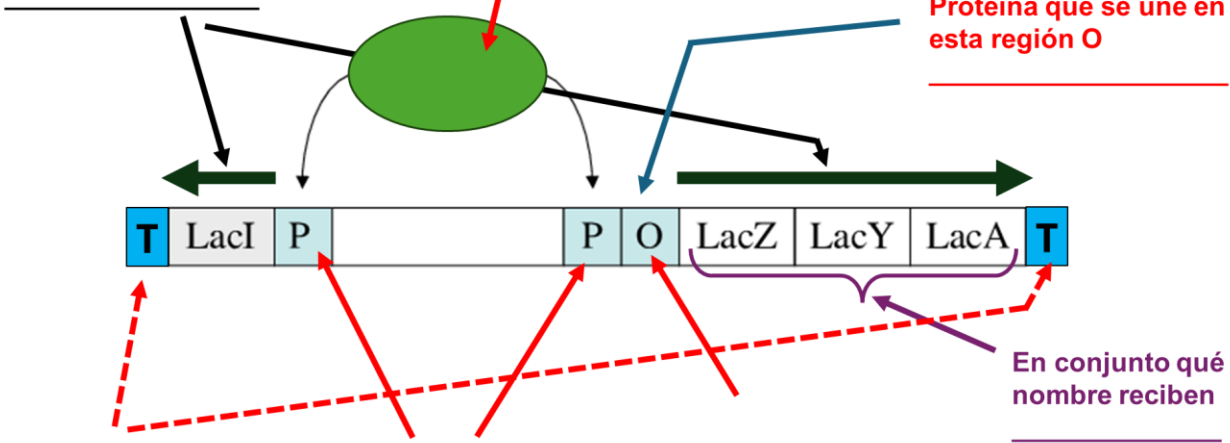




A qué proceso hace referencia

Qué enzima es: \_\_\_\_\_

Proteína que se une en esta región O



A qué hace referencia la letra T

A qué hace referencia la letra P

A qué hace referencia la letra O

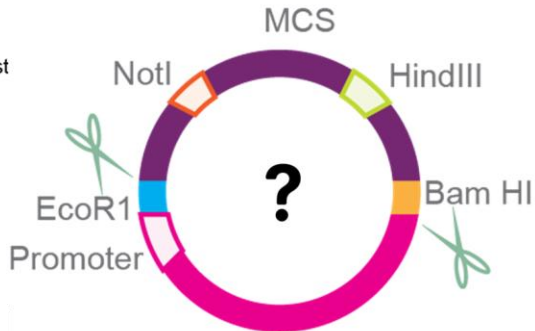
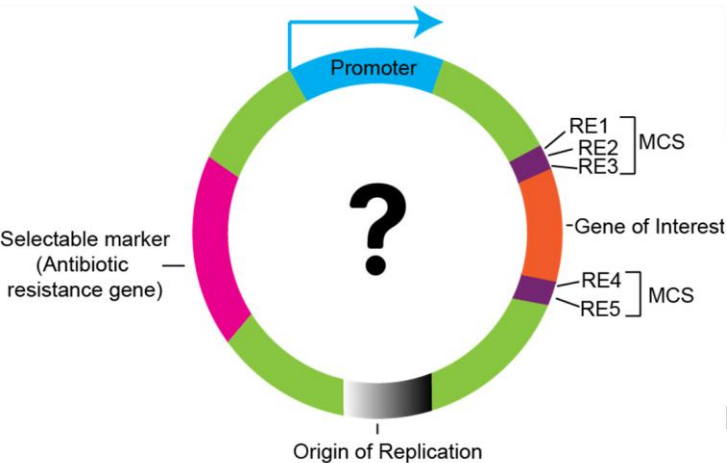
En conjunto qué nombre reciben

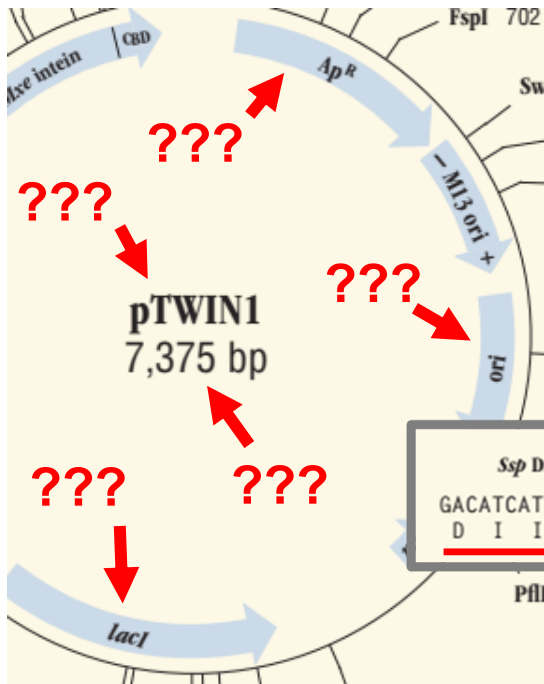
¿Qué estructuras son?

¿Qué función tiene cada región?

¿Qué regiones tienen?

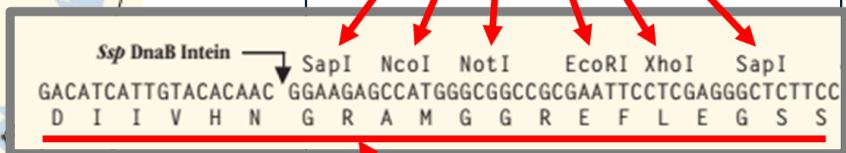
¿Qué aplicaciones tienen?





Qué es un marco abierto de lectura

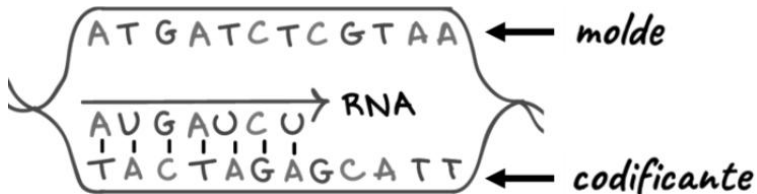
A qué hacen referencia estos nombres



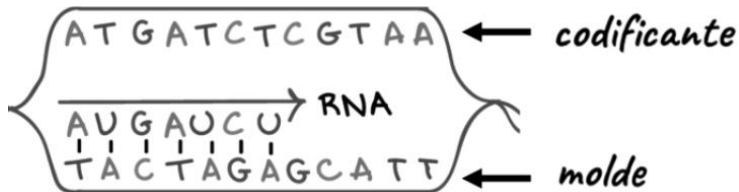
A qué hacen referencia estas letras

Observa las secuencias y el proceso que está ocurriendo  
De las siguientes figuras cuál es **correcta**.

A)



B)







Diseño de Primers

Diseño y construcción de  
Vectores de Expresión

# PCR Primer Design



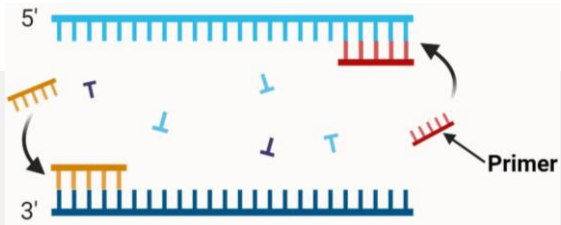
Forward primer	5' <b>GCTAAATGTT</b> CAGGCTGT <b>GG</b> 3'
Reverse primer	5' <b>GG</b> AATCAAAC <b>CG</b> AATGAC <b>CG</b> 3'

- ✓ Length: ~20 nucleotides
- ✓ GC content: ~50%
- ✓ GC clamp: primers end in at least two G or C nucleotides
- ✓ No complementary regions between primer pairs
- ✓ Melting temperature ( $T_m$ ): ~55-65°C

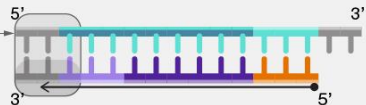


- Formación de homodímeros
- Formación de heterodímeros

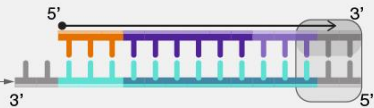
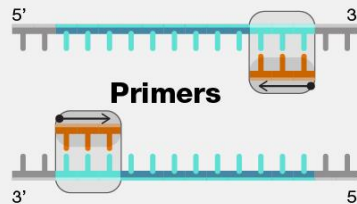




DNA replication occurs



Primers bind DNA



DNA segment of interest

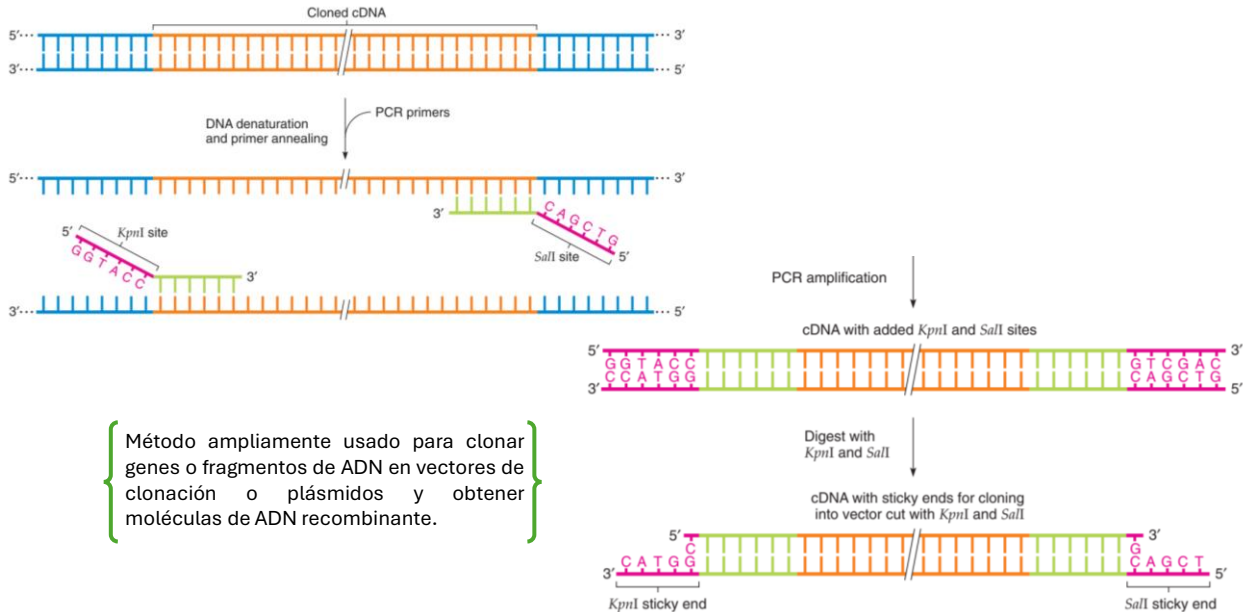


DNA polymerase



Primers

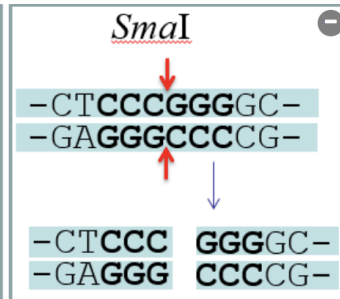
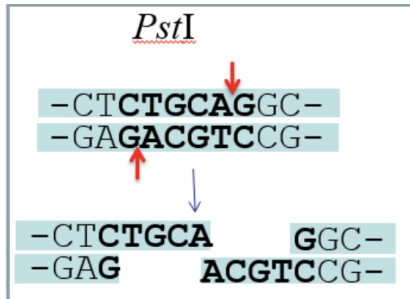
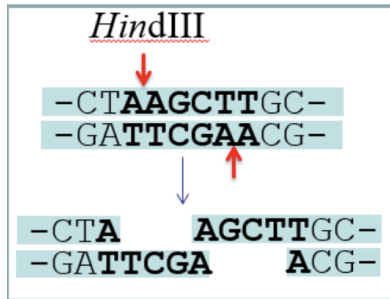
## Adición de sitios de corte a los productos de PCR



## Extremos generados por enzimas de restricción

5'

3'





HindIII  
digest



5' protruding ends



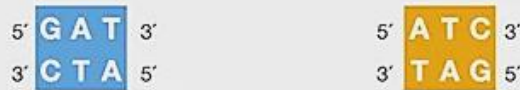
PstI  
digest



3' protruding ends



EcoRV  
digest



Blunt ends

### Actividad 1 en clase.

**Diseñar un par de oligos (F y R) para amplificar el ORF a partir de la siguiente secuencia.**

- 1) Identifica el ORF de mayor longitud.
- 2) Insertar un sitio **NdeI** en el extremo 5' del oligo
- 3) Insertar un sitio **HindIII** en el extremo 3' del oligo
- 4) Después validar la T<sub>m</sub> y el contenido de GC en el sitio T<sub>m</sub> Calculator para evaluar su compatibilidad.



Stop  
TAA  
TAG  
TGA



## Actividad 1 en clase.

Diseñar un par de primers (F y R) para amplificar el ORF en la siguiente secuencia.

1) Identifica el ORF.

2) Insertar un sitio **NdeI** en el extremo 5' del oligo

3) Inserta un sitio **HindIII** en el extremo 3' del oligo

4) Después validar la T<sub>m</sub> y el contenido de GC en el sitio T<sub>m</sub> Calculator para evaluar su compatibilidad.



Stop  
**TAA**  
**TAG**  
**TGA**

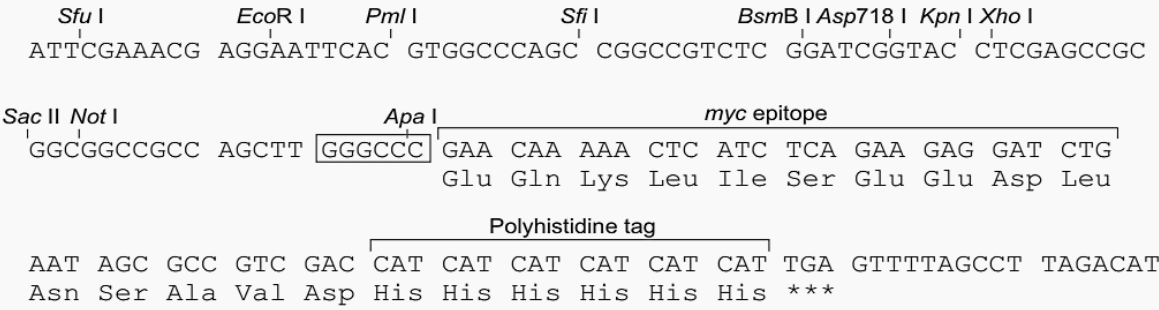
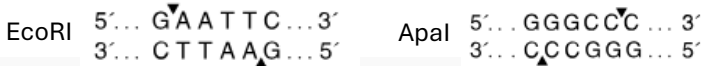


Actividad 2 en clase.

Diseñar un par de primers (F y R) para fusionar el ORF a myc epitope/His Tag.

Debes eliminar el codón de Stop.

Insertar el sitio de corte para EcoRI en el 5', y para ApaI en el 3'.

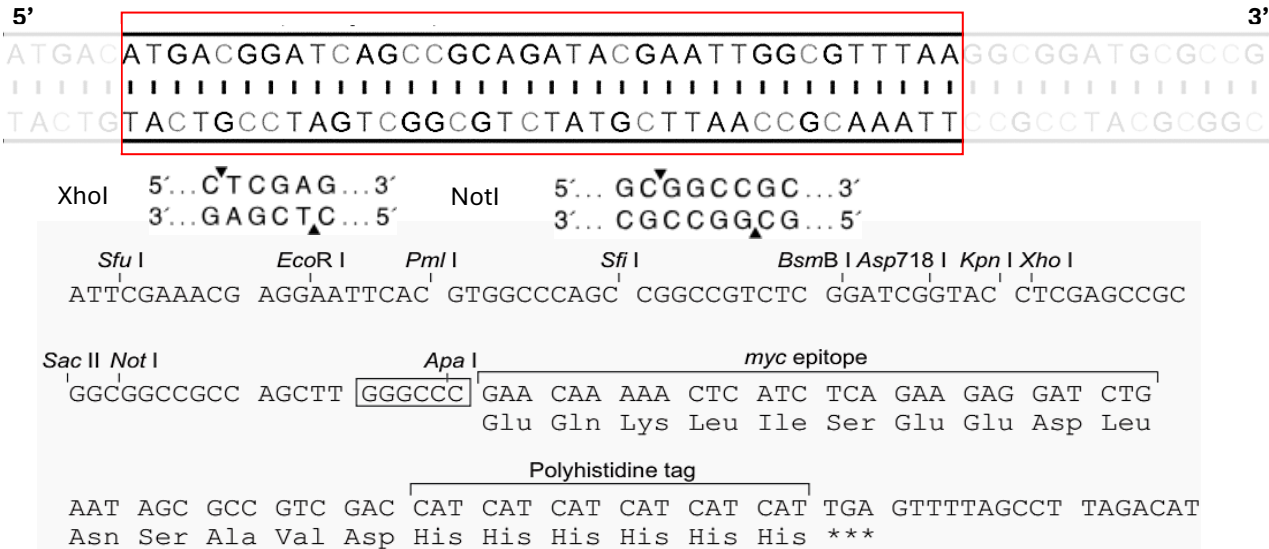


### Actividad 3 en clase.

Diseñar un par de primers (F y R) para fusionar el ORF a myc epitope/His Tag.

Debes eliminar el codón de Stop.

Insertar el sitio de corte para **XhoI** en el 5', y para **NotI** en el 3'.





## Actividad 4 en clase.

- 1) Diseñar un par de oligos (F y R) para fusionar un péptido señal en el N-Ter y una etiqueta FLAG en el C-Ter del ORF.
- 2) Elegir un par de sitios de restricción para insertar en los oligos.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Protein Expression and Purification 46 (2006) 189–195

Protein  
Expression  
& Purification

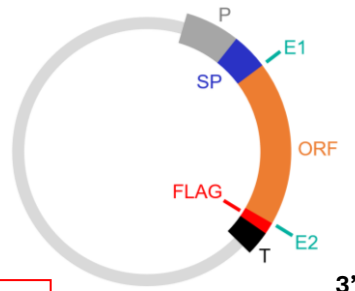
[www.elsevier.com/locate/yprep](http://www.elsevier.com/locate/yprep)

Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*

Trang Thi Phuong Phan, Hoang Duc Nguyen, Wolfgang Schumann \*

*Institute of Genetics, University of Bayreuth, D-95440 Bayreuth, Germany*

GCGGATAACAATTcccaattaaaggaggaaggatca  
 lacO RBS  
 atgattcaaaaacgaaagcggacagtttcgttcagacttgtgcttatg  
 M I Q K R K R T V S F R L V L M  
 tgcacgctgtttatgttcagtttgccgattacaaaaacatcagccg  
 C T L L F V S L P I T K T S A  
 taggatcctctagagtcgacgtccccggggcagcc  
 BamHI XbaI AatII SmaI

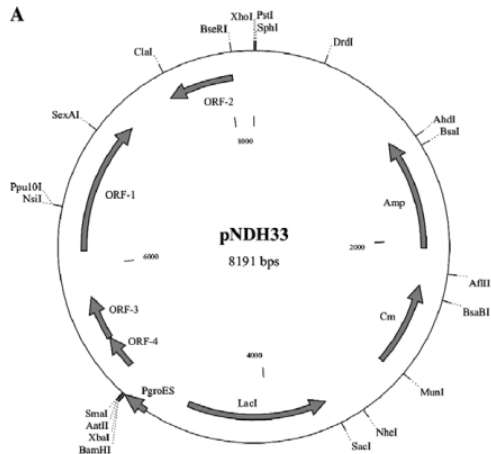


3'

5'

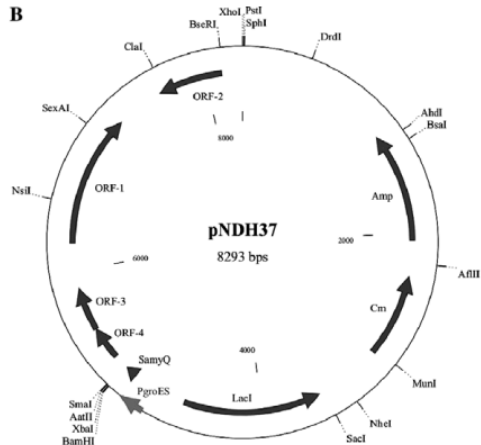
ATGACGGATCAGCCGCAGATACGAATTGGCGTTTAA  
 TACTGCCTAGTCGGCGTCTATGCTTAACCGCAAATT

A



**gaaaagaatgatgtaagcgtgaaaaatttttatcttatcac**  
**TTGAAAttggaagggagattcttTATTATAagaattgt**  
 -35 -10  
**ggAATTGTGAGCGGATAACAATTcccaatt**  
 lacO  
**aaaggaggaaggatcctctagagtcgacgtccccggggcagcc**  
 RBS BamHI XbaI AatII SmaI

B



**GCGGATAACAATTcccaattaaaggaggaaggatca**  
 lacO RBS  
**atgattcaaaaacgaaagcggacagtttcggttcagacttggtgcttatg**  
 M I Q K R K R T V S F R L V L M  
**tgcacgctgttatttgcagtttgccgattacaaaaacatcagccg**  
 C T L L F V S L P I T K T S A  
**taggatcctctagagtcgacgtccccggggcagcc**  
 BamHI XbaI AatII SmaI

**GCGGATAACAATT**cccaatt**aaaggagg**aaggatca**ATG ATT CAA AAA**  
**lacO** **RBS** **M I Q K**

CGA AAG CGG ACA GTT TCG TTC AGA CTT GTG CTT ATG TGC  
**R K R T V S F R L V L M C**

### SIGNAL SEQUENCE

ACG CTG TTA TTT GTC AGT TTG CCG ATT ACA AAA ACA TCA  
**T L L F V S L P I T K T S**

GCC gta**ggatcctctag**gtc**gacgtcccccggg**gcagcc**GAC TAC AAA**  
**A** BamHI XbaI AatII SmaI **D Y K**

**GAC GAT GAC GAC AAG TAA**  
**D D D D K \*\*\***

### FLAG

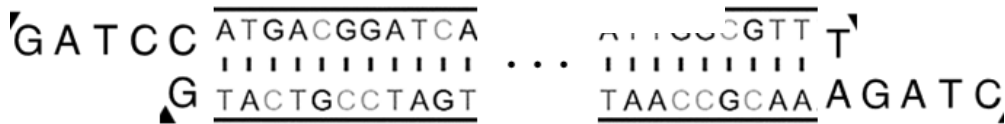
BamHI 5'... G <sup>▼</sup> GATCC...3' 3'... CCTAGG <sup>▲</sup> ...5'	AatII 5'... GACGT <sup>▼</sup> C...3' 3'... C <sup>▲</sup> TGCAG...5'
XbaI 5'... T <sup>▼</sup> CTAGA...3' 3'... AGATC <sup>▲</sup> T...5'	SmaI 5'... CCC <sup>▼</sup> GGG...3' 3'... GGG <sup>▲</sup> CCC...5'

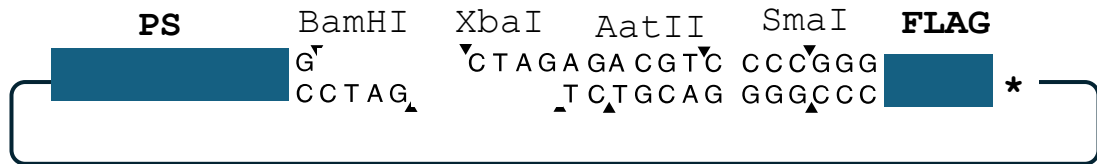
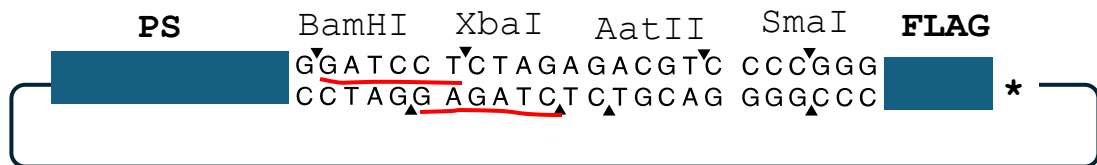
BamHI

XbaI

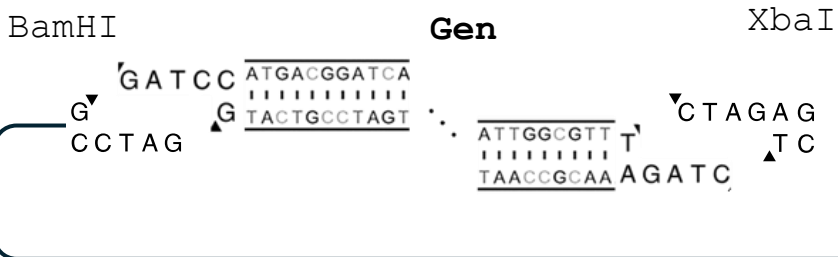
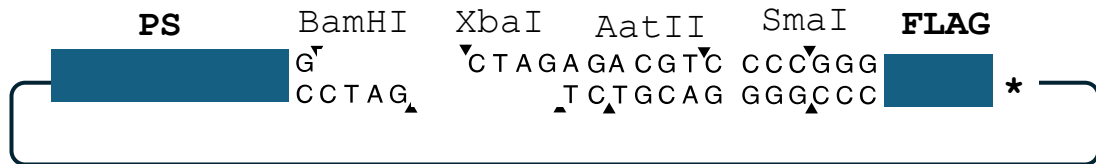


Digestión





'GATCC ATGACGGATCA ... ATTGGCGTT T'  
 G TACTGCCTAGT TAACCGCAA AGATC



BamHI

Gen

XbaI



GCC gtagggtatcctctagagtcgacgtcccccggggcagccGAC TAC AAA  
 A BamHI XbaI AatII SmaI D Y K

GAC GAT GAC GAC AAG TAA  
 D D D D K \*\*\*

FLAG

GCGGATAACAATTcccaattaaaggaggaaggatcaATG ATT CAA AAA

lacO

RBS

M I Q K

CGA AAG CGG ACA GTT TCG TTC AGA CTT GTG CTT ATG TGC

R K R T V S F R L V L M C

**SIGNAL SEQUENCE**

ACG CTG TTA TTT GTC AGT TTG CCG ATT ACA AAA ACA TCA

T L L F V S L P I T K T S

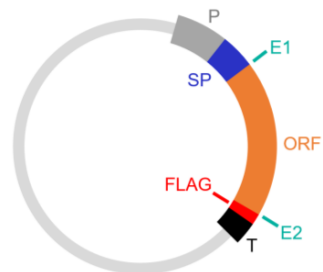
GCC gtagggatecctctagagtcgacgtecccggggcagccGAC TAC AAA

A BamHI XbaI AatII SmaI D Y K

GAC GAT GAC GAC AAG TAA

D D D D K \*\*\*

**FLAG**



BamHI	AatII
5'... GGATCC...3'	5'... GACGTC...3'
3'... CCTAGG...5'	3'... CTGCAG...5'
XbaI	SmaI
5'... TCTAGA...3'	5'... CCCGGG...3'
3'... AGATCT...5'	3'... GGGCCC...5'

5'

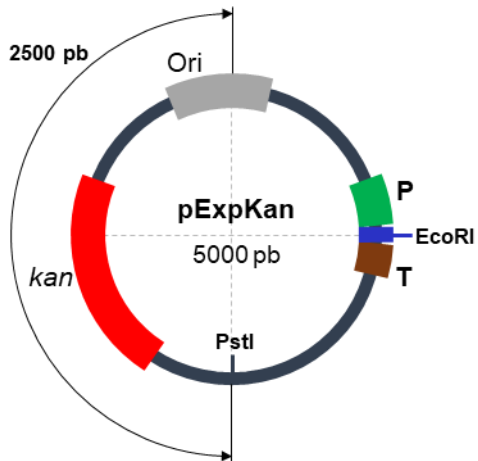
3'

ATGACATGACGGATCAGCCGCAGATACGAATTGGCGTTTAAATGCGGATGCGCCG  
 TACTGTACTGCCTAGTCGGCGTCTATGCTTAACCGCAAATTCCGCCTACGCGGC

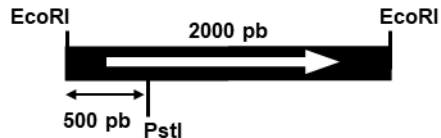


## Actividad

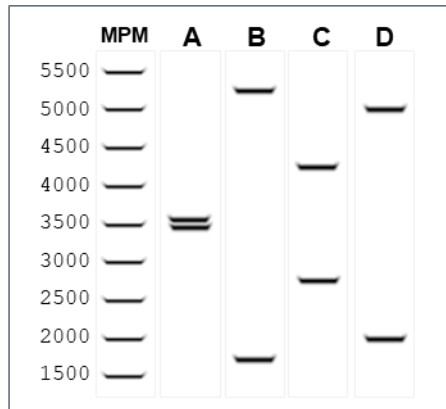
### Vector de expresión



### Gen de interés



### Gel de agarosa





## Programa



## **ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program**

*M. Wayne Davis and Erik M. Jorgensen\**

*Howard Hughes Medical Institute and School of Biological Sciences, University of Utah, Salt Lake City, UT, United States*

## Vectores

**pTW\_6His**

**pTW\_SP\_X\_6His**

## **pTW\_6His**

Promotor T7: 3188 - 3205

Operador: 3207 – 3231

RBS: 3246 - 3253

6His: ???

Terminador T7: 3389 - 3436

bla: 3601 - 4461

lacI: 922 - 2004

## Ejercicio 5: actividad en clase

Identifica a qué proteína codifica la secuencia del archivo problema1.txt

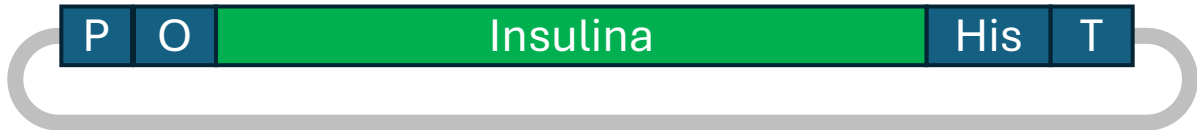
Construcción de un vector para expresar \_\_\_\_\_?\_\_\_\_\_ en *E. coli* BL21 (DE3).

El diseño del sistema es el siguiente (el gen debe tener una etiqueta de His en su extremo C-Terminal), se usará el vector pTW\_6His.

Puedes usar alguno de los siguientes sitios de restricción: NcoI, NotI, EcoRI y XhoI.

Validar el ORF de la secuencia.

Realiza un análisis de restricción para los vectores con y sin inserto.



## **pTW\_SP\_X\_6His**

Promotor T7: 3188 - 3205

Operador: 3207 – 3231

RBS: 3246 – 3253

PS: 3261 - 3353

6His: ???

Terminador T7: 3492 - 3539

bla: 3704 - 4564

lacI: 922 - 2004

## Ejercicio 6: actividad en clase

Construcción de un vector para expresar \_\_\_\_\_?\_\_\_\_\_ en *E. coli* BL21 (DE3).

El diseño del sistema es el siguiente (el gen debe tener una etiqueta de His en su extremo C-Terminal), se usará el vector pTW\_SP\_X\_6His.

Puedes usar alguno de los siguientes sitios de restricción: NcoI, NotI, EcoRI y XhoI.

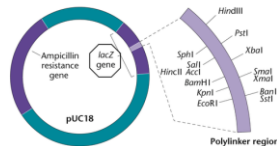
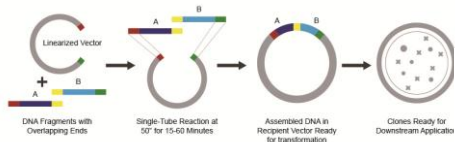
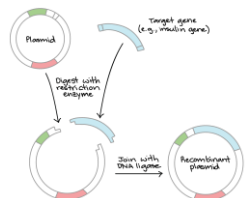
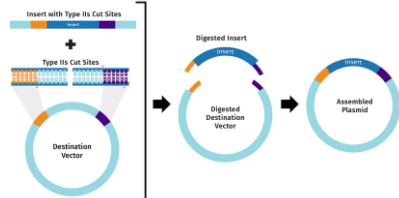
Validar el ORF de la secuencia.

Realiza un análisis de restricción para los vectores con y sin inserto.









The diagram illustrates the Gibson Assembly Protocol in four steps:

- Linear Vector & DNA inserts with overlapping ends:** Shows a linear DNA vector (grey) and two DNA inserts (Insert 1 in pink and Insert 2 in blue) with overlapping ends.
- Gibson assembly:** The linear vector and DNA inserts are joined together to form a circular plasmid.
- Transformed vector:** The assembled circular plasmid is shown.
- Bacterial transformation:** The transformed vector is introduced into a bacterial cell, shown as a petri dish with colonies.

