

Diseño *in silico* de primers, vectores de clonación y de expresión.

Actividades en clase

Ejercicio 3 (trabajo individual o en equipo)

A partir de la secuencia problema:

- 1) Identificar los posibles marcos de lectura (ORFs).
- 2) Identificar el ORF principal dentro de la secuencia problema (720 pb).
- 3) ¿Qué proteína codifica la secuencia? Usa la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos para buscar dentro de la base de datos del NCBI.

Ejercicio 4 (trabajo individual o en equipo)

Se pretende expresar y purificar una proteína recombinante en una cepa de *E. coli*, para ello se debe evaluar la eficiencia del sistema usando el gen reportero EGFP dentro del vector **pTWIN1 (7375 pb)**.

Se ha propuesto la siguiente estrategia: fusión del C-Ter de EGFP con el N-Ter de la Intein2 (ver el mapa del vector).

1) Diseñar un par de primers (Forward y Reverse) con los sitios de restricción NdeI y SapI, respectivamente, para sacar a EGFP (743 - 1462) del vector **pcDNA3 (6159 pb)**.

- A) Encontrar la secuencia de la EGFP dentro del vector **pcDNA3**.
- B) Validar la integridad del ORF.
- C) Antes de diseñar los primers revisar los sitios de corte dentro del gen.

2) Validar la compatibilidad de los primers en la plataforma IDT.

3) Proponer el mejor par de primers para la amplificación y clonación del gen.

4) Obtener la secuencia hipotética que resultaría después de una PCR.

5) Clonar la secuencia dentro del vector **pTWIN1** y validar la fusión con Intein2.

6) Validar la construcción con enzimas de restricción y geles virtuales.

Ejercicio 5: actividad en casa (trabajo individual o en equipo)

Construcción de 2 vectores de expresión para la producción intracelular y extracelular de la enzima alfa amilasa en la levadura *Pichia pastoris*.

El gen de la alfa amilasa es de la bacteria *Bacillus licheniformis* y se encuentra en el siguiente sitio: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/A17930.1>

Para la producción intracelular se usará el vector **pPicZ-B (3.3 kb)** y para la producción extracelular se usará **pPICZ α -A (3.6 kb)**. Tú elige los sitios de sitios de restricción que mejor consideres.

Comprueba las construcciones con enzimas de restricción y realiza geles virtuales.

Construye un esquema que desglose la estrategia de construcción de los vectores.

Mandar la tarea en formato PDF al siguiente correo: jezuniga@correo.xoc.uam.mx.