

Guía de problemas *Clonado Molecular Recombinogénico*

Problema 1

Usted desea clonar los marcos de lectura abierto de las proteínas Z del virus Junín (**Figura 1**) y GFP (**Figura 2**) en el vector de expresión para mamíferos, pCDNA3 (pdf adjunto y **Figura 3**), para evaluar el direccionamiento subcelular del polipéptido viral. Para esto, decide utilizar el sistema de clonado λ RED y *Gateway*.

```
ATGGGCAACTGCAACGGGGCATCCAAGTCTAACCAGCCAGACTCCTCAAGAGCCACACAGCCAGCCGCGAGAATTTAG
GAGGGTAGCTCACAGCAGTCTATATGGTAGATATAACTGTAAGTGCTGCTGGTTTGCTGATACCAATTTGATAACCT
GTAATGATCACTACCTTTGTTTAAAGGTGCCATCAGGGTATGTTAAGGAATTCAGATCTCTGCAATATCTGCTGGAAG
CCCCTGCCCACCACAATCACAGTACCGGTGGAGCCAACAGCACCACCACCATAG
```

Figura 1. Secuencia correspondiente al marco de lectura abierto de la proteína z del virus Junín.

```
ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAA
ATTTTCTGTCTAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAA
AACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTTCGGTTATGGTGTTCAATGCTTTGCGAGATACCCAGATCAT
ATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCTGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGA
CGGGAAGTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAGGTATTG
ATTTTAAAGAAGATGGAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACATAACTCACACAATGTATACATCATGGCA
GACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGA
CCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTG
CCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACAT
GGCATGGATGAACTATACAAATAA
```

Figura 2. Secuencia correspondiente al marco de lectura abierto de GFP.

- Diseñe las secuencias de los *primers* necesarios y los perfiles de ciclado que utilizará para llevar adelante el proyecto, y esquematice las etapas intermedias y la construcción final (sistema λ RED).
- Diseñar los *primers* necesarios para clonar el inserto de la **Figura 1** en un vector de expresión en células de mamífero, utilizando el sistema *Gateway*. Esquematice además, los vectores **Donor**, **Entrada** y la **Construcción Final**.

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAG
TATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTT
GACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGC
GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTC
CGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGAC
GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCAT
TATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
GATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTG
ACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTGACG
CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTA
CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGC
CGCCAGTGTGCTGGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTA
TAGTGTCACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC
CTCCCCCGTGCTTCTTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC
ATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT
AGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCC
CCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCG
CCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT
CGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC
ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
TGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTTCGGCC
TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTGAGTTAGGGTGT
GGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAA
AGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCCGCCCTA
ACTCCGCCCATCCCCGCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTA
TGCAGAGGCCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTT
GCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATT
GAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGAC
AATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGT
CCGGTGCCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTTCTTGCAGCT
GTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTATC
TCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCT
GCCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGAT
GATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGA
GGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCG
ACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGC
GGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCT
TCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTTCAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGA
TTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCC
AGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCCACCCCACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGC
AATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGT
ATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTGTGTGAA
ATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTG
AGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATG
AATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAC

```

GCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCA
TAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCG
CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAGTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
GGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT
GAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTT
TTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGAC
GCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTT
AAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA
GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG
ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATC
AGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTA
ATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
GTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC
CATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCAC
TCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTAC
TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGC
GCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGC
TGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCT
GGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACT
CTTCCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGA
AAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

```

Figura 3. Secuencia correspondiente al vector de expresión pCDNA3

Problema 2

Diseñe un sistema de clonado molecular que explote la tecnología Cre/loxP para la caracterización de promotores de mamíferos. El objetivo es comercializar 2 plásmidos (**A** y **B**) y la proteína Cre.

El plásmido **A** deberá contener: un origen de replicación, un gen de resistencia a antibióticos, un MCS flanqueado *upstream* por un sitio loxP y *downstream* por un UTR 3', y señales de poliadenilación y terminación eucariotas.

El plásmido **B** deberá contener: un origen de replicación, un gen de resistencia a antibióticos, un MCS *upstream* a un sitio loxP.

La idea es clonar supuestas secuencias promotoras en el plásmido **B** y diferentes marcos de lectura en el plásmido **A**. Evalúe la funcionalidad de sus construcciones utilizando como modelos GFP y algún promotor eucariota.