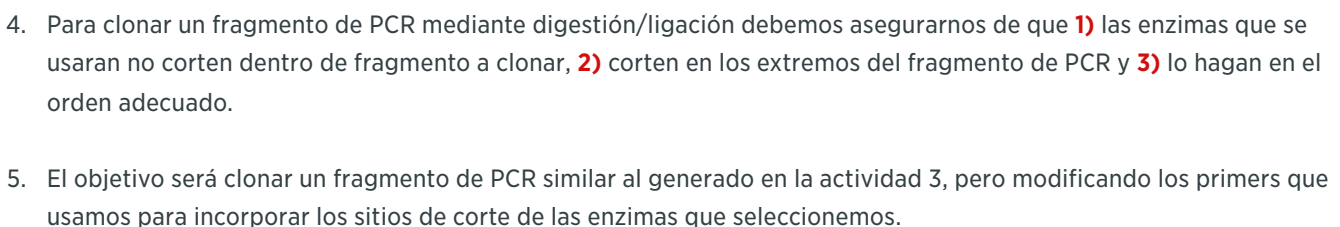


DOMINGO, 19/2/2023

1. Haz click derecho en la Actividad 4 y cópiala en tu carpeta. Este paso lo repetirás con todas las actividades.
2. Copia (click derecho y copiar) la carpeta Vectores de clonación a tu carpeta. Esta carpeta contiene 4 vectores. Sólo usaremos pBlueScript II SK (+) en esta actividad. En la actividad anterior hemos generado un fragmento de PCR en buena cantidad usando gDNA como molde. Pero al intentar clonarlo mediante digestión/ligación nos hemos dado cuenta de algo elemental : **iiiiiTendremos que añadir los puntos de corte de las enzimas adecuados a los primers. !!!!!**
3. Tenemos que inspeccionar el vector de clonación para ver que enzimas están disponibles. Abre el vector pBlueScript II SK (+) desde la carpeta que has copiado. Si seleccionas con el ratón el **MCS** (multicloning site) podrás ver las enzimas de restricción que están disponibles en ese vector.



6. Vamos a seleccionar las enzimas. Debemos elegir dos enzimas que no corten el fragmento de PCR para hacer la clonación. Para ello abre el **fragmento de PCR** generado en la actividad 3. Compara las enzimas presentes en el **MCS** del vector y búscalas en el **fragmento de PCR**. Puedes buscar las enzimas seleccionando el icono de **tijeras**. en la imagen de abajo veras 3 ejemplos que no cortan en el gen HI\_0004.

5

5. Instrucciones de las Activida...pQE-30

Actividad 4. Cloning del fragm...PCR HI\_004

pQE-30

SEQUENCE MAPLINEAR MAPDESCRIPTIONMETADATARELEVANT ITEMS

PCR HI\_004 (711 bp)

Eco81I

BsgI

AlwNI

BtsIMutI

TspRI

Eam1104I

Bsu36I

BspQI

CaiI

SapI

TscAI

LguI

BtsXI

BsrDI

BtsCI

EarI

BtsI

BseMI

BseGI

RseI

MslI

XhoII

TaiI

BstYI

HpyCH4IV

PvuI

HI\_0004 gene

HI\_0004 CDS (conserved hypothetical protein)

Enzyme PstI

CTGCAG

GACGTC

NEB

Use HF

Link: NEB

Inactivation: 80°C

Incubation: 37°C

Activity:

112.13.14/CS

757510050\*

Isos.: None

NEW DIGEST

SAVED DIGESTS

Enzyme lists

Manage enzyme lists

All enzymes

Cut sites visible on maps

Single cutters

Find enzyme

Clear selected

Pst

NameCutsSelectedColor

PstI0BamHIEcoRIPstI

Show enzymes that cut

anywhere in the sequence

Highlight enzymes with compatible sticky ends

BASES 711INSERT 96

ASSEMBLY WIZARD

SPLIT WORKSPACE

Si seleccionas una enzima veras su secuencia de corte que debemos copiar cuando elijamos la enzima a usar. En el caso de *PstI* la secuencia es **CTGCAG**

7. Para la clonación de este ejemplo usaré las enzimas *XmaI* y *BclI*. Las enzimas deben seleccionarse adecuadamente para conservar la orientación de fragmento de PCR en la clonación. Como estas enzimas no cortan nuestro fragmento podemos añadir la secuencia de corte a los primers que diseñamos en Actividad 2. Añadiré el punto de corte de *XmaI* al primer situado **a la izquierda** del gen que queremos clonar. Añadiré el punto de corte de *BclI* al primer situado **a la derecha** del gen que queremos clonar.

8. Elije tus enzimas y toma nota de los puntos de corte aquí, **sustituye los datos del ejemplo:**

| Enzimas elegidas |        |                |                       |                    |                 |
|------------------|--------|----------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
|                  | A      | B              | C                     | D                  | E               |
| 1                | Enzima | Punto de corte | Corta en el fragmento | Primer a modificar | Nuevo Primer    |
| 2                | XmaI   | CCCGGG         | No                    | HI_004_REV         | HI_004_XmaI_FWD |
| 3                | BclI   | ACTAGT         | No                    | HI_004_FWD         | HI_004_BclI_REV |

9. Para modificar los primers solo tenemos que añadir las secuencias de corte en su extremo 5'. Haz click en el primer localizado a la izquierda de la secuencia del fragmento de PCR y selecciona crear un **nuevo primer forward**.



12. Una vez los tengas **haz una simulación de PCR con los nuevos primers** y el fragmento generado tendrá los puntos de corte nuevos. Guarda el nuevo fragmento de PCR con un nombre descriptivo y escríbelo aquí sustituyendo el nombre de ejemplo

| Nombre del Fragmento |  |                       |
|----------------------|--|-----------------------|
|                      | A  | B                     |
| 1                    | Nombre del Fragmento de PCR con puntos de corte: | PCR_HI_0004_XmaI-BcuI |

13. El mismo efecto se conseguiría editando la secuencia del fragmento de PCR original, si añadimos manualmente los punto de corte en ambos extremos. Pero ese truco solo tiene gracia si ya sabes modificar primers.

14. El siguiente paso es cortar con las enzimas seleccionadas los elementos necesarios para la clonación:

- ☐ Vector pBlueScript II
- ☐ Fragmento de PCR con puntos de corte únicos en ambos extremos

Para ello, abre el vector haz click en el símbolo de la tijera. Busca las enzimas que usarás. Haz click sobre ellas y esto las añadirá a una lista. Para eliminar enzimas de la lista haz click sobre las que están en la lista. Una vez seleccionadas las enzimas correctas simula la digestión (**RUN DIGEST**).

14

L42023

Actividad 3. Simulación de una PC...

Actividad 4. Cloning del fragmento...

PCR\_HI\_004

PCR HI\_004 XmaI-BcuI

pBlueScript II SK (+)

SEQUENCE MAP

LINEAR MAP

PLASMID

DESCRIPTION

METADATA

RELEVANT ITEMS

Create

Analyze

Copy

Create PDF

Share

CspCI

BtgZI

Ppu2II

DraIII

BsaAI

ApeI

BsmFI

FaqI

Eco0109I

Bsp120I

PspOMI

XhoI

XbaI

SalI

AccI

NotI

EcoRV

EcoRI

HindIII

HincII

PaeR7I

SmaI

TspMI

Cfr9I

SpeI

BamHI

XbaI

EagI

BstZI

NotI

AleI

EcoICRI

Eco52I

BstZI

NotI

AleI

EcoICRI

Eco53KI

SacI

Ecl13va

SacII

Cfr42I

BstXI

PsII

AanI

PdiI

NaeI

NgmIV

ctaaattgtaagcgttaattttgtaaaattcgcgttaattttgtaaatcagctatttttaaccaataggccgaattcgcaaaatccctataaatacaaaagatagaccgagataggtgagttgtg

gatttaacatcgcgaattataaaacattttaagcgaatttaaaacatttagtcgagtaaaattgttatccgcttttagcgcttttaggaattattgtttcttatctgctctcccaactcacac

caaggcgatggccctacagtgaaccatcaccttaacagtttttgggtcaggtgcgttaagcactaaatcggaacctaaaggagcccccgttttagagcttgacgggaaagccggcaacgtggcgag

gtcccgctacacgggtgagtcactgttgatgggttagttcaaaaacccagctccacgactttcgtgattagccttgattccctcgttaaatctgaactgcccctttcgccgttgaccgctc

ccaccacaccccgccgcttaagtgcgcctacacggcgctccattcgcattcagctcgcaactgttggaaaggcgatcggtggccctcttcctctattagccagctggcgaaggggagtgctgca

gggtgtgtggcgcgcaattacggcggtgtccgcgcagggttaagcggtaagtcgacgcttgacaaccttcccgtagccagcccggaagcgataatcggtgacgcgtttccctctacacagct

ccaccacaccccgccgcttaagtgcgcctacacggcgctccattcgcattcagctcgcaactgttggaaaggcgatcggtggccctcttcctctattagccagctggcgaaggggagtgctgca

gggtgtgtggcgcgcaattacggcggtgtccgcgcagggttaagcggtaagtcgacgcttgacaaccttcccgtagccagcccggaagcgataatcggtgacgcgtttccctctacacagct

fi\_origin

lacZ\_a

T7\_promoter

pBlue...imer

MC5

pBlue...imer

T3\_promoter

M13\_re...imer

BASES 2961

INSERT 994

ASSEMBLY WIZARD

SPLIT WORKSPACE

NEW DIGEST

SAVED DIGESTS

Enzyme XmaI

NEB

Link: NEB

Use HF

Inactivation: 65°C

Incubation: 37°C

Activity:

Isos: SmaI, TspMI, Cfr9I

Jump to Cut Site:

714

Enzyme lists

Manage enzyme lists

All enzymes

Cut sites visible on maps

Single cutters

Find enzyme

XmaI

Name

Cuts

Selected

Color

Cfr9I

1

BcuI

SmaI

1

XmaI

TspMI

1

XmaI

Show enzymes that cut

anywhere in the sequence

Highlight enzymes with compatible sticky ends

RUN DIGEST

1

2

3

4

15. Una nueva ventana se abrirá con la simulación de la digestión. Selecciona el fragmento de mayor longitud que es nuestro vector cortado (1). Guarda la digestión con un nombre descriptivo (2) y ve la simulación del gel (3).

15

3

2

1

SEQUENCE MAP pBSII-XB VIRTUAL DIGEST LINEAR MAP PLASMID DESCRIPTION METADATA RELEVANT ITEMS

pBSII-XB Save NEB Use HF

| Enzymes | Cuts | Temp. | 11                            | 21 | 31  | 4/CS |
|---------|------|-------|-------------------------------|----|-----|------|
| BclI    | 1    | —     | Not available for this vendor |    |     |      |
| XmaI    | 1    | 37°C  | 25                            | 50 | <10 | 100  |

| Start | End | Length | Left Cutter | Left Overhang | Right Cutter | Right Overhang |
|-------|-----|--------|-------------|---------------|--------------|----------------|
| 714   | 725 | 12     | XmaI        | 5'            | BclI         | 5'             |
| 726   | 713 | 2949   | BclI        | 5'            | XmaI         | 5'             |

16. Debe aparecer una imagen que simula el aspecto de un gel de DNA. Descarga la imagen y súbela aquí, entre las líneas.

-----

Drag and drop a file from the sidebar to attach or

Upload a File

-----

17. Haz lo mismo con el fragmento de PCR. Incluye la Imagen entre las líneas

-----

Drag and drop a file from the sidebar to attach or

Upload a File


18. Una vez hechas las digestiones podemos ligar los fragmentos de interés. Para ello, vuelve a la ventana de la digestión del vector y del inserto de PCR. Haz click en crear **nuevo assembly**. Se abrirá una nueva ventana donde seleccionarás **digerir y ligar**.

18


The screenshot shows a software interface with a table of PCR products. The table has columns for 'Name', 'Size', 'Temp', 'Primer', 'Left Primer', 'Right Primer', 'Left Overhang', and 'Right Overhang'. The first row is highlighted in orange. Below the table, there is a sidebar with a blue button labeled 'Create New Assembly' and a blue button with a question mark. Below these buttons are two tabs: 'ASSEMBLY WIZARD' and 'SPLIT WORKSPACE'. A red circle highlights the 'Create New Assembly' button, and a red line points from it to the 'ASSEMBLY WIZARD' tab.

| Name | Size | Temp | Primer | Left Primer | Right Primer | Left Overhang | Right Overhang |
|------|------|------|--------|-------------|--------------|---------------|----------------|
| 1    | 1    | 55°C | 50     | 50          | 50           | 50            | 50             |

ASSEMBLY WIZARD SPLIT WORKSPACE

 Digest and Ligate

## Pick Assembly Strategy



☒ **Digest and Ligate**  
 Simple restriction-enzyme based cloning.


☐ **Gibson**  
 Homology-based, scarless, single-tube reaction assembly - see [Gibson 2009](#).

☐ **Golden Gate**  
 Quasi-scarless, single-tube reaction assembly - see [Engler 2008](#). Tool co-developed with [New England Biolabs](#).


Start

Cancel

19. En la base de la pantalla aparecen las opciones del assembly (ensamblaje) que queremos hacer. Necesitaremos un **Backbone** (se refiere a la columna vertebral que soporta la clonación, es decir, el vector de clonación) y un **Insert** (inserto o fragmento a clonar). Estas opciones permanecen abiertas aunque cambiemos de ventana de trabajo. Eso nos permite seleccionar los fragmentos a ligar.

 image.png

PREVIEW



Shift select two enzymes on the sequence map or run a digest and select a fragment.

Set from Selection

Backbone

Insert

+

Hide Preview

BASES 2961

START 726

END 713

LENGTH 2949

GC 50.32%

MELTING TEMP 80.3 °C

ASSEMBLY WIZARD

SPLIT WORKSPACE

20. Haz click en **Backbone** y después selecciona el **fragmento mayor del vector digerido** con las enzimas que seleccionaste. A continuación pica en **SET FROM SELECTION**.

20

SEQUENCE MAP **pBS-KB** × VIRTUAL DIGEST LINEAR MAP PLASMID DESCRIPTION METADATA RELEVANT ITEMS

pBS-KB Save

NEB Use HF

| Enzymes | Cuts | Temp. | 11                            | 21 | 31  | 4/CS |
|---------|------|-------|-------------------------------|----|-----|------|
| BclI    | 1    | —     | Not available for this vendor |    |     |      |
| XmaI    | 1    | 37°C  | 25                            | 50 | <10 | 100  |

| Start | End | Length | Left Cutter | Left Overhang | Right Cutter | Right Overhang |
|-------|-----|--------|-------------|---------------|--------------|----------------|
| 714   | 725 | 12     | XmaI        | 5'            | BclI         | 5'             |
| 726   | 713 | 2949   | BclI        | 5'            | XmaI         | 5'             |

PREVIEW

Shift select two enzymes on the sequence map or run a digest and select a fragment.

Backbone Insert

BASES 2961 START 726 END 713 LENGTH 2949 GC 50.32% MELTING TEMP 80.3 °C

ASSEMBLY WIZARD SPLIT WORKSPACE

21. Haz lo mismo con el fragmento del Inserto. Ve a la ventana de tu fragmento de PCR digerido, pica en **Insert**, después en el **fragmento digerido** y finalmente en **SET FROM SELECTION**. Al completar los pasos 20 y 21 veremos toda la información sobre los fragmentos que se van a ligar y si hay errores. Haz click en la marca de **check box**, pon nombre a tu clonación (**pBS-ID del gen que clonas**) y pica en **ASSEMBLE**. Selecciona tu carpeta de trabajo para guardar el clon recién hecho haciendo click en **SELECT**.

21

PREVIEW

agc CCGGtg taA tttt  
\*CGGGC Cac atTGATC

0 ERRORS AND 0 WARNINGS  
✓ Looks like everything checks out

Reverse Orientation  
Jump to Selection  
View Enzyme Activity

pBlueScript II SK (+)  
2.9 kb · BclI, XmaI

PCR HL\_004 XmaI-BclI  
717 bp · XmaI, BclI

BASES 723 START 2 END 718 LENGTH 717 GC 41.42% MELTING TEMP 76.0 °C

ASSEMBLY WIZARD SPLIT WORKSPACE

22. Puedes inspeccionar la clonación abriendo el archivo, ve a la ventana **PLASMID**, genera un PDF del mapa e insértalo como adjunto entre las líneas.

-----



Drag and drop a file from the sidebar to attach or

Upload a File

---

**Has completado la actividad 4.** Como habrás visto la complejidad de las actividades va creciendo a medida que avanzamos el trabajo. Paso a paso has conseguido familiarizarte con la plataforma y aumentar la complejidad del trabajo y diseños que puedes hacer. **Enhorabuena.**

**Si has visto errores en las actividades o piensas que algo no queda claro, toma nota y compártelo con el profesor.**