

Construcción de un vector de expresión para producir interferón alfa 2 (IFN α 2b)

Introducción. IFN α 2b es una proteína utilizada como medicamento, pertenece a la familia de los interferones, los cuales son proteínas producidas naturalmente por el cuerpo en respuesta a infecciones virales, bacterianas y otros estímulos.

El objetivo de este ejercicio es construir un vector para expresar IFN α 2b en la levadura *Pichia pastoris* y controlar su secreción con el sistema de pPICZ α -B.

Para la construcción desarrolla los siguientes pasos:

I) [10 puntos]. Identifica la secuencia de nucleótidos del gen IFN α 2b dentro del vector pBS-II-KS-IFN α 2b ya que no se sabe la localización, para ello se tiene un fragmento del N-Terminal y un fragmento del C-Terminal de su secuencia de aminoácidos.

MCDLPQTHSLGSRRTLMLLA-----IMRSFSLSTNLQESLRSKE*

Una vez identificado el gen IFN α 2b márcalo dentro del vector pBS-II-KS-IFN α 2b para saber su localización y traducir su secuencia completa.

Entregar una captura de la secuencia de IFN α 2b dentro del vector pBS-II-KS-IFN α 2b.

Entregar una captura de la secuencia traducida.

II) [30 puntos]. Una vez identificado el gen IFN α 2b, toma su secuencia e insértalo dentro del vector pPICZ α -B para generar el vector pPICZ α -B-IFN α 2b. Para este paso considera lo siguiente, debes usar únicamente los siguientes sitios de restricción: PstI o EcoRI para el extremo 5' del gen, y NotI o XbaI para el extremo 3' del gen. Analiza muy bien y detenidamente el gen para decidir qué par de sitios vas a utilizar.

Entregar una captura de la secuencia de IFN α 2b dentro del vector pPICZ α -B para ver las uniones.

Entregar una captura de la traducción del ORF completo, es decir, tomando desde el factor alfa hasta el codón de paro ubicado justo después de las 6 histidinas.

III) [15 puntos]. Identifica la secuencia Kozak dentro del vector resultante (pPICZ α -B-IFN α 2b), debes saber que todas las versiones de los vectores pPICZ (A, B, C, α -A, α -B y α -C) usados en *Pichia pastoris* tienen esta secuencia porque es crucial para un inicio eficiente de la traducción.

Si logras identificarla: 1) ¿qué secuencia es?; 2) ¿en qué posición se encuentra?; 3) debes citar al menos un artículo científico que sustente el uso de esa secuencia, si no sustentas la secuencia Kozak con una publicación mejor no responder y pasar a la siguiente pregunta.

IV) [10 puntos]. Hacer un gel virtual y entregar una captura tomando como referencia el siguiente ejemplo.

