

Trabajo práctico *In Silico* (Clone Manager)

Clonado de la proteína Fluorescente Verde GFP

Existen numerosas herramientas bioinformáticas que complementan el trabajo en la mesada y ayudan al diseño de los experimentos. Entre ellos existen *Chromas*, *Bioedit*, *Mega*, *Clustal*. Y también existen servidores como *Expasy*, *Prosit*, *Blast*, etc. Uno de los que utilizaremos en la materia es el “Clone Manager”, el cual permite simular la mayoría de las reacciones que se utilizan para el clonado molecular (digestiones enzimáticas, ligaciones, visualización de secuencia y mapa de vectores, entre otros). A través de las operaciones que ofrece el software, el usuario podrá realizar el diseño y la evaluación *In silico* del mismo. Como así también el análisis de secuencias y alineamientos.

En este trabajo práctico los introduciremos en las herramientas básicas del programa, para poder simular el clonado molecular de una secuencia blanco en un vector plasmídico. Si desean obtener más información sobre el software y sus herramientas pueden entrar al sitio <http://www.scied.com/>.

Proteínas fluorescentes marcadoras

En la actualidad disponemos de un amplio rango de proteínas fluorescentes y sus variantes, que abarcan casi todo el espectro de luz visible. Estas proteínas son ahora herramientas indispensables en la investigación básica y aplicada. Son utilizadas mayoritariamente en la caracterización de genes y proteínas, en el estudio de sus funciones, localización y asociación en procesos celulares. Por otro lado, estas proteínas también son utilizadas en sistemas biosensores.

Gracias al descubrimiento, estudio y desarrollo de la proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*), el japonés Osamu Shimomura y los estadounidenses Martin Chalfie y Roger Y. Tsien ganaron el Premio Nobel de Química en 2008. La proteína GFP es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, con un pico de emisión a 507 nm (zona verde del espectro visible). Es una de las proteínas marcadoras fluorescentes más ampliamente utilizadas. Y existen una gran cantidad de modificaciones de GFP adaptadas a distintos rangos de emisión, estabilidad, intensidad de emisión y optimizadas para la expresión en diferentes sistemas celulares.

En este trabajo obtendremos la secuencia del marco de lectura abierto (ORF) de GFP de la medusa *Aequorea victoria*, desde el *GenBank*. Y aprenderemos las operaciones básicas del Clone Manager a partir del clonado *In Silico* de GFP en vectores de clonado y expresión

Ejercicios:

Clonado en “vector de clonado”

1. Descargar la secuencia codificante para la proteína *Green Fluorescent Protein* de la medusa *Aequorea victoria* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
2. Diseñar *primers* para amplificar el ORF de GFP, para el posterior clonado en el plásmido pBS (los *primers* deben ser nombrados FwGFP y RvGFP).
3. Realizar la PCR *In silico* con FwGFP y RvGFP, sobre el molde pZero-GFP.
4. Digerir el vector pBS con la enzima de restricción EcoRV
5. Ligar el producto obtenido de la PCR (el cual tendrá extremos Romo, dado que por *default* el programa simula la PCR sin tener en cuenta si se realiza con la enzima *Taq* u otra de sus variantes) al plásmido pBS previamente digerido.

Clonado en “vector de expresión”

Luego del clonado del ORF de GFP en pBS, debe realizar el clonado de GFP en un plásmido de expresión fusionada a un *tag* de Histidinas en el N-terminal. Para ello debe diseñar nuevos *primers*, los cuales deberán incorporar sitios de enzimas de restricción, para el clonado de His-GFP en pQE-30

1. Diseñar *primers* para amplificar el ORF de GFP para el posterior clonado en marco con el *tag* de His6, en el N-Terminal, en el vector pQE-30 en (los *primers* deben ser nombrados FwGFP-ER1 y RvGFP-ER2).
3. Realizar la PCR *In silico* con FwGFP-ER1 y RvGFP-ER2, sobre el molde pZero-GFP.
4. Digerir el vector pQE-30 y el producto de la PCR con FwGFP-ER1 y RvGFP-ER2, con las enzimas correspondientes.

5. Ligar ambos productos, y confirmar la continuidad del marco de lectura desde el codón ATG del *tag* His6, hasta el codón Stop de GFP.

6. Obtener la secuencia aminoacídica de la proteína de fusión His-GFP.

Bibliografía

- Tsuji FI, Early history, discovery, and expression of Aequorea green fluorescent protein, with a note on an unfinished experiment. Microsc Res Tech. 2010