

Vectores de clonado

Son herramientas con las cuales podemos introducir ADN en las células: Derivados de plásmidos o Derivados de fagos

Plásmidos: Moléculas de ADN por lo general circular y de cadena doble que tienen **replicación autónoma** (pueden o no usar proteínas del huésped para replicarse). Se encuentran naturalmente en muchas bacterias.

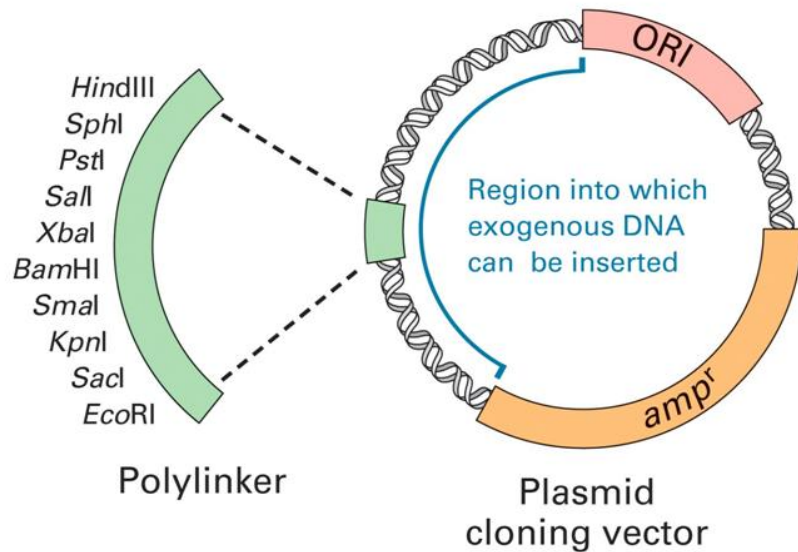
- Confieren algún fenotipo** (Resistencia a antibióticos, producción de antibióticos o enterotoxinas, producción de tumores en plantas: Ti, Ri)

- Plásmidos crípticos**: no confieren un fenotipo conocido

- Conjugativos**: promueven la conjugación (a través de los genes *tra*), y son de alto PM y bajo N° de copias (1-3). Ej. plásmido F de *E. coli*

- No conjugativos**: bajo PM y alto N° de copias

PLASMIDOS



Molecular Cell Biology, 4th Ed. Lodish, H. et al.

“Host range” (rango de huésped): huéspedes en los cuales se replican : **Restringido** o acotado (a bacterias entéricas *E. coli*, *Salmonella*) (Restricted host range).

Amplio (promiscuos), se pueden replicar en la mayoría de las bacterias (Gram negativas o Gram positivas, Broad host range)

Replicador (pMB1, ColE1) es el segmento de ADN que contiene el sitio donde empieza la replicación: **Ori** y los genes codificados por el plásmido para la replicación (algunos RNAs y proteínas)

Marcador: R a antibióticos. Confiere a la célula receptora un fenotipo particular

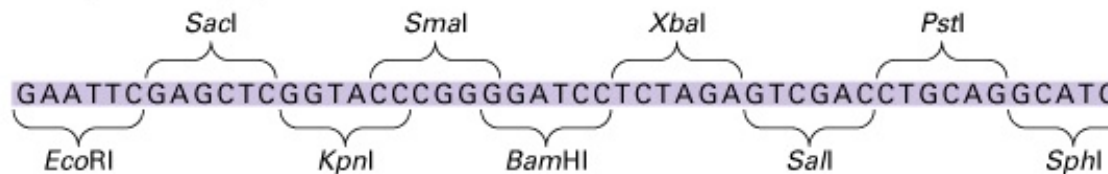
Sitio de múltiple clonado (poliligador o polilinker) insertar el ADN exógeno (por lo general fragmentos < a 5 Kb)

Vector de expresión: Promotor: controla la expresión de los genes corriente abajo.

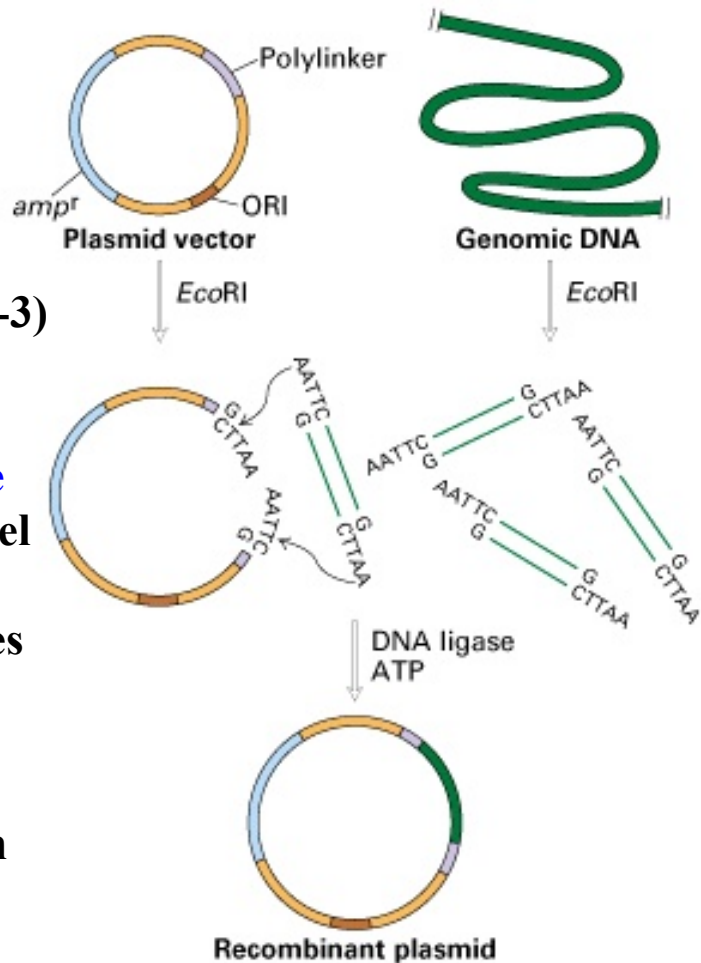
Se pueden introducir en células vivas por un proceso llamado **transformación**

Los poliligadores (Polilinkers) facilitan la inserción de los fragmentos de restricción en los plásmidos.

(a) Sequence of polylinker



(b) Insertion of *EcoRI* restriction fragments



Nº de copias del plásmido: alto (mayor de 20;~500) o bajo (1-3)

Control de la replicación depende del replicón que tenga:

Replicón pMB1 : control de la replicación por **mecanismo de RNA antisense y la proteína Rop** (gen *rop*) que permite que el primer RNAII que inicia la síntesis se aparea con el RNAI antisense en forma estable. Plásmidos pUC tienen mutaciones (en RNAII y *rop*) que afectan este mecanismo de control.

Replicón pSC101: la proteína **rep A** controla la replicación.

Control relajado: tienen alto Nº de copias y replican con proteínas del huésped que son de larga vida, independientemente de la replicación del genoma.

Control estricto: tienen bajo Nº de copias y dependen de la proteína Rep que necesita síntesis continua.

Segregación: genes *par* aseguran que pasen copias a cada célula hija en la división celular (región deletada en muchos plásmidos por eso es esencial mantener la presión selectiva de manera de seleccionar sólo las células con plásmidos)

Incompatibilidad: son incompatibles cuando tienen el mismo mecanismo de control de la replicación. Si tienen el mismo RNA antisentido, compiten en la replicación y no existe un mecanismo que asegure que cada plásmido se replique una vez y segregue a cada célula hija (Solo pueden coexistir dos plásmidos con el mismo *ori* si tienen distinta resistencia a antibiótico y se mantiene la presión selectiva)

TABLE 1-2 Control Elements That Regulate Replication

INCOMPATIBILITY GROUPS	NEGATIVE CONTROL ELEMENT	COMMENT
colEI, pMB1	RNAI	controls processing of pre-RNAI into primer
IncFII, pT181	RNA	controls synthesis of RepA protein
P1, F, R6K, pSC101, p15A	iterons	sequesters RepA protein

Iterones son secuencias que se encuentran en el plásmido y secuestran la proteína repA

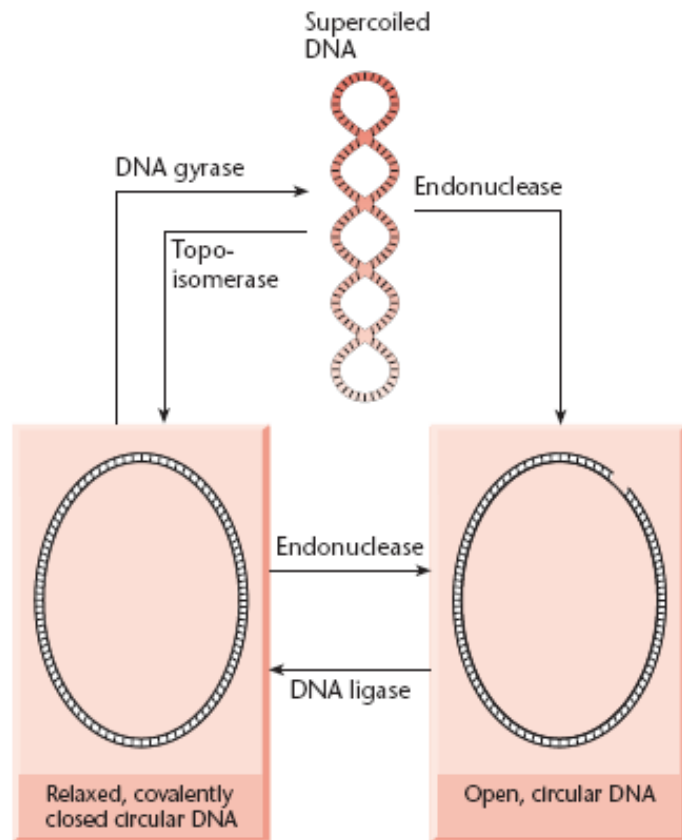
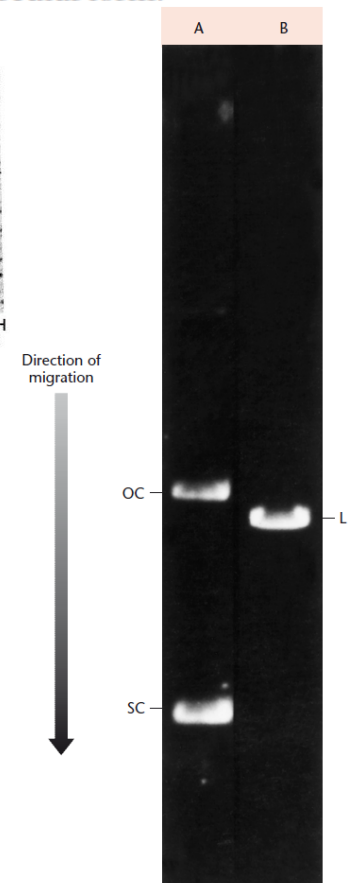
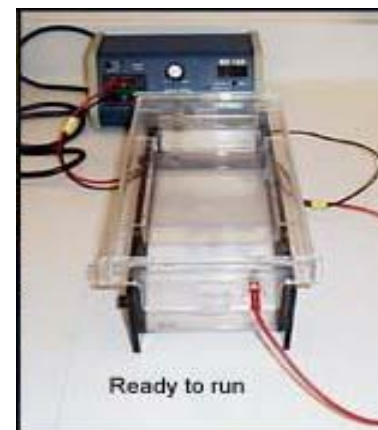
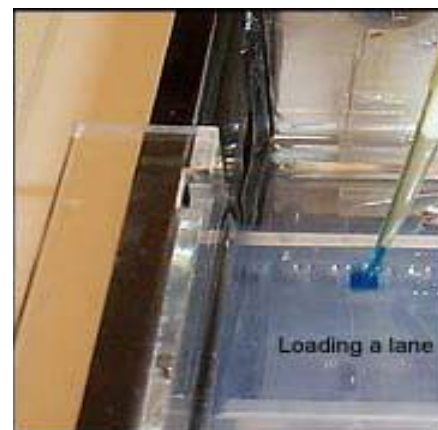
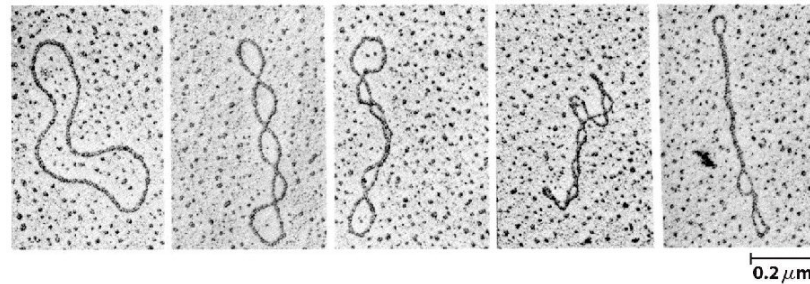


Fig. 4.2 Electrophoresis of DNA in agarose gels. The direction of migration is indicated by the arrow. DNA bands have been visualized by soaking the gel in a solution of ethidium bromide (which complexes with DNA by intercalating between stacked base pairs) and photographing the orange fluorescence which results upon ultraviolet irradiation. (A) Open circular (OC) and supercoiled (SC) forms of a plasmid of 6.4 kb pairs. Note that the compact supercoils migrate considerably faster than open circles (B). Linear plasmid (L) DNA is produced by treatment of the preparation shown in lane (A) with *Eco*RI, for which there is a single target site. Under the conditions of electrophoresis employed here, the linear form migrates just ahead of the open circular form.

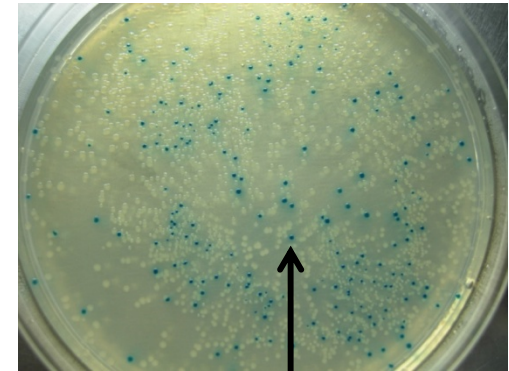
TOPOISÓMEROS DE PLÁSMIDOS



Producir proteínas en alta cantidad...(por ej. Insulina, etc)

Como lo hacemos ? ? ? Clonando *el gen correspondiente en un vector de manera que la proteína se exprese.....* El vector debe tener *un promotor que dirija la síntesis de esa proteína en un huésped, por ej. bacterias:* debemos obtener colonias de bacterias con el plásmido recombinante por transformación

Muchos vectores para expresar proteínas tienen el Promotor Lac



Vector (plásmido) + gen (inserto de ADN en el poliligador), luego transformamos bacterias con ese *vector recombinante: colonias blancas*

Vector vacío (sin inserto de ADN), luego transformamos bacterias: colonias azules

Para entender esto veamos ¿de donde viene este promotor?

OPERON LAC: contiene los genes que codifican las enzimas necesarias para el metabolismo de la lactosa

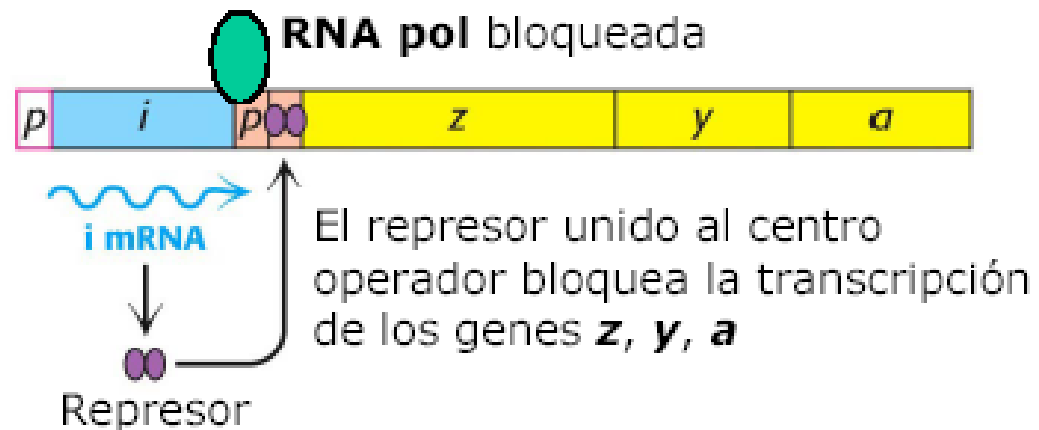
Tiene dos tipos de regulación:

Negativa: por *lac I* que reprime el operón en ausencia de lactosa

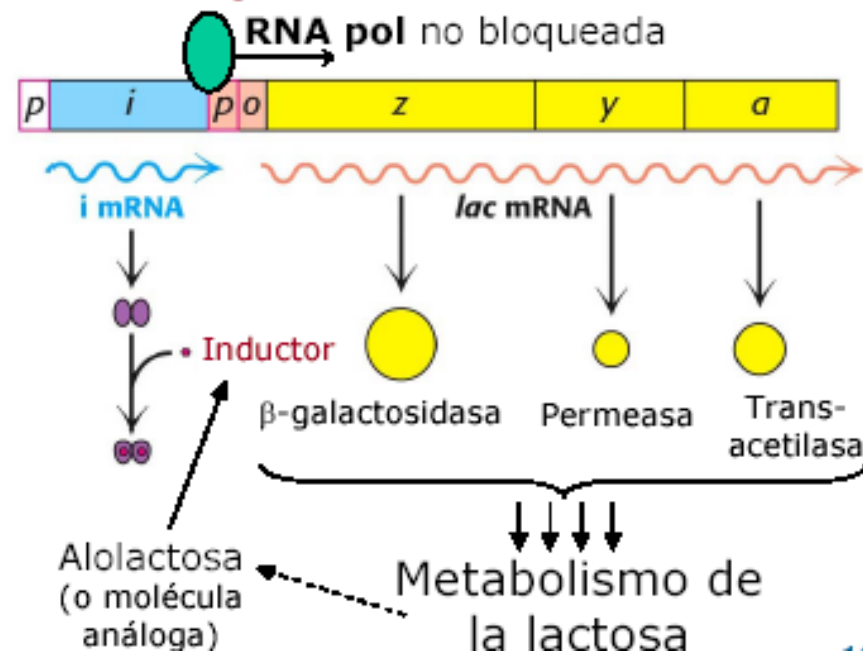
Positiva: por la proteína CAP-AMPc que se une al promotor y activa el operón en ausencia de glucosa. (si hay glucosa y lactosa hay baja expresión)

El gen *lac Z* (β -galactosidasa) se puede dividir en dos partes: fragmento α y fragmento ω , que cuando se expresan por separado y se unen generan una proteína activa

En ausencia de lactosa



En presencia de lactosa



OPERON *Lac* de *E. coli*

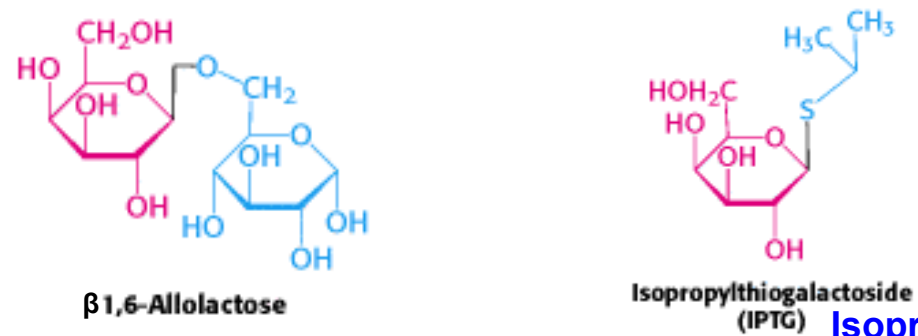
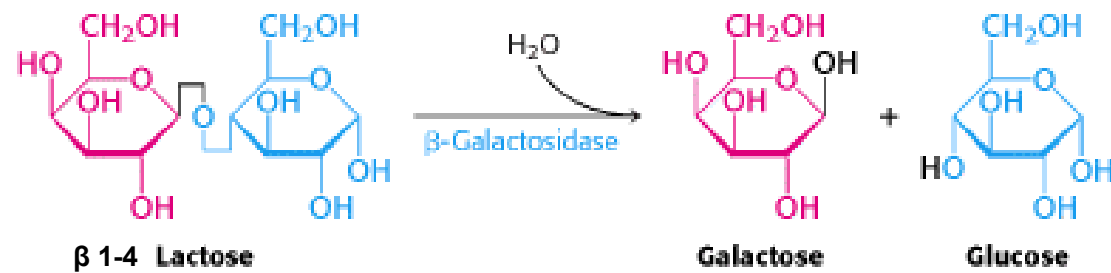
3 genes estructurales: *lac Z*: β -galactosidasa (hidroliza la lactosa rompe el enlace entre glucosa y galactosa); *lac Y*: permeasa (permite que la lactosa ingrese a la célula); *lac A*: transacetilasa.

Cuarto gen: *Lac I*: codifica la proteína reguladora **represora**, bloquea la transcripción de los genes Z, Y, A, mediante su unión al operador.

Lac I: tiene un efector alostérico: la **Lactosa** (o moléculas que se llaman análogos de lactosa ej. IPTG). La unión de Lactosa (o IPTG) a *Lac I* cambia la estructura y determina que el represor **no se una al operador en el ADN**, y se puedan sintetizar las enzimas para metabolizar la lactosa. **LACTOSA (o un análogo como el IPTG) son INDUCTORES**

Promotor: es reconocido por la **RNAPol** para transcribir el gen

Operador: se unen proteínas que pueden ser **activadoras** o **represoras**.

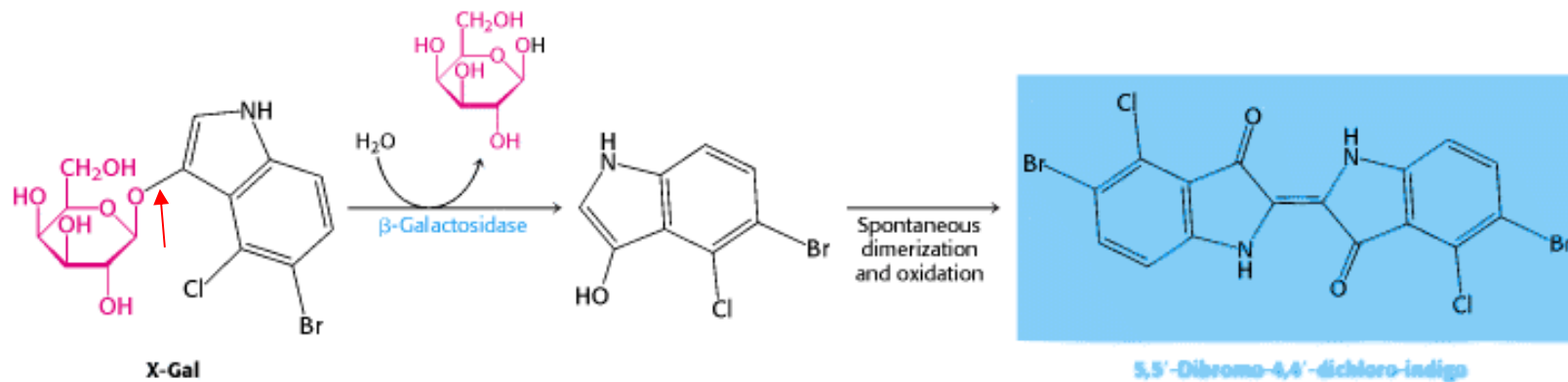


Isopropil β D-thiogalactopiranosido (IPTG)

Análogos de lactosa

IPTG

X-gal



X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl BD-galactopyranoside

Sitio de múltiple clonado (SMC) o Polilinker: interrumpe la secuencia del gen *lac Z* (en el péptido α de la β -galactosidasa).

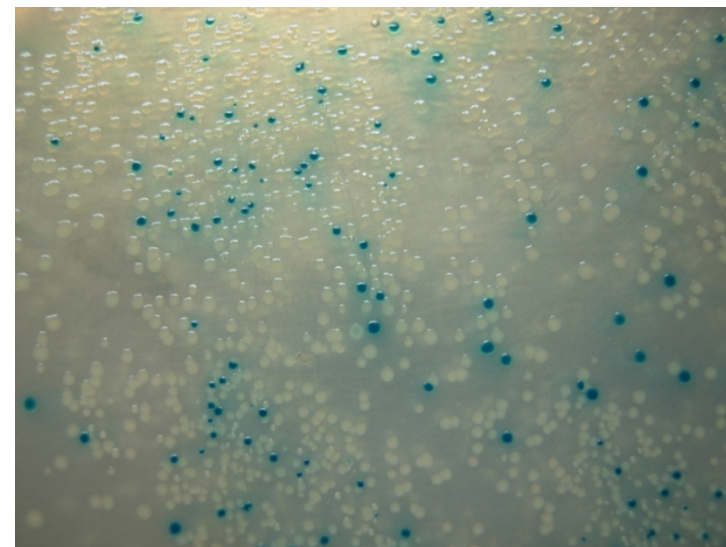
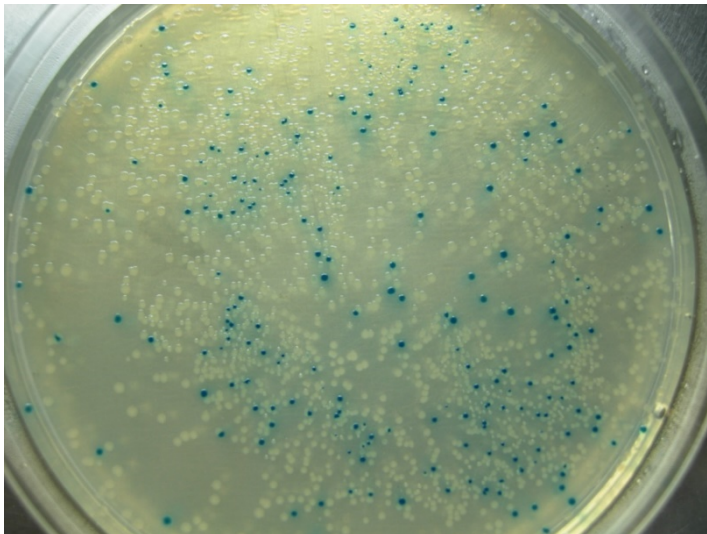
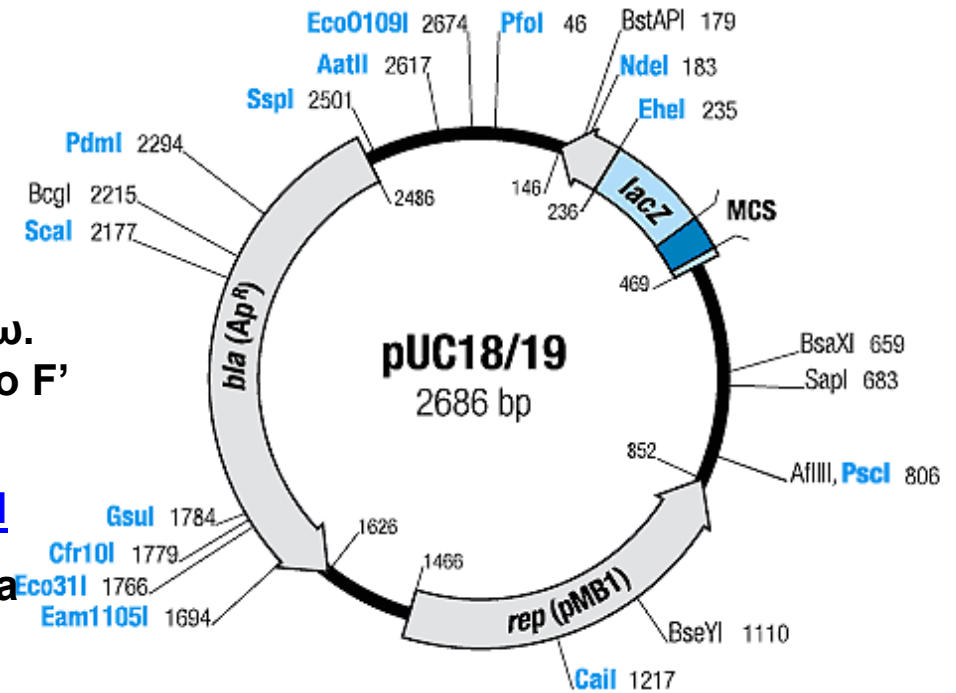
β -galactosidasa activa: se forma cuando el péptido α se complementa con el fragmento ω . El fragmento ω está codificado en el plásmido F' o en el genoma.

Colonias azules: plásmido sin inserto de ADN

Colonias blancas: se interrumpió la secuencia del gen *lac Z*: plásmido con inserto de ADN

En una bacteria con
background *lac Z*⁻

$\Delta(lac)$ [F' *lacI*q *lacZ* Δ M15]



Secuencia de nucleótidos del polilinker en vectores de la serie pUC

pUC19
 1 2 3 4 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 5 6 7 8
 THR MET ILE THR pro ser leu his ala cys arg ser thr leu glu asp pro arg val pro ser ser ASN SER LEU ALA
 ACC ATG ATT ACG CGA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCG AGC TCG AAT TCA CTG GCC
 HindIII SphI PstI SalI XbaI BamHI KpnI SstI EcoRI HaeIII
 XmaI SmaI
 HincII

pUC18
 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 7 8
 THR MET ILE THR ASN SER ser ser val pro gly asp pro leu glu ser thr cys arg his ala ser leu ala LEU ALA
 ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGG CAT GCA AGC TTG GCA CTG GCC
 EcoRI SstI KpnI BamHI XbaI SalI PstI SphI HindIII HaeIII
 XmaI SmaI
 HincII

pUC13
 1 2 3 4 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 5 6 7 8
 THR MET ILE THR pro ser leu gly cys arg ser thr leu glu asp pro arg ala ser ser ASN SER LEU ALA
 ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG GGC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GCG AGC TCG AAT TCA CTG GCC
 HindIII PstI SalI XbaI BamHI SstI EcoRI HaeIII
 XmaI SmaI
 HincII

pUC12
 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
 THR MET ILE THR ASN SER ser ser pro gly asp pro leu glu ser thr cys ser pro ser leu ala LEU ALA
 ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGC CCA AGC TTG GCA CTG GCC
 EcoRI SstI BamHI XbaI SalI PstI HindIII HaeIII
 XmaI SmaI
 HincII

pUC9
 1 2 3 4 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 5 6 7 8
 THR MET ILE THR pro ser leu ala ala gly arg arg ile pro gly ASN SER LEU ALA
 ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG GCT GCA GGT CGA CGG ATC CCC GGG AAT TCA CTG GCC
 HindIII PstI SalI BamHI EcoRI HaeIII
 XmaI SmaI
 HincII

pUC8
 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 7 8
 THR MET ILE THR ASN SER arg gly ser val asp leu gln pro ser leu ala LEU ALA
 ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC GTC GAC CTG CAG CCA AGC TTG GCA CTG GCC
 EcoRI BamHI SalI PstI HindIII HaeIII
 XmaI SmaI
 HincII

pUC7
 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 6
 THR MET ILE THR ASN ser pro asp pro ser thr cys arg ser thr asp pro gly asn SER
 ACC ATG ATT ACG AAT TCC CCG GAT CCG TCG ACC TGC AGG TCG ACG GAT CCG GGG AAT TCA
 EcoRI BamHI SalI PstI SalI BamHI EcoRI
 XmaI SmaI
 HincII

ATG

Es el ATG del vector, donde se inicia la traducción

- pUC18 and pUC19 vectors are small, high copy number, *E.coli* plasmids, 2686 bp in length. They are identical except that they contain multiple cloning sites (MCS) arranged in opposite orientations. pUC18/19 plasmids contain: (1) the pMB1 replicon (*rep*) responsible for the replication of plasmid (source - plasmid pBR322). The high copy number of pUC plasmids is a result of the lack of the *rop* gene and a single point mutation in the region *rep* of pMB1; (2) *bla* gene, coding for beta-lactamase that confers resistance to ampicillin (source - plasmid pBR322). It differs from that of pBR322 by two point mutations; (3) region of *E.coli* operon *lac* containing CAP protein binding site, promoter *Plac*, *lac* repressor binding site and 5'-terminal part of the *lacZ* gene encoding the N-terminal fragment of beta-galactosidase (source – M13mp18/19). This fragment, whose synthesis can be induced by IPTG, is capable of intra-allelic (alpha) complementation with a defective form of beta-galactosidase encoded by host (mutation *lacZ*DM15). In the presence of IPTG, bacteria synthesise both fragments of the enzyme and form blue colonies on media with X-gal. Insertion of DNA into the MCS located within the *lacZ* gene (codons 4 a 7 of *lacZ* are replaced by MCS) inactivates the N-terminal fragment of beta-galactosidase and abolishes alpha-complementation. Bacteria carrying recombinant plasmids therefore give rise to white colonies.
- The map shows enzymes that cut pUC18/19 DNA once. The coordinates refer to the position of first nucleotide in each recognition sequence.
- The exact position of genetic elements is shown on the map (termination codons included). The *bla* gene nucleotides 2486-2418 (complementary strand) code for a signal peptide. The LacZ polypeptide corresponding to wt beta-galactosidase and essential for blue/white screening ends at nt position 236 (compl. strand); another 30 codons in the same reading frame are derived from pBR322. The indicated *rep* region is sufficient to promote replication. DNA replication initiates at position 866 (+/- 1) and proceeds in indicated direction. Plasmids carrying the pMB1 and ColE1 replicons are incompatible, but they are fully compatible with those carrying the p15A replicon (pACYCC). pMB1-derived plasmids can be amplified using chloramphenicol.

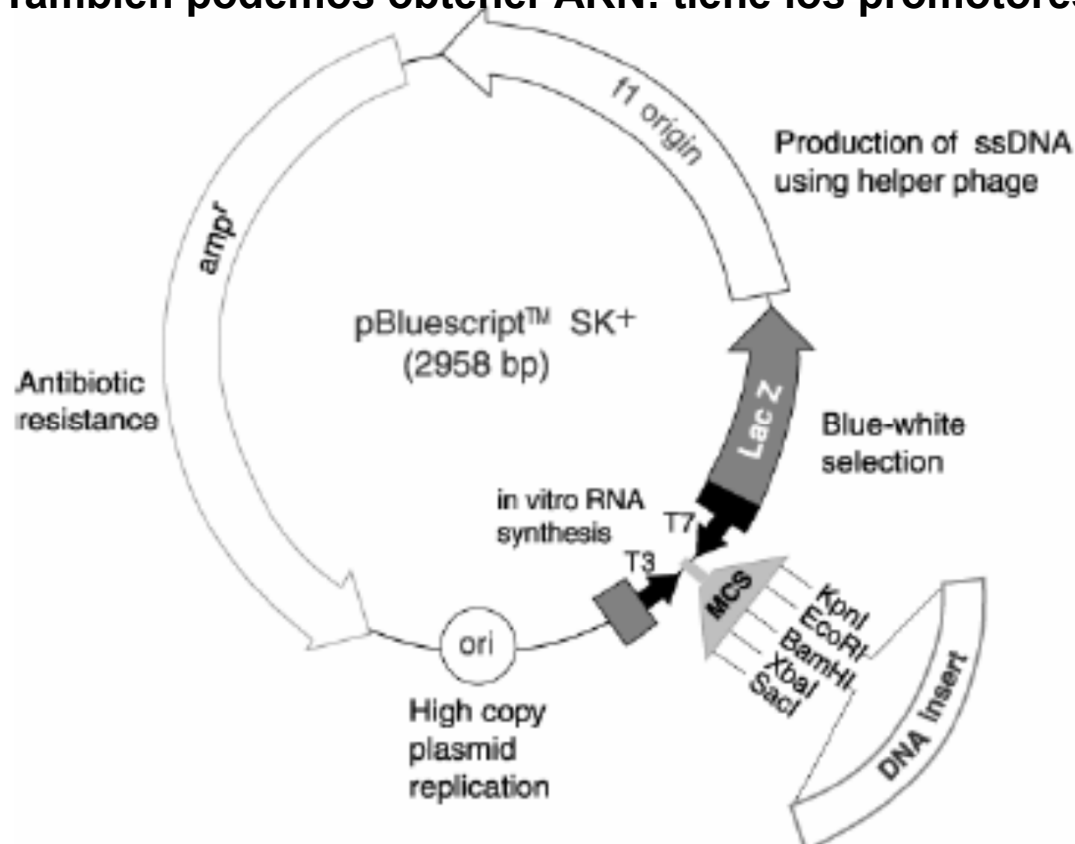
Para que la proteína se exprese el gen debe estar en fase:

el marco de lectura de los codones en el gen insertado debe coincidir con el marco de lectura dado por el ATG del vector. Se produce una proteína de fusión a β -galactosidasa.

Las proteínas que se expresan en los plásmidos de la serie PUC o Bluescript no se pueden separar fácilmente del resto de las proteínas de la bacteria, por eso es que luego se diseñaron los plásmidos “de expresión” que permiten purificar las proteínas recombinantes (pGEX, pET, etc). Se producen proteínas de fusión a Glutación S- transferasa o con una cola de histidinas entre otras estrategias.

Phagemidos: Ej. plásmidos Bluescript tienen el ori del fago filamentoso f1
Los fagos filamentosos como f1 son colifagos que contienen una molécula de ADN circular de simple hebra. No lisan la célula, la infectan y una vez completados los fagos son liberados al medio. Son útiles cuando se requiere ADN de simple hebra: secuenciación, sondas, etc.

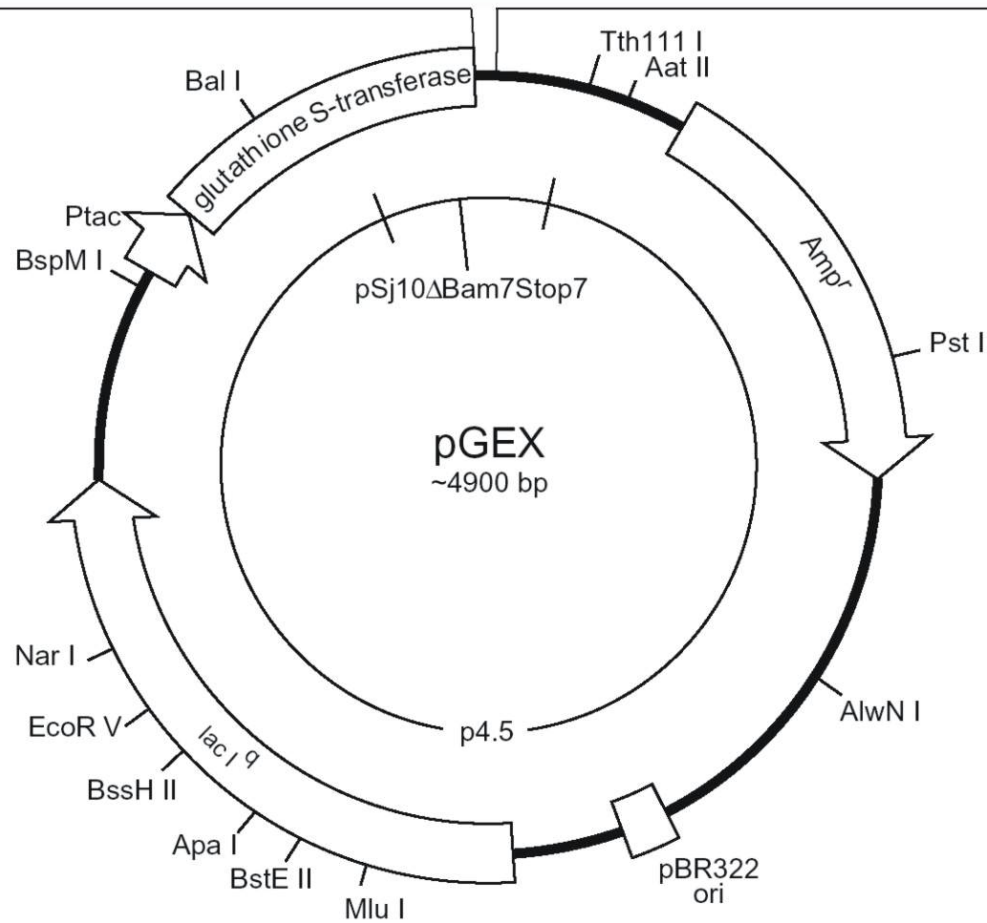
Un plásmido como el pBluescript nos permite usarlo para expresar una proteína recombinante ya que tiene el promotor Lac y nos permite hacer selección de colonias azules y blancas. También al ser un phagemido tiene otras funciones. Cuáles? Podemos obtener ADN simple hebra de las cadenas sense-antisense si al cultivo le agregamos el fago helper. También podemos obtener ARN: tiene los promotores de la RNA polimerasa del fago T3 y T7.



pGEX-3X

Factor Xa

Ile Glu Gly Arg ↓ Gly Ile Pro Gly Asn Ser Ser
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG TGA CTG ACT GAC
BamH I Sma I EcoR I Stop codons



Tags de afinidad (amino o carboxilo terminal)

Vectores pQE: purificar con cola de histidina amino terminal (his-tag). Resina de Niquel y se eluye con imidazol.

-Promotor fago T5
inducible por IPTG
(fuerte y reconocido por la pol *E. coli*) y terminadores de la transcripción fuertes

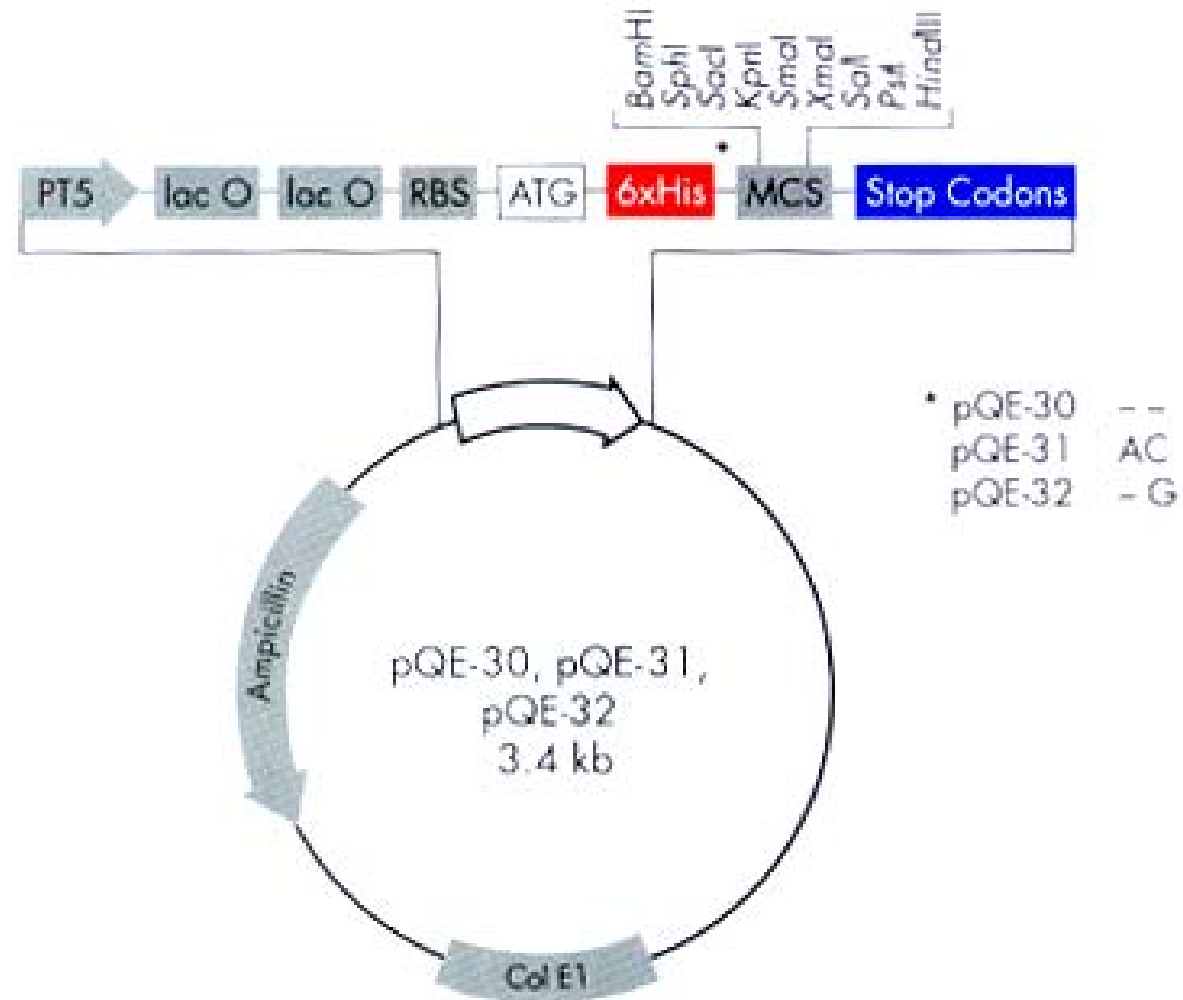
-Doble operador:
represión eficiente

-RBSII: alta velocidad de traducción

-Tag 6 histidinas

-Polilinker y codones stop

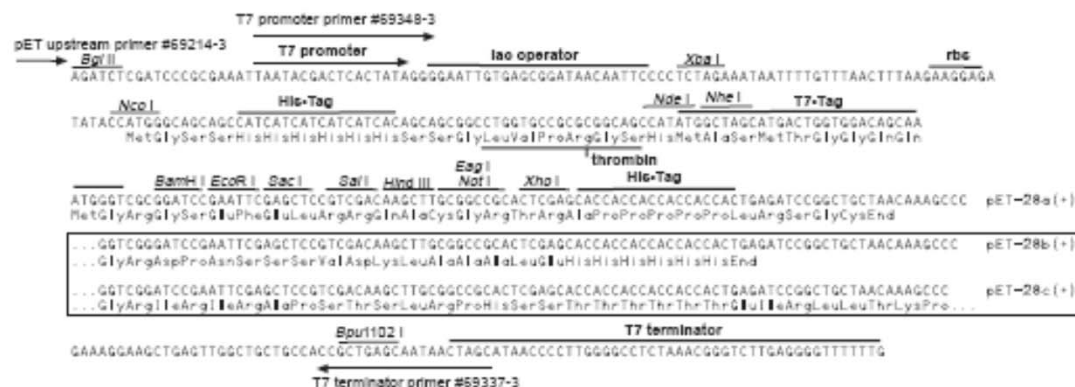
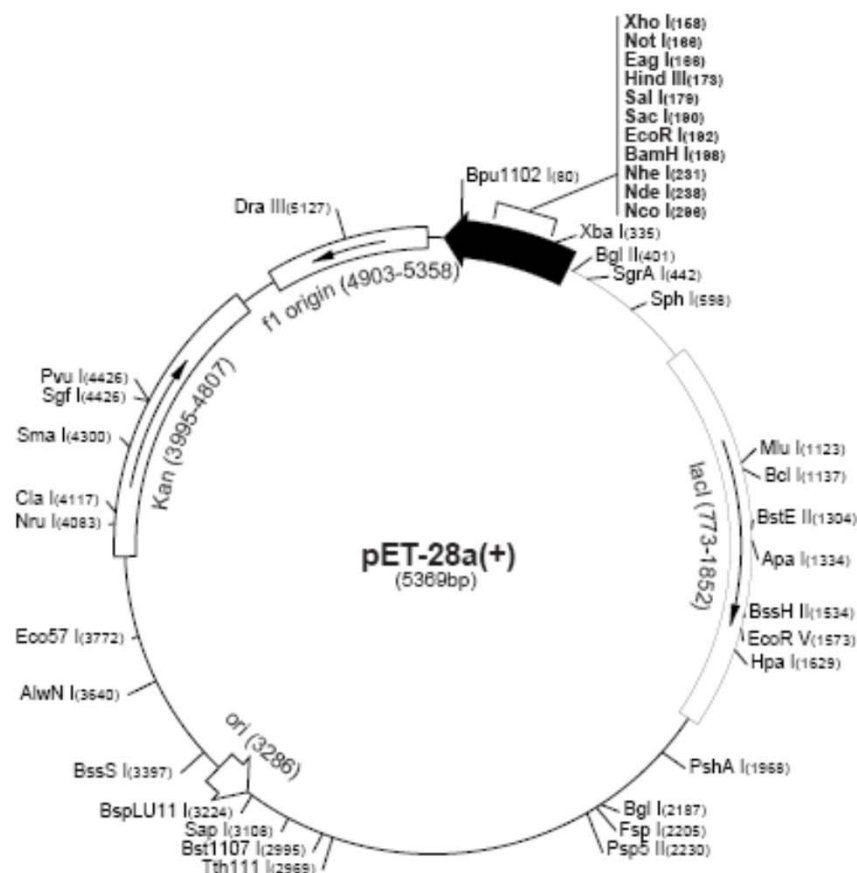
Usar una cepa de *E.coli* que provea el represor lac I.



pET-28a(+) sequence landmarks

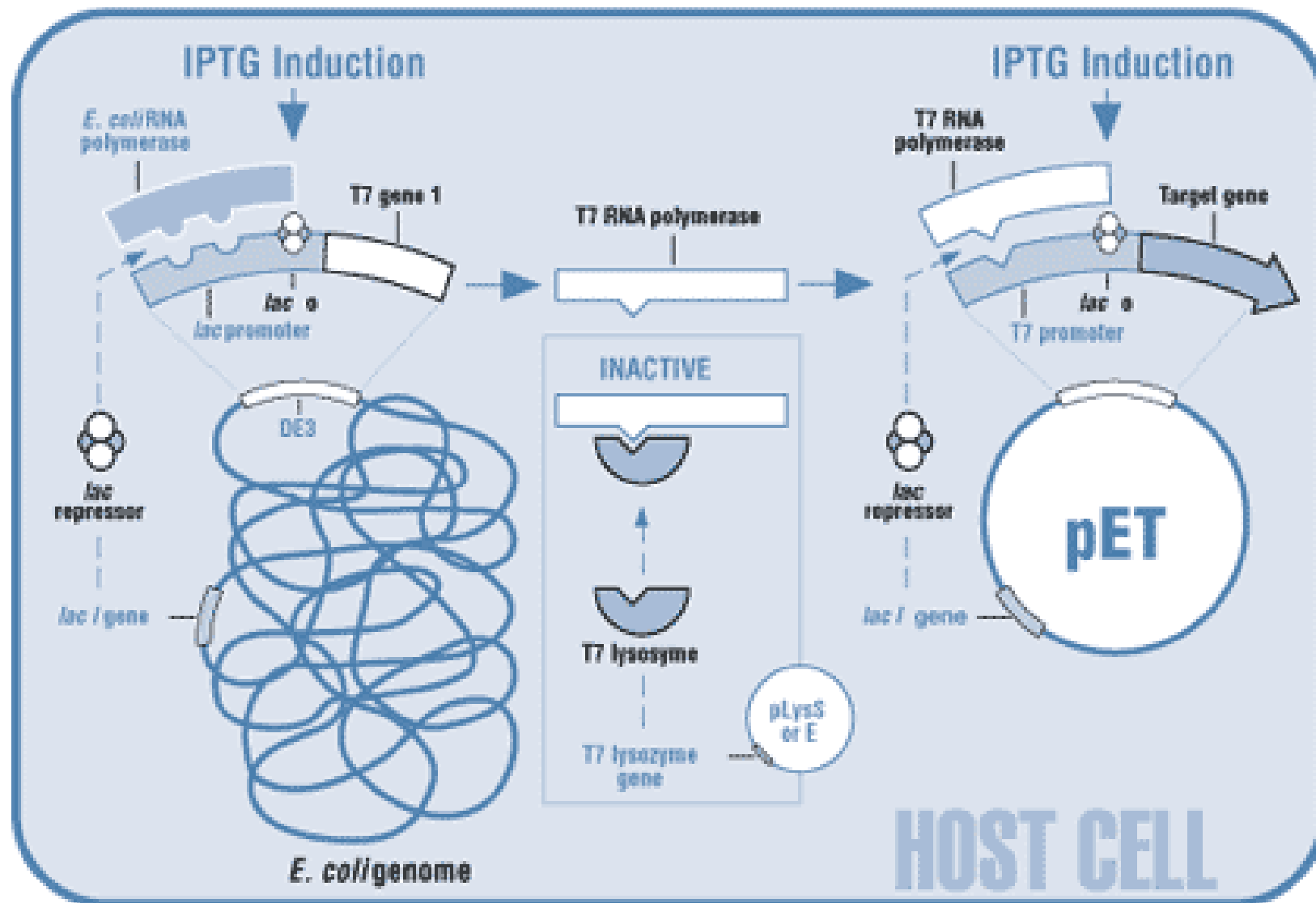
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



pET-28a-c(+) cloning/expression region

Elementos del control del sistema pET.



Elementos del control del sistema pET.

Regulation of Expression of the Gene of Interest: Expression of the gene of interest from pET plasmids is controlled by the strong phage T7 promoter that drives expression of gene 10 ($\Phi 10$). T7 RNA polymerase specifically recognizes this promoter, it binds to the T7 promoter and transcribes the gene of interest.

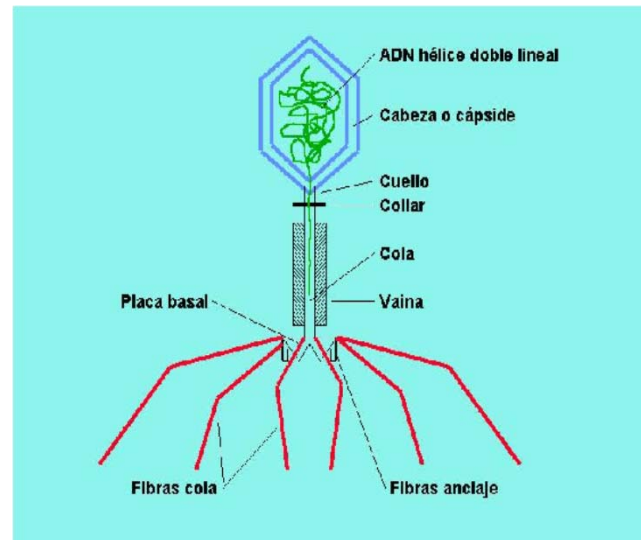
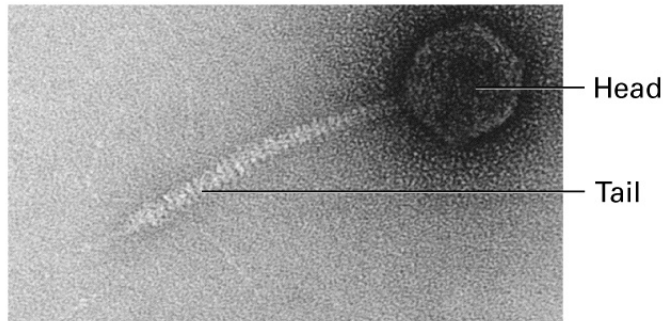
Regulation of Expression of T7 RNA Polymerase The BL21(DE3)pLysS strain carries the DE3 bacteriophage lambda lysogen. This lambda lysogen contains the *lacI* gene, the T7 RNA polymerase gene under control of the *lacUV5* promoter, and a small portion of the *lacZ* gene. This *lac* construct is inserted into the *int* gene, which inactivates the *int* gene. Disruption of the *int* gene prevents excision of the phage (i.e. lysis) in the absence of helper phage. The *lac* repressor represses expression of T7 RNA polymerase. Addition of IPTG allows expression of T7 RNA polymerase.

Regulation of T7 RNA Polymerase by T7 Lysozyme

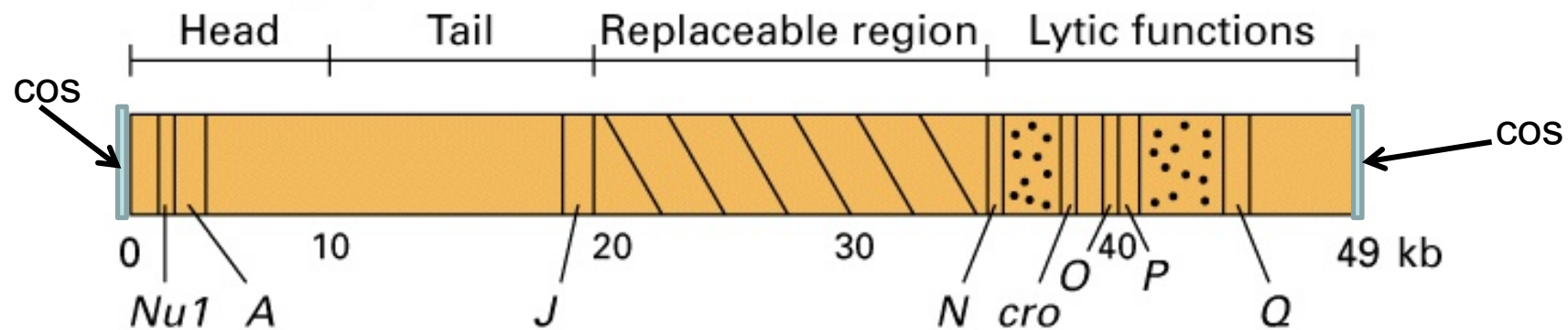
There is always some basal level expression of T7 RNA polymerase. If a toxic gene is cloned downstream of the T7 promoter, basal expression of this gene may lead to reduced ***growth rates, cell death, or plasmid instability***. T7 lysozyme (produced from pLysS or pLysE) has been shown to bind to T7 polymerase and inhibit transcription. This activity is exploited to reduce basal levels of T7 RNA polymerase. T7 lysozyme is a bifunctional enzyme. In addition to its T7 RNA polymerase binding activity, it also cleaves a specific bond in the peptidoglycan layer of the *E. coli* cell wall. This activity increases the ease of cell lysis by freeze-thaw cycles prior to purification.

Bacteriófago lambda

(a) λ Phage virion



(b) λ Phage genome



Sitios “cos”: extremos cohesivos protuberantes de 12nt con los cuales se forma la molécula circular