Problema de PCR I

Usted cuenta con la secuencia del gen *p10* de AcMNPV (***Fig.1***) y debe:

1) Diseñar un par de *primers* que le permita amplificar el ORF del gen *p10* de AcMNPV.
2) Diseñar un par de *primers* que le permita amplificar la región promotora del gen *p10*, para realizar posteriores estudios sobre su actividad, mediante su clonado en el plásmido pDsRed.
3) En todos los casos anteriores mencionar como haría el clonado de los productos de amplificación en el vector pZErO y en el pDsRed para el caso 2).

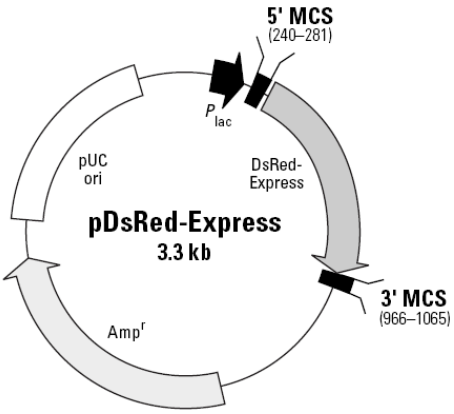
Nota: En todos los casos introduzca sitios de restricción en los *primers* para facilitar un posterior clonado. Tenga en cuenta el uso de codones (Tabla 1) para realizar la mutagénesis del punto 3.

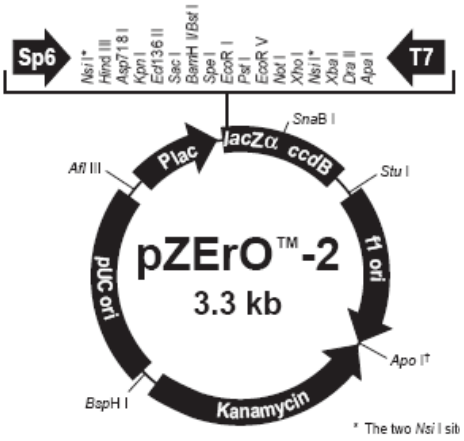
Fig 1: Secuencia del gen *p10* de AcMNPV

```
tcacttacaacaagggggactatgaaattatgcatttgaggatgccgggacctttaattcaacccaacac
aatatattatagttaaataagaattattatcaaatcatttgtatattaattaaaatactatactgtaaat
tacattttatttacaatcatgtcaaagcctaacgttttgacgcaaattttagacgccgttacggaaacta
acacaaaggttgacagtgttcaaactcagttaaacgggctggaagaatcattccagcttttggacggttt
gcccgctcaattgaccgatcttaacactaagatctcagaaattcaatccatattgaccggcgacattgtt
ccggatcttccagactcactaaagcctaagctgaaaacccaagcttttgaactcgattcagacgctcgtc
gtggtaaacgcagttccaagtaaatgaatcgtttttaaaataacaaatcaattgttttataatattcgta
cgattctttgattatgtaat
```

Tabla 1 : Tabla de codones. Ilustra los 64 tripletes posibles.

		2ª base			
		U	**C**	**A**	**G**
1ª base	**U**	UUU **Fenilal**. UUC **Fenilal**. UUA **Leucina** UUG **Leucina**	UCU **Serina** UCC **Serina** UCA **Serina** UCG **Serina**	UAU **Tirosina** UAC **Tirosina** UAA ***Stop*** UAG ***Stop***	UGU **Cisteína** UGC **Cisteína** UGA ***Stop*** UGG**Triptofan**.
	C	CUU **Leucina** CUC **Leucina** CUA **Leucina** CUG **Leucina**	CCU **Prolina** CCC **Prolina** CCA **Prolina** CCG **Prolina**	CAU **Histidina** CAC **Histidina** CAA **Glutamin** CAG **Glutamin**	CGU **Arginina** CGC **Arginina** CGA **Arginina** CGG **Arginina**
	A	AUU **Isoleuc.** AUC **Isoleuc.** AUA **Isoleuc.** AUG **Metion.**	ACU **Treon.** ACC **Treon** ACA **Treon** ACG **Treon**	AAU **Asparra**. AAC **Asparra**. AAA **Lisina** AAG **Lisina**	AGU **Serina** AGC **Serina** AGA **Arginina** AGG **Arginina**





MCS pDsRed

```
5' MCS                 230       240       250       260       270       280
lacZ                                                                          DsRed-Express
ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG GCC
                                Sph I     Acc I                Bam HI Xma I  Kpn I  Age I
                                          Sal I                       Sma I
3' MCS
DsRed-Express 970       980       990       1000      1010      1020      1030      1040
STOP
TAG CGGCCGCGACTCTAGAATTCCAACTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAACTTGTCTGGTGTCAAAAATAATAGGCCT
    Not I
     1050      1060
ACTAGTCGGCCGTACGGGCCC
Spe I      |   Apa I
        BsiW I
```

MCS pZEro

```
          P lac
95        GCGCAACGCA ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCCAGGCTT TACACTTTAT
                                                                M13 Reverse primer
155       GCTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTCACA CAGGAAACAG CT ATG
                                  Sp6 promoter/priming site                   Nsi I*  Met
220       ACC ATG ATT ACG CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC TCA AGC TAT GCA
          Thr Met Ile Thr Pro Ser Tyr Leu Gly Asp Thr Ile Glu Tyr Ser Ser Tyr Ala
           Hind III  Asp718 I  Kpn I  Ecl136 II  Sac I BamH I  Spe I                EcoRI
274       TCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT CCA CTA GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA
          Ser Ser Leu Val Pro Ser Ser Asp Pro Leu Val Thr Ala Ala Ser Val Leu Glu
                 Pst I EcoR V                Not I      Xho I            Nsi I* Xba I  Dra II Apa I
328       TTC TGC AGA TAT CCA TCA CAC TGG CGG CCG CTC GAG CAT GCA TCT AGA GGG CCC
          Phe Cys Arg Tyr Pro Ser His Trp Arg Pro Leu Glu His Ala Ser Arg Gly Pro
                                                   M13 (-20) Foward priming site
382       AAT TCG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAC AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CAA CGT
          Asn Ser Pro Tyr Ser Glu Ser Tyr Tyr Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg
          M13 (-40) Foward priming site
436       CGT GAC TGG GAA AAC CCT GGC GTT ACC CAA CTT AAT CGC CTT GCA GCA CAT CCC
          Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
490       CCT TTC GCC AGC TGG CGT AAT AGC GAA GAG GCC CGC ACC GAT CGC CCT TCC CAA
          Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln
                            LacZα/ccdB Fusion joint
544       CAG TTG CGC AGC CTA TAC GTA CGG CAG TTT AAG GTT TAC ACC TAT AAA AGA GAG
          Gln Leu Arg Ser Leu Tyr Val Arg Gln Phe Lys Val Tyr Thr Tyr Lys Arg Glu
598       AGC CGT TAT CGT CTG TTT GTG GAT GTA CAG AGT GAT ATT ATT GAC ACG CCG GGG
          Ser Arg Tyr Arg Leu Phe Val Asp Val Gln Ser Asp Ile Ile Asp Thr Pro Gly
                                      ccd B ORF
652       CGA CGG ATG GTG ATC CCC CTG GCC AGT GCA CGT CTG CTG TCA GAT AAA GTC TCC
          Arg Arg Met Val Ile Pro Leu Ala Ser Ala Arg Leu Leu Ser Asp Lys Val Ser
706       CGT GAA CTT TAC CCG GTG GTG CAT ATC GGG GAT GAA AGC TGG CGC ATG ATG ACC
          Arg Glu Leu Tyr Pro Val Val His Ile Gly Asp Glu Ser Trp Arg Met Met Thr
760       ACC GAT ATG GCC AGT GTG CCG GTC TCC GTT ATC GGG GAA GAA GTG GCT GAT CTC
          Thr Asp Met Ala Ser Val Pro Val Ser Val Ile Gly Glu Glu Val Ala Asp Leu
814       AGC CAC CGC GAA AAT GAC ATC AAA AAC GCC ATT AAC CTG ATG TTC TGG GGA ATA
          Ser His Arg Glu Asn Asp Ile Lys Asn Ala Ile Asn Leu Met Phe Trp Gly Ile
868       TAA ATG TCA GGC
          ***
```