

Análisis de secuencia y construcción de un vector de expresión para su uso en *Pichia pastoris*

Examen 2 en equipo (al entregar el documento final agregar su nombre completo y su porcentaje de contribución en este examen, entre todos debe sumar 100%).

1. [Total 10 puntos] Usando la secuencia del archivo llamado recombinate.txt responde lo siguiente.

[5] **A)** Encuentra el ORF de mayor longitud. ¿Cuántos nucleótidos tiene el ORF?

[5] **B)** Traduce la secuencia. ¿Cuántos aminoácidos tiene la secuencia traducida?

2. [Total 20 puntos] Hacer un BLAST en el NCBI usando la secuencia de aminoácidos y responde lo siguiente.

[5] **A)** ¿A qué organismo pertenece la proteína?

[5] **B)** ¿Qué nombre tiene la proteína?

[10] **C)** Describe qué aplicaciones tiene esta proteína en el campo de la industria biotecnológica y farmacéutica. Agrega al menos una referencia científica donde se mencionen las aplicaciones.

Nota: Son tres versiones del vector pPICZα (A, B y C), puedes elegir cualquiera de los tres.

3. [Total 20 puntos] Diseñar un par de *primers* (*Forward* y *Reverse*) con los sitios de restricción que usarás para insertar el ORF en el vector. Valida la *Tm* de tus *primers* con el programa *Tm Calculator* (*ThermoFisher*). La *Tm* en la columna *Annealing Temperature* °C se debe encontrar entre los 50 °C y 70 °C. Toma una captura de pantalla de este resultado.

4. [Total 30 puntos] Inserta el ORF dentro del vector que elegiste usando los sitios de restricción que tienen tus *primers*. Con el fin de validar la integridad de tu fusión captura una imagen del ORF completo traducido como se muestra en la siguiente imagen.



5. [Total 20 puntos] Una vez construido y validado tu vector realiza lo siguiente.

[15] **A)** Crea un mapa circular usando Benchling resaltando las regiones y sitios de restricción más relevantes.

[3] **B)** ¿Qué compuesto se usa para inducir la expresión del gen de interés en este sistema?

[2] **C)** ¿A qué antibiótico da resistencia el vector pPICZα que usaste?

6. [Total 20 puntos] Identifica la secuencia Kozak dentro del vector que construiste, debes saber que todas las versiones de vectores pPICZα (-A, -B y -C) usados en *Pichia pastoris* tienen esta secuencia porque es crucial para un inicio eficiente de la traducción.

Si logras identificar la secuencia Kozak contesta lo siguiente:

[5] **A)** ¿Qué secuencia es?

[5] **B)** ¿Entre qué posiciones se encuentra dentro del vector que construiste?

[10] **C)** Debes citar al menos un artículo científico que sustente el uso de esa secuencia que encontraste, si no sustentas la secuencia Kozak con una publicación no será tomada en cuenta toda la pregunta.

7. [Total 10 puntos] Imagen o captura de un gel virtual usando el par de enzimas que insertaste en tus *primers*.

Debes entregar lo siguiente:

1) Documento PDF con todas las respuestas, imágenes o capturas, referencias que demuestren y sustenten tus resultados.

2) Construcción del vector final creado en ApE (formato .ape).

3) URL del mapa circular construido en Benchling.

Mandar la información al siguiente correo: jezuniga@correo.xoc.uam.mx

En asunto escribir lo siguiente: **Examen 2 – equipo X**