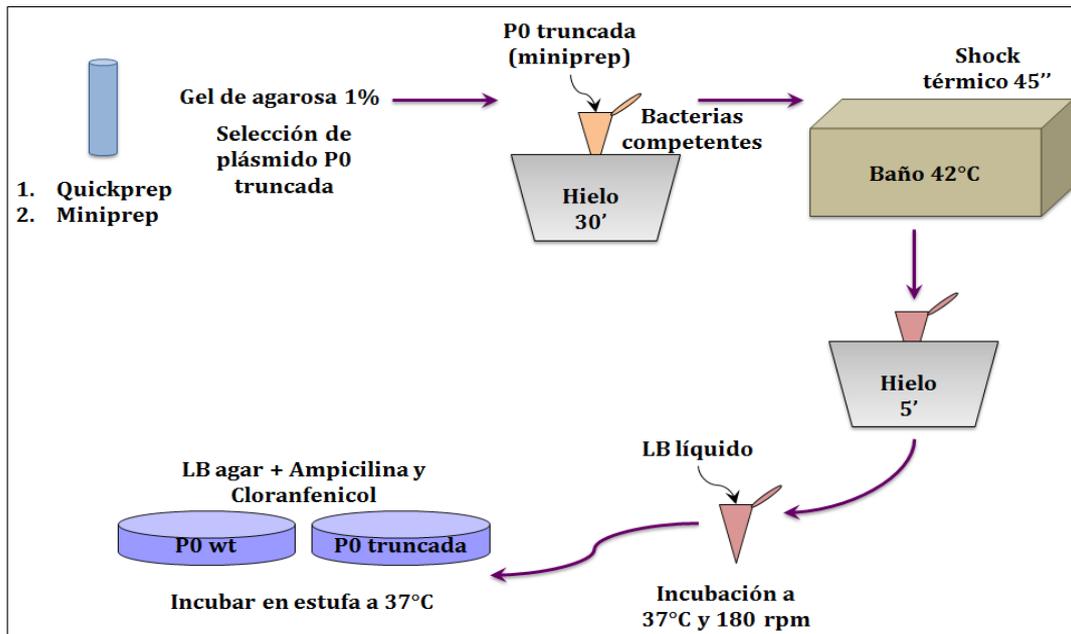


Figura 4: Esquema de trabajo del DÍA 3

1. Análisis de cultivos mediante preparación rápida de ácidos nucleicos (Quickprep)

- 1) Tomar 100 µl de cada cultivo y transferirlo a un tubo *ependorf*
- 2) Agregar 10 µl de Buffer de Muestra para DNA 6X.
- 3) Agregar 50 µl de Fenol: Cloroformo equilibrado a pH 8.0.
- 4) Agitar vigorosamente con vortex.
- 5) Centrifugar a 5000 rpm x 5 min.
- 6) Sembrar 20 µl de la fase acuosa (superior) en un gel de agarosa 1 %.

¿Qué cultivos contienen P0 wt y cuáles P0 truncada?

2. Minipreparación de ADN plasmídico (Miniprep)

- 1) Tomar 1,5 ml de cada uno de los cultivos seleccionados en el paso anterior y colocarlo en un tubo *ependorf*. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos. Volcar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 300 µl de **Solución I**.
- 2) Agregar 300 µl de **Solución II** preparada recientemente. Mezclar por inversión **SIN VORTEXEAR**.

- 3) Agregar 300 µl de **Solución III**. Mezclar por inversión. Incubar en hielo 15 minutos.
- 4) Centrifugar a 13.200 rpm durante 15 minutos. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo con 3 µl de RNAsa (20 mg/ml) e incubar 2 horas a 37°C.
- 5) **Realizar extracción con Cloroformo: Isoamílico (24:1)**
 - Agregar 600 µl de Cloroformo: Isoamílico (24:1). Vortexear.
 - Centrifugar a 13.200 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos.
 - Recuperar el sobrenadante.
- 6) Precipitación.
 - Agregar 600 µl de Isopropanol 100%. Mezclar por inversión en incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
 - Centrifugar a 13200 rpm durante 15 minutos.
 - Descartar el SN y lavar con 500 µl de etanol 70%. Centrifugar a 13.200 rpm por 5 minutos.
 - Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente. **OJO: en este caso, el pellet puede desprenderse con facilidad!!**
 - Resuspender en 40 µl de H₂O mQ estéril.

¿Cómo verificaría que obtuvo DNA plasmídico de alta pureza?

3. Transformación de bacterias competentes con P0 wt y P0 truncada.

Transformar 50 µl de bacterias competentes con 1 µl del producto de miniprep anterior, siguiendo el mismo protocolo del DÍA 1. Para ello:

- 1) Descongelar bacterias competentes *E. coli BL21* sobre hielo (cepa de expresión). **No sacar del hielo.**
- 2) Poner los plásmidos purificados mediante miniprep en el paso anterior, sobre hielo. **P0 wt y P0 truncada.**
- 3) Agregar 50 µl de bacterias competentes.
- 4) Mezclar suavemente.
- 5) Incubar 30 minutos en baño de hielo.
- 6) Transferir los tubos a un baño de agua a 42°C durante 45 segundos. **Evitar agitar los tubos.**
- 7) Transferir rápidamente los tubos a un baño de hielo e incubar durante 5 minutos.

- 8) Adicionar 600 μ l de medio **LB SIN ANTIBIÓTICO** a cada tubo e incubar 45 minutos en estufa a 37°C y 180 rpm.
- 9) Centrifugar la suspensión a 4.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante dejando aproximadamente 100 μ l de medio LB y resuspender el pellet.
- 10) Plaquear en **placas LB-Agar-Ampicilina + Cloranfenicol** (50 μ g/mL de cada antibiótico) con suavidad para no romper el agar. **OJO: enfriar bien la espátula!!**
- 11) Incubar las placas invertidas a 37°C toda la noche.

NOTA: la cepa de *E. coli* BL21 es una **cepa de expresión**, comúnmente utilizada para expresar una proteína de interés que luego se desea purificar. Además, es naturalmente resistente a cloranfenicol (CAM), por esta razón debe emplearse en la selección CAM además del antibiótico al que confiera resistencia el plásmido empleado.

DÍA 4: Análisis de colonias y crecimiento de cultivos

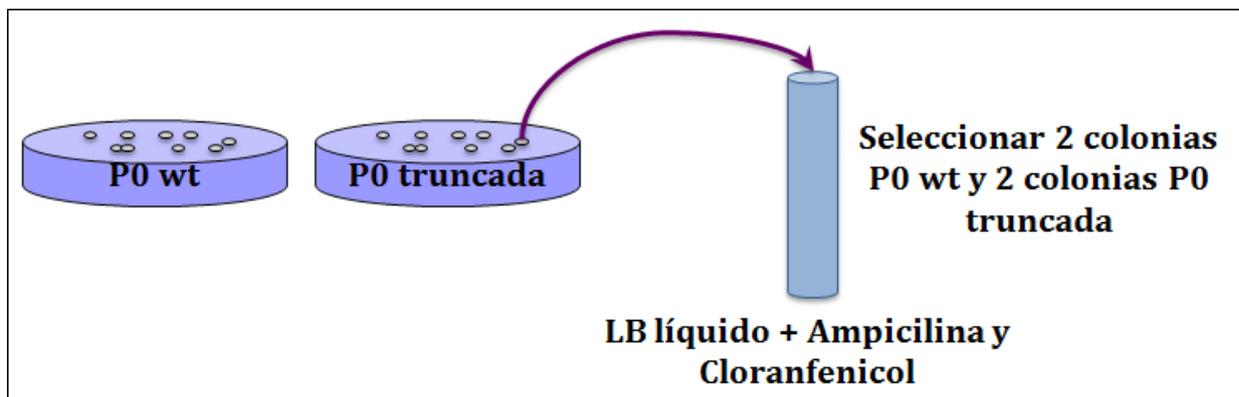


Figura 5: Esquema de trabajo del DÍA 4

1. Analizar las placas. Comparar el número de colonias en cada una. Anotar observaciones.
2. Seleccionar 2 colonias de la placa transformada con **P0 truncada** y 2 colonias de la placa transformada con el plásmido original sin digerir **P0 wt**. Marcar y numerar las colonias con fibra indeleble en la base de la placa.
3. Tomar una colonia con un tip estéril e inocular un tubo con medio LB líquido con Ampicilina + Cloranfenicol (50 μ g/mL de cada uno).
4. Crecer los cultivos toda la noche a 37°C con agitación.

DÍA 5: Inducción de la expresión de P0 y análisis mediante SDS-PAGE

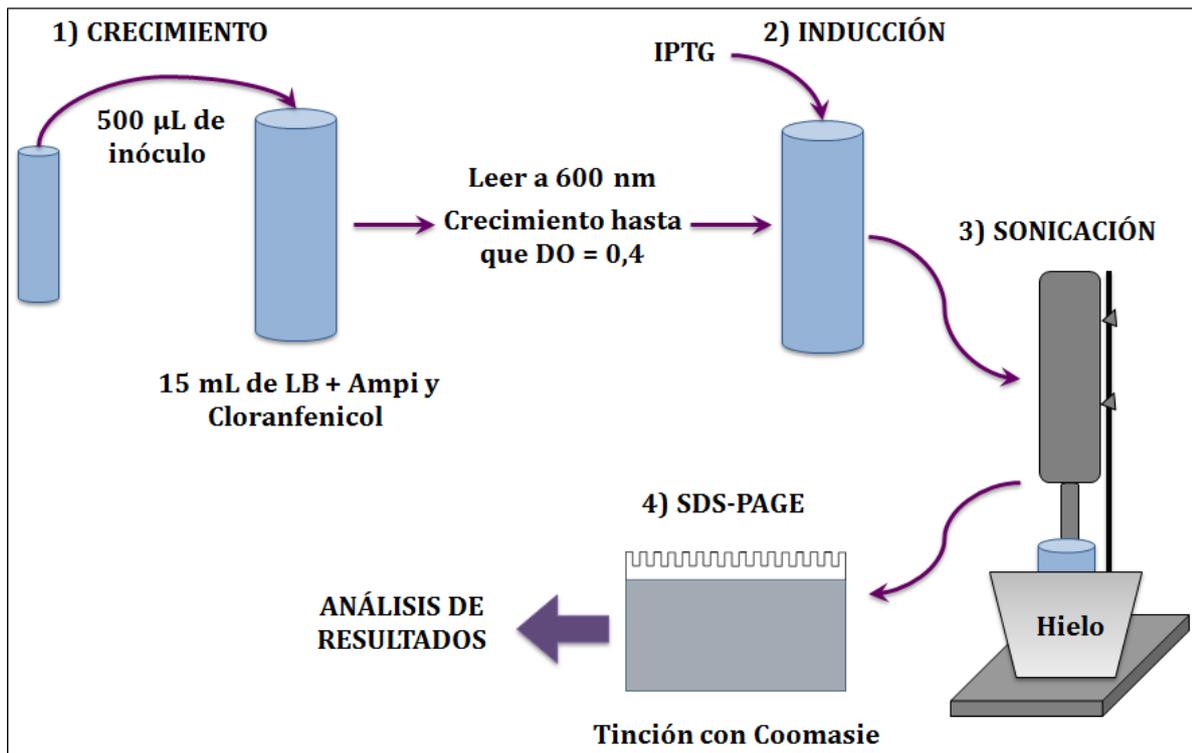


Figura 6: Esquema de trabajo del DÍA 5

1. Crecimiento del cultivo

El crecimiento del cultivo será monitorizado por lectura de absorbancia a 600 nm hasta alcanzar una $DO = 0,4$

- 1) Preparar dos tubos falcon por comisión con **15 mL de medio LB líquido suplementado con Ampicilina y Cloranfenicol.**
- 2) Realizar la lectura de blanco en el espectrofotómetro a 600 nm con el medio preparado en el paso 1.
- 3) Tomar 1000 µl del cultivo líquido de BL21 – P0 wt y BL21 – P0 truncada e inocularlos en los tubos preparados en el paso 1.
- 4) Incubar a 37°C y agitación (180 rpm), midiendo la DO a 600 nm cada 30 minutos hasta alcanzar una **DO=0,4.**

NOTA: La DO a 600 nm del cultivo es un parámetro que debe ponerse a punto. En general, se trabaja con una DO comprendida entre 0,4 – 0,8.

2. Inducción

- 1) Para inducir la expresión de P0 wt y truncada, adicionar en esterilidad IPTG a cada cultivo. IPTG stock: 100 mM; IPTG final: 0,5 mM. **¿Cuánto agrego?**
- 2) Incubar a 37°C durante 1 hora, agitando a 180 rpm.

NOTA: la temperatura y concentración de IPTG a la que se realiza la inducción son parámetros que deben ponerse a punto. Lógicamente, a 37°C la expresión es mayor, pero se puede regular la expresión trabajando a 15°C – 30°C. En cuanto a IPTG, se emplean comúnmente concentraciones comprendidas entre 0,1-1 mM.

3. Lisis bacteriana por sonicación

- 1) Finalizada la inducción, centrifugar los cultivos a 4000 rpm por 5 min.
- 2) Resuspender el pellet bacteriano en 5 mL de PBS frío utilizando tip azul. Asegurarse de homogeneizar bien.
- 3) Realizar ciclos de sonicado: **5 segundos de sonicado y 5 segundos de descanso.**
Total: 2 o 3 minutos. Notar cómo cambia la turbidez del cultivo.

NOTA: luego de la sonicación se obtiene un lisado total que puede fraccionarse luego por centrifugación en una fracción soluble y una insoluble, para luego identificar si la proteína de interés se encuentra soluble o en cuerpos de inclusión.

4. SDS-PAGE

- 1) Preparación de muestras:
 - Rotular 2 microtubos por comisión: P0 wt y P0 truncada
 - Agregar: 50 µl de cada lisado bacteriano + 25 µl de buffer de muestra 3X (SB 3X)
 - Hervir por 5 minutos.
- 2) Sembrar gel de poliacrilamida al 12%: **20 µl de muestra**
 - Well 1: vacío
 - **Well 2 y 3: Comisión I**
 - **Well 4 y 5: Comisión II**
 - **Well 6 y 7: Comisión III**
 - **Well 8 y 9: Comisión IV**
 - Well 10: marcador de peso molecular
 - Well 11-15: vacío
- 3) Correr el gel 20 minutos a 80 V y luego 90 minutos a 140 V.

- 4) Teñir el gel con solución de *Coomasie Brilliant Blue* R250 por 1 hora. Recuperar el colorante.
- 5) Desteñir con solución decolorante (ácido acético 10%, etanol o metanol 25%, en agua destilada v/v)
- 6) **Observar resultados y analizar. ¿Qué conclusiones puede sacar?**

TP n°4: MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA MEDIANTE PCR

I. OBJETIVOS:

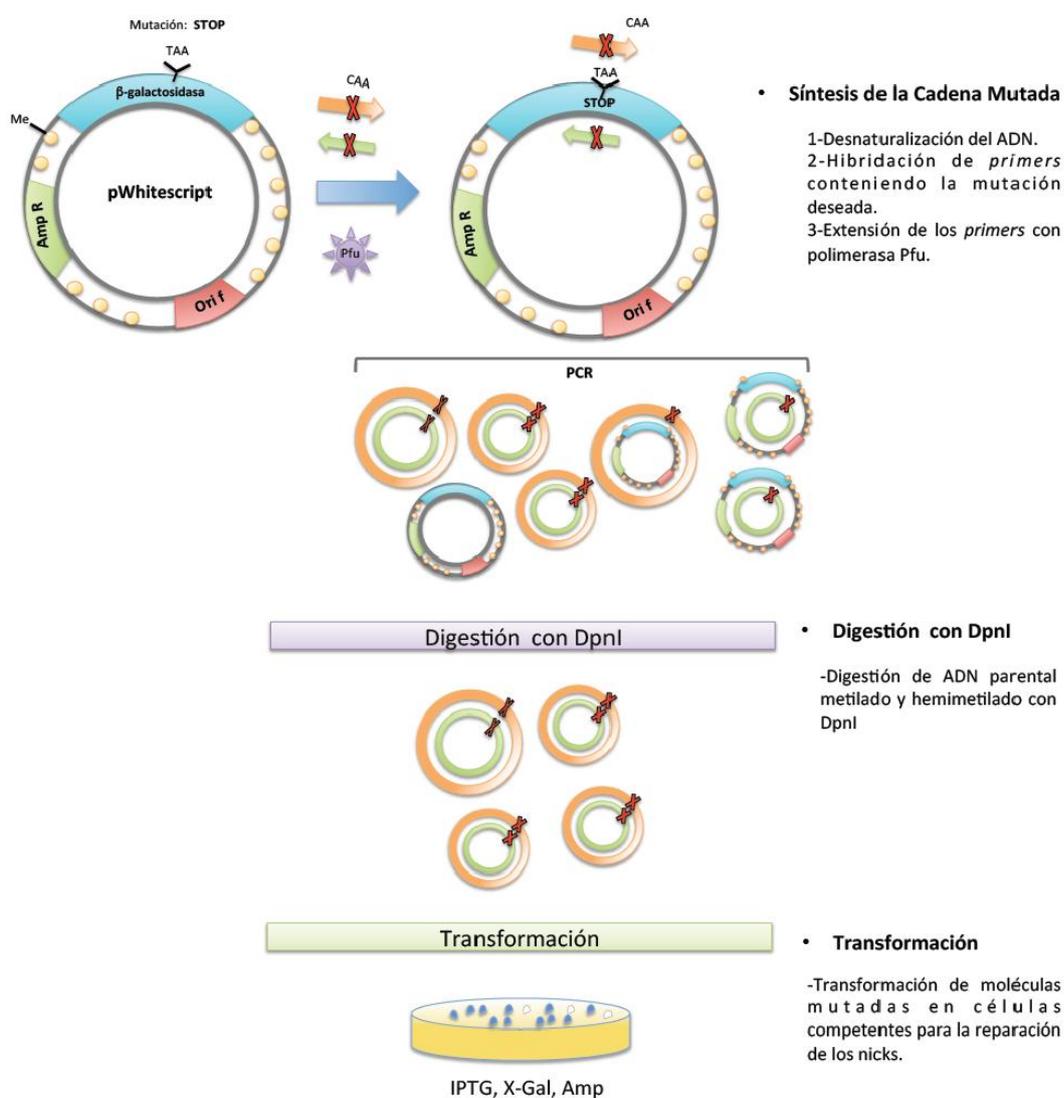
- Comprender el fundamento y las posibles aplicaciones de un ensayo de Mutagénesis Sitio Dirigida mediante PCR.
- Realizar Mutagénesis Sitio Dirigida sobre un vector pWhitescript.
- Adquirir habilidad técnica en el manejo dentro del laboratorio

II. INTRODUCCIÓN:

El plásmido pWhitescript de 4.5-kb contiene un codón stop generado por una mutación sin sentido (TAA) dentro del gen de la β -galactosidasa, en la posición en la cual se encuentra un codón que codifica para el aminoácido glutamina (CAA). Células competentes transformadas con el plásmido pWhitescript aparecen blancas cuando son cultivadas en LB-agar conteniendo ampicilina, IPTG y X-gal, ya que la actividad β -galactosidasa ha sido eliminada. Mediante amplificación por PCR con un juego de *primers* adecuado, se genera una mutación puntual T>C sobre codón stop (TAA) del plásmido pWhitescript. El nuevo codón (CAA), codifica para una glutamina, con lo cual se restaura la actividad β -galactosidasa. Luego de la transformación de bacterias competentes con el nuevo plásmido mutado mediante PCR, observaremos colonias azules cuando las bacterias crecen en un medio conteniendo IPTG y X-Gal. Como un método para aumentar la eficiencia del proceso de mutagénesis, se emplea la enzima de restricción Dpn I, la cual degrada selectivamente el vector parental, debido a que el mismo se encuentra metilado. El plásmido conteniendo la mutación, debido a que ha sido obtenido mediante PCR, no se encuentra metilado y es por lo tanto resistente a la degradación.

III. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Esquema de trabajo en tres pasos:



DIA 1

Paso 1: Mutación por PCR

	Tubo 1	Tubo 2 (control s/Pfu)
Buffer de Reacción 10X	5 µl	5 µl
(1 ng) de pWhitescript 4.5-kb	1 µl	1 µl
(125 ng) de <i>primer sense</i>	1,25 µl	1,25 µl
(125 ng) de <i>primer antisense</i>	1,25 µl	1,25 µl
dNTP 10 mM	1 µl	1 µl
ddH ₂ O para llevar a 50 µl	39,5 µl	40,5 µl
<i>Pfu ultra</i> HF DNA polymerase (2.5 U/µl)	1 µl	1 µl

Parámetros de ciclado:

94°C	2,30 minutos	
94°C	45 segundos	} 35 ciclos
55°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	

Luego de la reacción de ciclado enfriar los tubos a 37°C.

Paso 2: Digestión con Dpn I del producto amplificado:

1. Agregar 1 µl de Dpn I (10 U/µl) a 10 µl de cada tubo de amplificación.
2. Mezclar por pipeteo.
3. Realizar un pequeño *spin down*.
4. Incubar 1 hora a 37°C para digerir el plásmido parental.

Nota: Un grupo realizará además una reacción control sin enzima Dpn I.

Paso 3: Transformación de células TOP10 competentes con los productos de mutagénesis.

1. Agregar 100 µl de bacterias competentes a los 10 µl de producto de digestión.
2. Mezclar suavemente.
3. Incubar 30 minutos en baño de hielo.
4. Transferir los tubos a un baño de agua a 42°C durante 45 segundos. Evitar agitar los tubos.
5. Transferir rápidamente los tubos a un baño de hielo e incubar durante 5 minutos.
6. Adicionar 0,5 ml de medio LB **SIN ANTIBIÓTICO** a cada tubo e incubar 45 minutos en estufa a 37°C.
7. Preparar las placas: agregar a cada placa 40 µl de X-gal 2% en DMF y 20 µl de IPTG 100 mM. Rastrillar y dejar secar.
8. Centrifugar la suspensión a 4.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante dejando aproximadamente 100 µl de medio LB y resuspender el pellet.
9. Plaquear en placas LB-Agar-Ampicilina (50 µg/ml), preparadas en el paso 7.
10. Incubar toda la noche a 37°C.

DIA 2

Análisis de las placas obtenidas.

Anotar observaciones y los resultados obtenidos en cada caso por los distintos grupos de la comisión.

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA

Tema 1: ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

I. OBJETIVOS:

- Conocer y comprender el funcionamiento de las enzimas de restricción.
- Comprender el concepto de frecuencia de corte.
- Entender la diferencia entre isoesquizómeros e isocaudómeros.

II. INTRODUCCIÓN

Las enzimas de restricción son proteínas que cortan ambas hebras de ADN en forma específica. Esto significa que cada enzima reconoce una secuencia particular del ADN. Esa secuencia específica para cada enzima se denomina “**sitio de restricción**”.

Descubrimiento de las enzimas de restricción

Las enzimas de restricción fueron descubiertas a partir del fenómeno llamado restricción mediada por el huésped (*host-mediated restriction*). Se han descrito sólo en bacterias, y toman su nombre del organismo del cual provienen. Por ejemplo: **EcoRI**

E= género *Escherichia*

co= especie *coli*

R=cepa RV13

I= primera enzima aislada de esta cepa.

Las enzimas de restricción que se descubrieron en la bacteria *Escherichia coli* se denominan Eco. Existen diferentes tipos de enzimas Eco que se diferencian en la secuencia que reconocen y cortan. Al investigar otras especies de bacterias se descubrieron cientos de enzimas de restricción distintas y cada una reconoce una región específica. Se cree que la función natural de estas enzimas en las bacterias es protegerlas contra ADNs foráneos (por ejemplo, de virus que podrían infectarlas). De esta manera, la bacteria utiliza estas “tijeras moleculares” para fragmentar el ADN viral que la infecta. El ADN propio de la bacteria no es atacado, pues se encuentra “protegido” contra sus propias enzimas de restricción a través de sistemas de modificación del ADN propio, que metila secuencias específicas. De este

modo, el ADN bacteriano no es digerido por las endonucleasas que posee.

III. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Existen, en general, 3 sistemas de enzimas de restricción:

Las enzimas de **Tipo I**: Son enzimas multiméricas ya que poseen tres subunidades y pueden reconocer una secuencia específica de ADN, metilar y digerir. En general, cortan las dos cadenas del ADN en una posición **a distancia** del sitio de reconocimiento. No se utilizan normalmente en investigación ya que el sitio de corte no coincide con el de reconocimiento.

Las enzimas de **Tipo II** reconocen una secuencia específica y cortan las dos cadenas de la molécula de ADN con absoluta precisión **dentro** de la secuencia reconocida. Se usan ampliamente en investigación puesto que cortan en sitios específicos. Las secuencias reconocidas por las enzimas de Tipo II son simétricas (“palindrómicas”), es decir, la secuencia de una de las cadenas leída en dirección 5'-3' es la misma que la secuencia de la cadena complementaria leída también en dirección 5'-3'. Por ejemplo, la enzima de restricción *EcoRI* reconoce la siguiente secuencia palindrómica de nucleótidos:

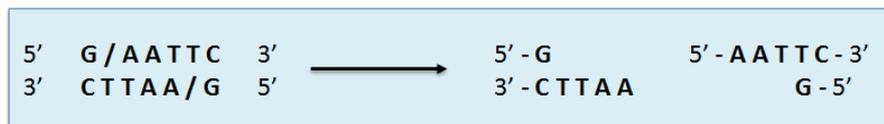


Figura 1: Ejemplo de sitio de reconocimiento y corte de la enzima EcoRI

Las enzimas **Tipo III** son similares al sistema tipo I, utilizan una enzima oligomérica que realiza todas las actividades enzimáticas, y cortan el ADN 25-27 bp más allá del sitio de reconocimiento.

En el siguiente cuadro se resumen las principales características de las enzimas de restricción:

	Tipo I	Tipo II (usadas en Ing. Genética)	Tipo III
Restricción y Modificación	Una enzima multifuncional	Endonucleasa y metilasa separadas	Enzimas separadas con una subunidad común
Endonucleasa	3 subunidades diferentes	Homodímero	Heterodímero
Requerimientos de la restricción	ATP, Mg ²⁺ , S-adenosilmetionina	Mg ²⁺	ATP, Mg ²⁺ , S-adenosilmetionina
Sitio de corte	Al azar, >1000 pb del sitio de reconocimiento	En el sitio de reconocimiento	24-26 pb 3' del sitio de reconocimiento

Tabla 1: Clasificación de las enzimas de restricción

Las enzimas Tipo II son ampliamente utilizadas en laboratorios de investigación. Cada vez que reconocen su sitio específico, se posicionan sobre la molécula de ADN y cortan dentro de esa secuencia.

De acuerdo a como realizan el corte, las enzimas se pueden clasificar en:

- Enzimas que generan “**extremos cohesivos**” (desparejos): el corte en ambas cadenas se lleva a cabo del lado 5´ (Figura 2A) o del lado 3´ (Figura 2B) del sitio palindrómico, generando extremos de una sola hebra (5´ o 3´, respectivamente). Estos extremos “colgantes” de simple cadena, pueden pegarse con otros extremos de cadena simple que tengan la secuencia complementaria.
- Enzimas que generan “extremos romos” (parejos): el corte en ambas cadenas se lleva a cabo **sobre el eje de simetría de la secuencia palindrómica**, por lo que no quedan extremos monocadena (Figura 2C).

Las enzimas de restricción **cortan siempre** de manera que el grupo fosfato de **la unión fosfodiéster queda en el extremos 5´**, y el en extremo 3´ queda un grupo hidroxilo. El mecanismo de corte se realiza a través de la ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos extremos de DNA.

Las enzimas encargadas de unir los extremos de ambas cadenas se denominan *ADN ligasas*.

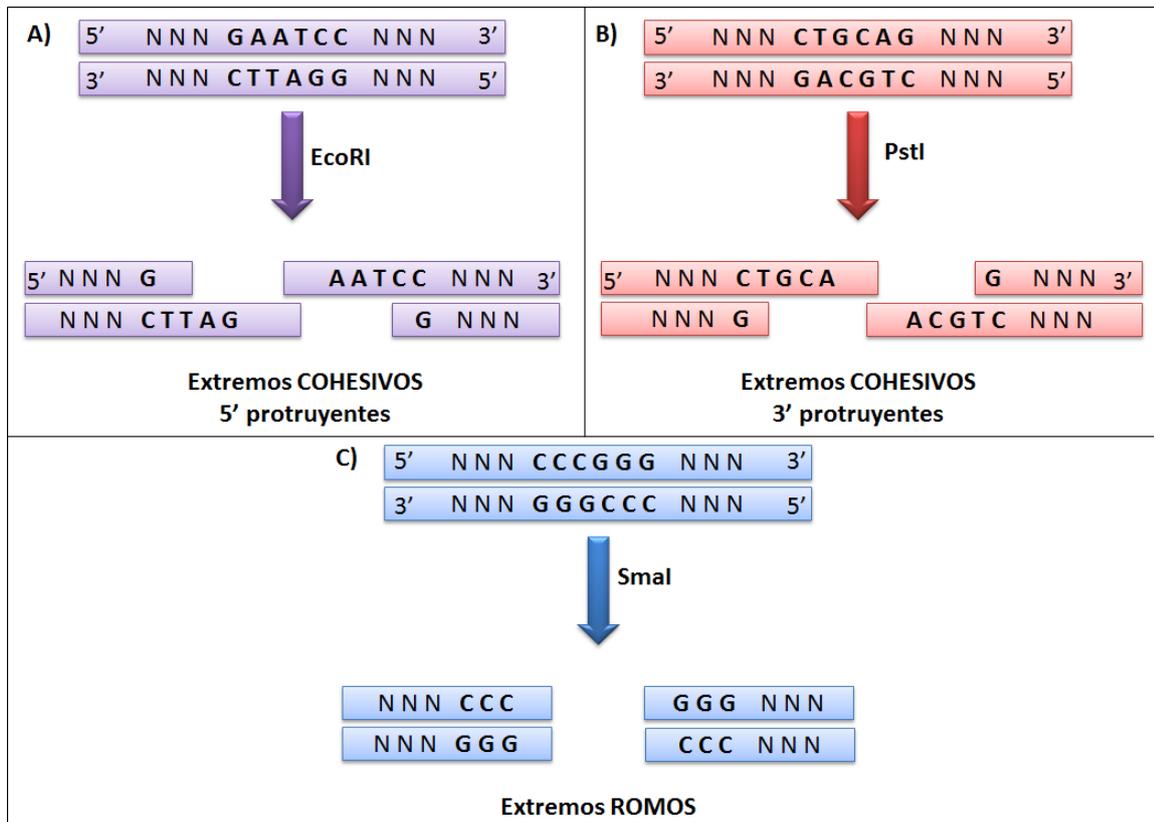


Figura 2: Tipos de extremos generados por el corte de las enzimas de restricción

Si dos moléculas de ADN de diferente origen comparten los sitios de reconocimiento palindrómicos para una determinada enzima de restricción, las moléculas digeridas con dicha enzima tendrán colas complementarias de cadena sencilla. Si estos fragmentos se ponen juntos, bajo determinadas condiciones, los fragmentos de ADN de distinto origen pueden formar moléculas recombinantes, estableciendo puentes de hidrógeno entre los extremos cohesivos. Luego se utiliza la enzima ADN ligasa para unir covalentemente los esqueletos azúcar-fosfato de los dos fragmentos, produciéndose así una molécula de ADN recombinante.

Isoesquizómeros

Los **isoesquizómeros** son dos enzimas de restricción diferentes que comparten la **misma secuencia de reconocimiento**, aunque **no necesariamente generan extremos cohesivos entre sí**, como por ejemplo las enzimas que figuran en la siguiente tabla:

Enzima	Secuencia	Sitio de corte	Tipo de corte
MboI	G A T C	N /G A T C C T A G/ N	Extremos cohesivos 5' protruyentes
BfuCI	G A T C	N /G A T C C T A G/ N	Extremos cohesivos 5' protruyentes
DpnI	G A T C	G A / T C C T / A G	Extremos romos
DpnII	G A T C	N /G A T C C T A G/ N	Extremos cohesivos 5' protruyentes
Sau3AI	G A T C	N /G A T C C T A G/ N	Extremos cohesivos 5' protruyentes
BscFI	G A T C	N /G A T C C T A G/ N	Extremos cohesivos 5' protruyentes
Bsp143I	G A T C	N /G A T C C T A G/ N	Extremos cohesivos 5' protruyentes

* Cuando dos isoesquizómeros **NO** generan extremos cohesivos entre sí se los denomina: **Neoesquizómeros**. Por ejemplo, en la tabla siguiente, las enzimas TspMI, XmaI y SmaI son isoesquizómeros, pero XmaI y SmaI, así como TspMI y SmaI además son neoesquizómeros.

Enzima	Secuencia	Sitio de corte	Tipo de corte
SmaI	C C C G G G	C C C / G G G G G G / C C C	Extremos romos
TspMI	C C C G G G	C / C C G G G G G G C C / C	Extremos cohesivos 5' protruyentes
XmaI	C C C G G G	C / C C C G G G G G G C C / C	Extremos cohesivos 5' protruyentes

Isocaudómeros:

Son enzimas que **reconocen secuencias diferentes**, pero generan extremos cohesivos entre sí.

Enzima	Secuencia	Sitio de corte	Tipo de corte
BglII	A G A T C T	A / G A T C T T C T A G / A	Extremos cohesivos 5'-GATC
BamHI	G G A T C C	G / G A T C C C C T A G / G	Extremos cohesivos 5'-GATC
MboI	G A T C	N /G A T C C T A G/ N	Extremos cohesivos 5'-GATC

IV. CÁLCULO DE FRECUENCIA DE CORTE

La frecuencia teórica de corte de una enzima se puede calcular asumiendo que una molécula de ADN tiene una distribución al azar de las cuatro bases A, T, C y G. De esta forma la frecuencia de corte sería $1/4^n$ (siendo n=número de bases que componen el sitio de reconocimiento). Dicho de otro modo, el tamaño promedio de los fragmentos obtenidos será 4^n pb.

Sin embargo, en los genomas reales, la proporción de las cuatro bases no es idéntica, y las mismas no se distribuyen al azar. Por ejemplo, una enzima de restricción cuya secuencia de reconocimiento está compuesta por 6 nucleótidos, generaría fragmentos con un tamaño promedio de $4^6 = 4096$ pb, es decir **en teoría** el promedio de los fragmentos generados por digestión con dicha enzima será de 4096 pb. La siguiente tabla muestra las frecuencias de corte reales para algunas enzimas de restricción sobre ADN genómico de diferentes organismos, que de manera teórica generarían fragmentos de un tamaño promedio de 4096 pb.

Enzima	Secuencia	<i>Arabidopsis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Humano</i>
ApaI	G G G C C C	25.000 pb	15.000 pb	2.000 pb
AvrII	C C T A G G	15.000 pb	150.000 pb	8.000 pb
BamHI	G G A T C C	6000 pb	5.000 pb	5.000 pb
DraI	T T T A A A	2.000 pb	2.000 pb	2.000 pb

Tabla 2: Frecuencia real de corte de las enzimas ApaI, AvrII, BamHI y DraI en el ADN de diferentes organismos.

Símbolo de los nucleótidos

Símbolo	Nucleótido	Categoría
A	Adenina	Purina
C	Citocina	Pirimidina
G	Guanina	Purina
T	Timina	Pirimidina
N	Cualquier nucleótido	-----
R	A ó G	Purinas
Y	C ó T	Pirimidinas
S	C ó G	Enlace Fuerte
-	<i>gap</i>	-----

V. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Ejercicio 1

Respecto de las enzimas de restricción diga cuál de estas opciones es **INCORRECTA**:

- a. Las enzimas de Tipo II reconocen secuencias palindrómicas y son las más ampliamente utilizadas en Ingeniería Genética.
- b. Las enzimas de restricción Tipo II son homodímeros.
- c. Las enzimas Tipo II pueden generar extremos romos, 5'-protruyentes ó 3'-protruyentes.
- d. La enzima Xmn I reconoce la siguiente secuencia:

5' GAANNNTTC 3'

Por lo tanto, teóricamente la digestión de ADN genómico con XmnI generará fragmentos con un promedio de 4^6 pb=4096 pb.

- e. Dos isoesquizómeros reconocen la misma secuencia de ADN y por lo tanto generan extremos cohesivos entre sí.

Ejercicio 2

A partir de la siguiente tabla:

- a. Indique la frecuencia teórica de corte (FC) de las enzimas.
- b. Complete en la tabla los terminales que producen las diferentes enzimas.
- c. Indique los isoesquizómeros de las enzimas ApaBI, SmaI y SstI.
- d. Indique (si lo hubiera) un par de enzimas isocaudómeros.

ENZIMA	SITIO DE CORTE	TERMINALES	FC
SmaI	5'-CCC/GGG-3' 3'-GGG/CCC-3'		
BglII	5'-A/GATCT-3' 3'-TCTAG/A-5'		
SstI	5'-GAGCT/C-3' 3'-C/TCGAG-5'		
MboII	5'-GAAGANNNNNNN/-3' 3'-CTTCTNNNNNNN/N-5'		

ApaBI	5'-GCANNNNN/TGC-3' 3'-CGT/NNNNNACG-5'		
TaqI	5'-T/CGA-3' 3'-AGC/T-5'		
TspMI	5'-C/CCGGG-3' 3'-GGGCC/C-5'		
EcoR53kl	5'-GAG/CTC-3' 3'-CTC/GAG-5'		
HaeIII	5'-GG/CC-3' 5'-CC/GG-3'		
BstAPI	5'-GCANNNNN/NTGC-3' 3'-CGTN/NNNNNACG-5'		
XmaI	5'-C/CCGGG-3' 3'-GGGCC/C-5'		
PstI	5'-CTGCA/G-3' 3'-G/ACGTC-5'		
BamHI	5'-G/GATCC-3' 3'-CCTAG/G-5'		
NotI	5'-GC/GGCCGC-3' 3'-CGCCGG/CG-5'		
MstI	5'-TGC/GCA-3' 3'-ACG/CGT-5'		
XhoI	5'-R/GATCY-3' 3'-YCTAG/R-5'		
McrI	5'-CGRY/CG-3' 3'-GC/YRGC-5'		

Ejercicio 3

¿Cuál o cuáles de estas enzimas generan extremos cohesivos con Bcl I (T/GATCA)?

- a. BamHI (**G/GATCC**)
- b. BstK TI (**GAT/C**)
- c. NdeII (**/GATC**)
- d. Eco RI (**G/AATTC**)
- e. HinfI (**G/ANTC**)

- A. El ADN quimérico puede ser digerido nuevamente con Bcl I?
- B. El ADN quimérico puede ser digerido nuevamente con la enzima elegida?

Ejercicio 4

La enzima DraIII corta en la siguiente secuencia **5'-CACNNN/GTG-3'**. Diseñe dos sitios de restricción para esta enzima que **NO SEAN COHESIVOS** entre sí.

SITIO 1:

SITIO 2:

Ejercicio 5

¿Cuál o cuáles de las siguientes enzimas generan extremos cohesivos con PstI (CTGCA/G)?

- a. ApaI (**G/TGCAC**)
- b. NsiI (**ATGCA/T**)
- c. SbfI (**CCTGCA/GG**)
- d. HpyCH4V (**TG/CA**)
- e. BsgI (**GTGCAGN₁₄NN/**)

Ejercicio 6

Usted cuenta con dos productos de digestión, uno de ellos realizado con la enzima SacI (GAGCT/C) y el otro con la enzima HindIII (A/AGCTT). Al mezclar ambos productos de digestión en presencia de una ligasa ¿se obtendrán moléculas híbridas de ADN?

Ejercicio 7

Del siguiente listado de enzimas ¿cuál o cuáles elegiría para digerir y generar extremos compatibles con Sac I (GAGCT/C)?

- a. Psp124BI (**GAGCT/C**)
- b. AluI (**AG/CT**)
- c. Eco53kI (**GAG/CTC**)
- d. AatII (**GACGT/C**)
- e. SstI (**GAGCT/C**)

A. ¿El ADN quimérico obtenido de la ligación puede ser digerido nuevamente con la enzima elegida?

Ejercicio 8

Utilizando la herramienta *online* WebCutter 2.0: <http://heimanlab.com/cut2.html> proponga un protocolo de restricción para generar dos moléculas de ADN híbridas a partir de las siguientes secuencias de ADN:

Secuencia 1:

5' -GTACTTGGGAATGATCAGTCCAATGAGTACCGTAA-3'

3' -CATGAACCCTTACTAGTCAGGTTACTCATGGCATT-5'

Secuencia 2:

5' -TGAACCGGGATCCTAGCTAAGTTAGATATCTCTA-3'

3' -ACTTGGCCCTAGGATCGATTCAATCTATAGAGAT-5'

-Para lograrlo coloque la hebra en dirección 5'-3' de la secuencia 1 en el espacio correspondiente y analice las enzimas que la cortan.

-Luego realice lo mismo con la secuencia 2 y elija las enzimas convenientes para hibridar ambas moléculas.

Escriba las secuencias de los híbridos resultantes:

I.

II.

Tema 2: METILACIÓN DEL ADN

I. OBJETIVOS:

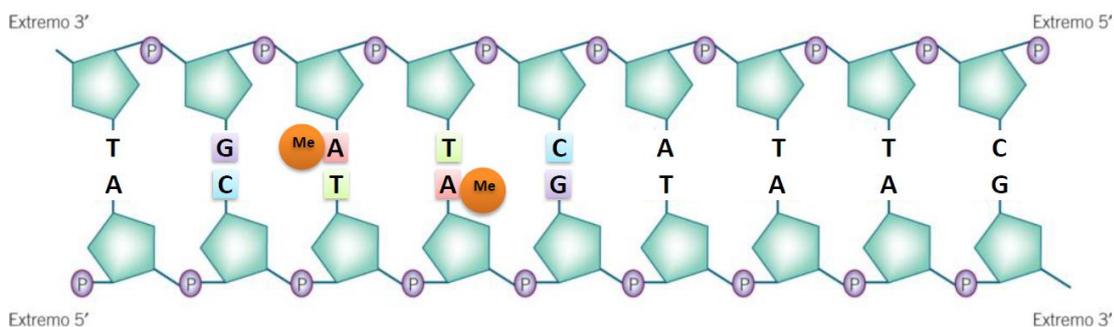
- Comprender el concepto de metilación de ADN en bacterias
- Comprender la importancia de los sistemas de metilación bacterianos para el diseño de estrategias de manipulación genética.

II. INTRODUCCIÓN:

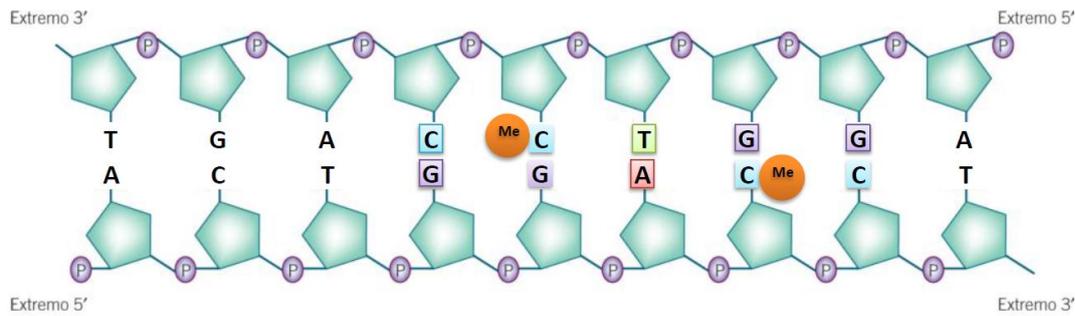
La metilación de las bases del ADN ocurre en todos los seres vivos. La metilación implica la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-metionina al ADN. La formación de m^6A , m^4C y m^5C es catalizada por metiltransferasas que reconocen motivos específicos del ADN.

En muchas plantas y animales se caracteriza por la adición bioquímica de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina en dinucleótidos CpG, por medio de una enzima metiltransferasa (Ej: Dnmt1). En plantas, la citosina puede ser metilada en CpG, CpNpG, y CpNpN donde N representa cualquier nucleótido menos guanina. En *E. coli* existen muchos sistemas de metilación, pero dos de ellos son particularmente relevantes: La **metilación Dam** (por *Deoxy Adenosine Methylation*), que se caracteriza por la adición de un grupo metilo a la posición N6 de las adenina incluidas en la secuencia $G^{m6}ATC$, y la **metilación Dcm** (por *Deoxy Cytosine Methylation*) que se caracteriza por la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la segunda citosina dentro de la secuencia $C^{m5}CWGG$ (donde W representa A o T).

Metilación Dam



Metilación Dcm



Los patrones de metilación de las CpG metiltransferasas son heredables, tejido específico y se correlacionan con la expresión génica. Como consecuencia se postula que la metilación CpG juega un papel muy importante en la diferenciación y en la expresión génica.

La mayoría de ADN metiltransferasas descritas en bacterias son parte de sistemas de restricción/modificación. Cada sistema de modificación-restricción está constituido por una endonucleasa de restricción y una ADN metiltransferasa (de adenina o citosina). En la mayoría de los sistemas de restricción-modificación, la metilación de las bases previene el clivaje del ADN por una endonucleasa afín, protegiendo así el ADN del huésped. Sin embargo han sido descritas enzimas de restricción que son activas sobre el ADN modificado (metilado). En algunos genomas es común observar ADN metiltransferasas *solitarias*. Éstas probablemente deriven de sistemas de modificación restricción que han perdido su enzima de restricción.

La metilación cumple diferentes funciones

- En eucariotas superiores actúa como un método para la regulación de la expresión génica (Costello and Plass, 2001). Por otro lado, la metilación aberrante es un fenómeno común en cáncer de mama y juega un papel central en el *imprinting* génico, en el desarrollo embrionario y en el silenciamiento de genes del cromosoma X.
- En bacterias, la visión tradicional de los sistemas de restricción/modificación como sistemas inmunitarios no adaptativos, que protegen a las bacterias frente a los fagos y otros ADN invasores, se ha ampliado progresivamente debido a observaciones que sugieren funciones adicionales. Por ejemplo, en *E. coli* la ausencia de metilación Dam causa efectos pleiotrópicos indicativos de la existencia de múltiples interacciones ADN-proteína bajo el control de la metilación GATC.

Por otro lado se ha observado que la metilación es una señal fisiológica del estado de la célula. Por ejemplo: durante la replicación bacteriana los nucleótidos no metilados son incorporados en la cadena recién sintetizada. Por lo tanto la molécula hija se encuentra

hemimetilada (solamente metilada en la hebra templado). La hemimetilación puede ser utilizada por la bacteria como un marcador que le permite al aparato de reparación de la célula, distinguir entre una hebra molde y una hebra naciente.

III. IMPORTANCIA DE LA METILACIÓN DEL ADN EN INGENIERÍA GENÉTICA.

Comprender la biología de la metilación del ADN es muy importante en experimentos de restricción y clonado ya que la metilación puede:

1. Modificar la susceptibilidad del ADN para ser digerido.
2. Reducir la eficiencia de la transformación.

En eucariotas, los efectos de la metilación CpG son un problema cuando es necesario digerir ADN genómico. Sin embargo los patrones de metilación no se mantienen una vez que dicho ADN ha sido clonado en un huésped bacteriano.

En bacterias la mayoría de las cepas utilizadas en Biología Molecular son derivadas de *E. coli* K-12 y pueden contar con los sistemas de metilación: Dam, Dcm y M.EcoK1.

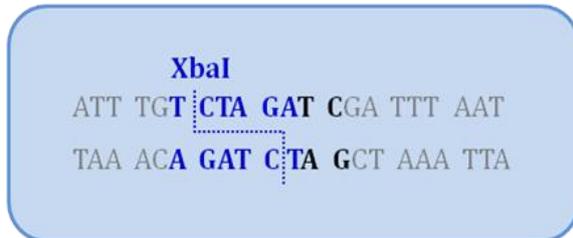
Sistema de metilación	Secuencia que metila	Frecuencia del sitio que metila
Dam	G A T C	≈1 sitio cada 256 pb
Dcm	C C A G G C C T G G	≈1 sitio cada 512 pb
EcoKI	A C C (N6) G T G C G C A C (N6) G T T	≈1 sitio cada 8.000 pb

- La metiltransferasa codificada por el gen *Dam* (ADN-adenina metiltransferasa) modifica residuos A en secuencias GATC.
- La metiltransferasa codificada por el gen *Dcm* (ADN-citosina metiltransferasa) modifica el residuo C interno en secuencias CCWGG.
- La metiltransferasa *M.EcoKI* modifica residuos en secuencias muy poco frecuentes.

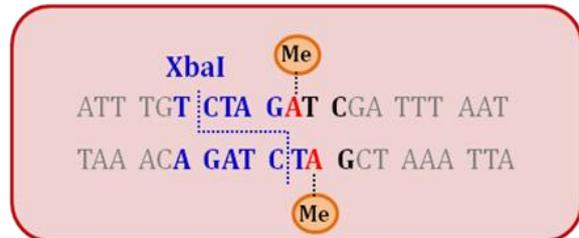
De los tres sistemas, Dam y Dcm son los más frecuentes en cepas bacterianas utilizadas en ingeniería genética y no pertenecen a sistemas de modificación/restricción.

La importancia de conocer acerca de este tema radica en que algunos o todos los sitios de restricción en una secuencia de ADN, pueden ser resistentes al corte cuando son

aislados de cepas que expresan las metiltransferasas Dam o Dcm. Esto sucede cuando la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción se solapa o coincide con el sitio de metilación, y la actividad de dicha enzima es afectada por la metilación. Por ejemplo, la enzima XbaI reconoce la secuencia **T/CTAGA**, pero si la misma se encuentra solapada con un sitio Dam (**T/CTAGA*TC**) que ha sido metilado, XbaI no cortará sobre esa secuencia.



E. coli cepa Dam (-): sitio Dam no metilado (GATC), la enzima XbaI puede cortar el ADN



E. coli cepa Dam (+): sitio Dam está metilado (G^ATC), la enzima XbaI no puede cortar el ADN

Por lo tanto es importante saber que existen cepas comerciales disponibles carentes de actividad metiltransferasa, es decir que son dam- y/o dcm- (falta de actividad de cualquier metilasa). De hecho, es posible desmetilar el ADN extraído de cepas dam+/dcm+ mediante su transformación en cepas dam-/dcm-. Esto ayudaría a digerir las secuencias que no están siendo reconocidas por las enzimas de restricción **sensibles a la metilación**.

Existen también enzimas de restricción **dependientes de la metilación** como por ejemplo la enzima DpnI que puede reconocer los sitios 5'-G^mATC-3' y digerir el ADN metilado, pero es inactiva sobre ADN no metilado. Esta enzima es muy utilizada en ensayos de mutagénesis sitio dirigida, ya que al ser su sitio de reconocimiento (GATC) un sitio muy frecuente en una secuencia de ADN, la enzima es capaz de degradar ADN molde luego de una reacción de PCR.

IV. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN SEGÚN SU COMPORTAMIENTO ANTE LA METILACIÓN

- **Insensibles** a la metilación: son las enzimas de restricción que cortan independientemente del sistema de metilación. Ej: Sau3AI
- **Sensibles** a la metilación: son las enzimas de restricción que no cortan la secuencia de reconocimiento cuando la misma se encuentra metilada. Ej: MboI
- **Dependientes** de metilación: son las enzimas de restricción que requieren que la secuencia de reconocimiento está metilada. Ej: DpnI

La siguiente tabla ejemplifica la clasificación de las enzimas de restricción en función de su comportamiento frente a la metilación.

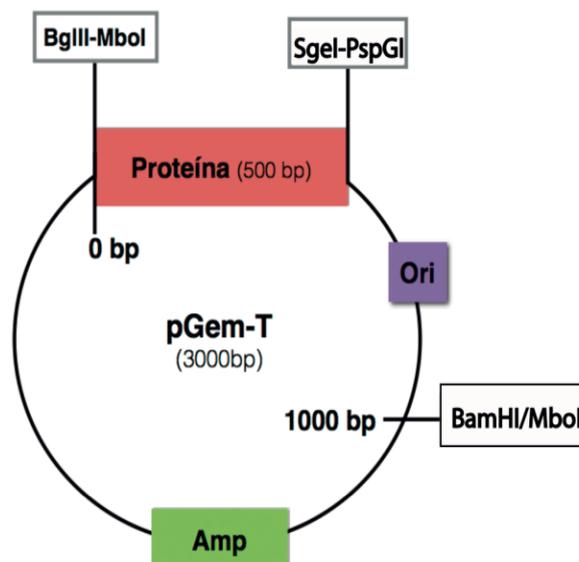
Clasificación		Ejemplos	Efecto
Sensibles	Dam	BclI T/GA*TC DpnII /GA*TC MboI /GA*TC MboII GAAGA*TC	Restricción bloqueada
	Dcm	ApaI GGGCC*/CWGG MscI TGG/CC*AGG StuI AGG/CC*TGG GsuI CTCC*AGG PspG1 /CCWGG	Restricción bloqueada
Insensibles		AsiSI, BstYI, BglII, Sau3AI, BsaWI, BamHI, PvuI, DraIII, KpnI, HaeIII	Restricción permitida
Dependientes		DpnI GA*/TC (Dam) SgeI CC*WGG (Dcm)	Restricción solo si el sitio está metilado

V. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Ejercicio 1

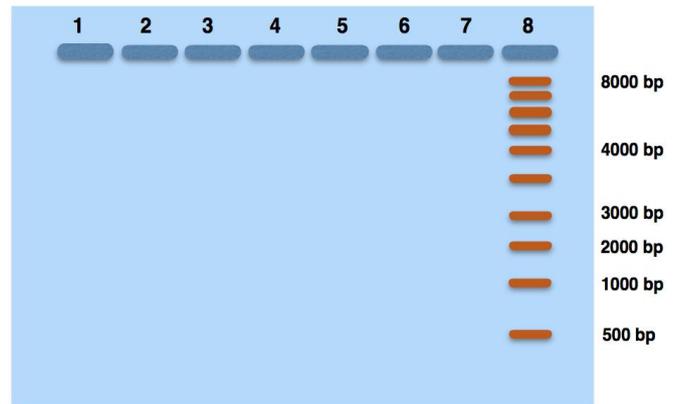
Usted realiza el subclonado de una secuencia de interés (500 pb) en el vector pGEM-T Easy (3000 pb). Para ello transforma el vector en la cepa de clonado *E. coli* Top 10 (Dam+/Dcm+). A continuación usted desea chequear la identidad del fragmento clonado. Para ello diseña un experimento en el cual realizará restricciones con las siguientes enzimas: PspGI, MboI, BamHI, BglII y SgeI.

ENZIMA	SITIO DE RECONOCIMIENTO	SENSIBILIDAD Dam	SENSIBILIDAD Dcm
PspGI	/CCWGG	insensible	sensible
MboI	/GATC	sensible	insensible
BamHI	G/GATCC	insensible	insensible
BglII	A/GATCT	insensible	insensible
SgeI	/CCWGG	insensible	dependiente



a- Dibuje los patrones de restricción que obtendrá de las siguientes digestiones:

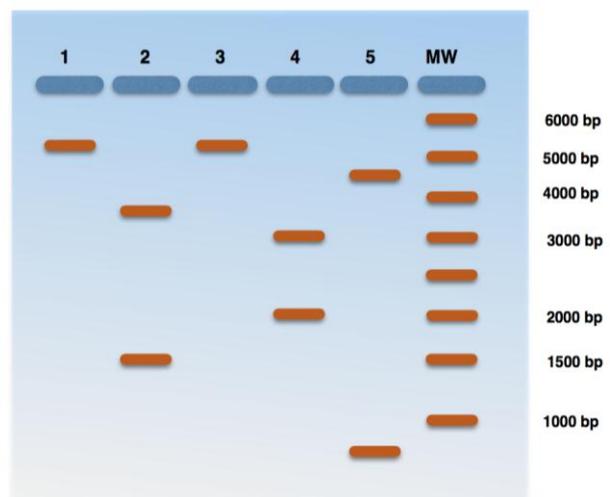
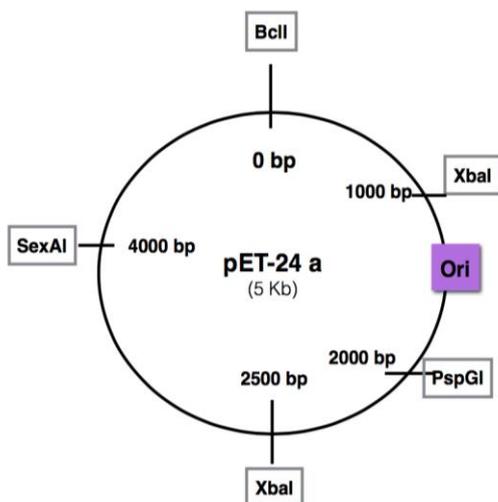
- Calle 1: Digestión con BgIII
- Calle 2: Digestión con BgIII + BamHI
- Calle 3: Digestión con PspGI + MboI
- Calle 4: Sin Digerir
- Calle 5: Digestión con SgeI + BgIII
- Calle 6: Digestión con BamHI- SgeI
- Calle 7: Digestión con BgIII + PspGI



Ejercicio 2

Usted dispone de un vector pET-24a y para corroborar la identidad del mismo, decide realizar una digestión con las siguientes enzimas: XbaI, PspGI I, BclI y SexAI. Para contar con la cantidad suficiente de ADN plasmídico a digerir, transforma el vector en la cepa IM30B de *E. coli* (DAM+/dcm-) y realiza la miniprep correspondiente para extraer el ADN plasmídico. A continuación realiza el ensayo de restricción con las enzimas anteriormente mencionadas de la siguiente manera:

- Calle1: Digestión con XbaI.
- Calle2: Digestión con SexAI+XbaI
- Calle 3: Digestión con PspGI+BclI
- Calle 4: Digestión con SexAI+PspGI
- Calle 5: Digestión con XbaI+PspGI



- A. De los sitios de restricción marcados en el vector ¿cuál de ellos se verá afectado por el sistema de metilación de la bacteria?
- B. ¿Cómo explicarías los resultados observados en el gel?
- C. ¿Cómo explicarías el resultado obtenido en el carril 1?
- D. ¿Qué resultados esperarías de la digestión del vector pET-24a si el mismo hubiese sido amplificado en la cepa GM33 (dam-/Dcm+) de *E.coli*? Dibuje un gel con los patrones de restricción esperados de las digestiones propuestas en el ejercicio.

Ejercicio 3

Usted cuenta con tres cepas bacterianas cuyos genotipos se encuentran especificados en el siguiente cuadro.

Cepa	Genotipo	AlwI	DrallI	ScrFI	ClaI	BamHI	DpnI	MscI	TaqI	StuI	KpnI	DpnII
BL21	F- ompT gal dcm-6 hsdSB(rK-mB-) Δ(srl- recA)306::Tn10(TetR)											
GM33	sup-85 (Am) dam-3											
JM110	hsdR17 supE44 thi-1 leuB6 galK2 galT22 ara-14 tsx-78 A(lac-proAB) dam-3 dcm-6											

A continuación se le presenta una secuencia de nucleótidos, con los sitios de restricción para las diferentes enzimas presentes en el cuadro. A partir de dicha secuencia, analice cuáles enzimas son insensibles y cuáles potencialmente sensibles a la metilación Dam y Dcm. Señale en el cuadro cuáles sitios se verán afectados para la restricción (+) y cuáles no (-), cuando el fragmento sea clonado en cada una de las cepas bacterianas disponibles.

Para resolver el siguiente ejercicio haga uso del sitio web:

<https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/dam-dcm-and-cpg-methylation>

```

>ATCACGGCTCGTGCGTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGGAGGAAGACGGCGTCCGCAAGTG
TAAGAAAGTGC GAAGGGCCTTGCCGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTACC GGTTGAATTTAAAGACTCACTC
                                     KpnI
                                     .....
TCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGC
                                     DpnI
                                     .....
CGGTGGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGAA
                                     DpnI
                                     .....
AACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGTGATTCAGGCTTGGCCA GAAAACAGGACGGACCTCCATGCC
                                     MscI
                                     .....
TTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCC
|
CAAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAA
ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCTGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCG
                                     StuI
                                     .....
CCAGAGTGCCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGACCAGACAACCTGTATCCAGTGTG
GGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACT
GGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGG
    ScrFI                               DpnI
    .....                               .....
CCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCCACATCGTTCGGAA
GCGCACGCTGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCC
                                     DraII
                                     .....
AACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTGCTGGGCTCCGGTGCGT
                                     DpnI                               DpnI
                                     .....                               .....
TCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCAGAGGTGAGAAAGTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGA
                                     AlwI
                                     .....
ATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTG
GACAACCCACGCTGTGCCGCTGCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTCAACTCATCACGCAGCTCA
TGCCCTTCGGCTGCCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAA
CTGGTGTGTGCAGATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGGATCCGGCA
    DpnI                               BamHI
    .....                               .....
GCCAGGAACGTACTGGTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCTGG
                                     DpnI
                                     .....
GTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGCAAAGTGCCTATCAAGTGGATGGCATTGAATCAAT
TTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGATGTCTGGAGCTACGGGGTGACCGTTTGGGAGTTGATGACC
TTTGATCCAAGCCATATGACGGAATCCCTGCCAGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAACGCC
                                     DpnI
                                     .....
TCCCTCAGCCACCCATATGTACCATCGATCTCTACATGATCATGGTCAAGTGCTGGATGATAGACGCAGA
    ClaI
    .....
TAGTCGCCCCAAAGTTCCGTGAGTTGATCATCGAATTCCTCCAAAATGGCCCCGAGACCCCCAGCGCTACCTT
                                     TaqI
                                     .....
GTCATT CAGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTCTTACAGACTCCAACCTTCTACCGTGCCCTGATGG
    
```

Tema 3: CLONADO

I. OBJETIVOS

- Comprender el fundamento y las etapas de un ensayo de clonado.
- Comprender el fundamento de selección fenotípica y genotípica.
- Comprender cómo funciona un sistema de expresión.
- Adquirir las habilidades básicas para el armado de vectores de clonado y de expresión.

II. INTRODUCCIÓN

En Biología Molecular, el término de clonado hace referencia a una técnica que tiene por objetivo generar numerosas copias idénticas de una única molécula de ADN. Para ello se unen moléculas de ADN (vector) con el o los fragmentos de ADN que se desea clonar (inserto). Luego se introduce en células bacterianas, de forma que logre mantenerse y multiplicarse (replicarse) dentro de las mismas. Si bien, la PCR es una técnica utilizada también para amplificar un número de copias de ADN, la misma se enfrenta a problemas de contaminación con ADN foráneo, inserción de mutaciones durante la amplificación por la polimerasa y amplificación de fragmentos cortos de ADN.

III. ¿Cómo realizamos un clonado?

Teniendo en cuenta los conceptos revisados anteriormente, ahora nos enfocamos en los pasos para realizar un clonado en el laboratorio:

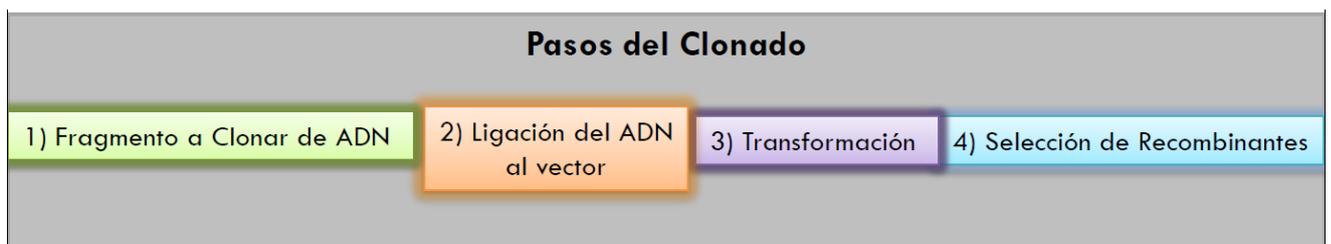


Figura 1: Pasos para realizar un clonado

1. Fragmento de ADN a clonar (inserto)

Para obtener el inserto de interés hay que recurrir a una fuente de ADN que lo incluya; por ejemplo, el genoma de un animal o de una planta. Luego se puede aislar el fragmento mediante:

- a. Corte con enzimas de restricción: se obtienen fragmentos con extremos 5' fosfato y extremos 3' OH.
- b. Amplificación por PCR: se obtienen fragmentos desfosforilados con extremos 3' y 5' con un grupo hidroxilo (OH).

El tamaño máximo a insertar está limitado por la capacidad del vector usado y su uso es variado.

Vectores de Clonado

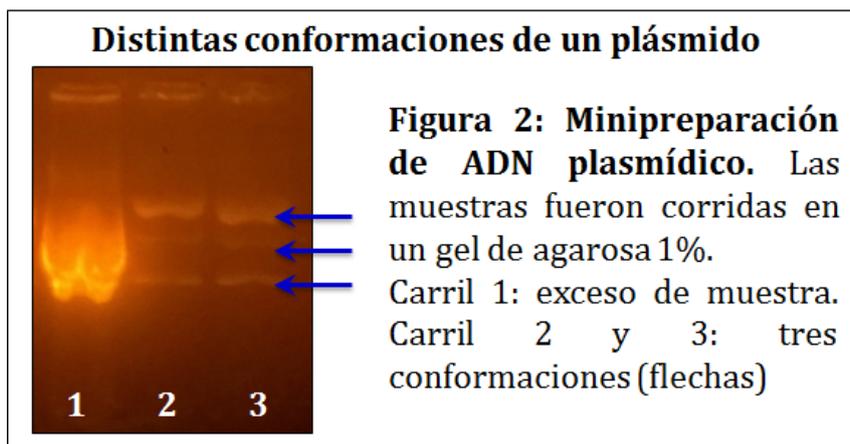
Los vectores de clonado son moléculas de ADN doble cadena, circulares, extracromosómicas, de replicación independiente y heredables. Se encuentran distribuidos ampliamente en organismos unicelulares, tanto procariontes como eucariotes. A continuación se encuentran clasificados en la tabla 1:

Vectores de clonado	Huésped	Tamaño de inserto	Aplicaciones
Plásmidos		5-10 Kb	Clonación de fragmentos de ADN. Obtención de proteínas recombinantes.
Derivados del bacteriófago λ	E. coli	5-25 Kb	Clonación de fragmentos de ADN.
Cósmidos	E. coli	35-45 Kb	Vector híbrido: contiene sitios cos del fago λ e ingresa a E. coli por infección, pero se comporta como un plásmido. Construcción de genotecas.
PACs	E. coli	100-300 Kb	Cromosoma artificial derivado del fago P1 (ADN circular). Construcción de genotecas.
BACs	E. coli	> 300 Kb	Cromosoma artificial de bacteria (ADN circular). Construcción de bibliotecas de genes.
YACs	Saccharomyces cerevisiae	200-2000 Kb	Cromosoma artificial de levadura (ADN lineal). Construcción de bibliotecas de genes.
MACs	Células de mamíferos	> 1000 Kb	Cromosoma artificial de mamíferos. Construcción de bibliotecas de genes.

Tabla 1: Vectores de clonado. Adaptada de "Principles of Gene Manipulation and Genomics"-7th edition.

Los vectores de clonado presentan diferentes conformaciones que se muestran en la Figura 2:

- **ADN Superenrollado (S):** Enrollamiento de la doble hélice, generando una estructura condensada y enredada.
- **ADN Covalentemente Cerrado (CCC):** Es una estructura relajada en el que las cadenas de ADN se encuentran intactas y covalentemente cerradas en forma.
- **ADN Circular (OC):** Las cadenas de ADN presentan roturas de la unión fosfodiéster en una de las cadenas (*nicks*), por lo que la molécula no se encuentra cerrada covalentemente y se mantiene unida por puentes de hidrógeno.



Las regiones indispensables que un plásmido debe tener para ser empleado en estrategias de clonado se esquematizan en la Figura 3 y son:

- ORI.** Origen de replicación específico de la especie bacteriana que se usará en la transformación. Le permite al plásmido replicarse independientemente del cromosoma bacteriano.
- MCS.** Sitio de clonado múltiples o *polylinker*. Es una región que contiene varias secuencias de reconocimiento para numerosas enzimas de restricción. Es útil para insertar fragmentos de ADN obtenidos por digestión con las mismas enzimas de restricción presentes en esta región.

Nota: Para clonar insertos de PCR, se suelen usar vectores abiertos cuyos extremos 3' terminan en con un nucleótido T protruyente. Esto es posible ya que la enzima *Taq* ADN polimerasa añade un nucleótido A en el extremo 3' de los amplicones.

- Marcador de selección.** Región que confiere un cierto fenotipo a sus huéspedes que nos permite seleccionar aquellas bacterias que no introdujeron el plásmido, eliminando aquellas que no incorporaron el vector. El marcador de resistencia es casi siempre un gen que codifica para una proteína que confiere resistencia a un

determinado antibiótico. Estos pueden ser: resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados, producción de antibióticos, producción de enterotoxinas, entre otros.

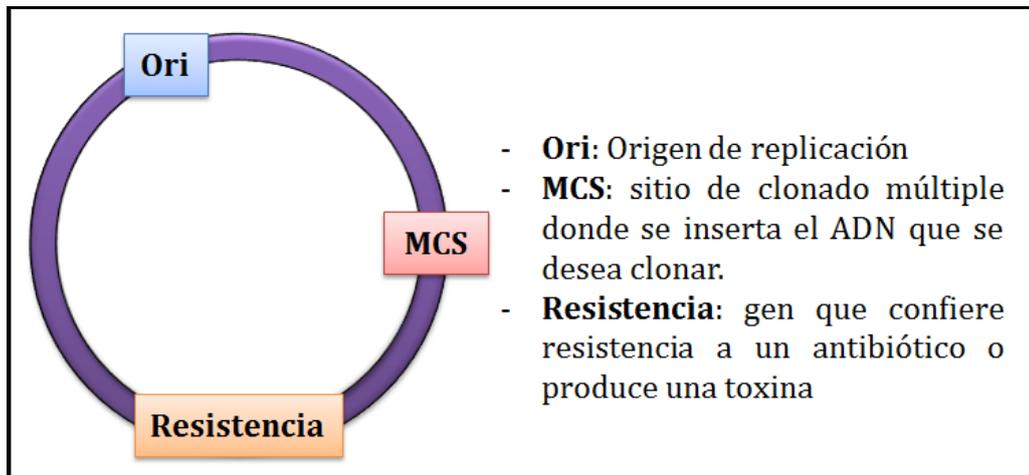


Figura 3: Estructura básica de un vector de clonado

2. Ligación

Consiste en unir (ligar) los fragmentos de ADN obtenidos anteriormente con el vector de clonado. En este proceso interviene una enzima llamada ADN ligasa, que establece un enlace fosfodiéster entre la última base del inserto y la primera base de los extremos del vector sin incorporar un nuevo nucleótido. Esto tiene como consecuencia que se produzca la unión covalente entre las cadenas de ADN correspondientes al vector y al inserto (Figura 4).

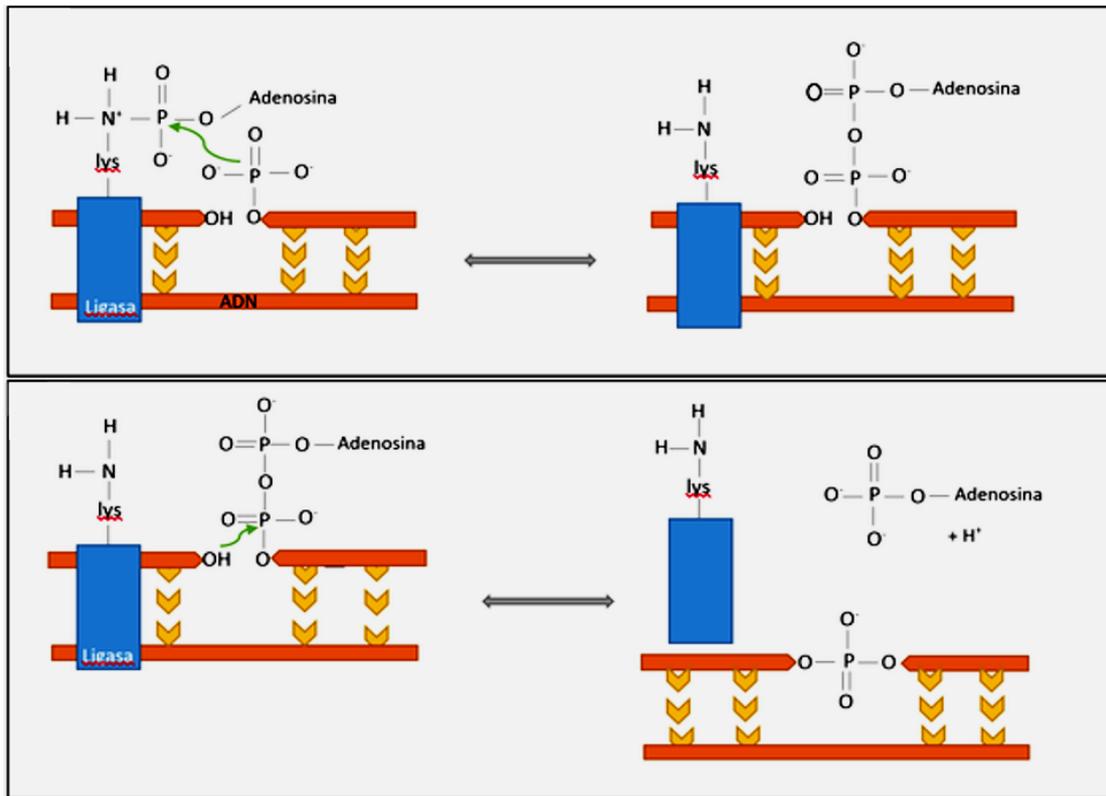


Figura 4: Mecanismo de reacción de una ADN ligasa. Figura tomada de Wikipedia.

3. Transformación

En este proceso se induce la entrada de los plásmidos en el interior de las bacterias. Las bacterias utilizadas son llamadas competentes. Naturalmente, una bacteria puede adquirir un estado de “competencia” que le permite recibir una única molécula de ADN foráneo. Dado que este evento ocurre en una frecuencia muy baja naturalmente, en el laboratorio se induce artificialmente este estado de permeabilidad para aumentar la eficiencia de introducir una molécula de ADN. Para ello se utilizan métodos químicos, como cationes divalentes (CaCl_2), y físicos, como la aplicación de un campo eléctrico (electroporación).

La eficiencia de este proceso puede variar enormemente, pero en todos los casos la fracción de bacterias que incorporan ADN exógeno es marginal. Por lo tanto, la eficiencia se expresa como el número de eventos independientes de incorporación de ADN exógeno por cada microgramo (μg) de ADN empleado. Para estimar este valor, se transforman bacterias con una cantidad exactamente medida de un determinado plásmido usado como estándar (en general un plásmido pequeño superenrollado) y se cuenta el número de colonias resistentes obtenidas (UFC). Posteriormente, se extrapola el valor obtenido al correspondiente a un μg de ADN plasmídico.

Por ejemplo:

Sí	10 pg ADN.....	10 UFC
	100 pg ADN.....	100 UFC
	1000 pg (=1ng) ADN.....	1000 UFC

Entonces,

1 µg (1000 ng) ADN10⁶ UFC (eficiencia = 10⁶ UFC/µgADN)

4. Selección de recombinantes

Luego de la transformación del microorganismo que se haya elegido para trabajar, deben seleccionarse sólo aquellos que incorporaron el plásmido que contiene el fragmento de interés. Para ello se cultiva el microorganismo en un medio de cultivo de selección.

En bacterias

En bacterias, generalmente el plásmido confiere resistencia a un antibiótico, como por ejemplo kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, entre otros. Entonces, el medio de selección contiene alguno de estos antibióticos y las bacterias transformadas con el vector (posean o no el fragmento de ADN de interés), sobrevivirán en presencia del mismo.

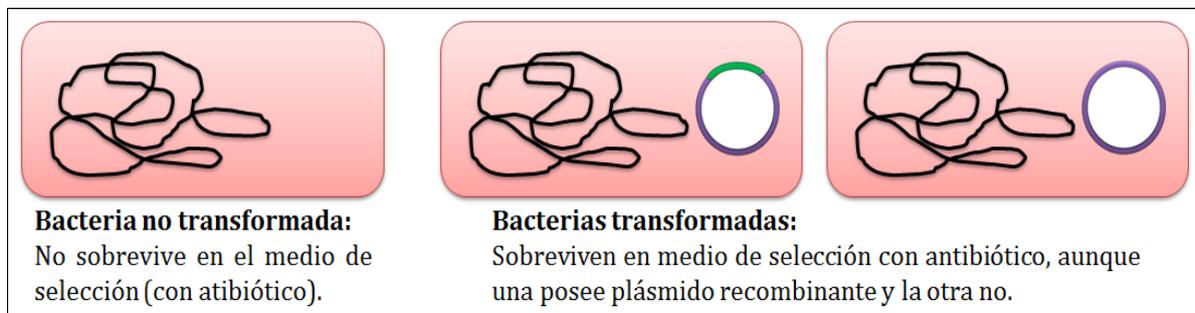


Figura 5: Selección de bacterias transformadas

Selección fenotípica

El plásmido puede contener algún sistema que le permita discriminar entre las células que llevan el vector con el inserto y las que llevan el vector vacío (sin inserto). Un sistema muy usado es el que utiliza la secuencia del gen de la β-galactosidasa (gen *LacZ*, del operón *lac* de *E. coli*) dentro del cual se encuentra la región de clonado múltiple (*polylinker*). Para que tenga lugar la expresión del gen de la β-galactosidasa, es necesaria la presencia de IPTG, molécula que actúa como un inductor continuo del gen. La proteína β-galactosidasa, en presencia de uno de sus sustratos, X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-galactósido), produce un precipitado azul, ya que X-gal es hidrolizado por la enzima, dando lugar a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, que es oxidado originando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Así, si cultivamos en medio sólido bacterias

transformadas con un plásmido que exprese el gen de la β -galactosidasa, en presencia de IPTG y X-gal, las bacterias que hayan incorporado un plásmido vacío (sin inserto o **no recombinante**) podrán producir el enzima, por poseer intacto su gen, y originarán colonias de color azul. Por el contrario, las bacterias que hayan incorporado un plásmido donde el inserto interrumpe el gen *LacZ* (plásmidos **recombinantes**) tendrán una versión trunca e inactiva el gen de la β -galactosidasa, y no se formará el precipitado azul (darán lugar a colonias blancas). En la Figura 6 se esquematiza este mecanismo de selección fenotípica.

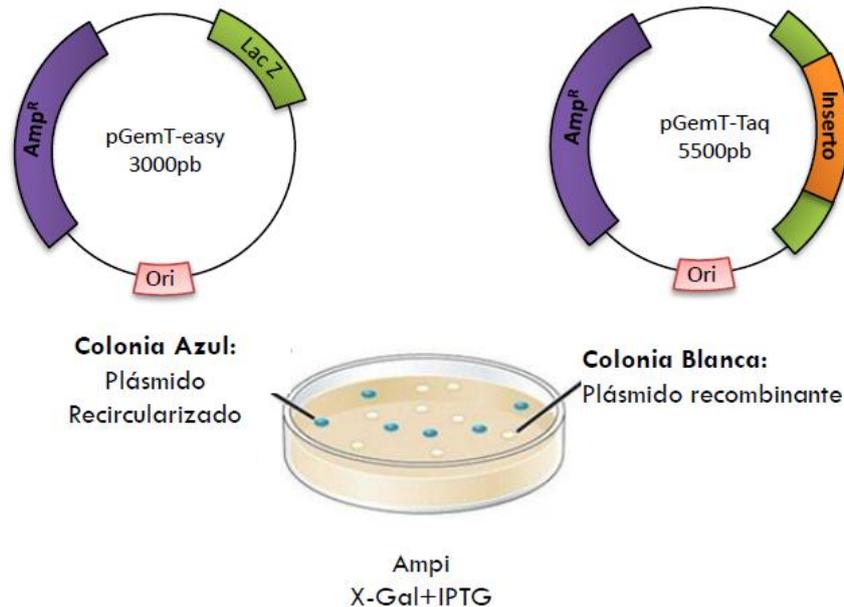


Figura 6: Empleo del sistema *LacZ* para la selección fenotípica de colonias recombinantes.

Selección genotípica

Con posterioridad al *screening* inicial mediante colonias blancas y azules, o cuando el vector no provee esta posibilidad, es siempre necesario realizar una **selección genotípica** de las colonias obtenidas para determinar si el clonado funcionó y el vector contiene el inserto de interés. En algunos casos, el objetivo puede ser la obtención de un vector de expresión, por lo que será necesario comprobar que el fragmento de ADN clonado se encuentra en la orientación correcta y en el marco de lectura para la correcta expresión de la proteína de interés.

Cualquiera sea el caso, debemos tener en cuenta que cada colonia obtenida en la placa de cultivo representa una bacteria transformada por una única molécula de plásmido (**recombinante o no recombinante**), de modo tal que las bacterias de una colonia son clones y todas poseen el mismo plásmido. Sin importar la estrategia elegida para la obtención del fragmento a clonar, uno tiene siempre una población mixta de plásmidos

recombinantes y no recombinantes. Para poder seleccionar los clones (colonias) que poseen el vector recombinante, se toman varias colonias de la placa de agar y se cultivan por separado en medio líquido por 12-16 horas.

A continuación se pueden emplear distintas estrategias para determinar si el clon seleccionado incorporó el vector recombinante:

a) Mapeo de restricción. Se puede digerir el vector con una o más enzimas de restricción. A partir del mapa tentativo del vector armado y según los fragmentos obtenidos luego de la digestión, podremos inferir la presencia o no del inserto y la orientación del mismo (Figura 7).

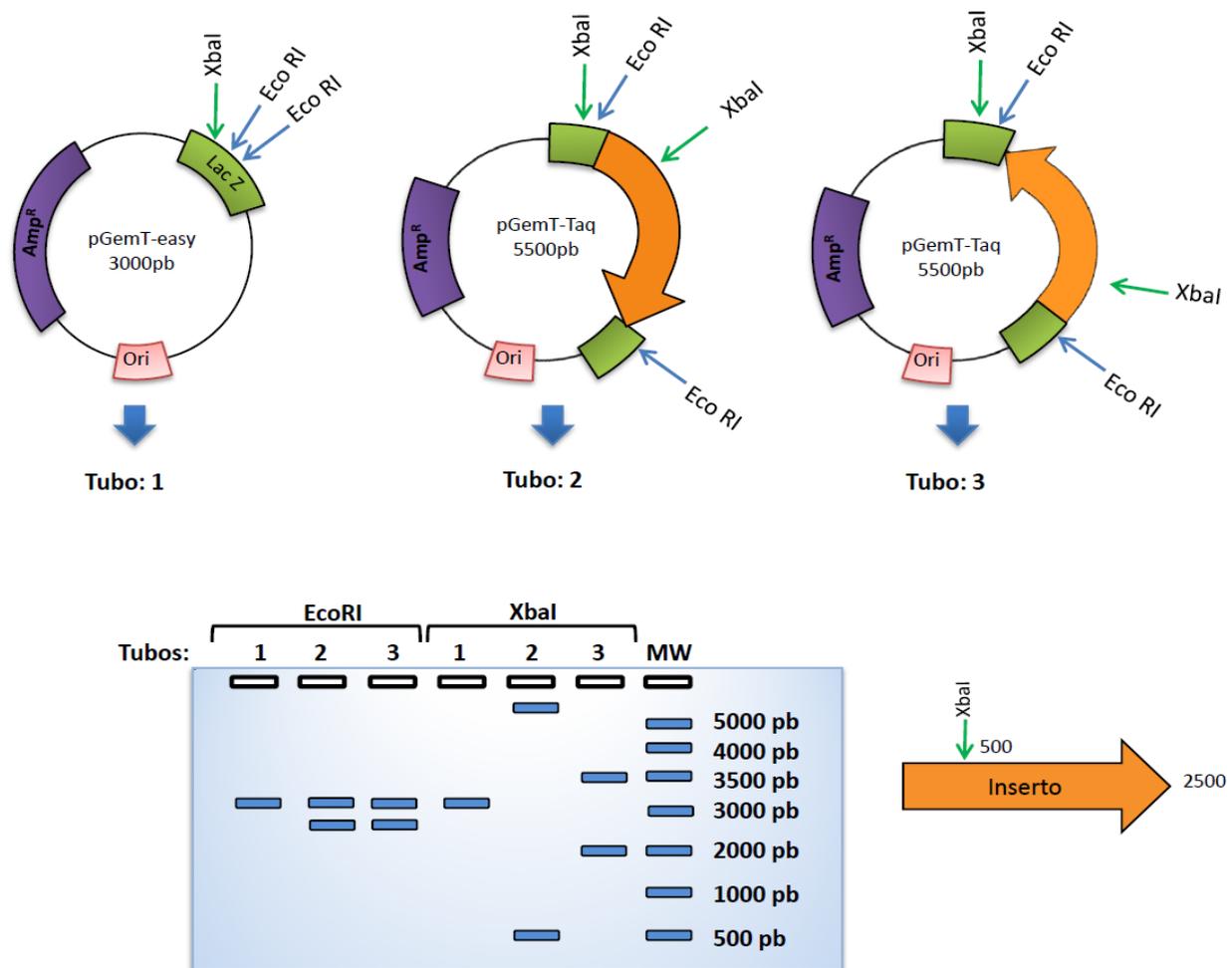


Figura 7: Mapeo de restricción de un vector.

b) PCR. Para detectar la presencia del inserto se pueden utilizar los *primers* con los que se amplificó la secuencia a clonar. En este caso, independientemente de la orientación del inserto, se observará un producto de amplificación en el gel de agarosa. Cuando el fragmento a clonar se haya obtenido por digestión con enzimas de restricción, diseñaremos

un par de *primers*. Idealmente uno de ellos hibridará dentro del inserto y otro sobre el vector de clonado, de modo tal que solamente habrá amplificación si el inserto se encuentra en la orientación correcta (Figura 8).

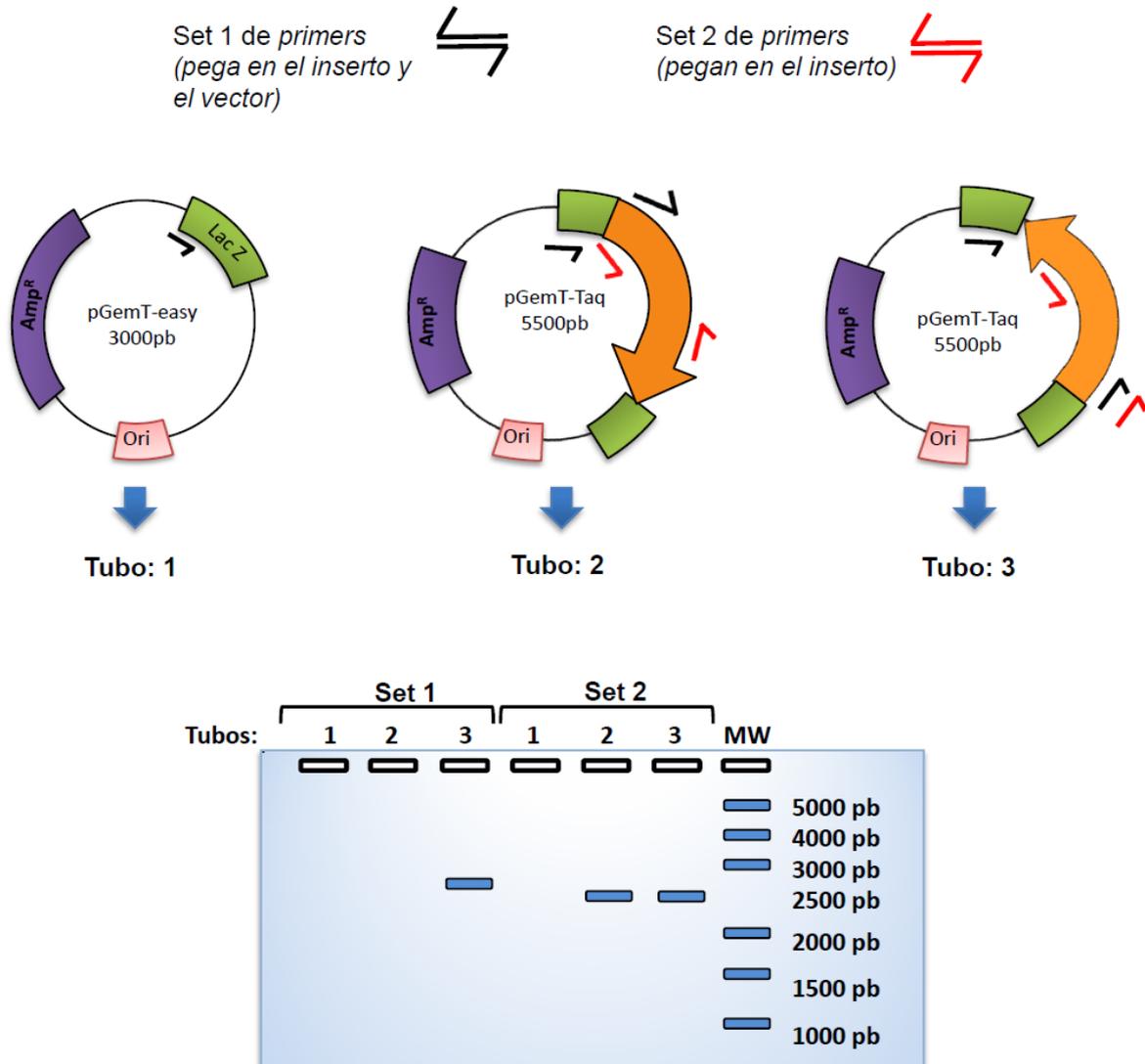


Figura 8: Verificación de presencia y orientación de un inserto mediante PCR.

c) Secuenciación. En este caso, se secuencia el fragmento que se clonó, por lo tanto podemos determinar si existe un corrimiento en el marco de lectura o eventuales mutaciones (Figura 9).

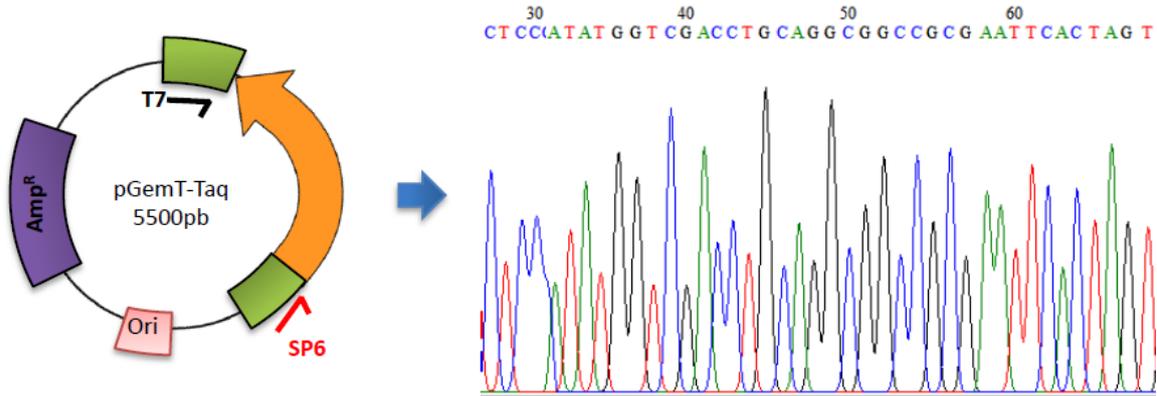
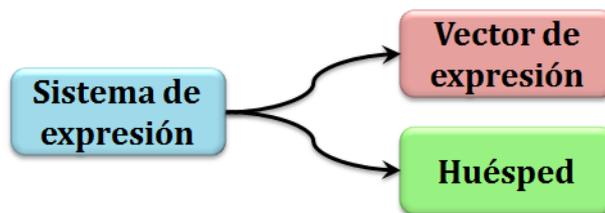


Figura 9: Secuenciación

IV. SISTEMAS DE EXPRESIÓN

Un sistema de expresión consta de dos componentes principales: un organismo donde se llevará a cabo el proceso de producción de la proteína recombinante (huésped) y un vector de expresión que posee los elementos regulatorios necesarios para que tengan lugar los procesos de transcripción y traducción en el organismo huésped.



Los sistemas de expresión se pueden clasificar en dos grandes categorías: procariontes y eucariontes. En cualquiera de los casos, es importante destacar que **el armado del vector de expresión siempre se realizará en un sistema bacteriano** y luego de ser corroborada la identidad del inserto clonado y la orientación del mismo, el vector podrá ser utilizado en el sistema de expresión de elección.

Los vectores para expresión de proteínas son elegidos normalmente en combinación con el sistema de expresión a utilizar. Hoy en día se pueden producir proteínas recombinantes en diferentes organismos, como por ejemplo cultivos celulares de bacterias, levaduras, hongos, mamíferos, plantas e insectos. Para cada uno de estos sistemas existen diferentes vectores, los cuales será necesario adecuar en función de los requerimientos de la proteína que se desea expresar.

Los sistemas de expresión procariotas son generalmente mucho más fáciles para trabajar y son útiles en la mayoría de las aplicaciones. Sin embargo, en algunos casos pueden presentar limitaciones para expresar proteínas eucariotas completamente funcionales. Esto ocurre porque la actividad adecuada de una proteína depende de una síntesis sin errores, acompañada de un plegamiento correcto que podrá requerir o no, de modificaciones postraduccionales, como la formación de puentes disulfuro o la glicosilación de determinados aminoácidos, la incorporación de cofactores esenciales para la actividad de la proteína, etc.

Los sistemas de expresión eucariotas son más complejos y se suelen utilizar cuando no se consigue una expresión óptima mediante los sistemas de expresión procariotas. Además, los materiales empleados son más costosos (Figura 10).

En conclusión, será necesario elegir el sistema de expresión que mejor se adecúe a los requerimientos de la proteína que se desea expresar.

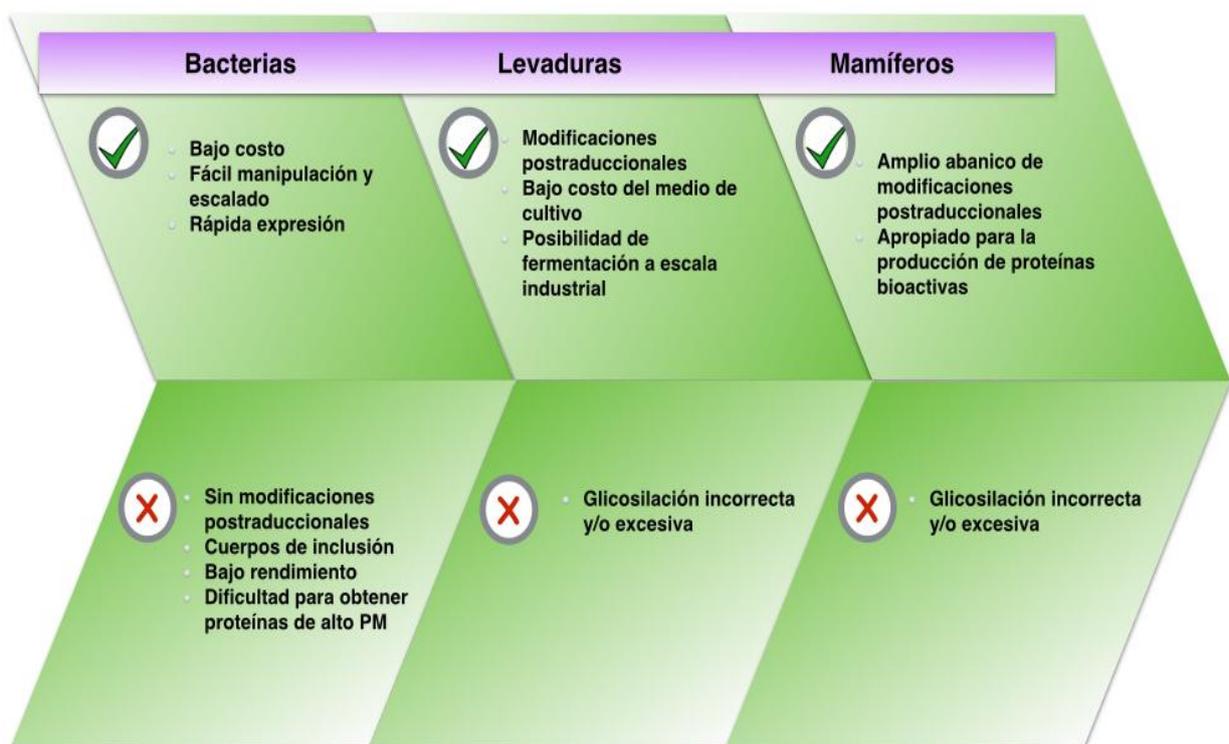


Figura 10: Sistemas de Expresión

IV. a) Sistemas Bacterianos de Expresión

Como mencionamos anteriormente, un sistema de expresión bacteriano consta de una bacteria (huésped) y un vector de expresión con los elementos regulatorios necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicha bacteria.

Huésped

Dentro de los microorganismos, el más utilizado para la síntesis de proteínas recombinantes es *Escherichia coli* ya que esta bacteria es fácil de cultivar y de modificar genéticamente.

Las **ventajas** de utilizar *Escherichia coli* como huésped se basan en:

- ✓ Facilidad de manipulación del ADN.
- ✓ Elevado número de mutantes y vectores de expresión disponibles.
- ✓ Amplio conocimiento de la fisiología de la célula, que permite alcanzar densidades celulares elevadas con un medio de cultivo económico.
- ✓ Conocimiento del efecto de la sobreexpresión de proteínas sobre la bacteria.

Las **desventajas** de utilizar *Escherichia coli* en la síntesis de proteínas recombinantes:

- ✗ No lleva a cabo procesamientos post-transduccionales propios de células eucariotas, como es el caso de la glicosilación o fosforilación, lo cual afecta la estructura, estabilidad, solubilidad y actividad biológica de la proteína producida.
- ✗ No lleva a cabo el plegamiento correcto de las proteínas recombinantes.
- ✗ No forma puentes disulfuro en el citoplasma, salvo en ciertas cepas mutantes.
- ✗ Retiene la metionina aminoterminal en las proteínas recombinantes, que no está presente en las formas nativas. Esto afecta la estabilidad de la proteína y produce inmunogenicidad.
- ✗ Problemas de codon bias (o preferencia de codones). El código genético es degenerado, varios tripletes pueden dar lugar a un mismo aminoácido. Cada especie tiene su propia proporción de tripletes, siendo unos más frecuentes que otros. Cuando el codon bias del gen que se quiere expresar es diferente al de *E. coli*, la eficiencia de traducción y por tanto el rendimiento en la expresión disminuye considerablemente.
- ✗ Alto contenido de proteasas. El alto contenido de proteasas en el espacio intracelular puede alterar el producto final, impidiendo la expresión de proteínas activas.

Un efecto colateral experimentado por las bacterias cuando son forzadas a producir una proteína a concentraciones elevadas es la generación de cuerpos de inclusión, que son agregados citoplasmáticos insolubles de la proteína expresada. Para estos casos se han desarrollado métodos de procesamiento de cuerpos de inclusión, y aproximaciones para

reducir la producción de los mismos, que incluyen el direccionamiento de la proteína hacia el espacio periplásmico y el crecimiento de las bacterias a temperaturas inferiores a la estándar (37°C), de modo que la producción de la proteína de interés sea paulatina en el tiempo para reducir la agregación de la misma.

La cepa de *E. coli* más utilizada en los sistemas de expresión es la BL21, debido a que es defectiva en las proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación de proteínas. En función del sistema de expresión empleado, la cepa puede contener un módulo regulador de la expresión integrado en el cromosoma. En el caso concreto de los sistemas de expresión pET (Novagen) y pRSET (Invitrogen), la cepa de expresión contiene el ADN del bacteriófago DE3 integrado en el cromosoma. Este bacteriófago contiene a su vez el gen codificante de la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5 cuya actividad se induce por medio de la adición del inductor IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). En este sistema, el vector de expresión pET utilizado para la expresión de la secuencia codificante de la proteína de interés, incorpora una región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa, de manera que tras la adición de IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano por la adición de IPTG, induce la expresión de la proteína de interés a partir del vector. De este modo, el uso de estos vectores requiere que el organismo exprese la enzima T7 RNA polimerasa para poder expresar la proteína en estudio.

En el caso de los sistemas pGEX (GE Healthcare), pQE (QIAGEN), pTrc (Invitrogen), pBAD (Invitrogen) la expresión de las proteínas recombinantes no está supeditada a la presencia de un módulo regulador integrado en el cromosoma de la bacteria. A diferencia de los vectores mencionados en el párrafo anterior, estos vectores poseen los elementos reguladores del promotor para la expresión de proteínas recombinantes dentro del mismo vector, por lo que pueden emplearse en combinación con diferentes cepas bacterianas.

Vectores para expresión en bacterias

Respecto al vector de expresión es preciso tener en cuenta varios criterios con el fin de obtener una expresión eficiente:

- ❖ El origen de replicación, que influye en el número máximo de copias del vector de expresión por cada célula, (el número de copias del gen clonado es otro factor a considerar muy importante). Cuando se pretende que el gen se exprese a alto nivel, se suele escoger un plásmido de control relajado, es decir, con gran número de copias, mientras que si interesa un nivel bajo de expresión se escoge un plásmido de control estricto, con poco número de copias, u otra alternativa plausible sería integrar el gen de interés en el cromosoma bacteriano.

- ❖ Las secuencias de inicio y final de la transcripción, entre las que se incluyen los promotores y terminadores y operadores.
- ❖ Las señales de comienzo de la traducción, como son el codón de inicio de la traducción y los sitios de unión al ribosoma.
- ❖ La localización subcelular de la proteína que se va a expresar (citoplasma o periplasma).
- ❖ El control de la segregación plasmídica. En la segregación plasmídica es de gran importancia el mecanismo de retención del vector en la célula. El mecanismo clásico para evitar el inconveniente de la segregación es la coexpresión en el vector de un gen codificante para la resistencia a un marcador de selección, generalmente un antibiótico, de manera que únicamente la células que posean en su interior el vector serán capaces de propagarse en un medio de cultivo que contenga el marcador de selección.
- ❖ La eficiencia de la traducción, lo que puede incluso llevar a emplear codones sinónimos adaptados a la abundancia de los correspondientes ARNt del huésped.

Por lo tanto el vector de expresión deberá contener (en dirección 5´- 3´) los siguientes elementos:

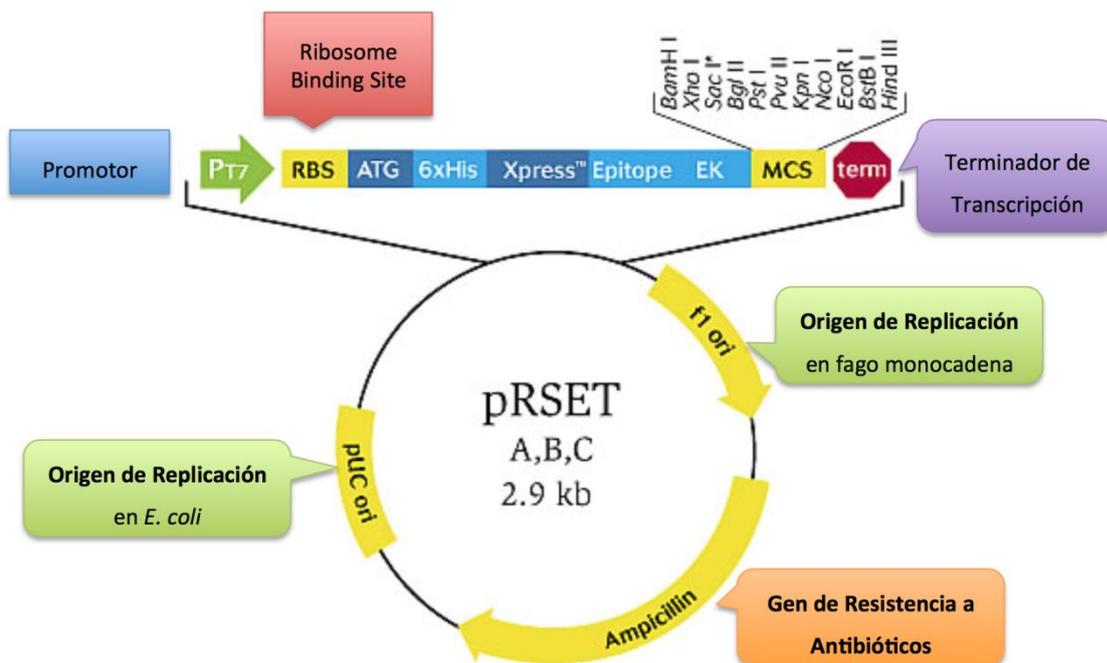


Figura 11: Vector para expresión en Bacterias. Imagen tomada y adaptada a partir de la página de Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V35120>

- I) Un **promotor eficiente**, dotado de las regiones conservadas -35 (TTGACA o similar) y -10 (TATAAT o similar).
- II) A corta distancia del promotor, debe tener una región que al transcribirse suministre el **sitio de entrada al ribosoma**: la denominada secuencia de Shine-Dalgarno, que es complementaria del extremo 3' del ARNr 16S.
- III) A una distancia de entre 3-11 pb downstream de la secuencia de Shine-Dalgarno, debería situarse el **codón ATG** que señala el comienzo de la traducción del ARNm. Este codón lo puede suministrar el gen a clonar, o bien el vector puede disponer de ese codón, seguido de alguna diana que permita la inserción del gen a expresar.
- IV) Finalmente, y situado al lado 3' de todo lo anterior, es necesaria una secuencia que funcione como **terminador de la transcripción** (que en su forma de ARN constituye la típica horquilla por emparejamiento intracatenario), donde la ARN polimerasa se desliga del ARN recién formado.

IV. b) Levaduras como Sistemas de Expresión

Las levaduras presentan muchas de las ventajas de las bacterias: alto rendimiento, estabilidad de la cepa productora, crecimiento a alta densidad, productividad, crecimiento en medios baratos y químicamente definidos. Pero además, como eucariotas, son capaces de glicosilar y de plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro, ya que su proceso de producción es muy similar al de las células de mamífero. La adición de una secuencia señal en el gen permite la secreción de la proteína al medio de cultivo. Además, algunas levaduras, como *S. cerevisiae*, tienen una larga historia de utilidad en procesos de fermentación industrial.

Otro aspecto en el que las levaduras se muestran como valiosos productores de proteínas recombinantes, es la disponibilidad de algunos promotores muy fuertes y de regulación muy precisa, sobre todo en las levaduras metilotróficas, como *Pichia pastoris* o *Pichia metanólica*. Entre otras ventajas de los metilotrofos destacan su capacidad para crecer en soluciones de metanol, eliminando virtualmente otros microorganismos competidores o contaminantes y la posibilidad de integrar múltiples copias del vector en su genoma, dando lugar a transformantes estables.

Vectores para expresión en levaduras

Además de los elementos básicos y necesarios para el armado del vector en bacterias (origen de replicación bacteriano, gen resistencia y sitio de clonado múltiple) serán necesarios algunos otros elementos que permitirán que el vector se replique y se mantenga estable en la cepa de levaduras, además de que sea capaz de conducir la expresión de la proteína de interés:

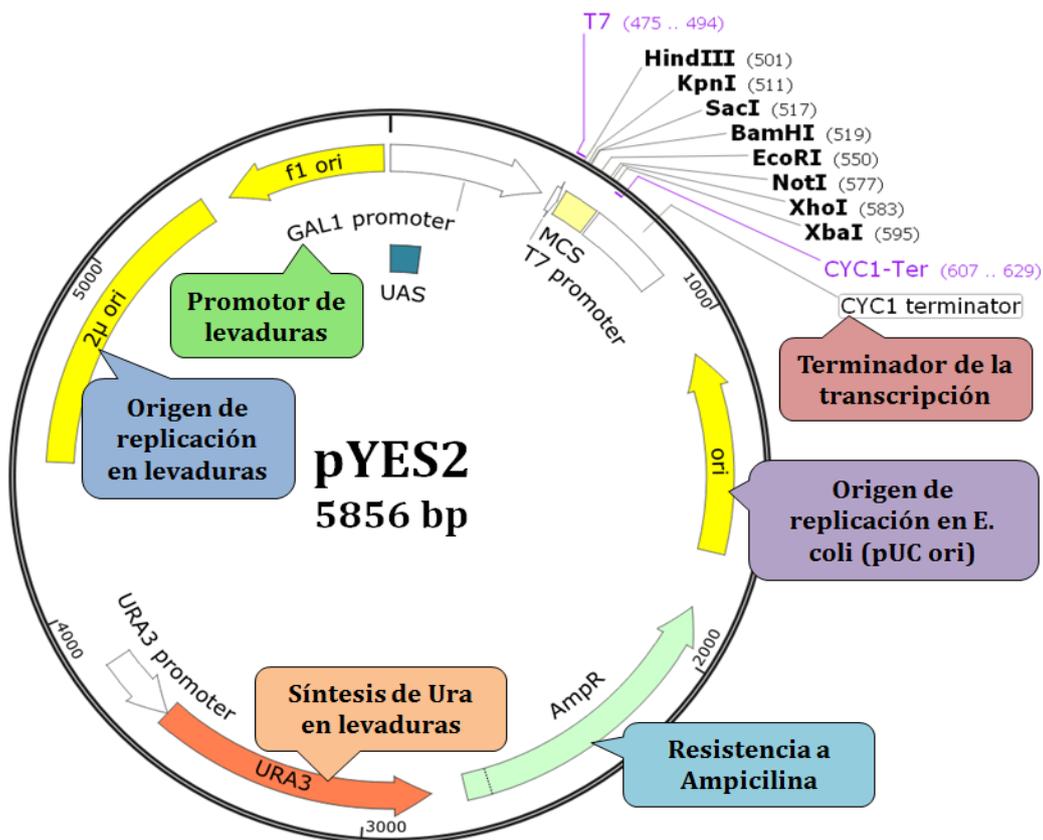


Figura 12: Vector para expresión en Levaduras. Imagen tomada y adaptada a partir de la página de Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V82520>

I) Origen de replicación para levaduras.

II) Marcadores de selección.

Auxotróficos: Inclusión en el vector de alelos que complementan mutaciones en cepas auxotróficas. Ej.: LEU2, TRP1, URA3, HIS3, usados en cepas auxotróficas para leucina, triptófano, uracilo e histidina respectivamente. Es decir, únicamente las células que contengan el vector, serán capaces de crecer en un medio de cultivo que carezca del elemento para el que la cepa es auxótrofa.

Dominantes: Se pueden usar en una mayor variedad de cepas. Ejemplos:

- Tn903 kanR selección con G418.
- DHFR: selección con metotrexato /sulfanilamida.
- CamR: selección con cloranfenicol en medio con glicerol.

III) Promotores y terminadores transcripcionales.

Promotores de enzimas glicolíticas: son los más poderosos pero poco regulables.

Son inducidos varias veces por glucosa. Ejemplos:

- PGK: fosfoglicerato quinasa
- GAP: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
- ADH: alcohol deshidrogenasa

Promotores del metabolismo de galactosa: Son los promotores regulables más usados. Ejemplos:

- GAL1, GAL7 y GAL10: Se inducen hasta 1000 veces por galactosa y se reprimen por glucosa.

Terminadores: Sólo de levaduras. En general se usa el terminador CYC1 TT y AOX1 TT

IV) Secreción de proteínas.

- Se utiliza un péptido señal N-terminal hidrofóbico, propio de levaduras.
- Permite un plegamiento correcto.
- Evita efectos tóxicos.
- Facilita la purificación.

La principal desventaja de producir proteínas en sistemas de levaduras es que el patrón de glicosilación en levaduras es distinto del de mamíferos; por lo tanto las proteínas humanas, glicosiladas en levaduras, pueden tener efectos inmunogénicos en humanos.

Selección en Levaduras mediante auxotrofia

En levaduras, empleadas como un sistema de expresión ya que poseen la maquinaria necesaria para realizar modificaciones postraduccionales, se utiliza un sistema de selección distinto. En este caso, se utilizan cepas especiales de levaduras que son auxotróficas, es decir cepas que poseen una mutación en una enzima de una vía metabólica, de modo tal que esta cepa necesita para su crecimiento del aporte exógeno del producto que genera la enzima afectada. Así, los plásmidos empleados en levaduras contienen un gen que codifica una enzima que le devuelve a la levadura la capacidad de sintetizar el metabolito que no era capaz de producir. En condiciones de cultivo, sólo las levaduras que incorporan el plásmido podrán sobrevivir en un medio de cultivo que no posee el metabolito que no puede sintetizar. Las cepas más utilizadas en ingeniería genética son His3, Leu2, Trp1 y Ura3, entonces no pueden producir histidina, leucina, triptófano y uracilo, respectivamente (Figura 13).

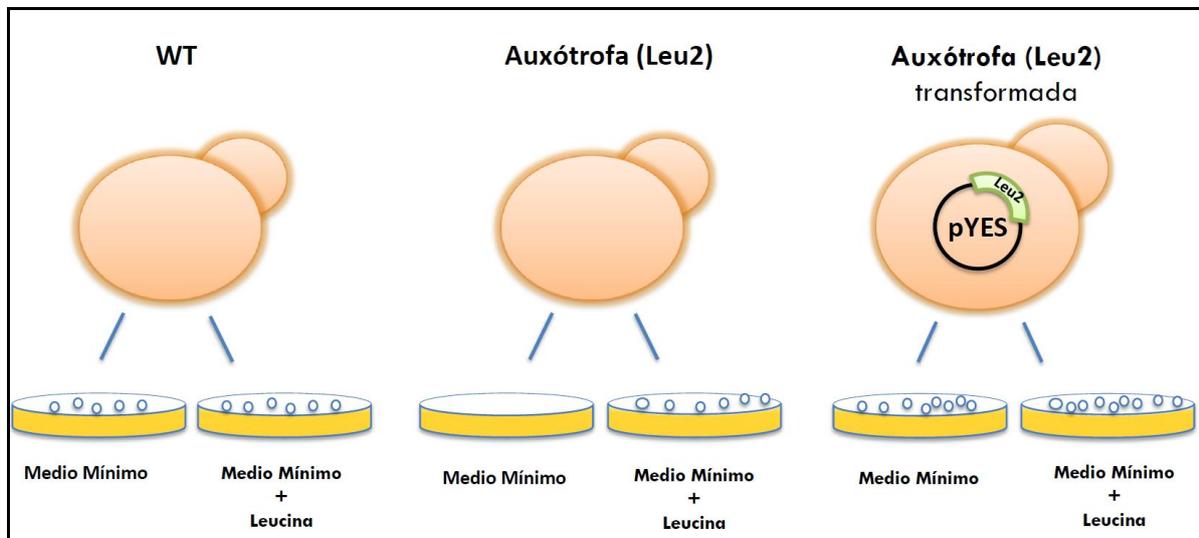


Figura 13: Selección de levaduras transformadas.

IV. c) Cultivos celulares animales como sistemas de expresión

Expresar proteínas en un cultivo celular puede tener diferentes finalidades, como por ejemplo caracterizar la función de una proteína de interés, conocer su localización subcelular (utilizando una proteína marcada), facilitar el estudio de la regulación de la expresión de un gen y obtener proteínas recombinantes correctamente procesadas por células de mamífero.

Cuando se necesitan proteínas con una modificación postraducciona específica de mamíferos, un entorno mamífero es la mejor opción para expresarlas. El uso de cultivos de líneas celulares de mamífero, como por ejemplo la línea celular CHO, constituye uno de los

sistemas más empleados para la producción de anticuerpos monoclonales y otras proteínas recombinantes. Existen muchas otras líneas celulares utilizadas hoy en día como por ejemplo los mielomas de ratón (NSO), de riñón de hámster (BHK), de simio (Vero) y de humano (HEK).

Si bien los cultivos celulares parecen ser la única opción viable para proteínas complejas en las que la estructura y posterior modificación son críticas, los mismos presentan un rendimiento bajo comparado con los procariontes y las levaduras. Además, el cultivo y mantenimiento de cultivos celulares de este tipo es costoso, ya que se requieren condiciones más restrictivas en cuanto al ambiente y sistema de cultivo, y eventualmente el uso de aditivos a los medios de cultivo empleados que encarecen el proceso.

Para que un vector plasmídico pueda ser expresado en células de mamífero, es necesario que ese vector tenga algunas particularidades (Figura 14). Además de las características necesarias para el armado del vector en una bacteria, como un origen de replicación (que sirve para mantener y amplificar el ADN), un gen de resistencia para antibiótico (que nos permite seleccionar las bacterias que contienen el plásmido) y un MCS, necesitamos un promotor, una señal de poliadenilación y un gen de resistencia que funcionen en células de mamífero.

¿Qué debe tener un vector para su uso en cultivos de células animales?

- ✓ **Promotor:** pRSV: expresión elevada y constitutiva
- ✓ **Señal de Poliadenilación:** SV40pA
- ✓ **Gen de Resistencia:** a un antibiótico para la selección de células de mamífero que han incorporado el plásmido. Ejemplos: neomicina o higromicina.
- ✓ **Gen Reportero:** GFP (green fluorescent protein) que permiten la generación de proteínas de fusión para detectar las células transfectadas in vivo.

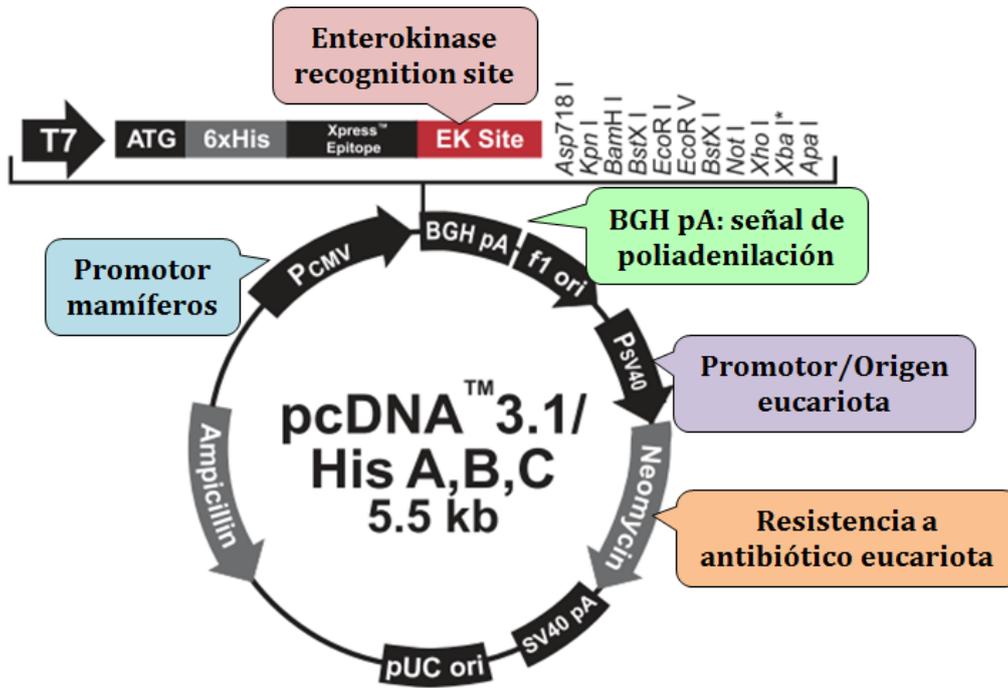


Figura 14: Vector para expresión en Células Animales. Imagen tomada y adaptada a partir de la página de *Thermo Fisher Scientific*: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V38520>

V. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Ejercicio 1

El vector pGEM-T Easy es muy utilizado para el clonado directo de productos de PCR. La principal ventaja de este vector es la presencia de una timina sobresaliente en sus extremos 3' (Figura 15).

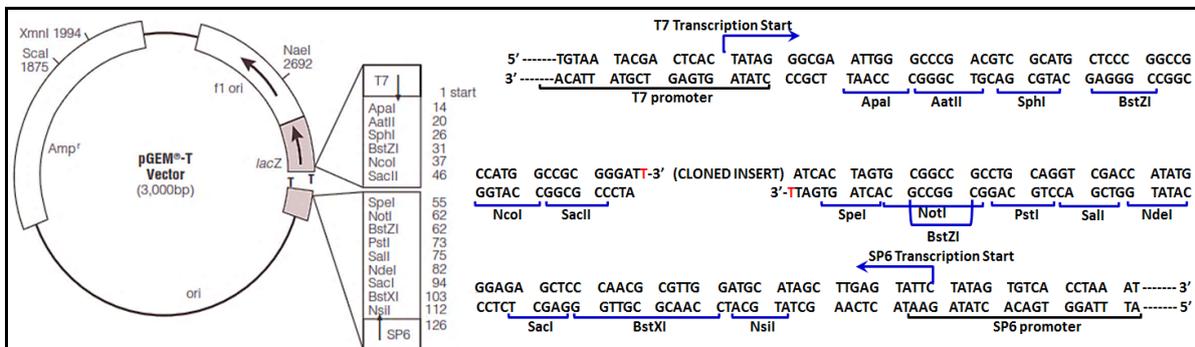


Figura 15: Mapa del vector pGEM-T Easy: Imagen tomada de PROMEGA Corporation <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>

- i) Durante la fabricación del vector ¿qué tipo de enzima usted considera que se utilizó para generar las Timinas 3' protruyentes?
- ii) ¿Qué tipo de enzima y qué actividad enzimática es la responsable de la adición de Adeninas (A) 3' terminales al producto de PCR?
- iii) El producto de PCR clonado en el vector p-GEM-easy es de 1642 pb y se muestra en la calle 1 de la Figura 16. El mismo fue purificado y mezclado con p-GEM-T Easy en presencia de ligasa T4 para llevar a cabo la reacción de clonado. Esta ligación se utilizó para transformar células quimiocompetentes de la cepa Top 10 de *Escherichia coli*, por el método del shock térmico. Para seleccionar las transformantes se realizó un cultivo en medio suplementado con IPTG, X-Gal y ampicilina:
 - a) Explique brevemente el fundamento de la aparición de colonias blancas.
 - b) Dado que también se obtuvieron colonias azules formule una hipótesis que explique su aparición.

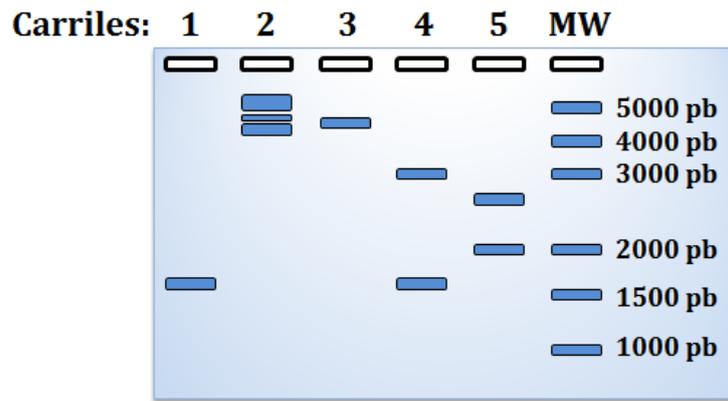


Figura 16: Gel de agarosa 1% donde se muestra en el **carril 1:** Fragmento amplificado; **carril 2:** Miniprep; **carril 3:** Digestión con Apa I; **carril 4:** Digestión con Not I; **carril 5:** Digestión con Sca I; **carril 6:** Marcador de peso molecular.

c) Posteriormente el ADN fue alicuotado y digerido con distintas enzimas de restricción en experimentos independientes:

Tubo 1

Apa I

Tubo 2

Not I

Tubo 3

Sca I

1. Indique las diferencias entre las digestiones del tubo 1 y 2 sembradas en las calles 3 y 4 del gel respectivamente.
2. ¿A qué corresponde la banda observada en la calle 3 y qué peso molecular aproximado tiene?
3. ¿A qué corresponde la banda de menor peso molecular de la calle 4 y qué peso aproximado tiene?
4. ¿Cuántos sitios de restricción para la enzima Sca I usted estima que presenta el fragmento clonado? Justifique su respuesta con un esquema.

d) Usted necesita realizar una ribosonda del fragmento clonado.

1. Explique brevemente qué enzima utilizaría.
2. ¿Qué enzima de restricción podría utilizar para que la ribosonda obtenida tenga una longitud de aproximadamente 1,6 kb?
3. Escriba las 50 primeras bases de la ribosonda obtenida a partir del extremo 3'.

Ejercicio 2

Usted desea generar un vector para obtener una proteína de fusión múltiple, que contenga los siguientes dominios:

- i. Dominio de unión a calmodulina (CaBD).
- ii. Proteína X (X).

i. Indique si podrá utilizar las mismas enzimas con las que clonó para extraer el inserto de interés.

ii. Indique una estrategia alternativa.

Usted cuenta con la siguiente lista de enzimas:

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| NheI: G/CTAGC | BamHI: G/GATCC |
| XhoI: C/TCGAG | KpnI: GGTAC/C |
| BclI: T/GATCA | BglII: A/GATCT |
| BmtI: GCTAG/C | SacI: GAGCT/C |
| Sall: G/TCGAG | |

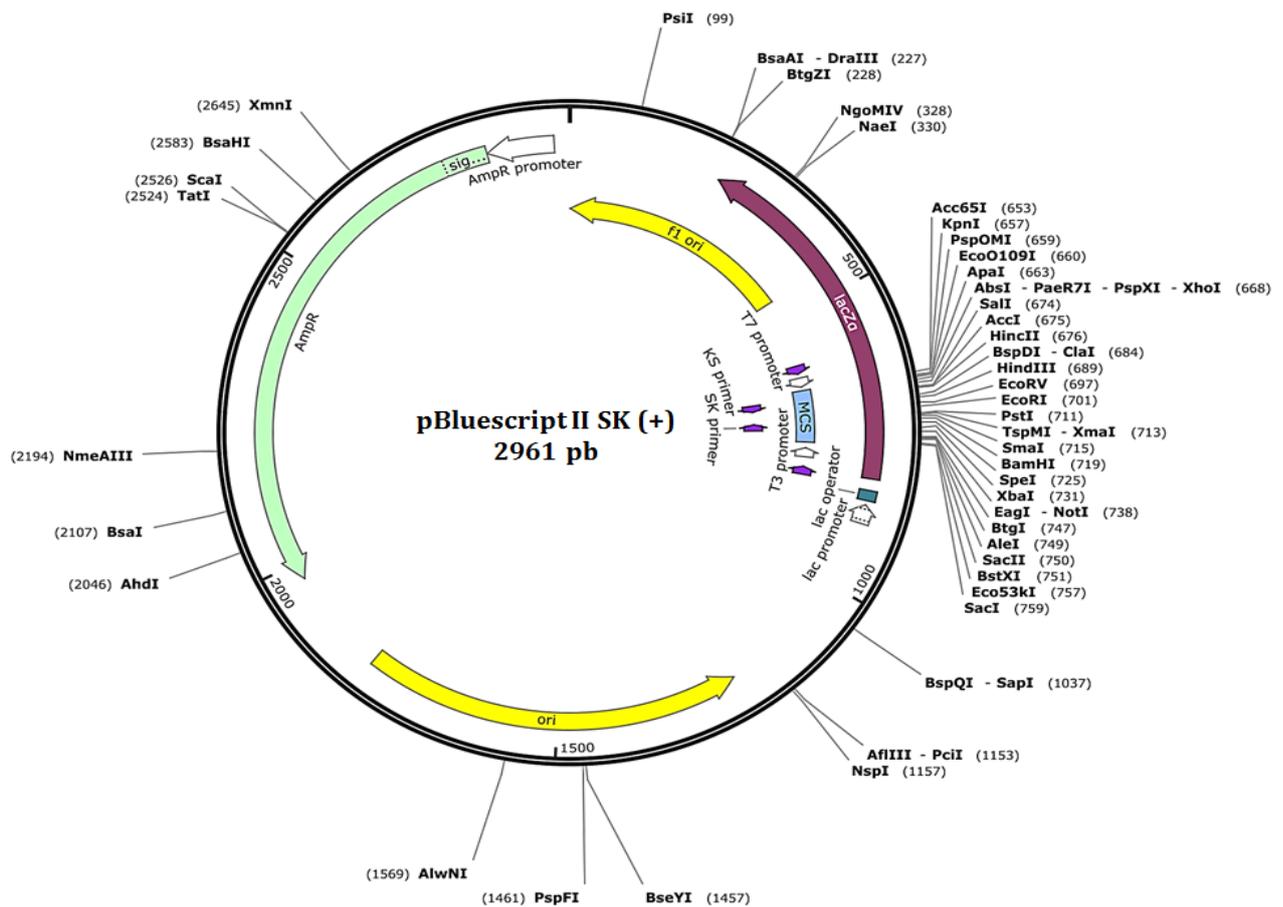


Figura 17: mapa del vector pBluescript II SK (+). Imagen tomada de la siguiente página web: [https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pBluescript_II_KS\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pBluescript_II_KS(%2B))

Ejercicio 4

Usted desea clonar un fragmento de 1200 bp que ha obtenido mediante digestión con la enzima BlnI en sus extremos. A continuación se muestran los sitios de restricción relevantes del inserto y el vector (Figura 18).

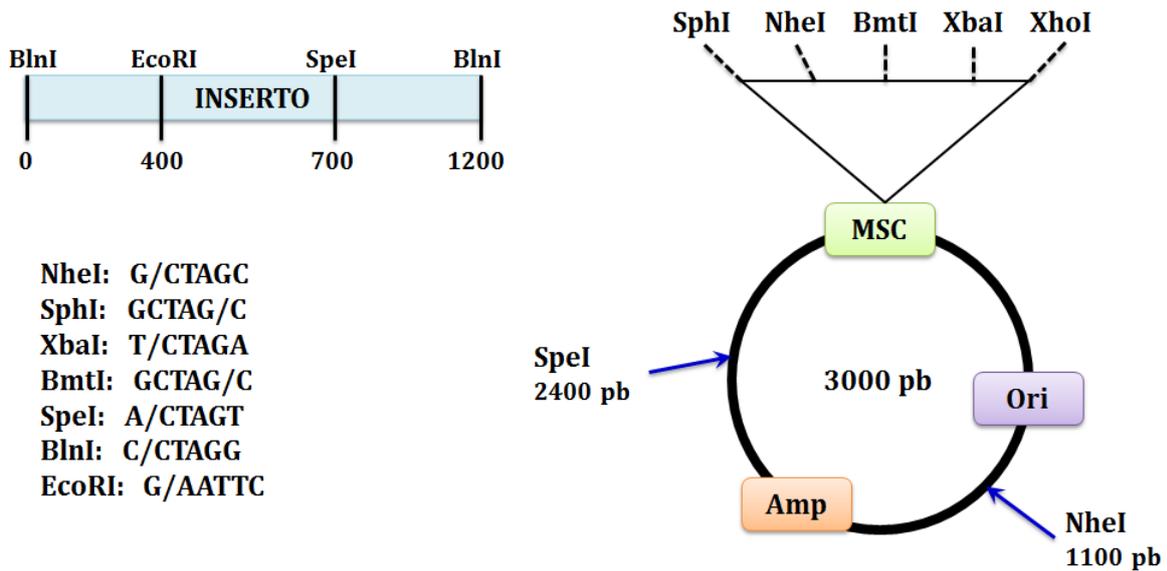


Figura 18: esquema del ejercicio 4

Responda:

- ¿Con qué enzima/s podría digerir el vector para llevar a cabo el clonado del inserto?
- ¿Para asegurar el clonado, será necesario desfosforilar el vector o el inserto? Justifique su respuesta.
- Con qué enzima/s distinguirá los clones recombinantes de los no recombinantes? Grafique los fragmentos de restricción que espera obtener de la digestión.

Ejercicio 5

Usted desea clonar el marco abierto de lectura (ORF) que se muestra en la figura 19 en el vector pSD56.2, para que se exprese como proteína de fusión a una cola de hexahistidina (6xHis). El vector pSD56.2 posee sólo un sitio de restricción XbaI para el clonado (Figura 19). Diseñe el primer Fw para amplificar el ORF y agregue un sitio de restricción adecuado. Tenga en cuenta la fase de lectura y que el ORF presenta un sitio XbaI interno. Para ello cuenta con las siguientes enzimas de restricción:

- **Xba I: T↓CTAGA**
- **Nde I: CA↓TATG**
- **Spe I: A↓CTAGT**
- **Cla I: AT↓CGAT**

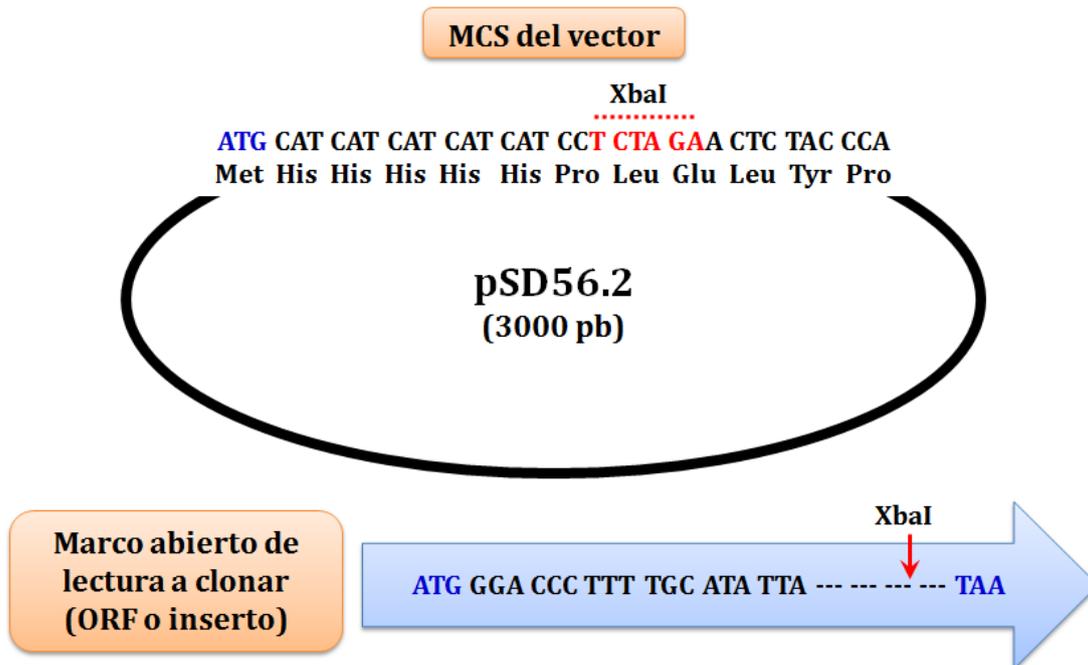


Figura 19: Esquema del vector pSD56.2, con su respectivo MCS, y del fragmento a clonar. Los codones de inicio y terminación de la transcripción aparecen resaltados en azul, mientras que los sitios XbaI en el vector y en el inserto, señalados con rojo.

Ejercicio 6

Usted ha clonado en el vector λ ZAP un fragmento de ADN que presenta un marco abierto de lectura correspondiente a una posible proteína, con alta homología a fosfodiesterasas (Figura 20). A partir de este fagémido se ha obtenido el plásmido correspondiente (pBluescript SKM13). Utilizando este *primer*, explique qué RNA polimerasa (T3 o T7) utilizaría para los siguientes fines:

- Realizar ensayos de transcripción y traducción *in vitro* del ORF correspondiente y evaluar su actividad biológica (fosfodiesterasa).
- Obtener una sonda de ARN para detectar el posible ARN que codifica para esta proteína mediante *Northern blot*.

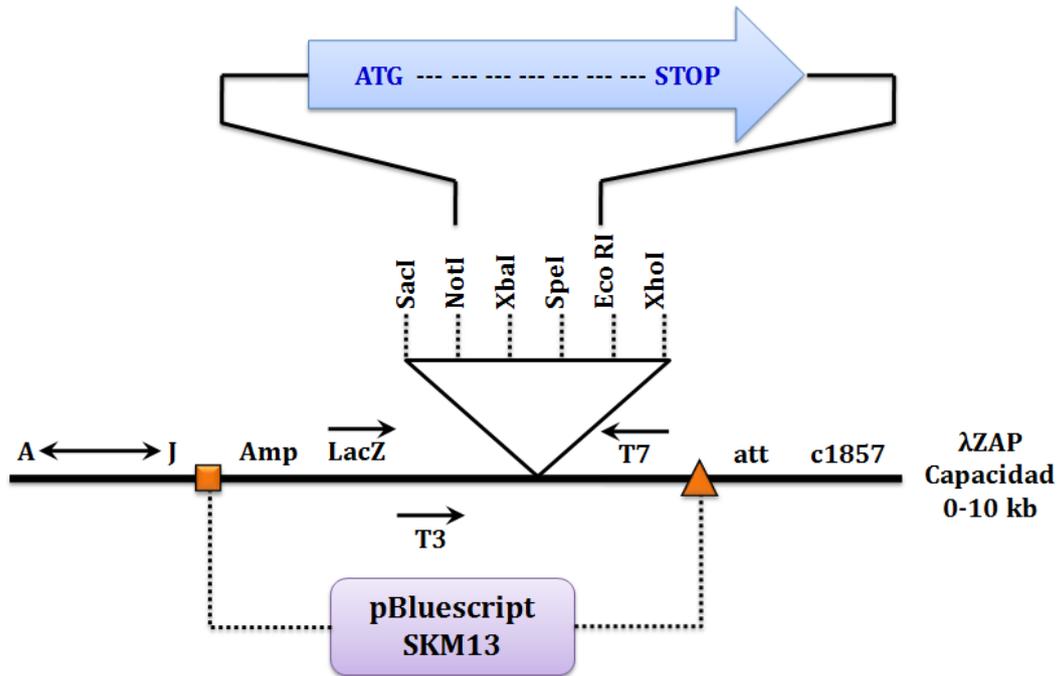


Figura 20: Esquema del fagémido λ ZAP y los sitios de corte que luego de la escisión *in vivo* y recircularización formarán el plásmido pBluescript SKM13.

Ejercicio 7

Usted cuenta con la secuencia completa de la proteína S21 de *Trypanosoma cruzi* en un vector de clonado T-A (pGEM-T-easy-3000 bp) (Figura 21). Dicho vector fue amplificado en la cepa de clonado Top 10 (Dam⁺/Dcm⁺).

Para determinar la orientación en la que ingresó el inserto usted cuenta con la siguiente lista de enzimas y *primers*:

BclI: T↓GATCA

MboI: ↓GATC

PspGI: ↓CCWGG

SexAI: A↓CCWGGT

XbaI: T↓CTAGA

HindIII: A↓AGCTT

EcoRI: G↓AATTC

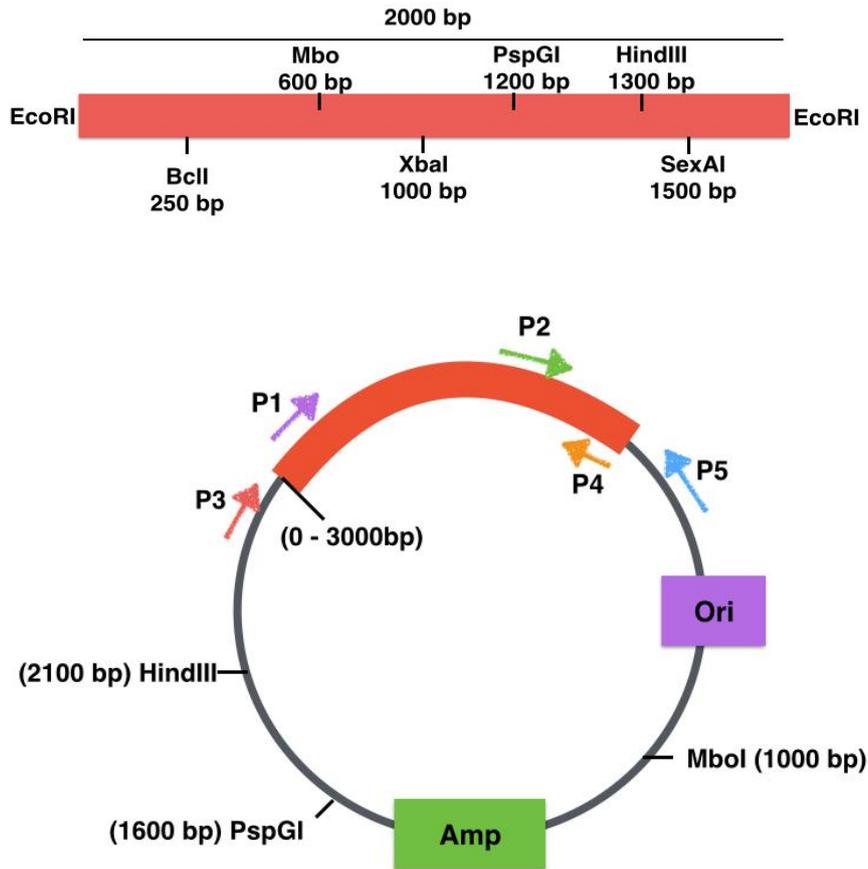


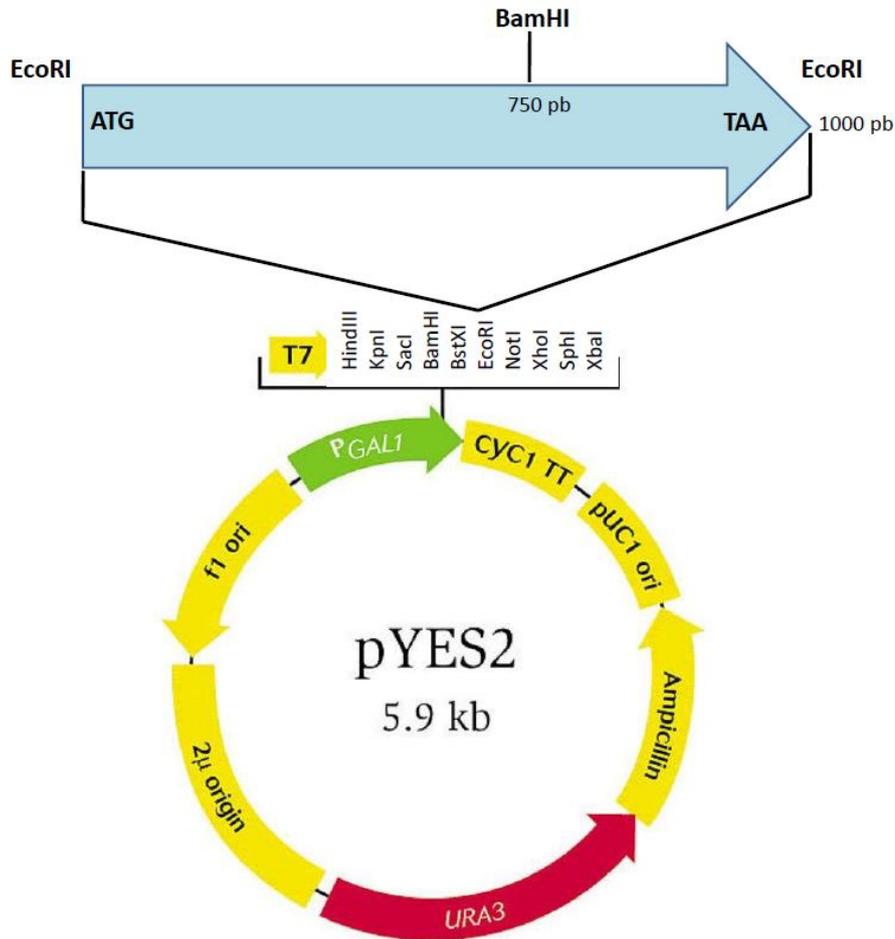
Figura 21: **A:** Esquema de la proteína S21 con sus correspondientes sitios de corte. **B:** Esquema del vector pGEM-T Easy con la proteína S21 clonada y los sitios donde pegan los diferentes *primers*.

Usted cuenta con cinco *primers*. El sitio donde pegan se encuentra graficado en la figura del vector.

- a)** Indique qué enzima/s utilizaría para determinar la orientación del inserto.
- b)** Indique qué par de *primers* utilizaría para determinar la orientación del fragmento clonado.

Ejercicio 8

Usted ha clonado el siguiente fragmento en un sitio EcoRI único del plásmido pYES para expresión en levaduras (Figura 22). Usted cuenta con las enzimas de restricción SacI, EcoRI, BamHI y XhoI. Cómo podría determinar ¿cuáles clones poseen el inserto de interés en la orientación correcta? Explique los resultados esperados en cada caso.



Esquema del plásmido pYES. Imagen tomada y adaptada a partir de la página de *Thermo Fisher Scientific*: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V82520>

Ejercicio 9

Usted cuenta con la secuencia de la enzima X en un vector de clonado y necesita transferirla a un vector de expresión para expresarla como una proteína de fusión a Histidina. Elige como vector de destino uno que fue previamente cortado y purificado por un compañero de laboratorio. Su compañero lo cortó con las enzimas NcoI y EcoRI ya que él lo necesitaba con esos extremos. El sitio de clonado múltiple de dicho vector de expresión (pET 28^a) se encuentra graficado en la Figura 22.

El problema es que su inserto contiene un sitio NcoI interno. Diseñe una estrategia que le permita amplificar la proteína X a partir del vector de clonado, de manera tal que los extremos del inserto presenten extremos compatibles con el vector.

Tenga en cuenta que la secuencia de la proteína deberá quedar en fase para que el *tag* de His se encuentre C-terminal.

Figura 22: Sitio de Clonado Múltiple pET 28 a

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAAATACGACTCAGCTATATAGGGGAATTGTGAGCGGATTAACAATTCCCCCTAGAGAATAATTTTGTAACTTTAAGGAAGGAGA

RBS

1

TATACC**NcoI**ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT ATG **NdeI** GCT AGC **NheI** ATG ACT GGT GGA CAG CAA
 Met GLY Ser Ser His His His His His Ser Ser Ser GLY Leu Val Pro Arg GLY Ser His Met Ala Ser Met Thr GLY GLY Gln Gln

BamHI GGA TCC **EcoRI** GAA TTC **SacI** GAG CTC **SalI** CGT CGA **HindIII** CAA GCT TGC GGC CGC **NotI** ACT CGA GCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CTG AGA TCC GGC TGC TAA CAAAGCCC
 Met GLY Arg Arg GLY Ser Gln Phe Gln Leu Arg Arg Arg Gln Ala Cys GLY Arg Thr Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Arg Ser GLY Cys ***

BspH I: T↓CATGA

BstNSI: RCATG↓Y

Nco I: C↓CATGG

Psc I: A↓CATGT

Hind III: A↓AGCTT

EcoR I: G↓AATTC

Pae I: GCATG↓C

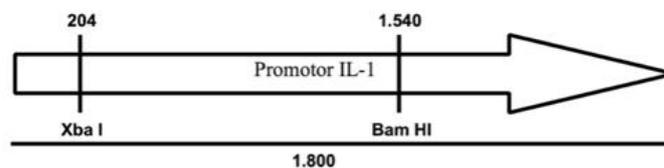
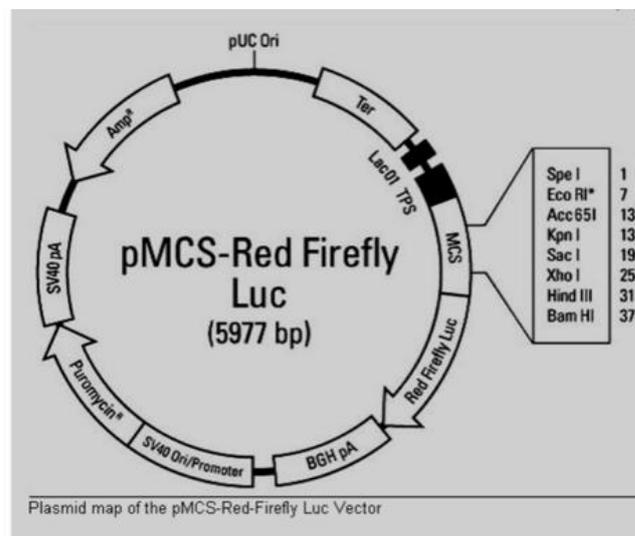
Primer Fw: 5' _____ ATG CTG CCC CTC TTT GAG C 3'

Primer Rv: 5' _____ CTC CTT GGC GGA GAG CTC G 3'

Nota: Tenga en cuenta que el codón que codifica histidina es CAC.

Ejercicio 10

Se desea estudiar la regulación de la transcripción de la citoquina IL1. Para ello se clonará su promotor, de 1800 pb río arriba del gen reportero Luciferasa, en el vector pMCS-Red FireflyLuc (ver esquema: Imagen tomada desde el sitio web: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16155>)



- Elija una enzima de restricción para el extremo 5' y uno para el extremo 3'.
- Teniendo en cuenta lo propuesto en a), diseñe un ensayo de restricción para confirmar el clonado. Para ello cuenta con todas las enzimas del MCS y XbaI.
- Esquematice el resultado esperado del paso b).

Ejercicio 11:

Se desea expresar la proteína X fusionada a una cola de hexahistidina y epitope myc, empleando el vector cuyo sitio de clonado múltiple (MCS) se muestra en el esquema de abajo. Para ello se diseñarán oligonucleótidos **Fw** y **Rv**, conteniendo sitios de restricción adecuados, para amplificar el ORF correspondiente.

□

```

      CAAT
      |
741 AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGAGC CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
      |
      TATA
      |
801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG GCTTATCGAA
      |
      T7 promoter/priming site
      |
861 ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGG CTA GCG TTT AAA CGG GCC CTC
      |
      Xho I   Not I           BstXI*   EcoRV   EcoRI           BstXI*
      |
917 TAG ACT CGA GCG GCC GCC ACT GTG CTG GAT ATC TGC AGA ATT CCA CCA CAC
    *** Thr Arg Ala Ala Thr Val Leu Asp Ile Cys Arg Ile Pro Pro His
      |
      BamHI           Asp718I Kpn I   Hind III           Apa I*   myc epitope
      |
968 TGG ACT AGT GGA TCC GAG CTC GGT ACC AAG CTT GGG CCC GAA CAA AAA CTC
    Trp Thr Ser Gly Ser Glu Leu Gly Thr Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu
      |
      Polyhistidine tag
      |
1019 ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT
    Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
      |
      Afl II           BGH Reverse priming site
      |
1070 TGA GTTTAAACGG TCTCCAGCTT AAGTTTAAAC CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTA
    ***
    
```

□

5'	ATG ---	ORF X		---	GAG TGT TTT CAA	TGA	3'
3'	TAC ---			---	CTC ACA AAA GTT ACT		5'
	M -	Proteína X		-	E C F Q	Stop	

□

- En la siguiente tabla, indique cuáles combinaciones de sitios de restricción son adecuadas (SI) y cuáles no los son (NO). **Cuidado:** tenga en cuenta que en dicho MCS existen dos sitios ApaI y dos sitios BstXL.

Combinación adecuada:SI/ NO	Sitio restricción primer <i>Fw</i>	Sitio restricción primer <i>Rev</i>
	NheI	EcoRI
	ApaI	BstXI
	BstXI	ApaI
	NotI	NheI
	BstXI	BamHI
	EcoRI	BstXI
	NotI	BstXI

b) Escriba el *primer Rv* que diseñaría si utilizase **Hind III** (AAGCTT) como sitio de clonado 3' del ORF. Tenga en cuenta que debe obtener una proteína con una fusión en su extremo C-terminal.