

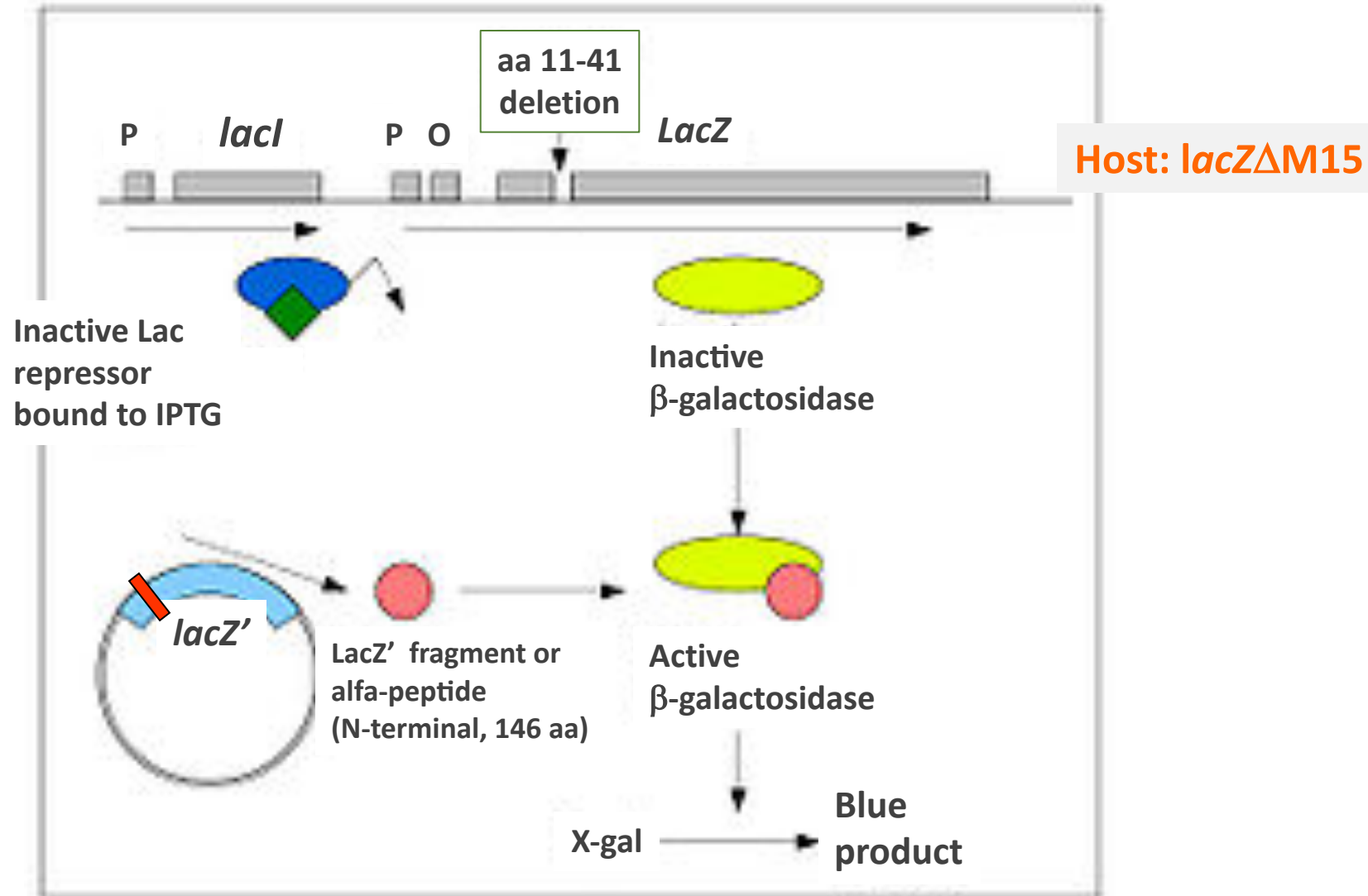
TP 3

Sistema α -complementação vs sistema vetores pNM
Exemplos de vetores de fusão traducional e transcricional
Vetores virais
Problemas de clonagem

Lac operon as a tool

- Vectors that allow identification of recombinant clones by **α -complementation**
 - P O lacZ'
 - IPTG induction
 - Host: *E. coli* Δ lacZM15
 - lacI or lacI^q (plasmid or chromosome)
 - MCS imbedded in the beginning of lacZ
 - β -gal⁺ (blue) – non-recombinants
 - β -gal⁻ (white) – recombinants
- Vectors for the identification of transcription and translational signals
 - 'lacZ (no lac promoter region)
 - No IPTG induction
 - Host: *E. coli* Δ lacX74 (Δ lacI^qPOZY)
 - MCS upstream 9th codon of lacZ
 - β -gal⁺ (blue) – recombinants
 - β -gal⁻ (white) – recombinants or non-recombinants

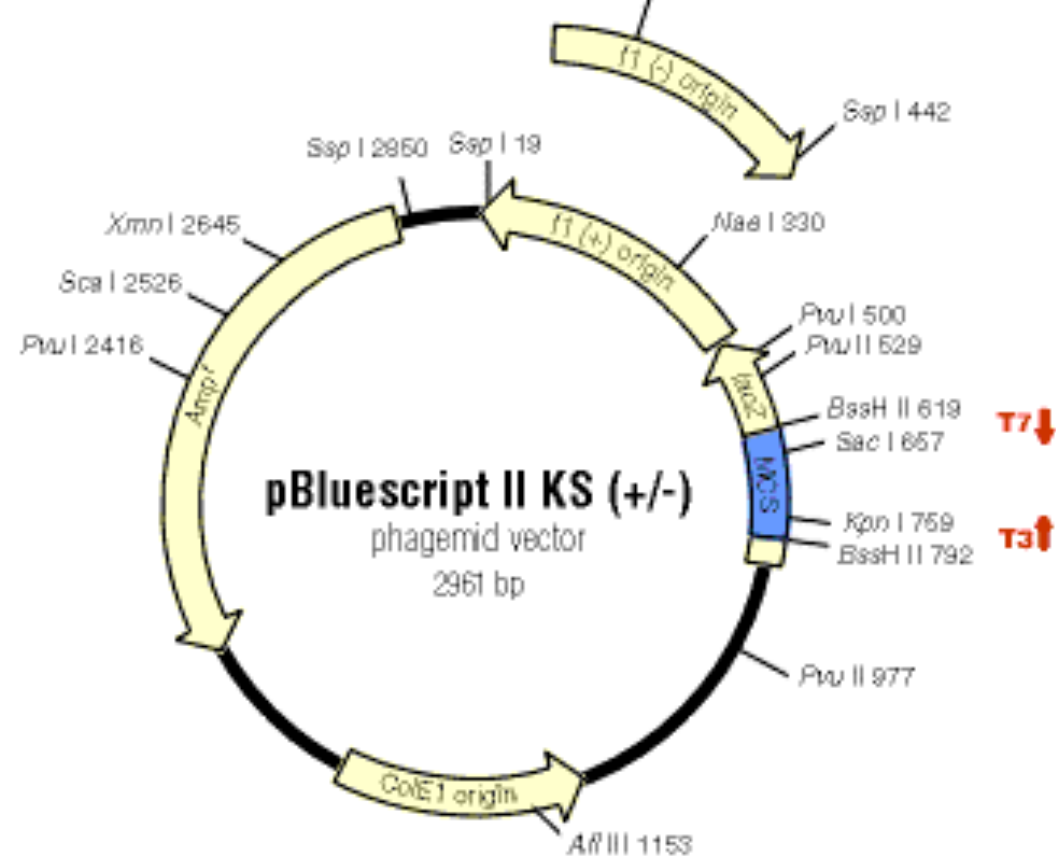
α -complementation (blue/white color selection)



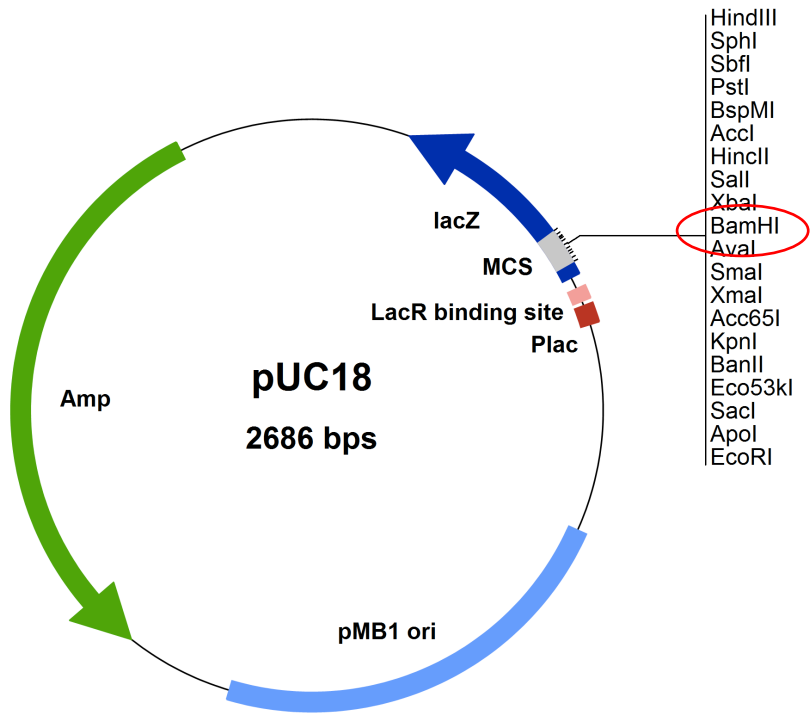
IPTG – inducer analogue (not a substrate of β -galactosidase)

Ex of a plasmid that uses α -complementation for recombinants selection

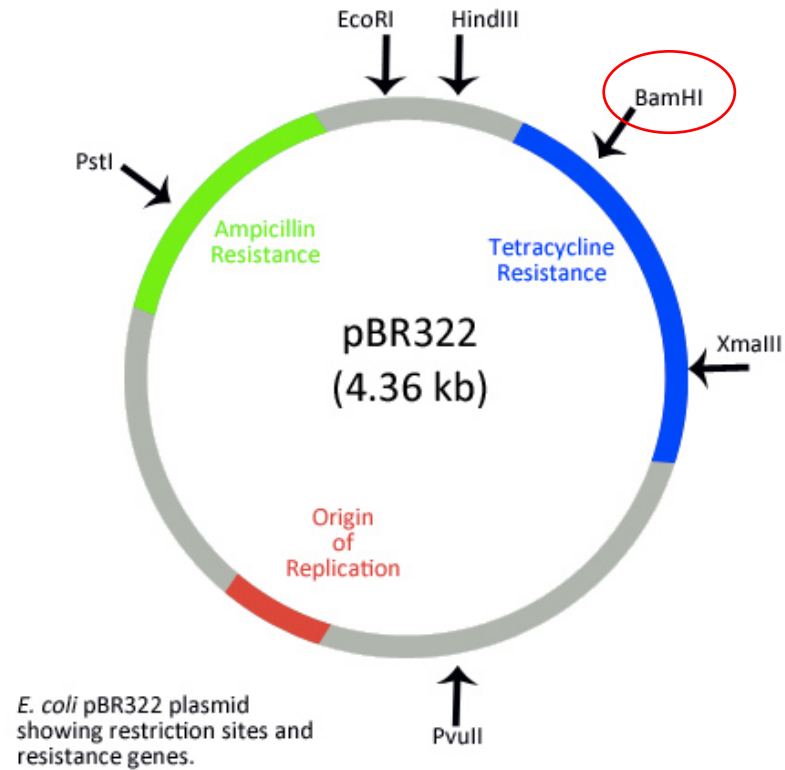
β -gal⁺ (blue) – non-recombinants
 β -gal⁻ (white) – recombinants



18. A clonagem de um fragmento *Bam*HI no vector pUC18 inativa o gene *lacZ*, que codifica a β -galactosidase, mas a clonagem do mesmo fragmento no vector pBR322 inativa o gene de resist \tilde{e} ncia \grave{a} tetraciclina. Atendendo a que ambos os vectores cont \tilde{e} m o gene de resist \tilde{e} ncia \grave{a} ampicilina, que permite seleccionar os transformantes ap \acute{o} s a clonagem no local *Bam*HI, qual destes plasm \acute{i} dios \acute{e} mais eficaz enquanto vector de clonagem?



Seleção recombinantes, por alfa-complementação, após 16-18 h incubação a 37 °C

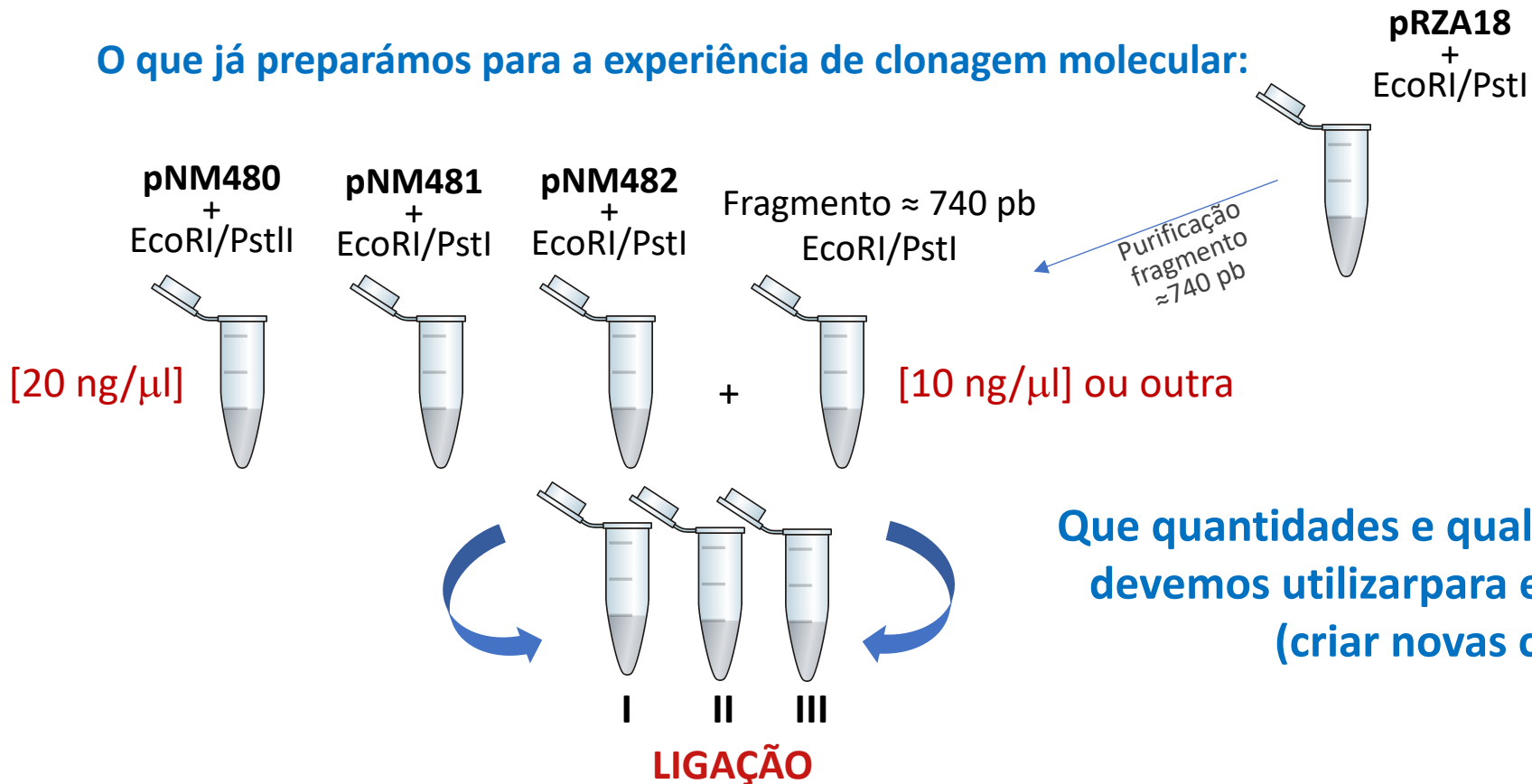


Seleção recombinantes após 2 dias pois \acute{e} necess \acute{a} rio:
1 $^{\circ}$ dia – seleç \tilde{a} o transformantes (Amp)
2 $^{\circ}$ dia – seleç \tilde{a} o recombinantes (por *replica plating* em Tet)

Passos para a clonagem molecular

- Preparar misturas de ligação (utilizar após o tempo de incubação indicado para a DNA ligase ou congelar)
- Preparar células competentes (testar de imediato a competência das células; congelar. só utilizar com as misturas de ligação depois de confirmar que estão competentes)
- Preparar caixas de meio selectivo (testar actividade da ampicilina inoculando quaisquer células sensíveis à ampicilina (idealmente E. coli MC1061 (competentes ou não)))
- Transformação
- Confirmação da correcta construção dos clones (recombinantes) obtidos por análise de restrição / PCR / sequenciação

O que já preparámos para a experiência de clonagem molecular:



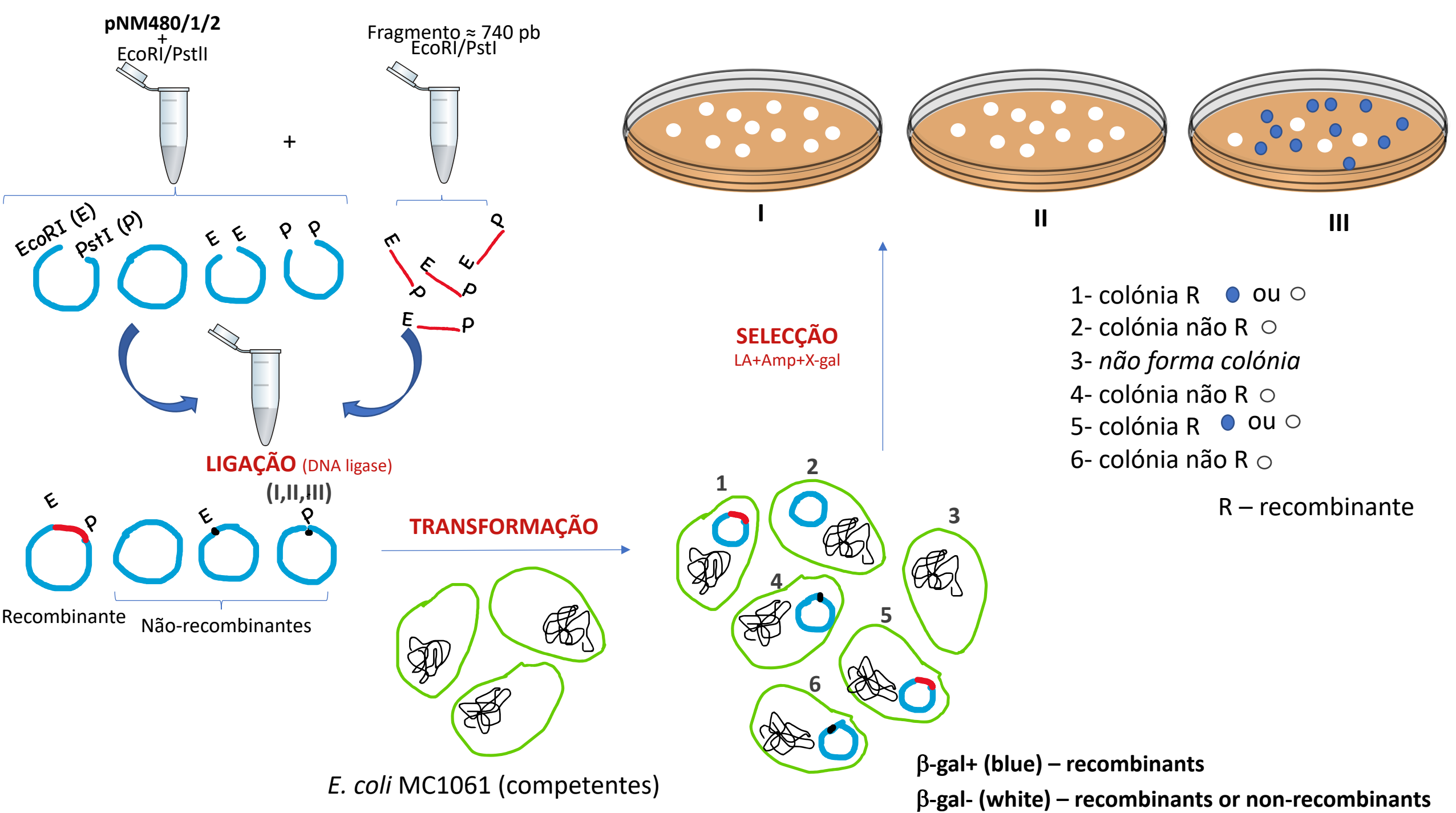
Que quantidades e qual a relação molar de vector vs inserto devemos utilizar para estabelecer uma **mistura de ligação** (criar novas construções moleculares)?

3 construções diferentes:

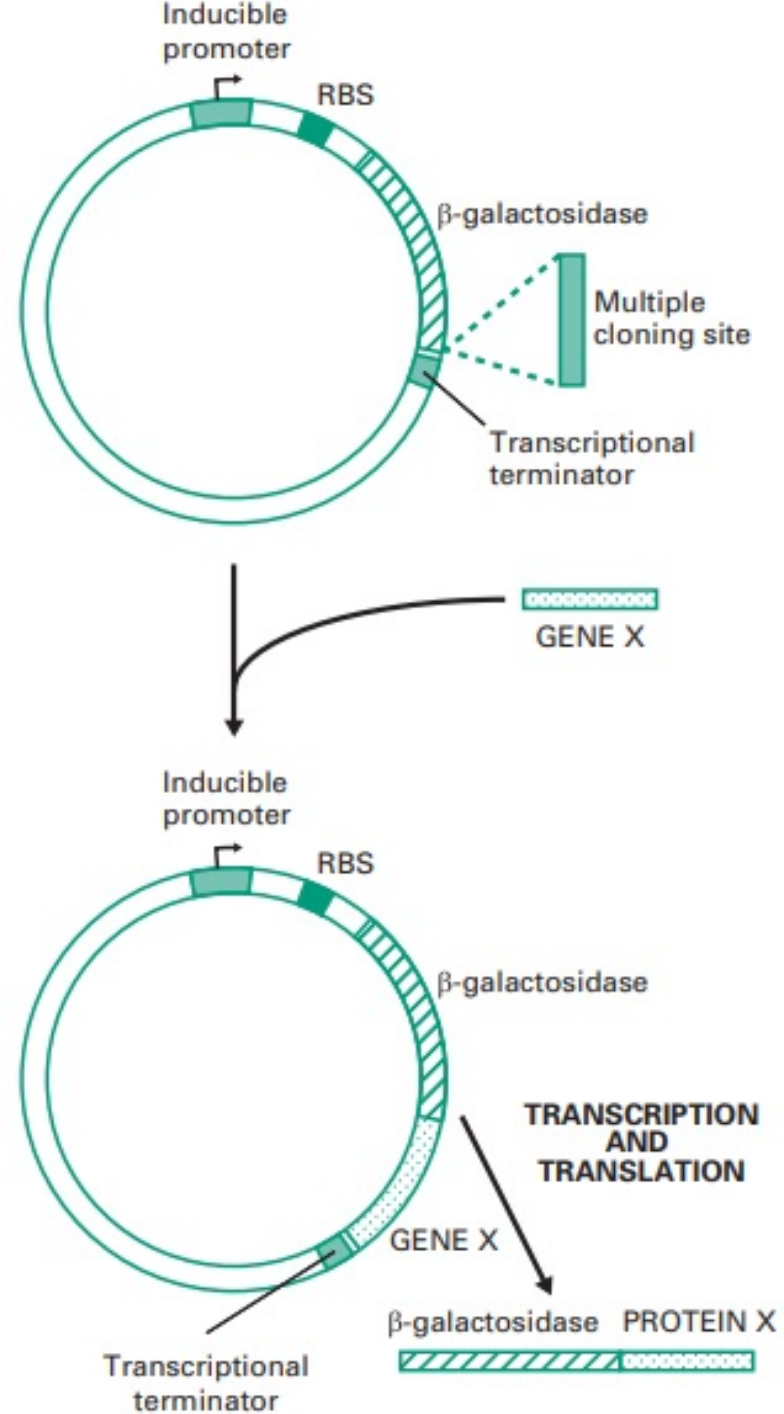
I - pNM480 E/P + fragmento E/P de ≈ 740 pb

II - pNM481 E/P + fragmento E/P de ≈ 740 pb

III - pNM482 E/P + fragmento E/P de ≈ 740 pb

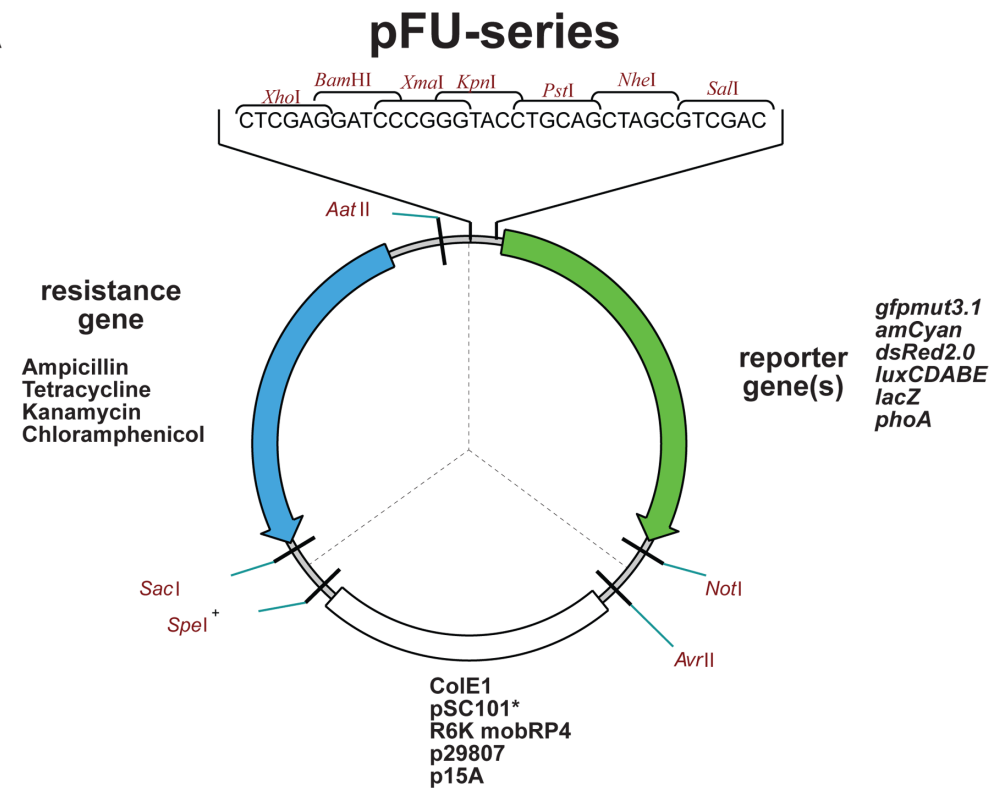


Translational fusion



Transcription and translational fusion

A



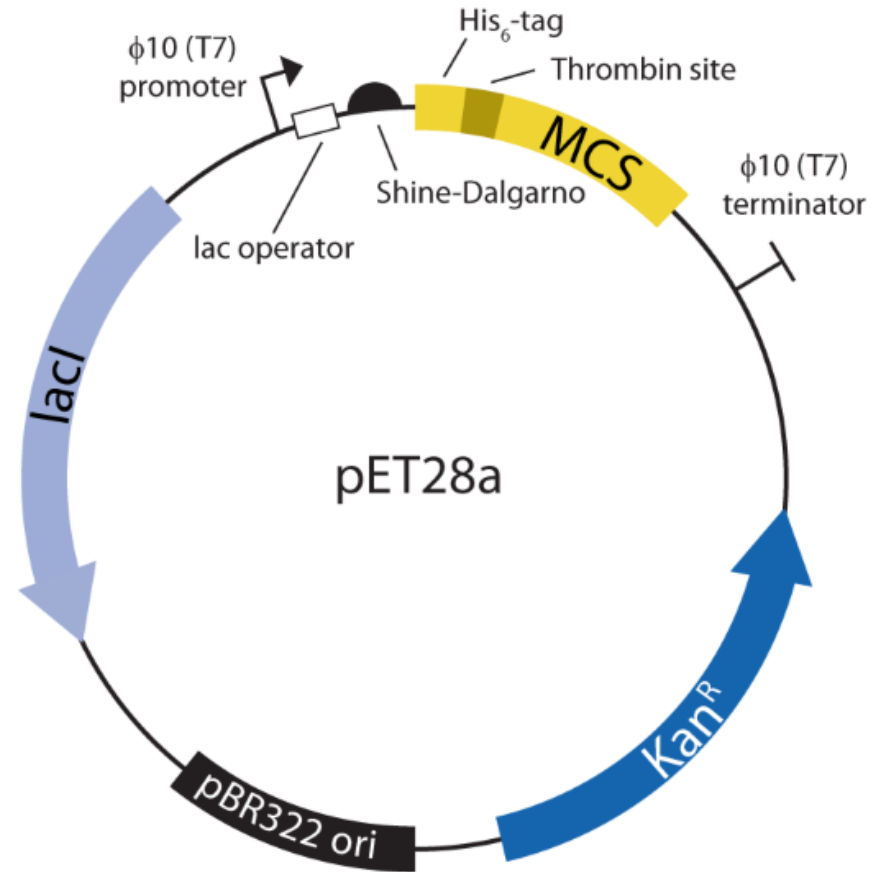
B

vector name	vector backbone	reporter gene	resistance cassette	promoter
pFU31	ColE1	<i>gfpmut3.1</i>	Ampicillin	-
pFU34	ColE1	<i>rbs-gfpmut3.1</i>	Ampicillin	-
pFU35	ColE1	<i>luxCDABE</i>	Ampicillin	-
pFU36	ColE1	<i>rbs-luxCDABE</i>	Ampicillin	-
pFU61	ColE1	<i>lacZ</i>	Ampicillin	-
pFU62	ColE1	<i>rbs-lacZ</i>	Ampicillin	-
pFU47	ColE1	<i>dsRed2</i>	Ampicillin	-
pFU64	ColE1	<i>rbs-dsRed2</i>	Ampicillin	-
pFU78	ColE1	<i>amCyan</i>	Ampicillin	-
pFU81	ColE1	<i>rbs-amCyan</i>	Ampicillin	-
pFU84	pSC101*	<i>phoA</i>	Ampicillin	-
pFU86	pSC101*	<i>rbs-phoA</i>	Ampicillin	-
pFU53	pSC101*	<i>luxCDABE</i>	Ampicillin	-
pFU54	pSC101*	<i>rbs-luxCDABE</i>	Ampicillin	-
pFU95	ColE1	<i>rbs-gfpmut3.1</i>	Ampicillin	<i>PgapA</i>
pFU166	p29807	<i>rbs-luxCDABE</i>	Ampicillin	<i>PgapA</i>
pFU168	ColE1	<i>rbs-gfpmut3.1</i>	Tetracycline	-
pFU57	p29807	<i>gfpmut3.1</i>	Ampicillin	-
pFU69	ColE1	<i>rbs-gfpmut3.1</i>	Kanamycin	-
pFU72	R6K mobRP4	<i>luxCDABE</i>	Ampicillin	-
pFU163	p15a	<i>rbs-gfpmut3.1</i>	Ampicillin	-
pFU98	pSC101*	<i>rbs-luxCDABE</i>	Chloramphenicol	-
pFU99	pSC101*	<i>rbs-lacZ</i>	Chloramphenicol	-

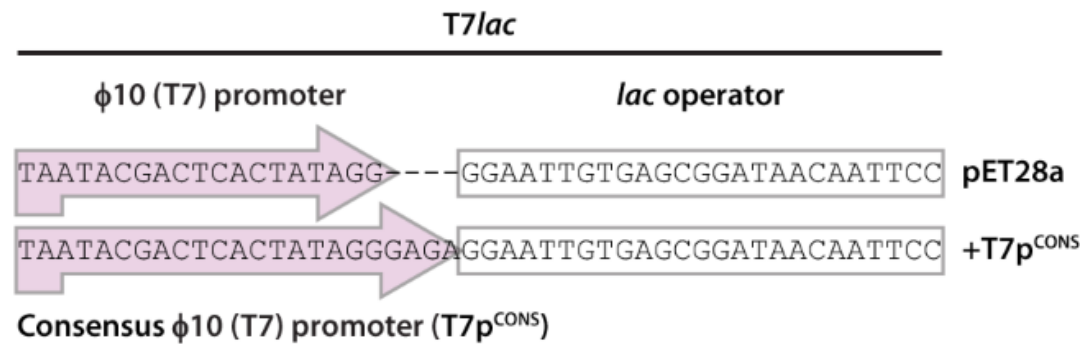
Applications

Translational fusion

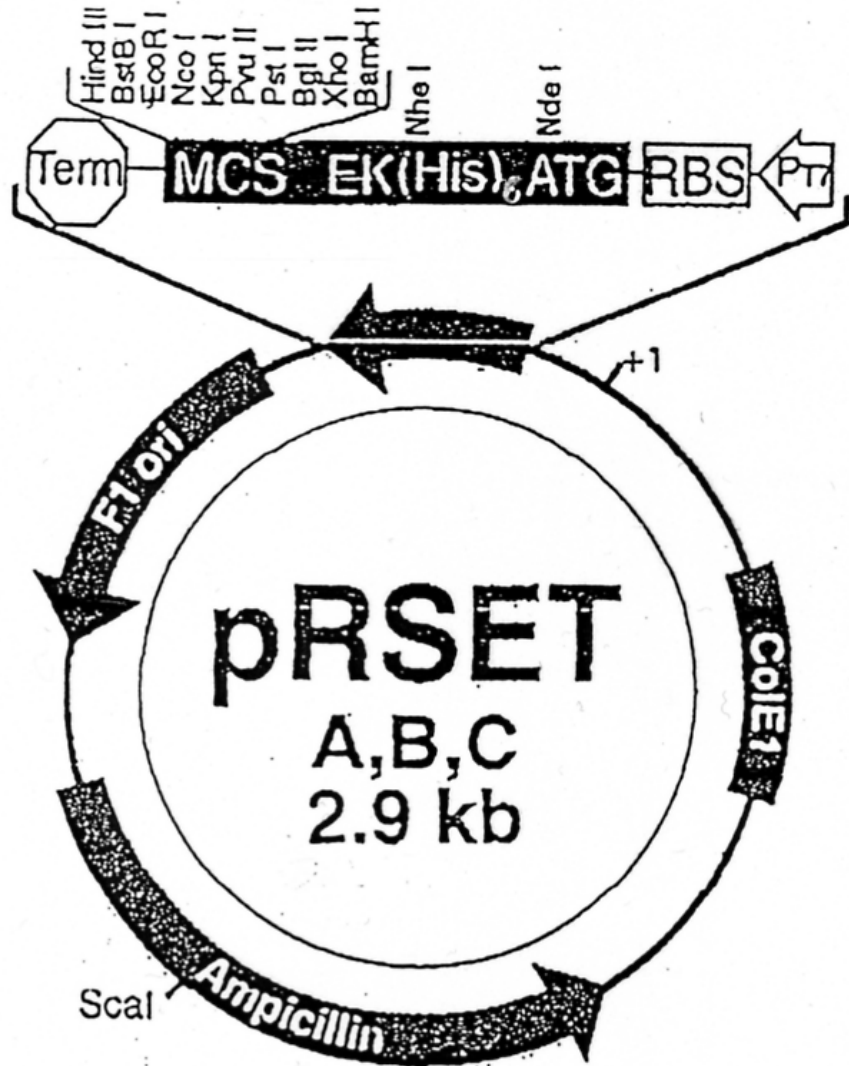
a



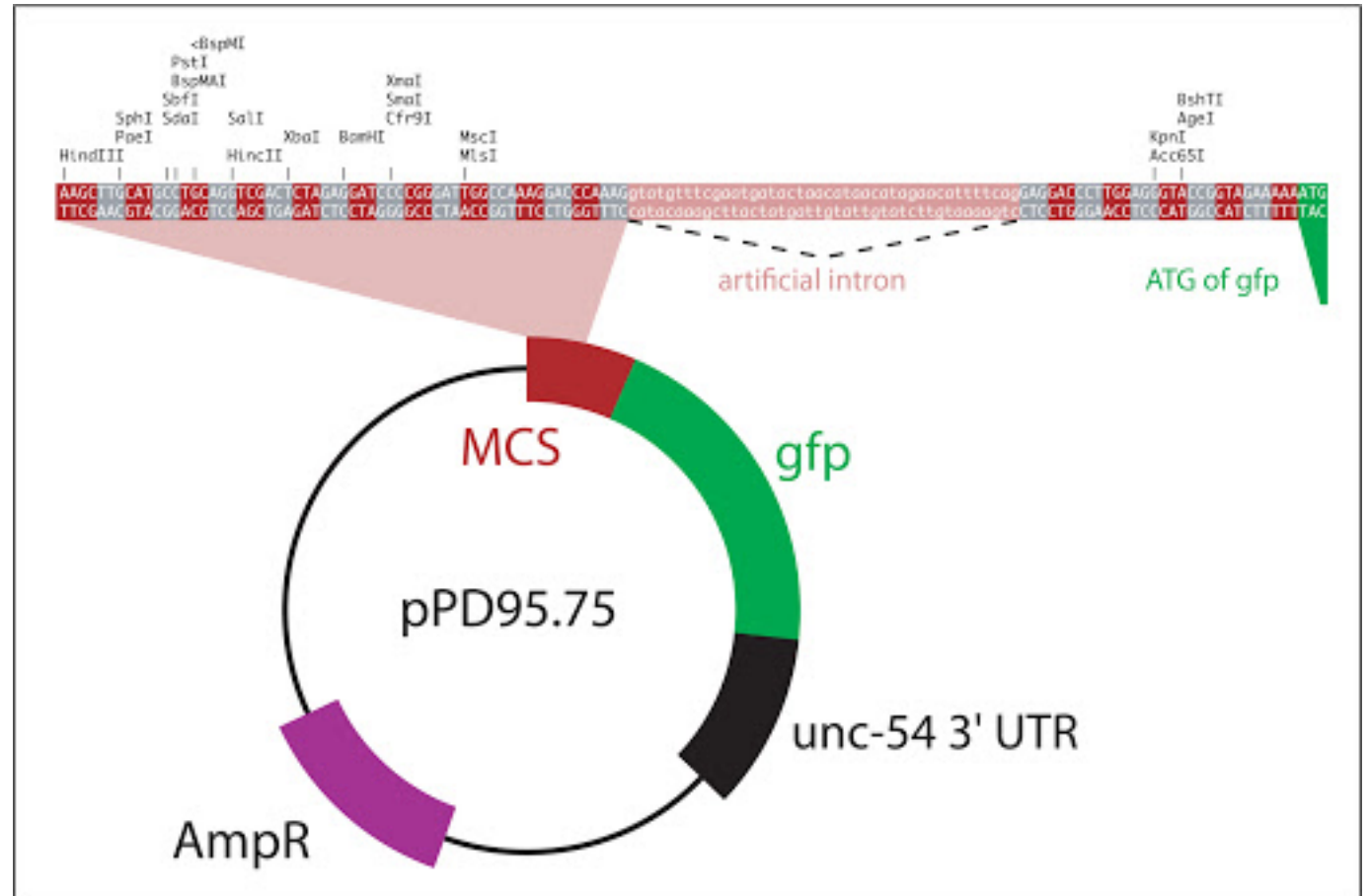
b



Translational fusion



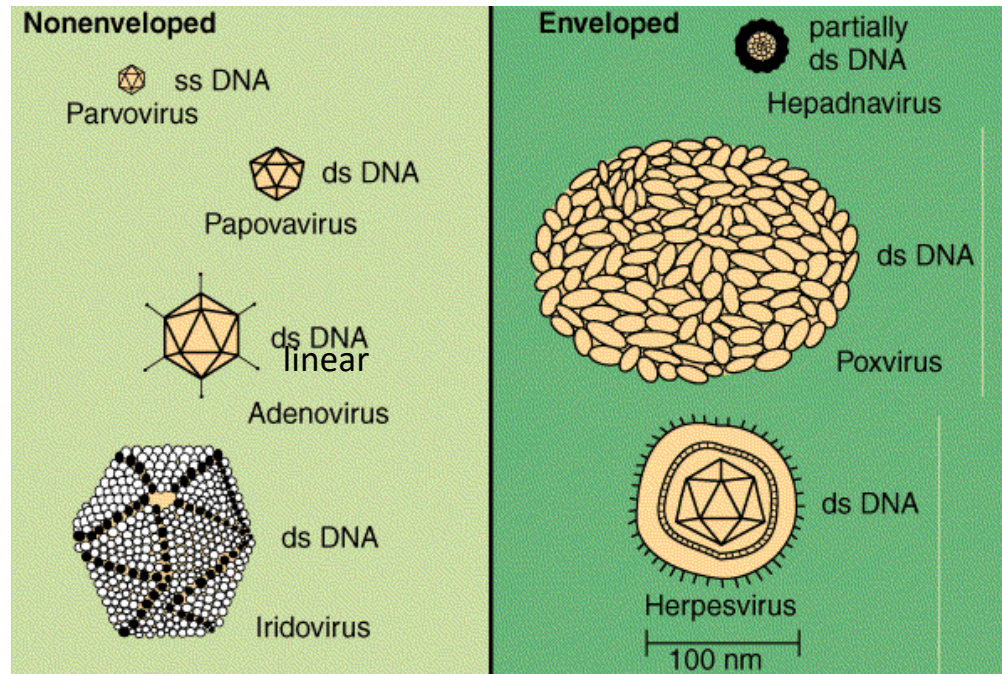
Translational fusion



http://www.wormbook.org/chapters/www_reporterfusions/reporterfusions.html

[Addgene](#)

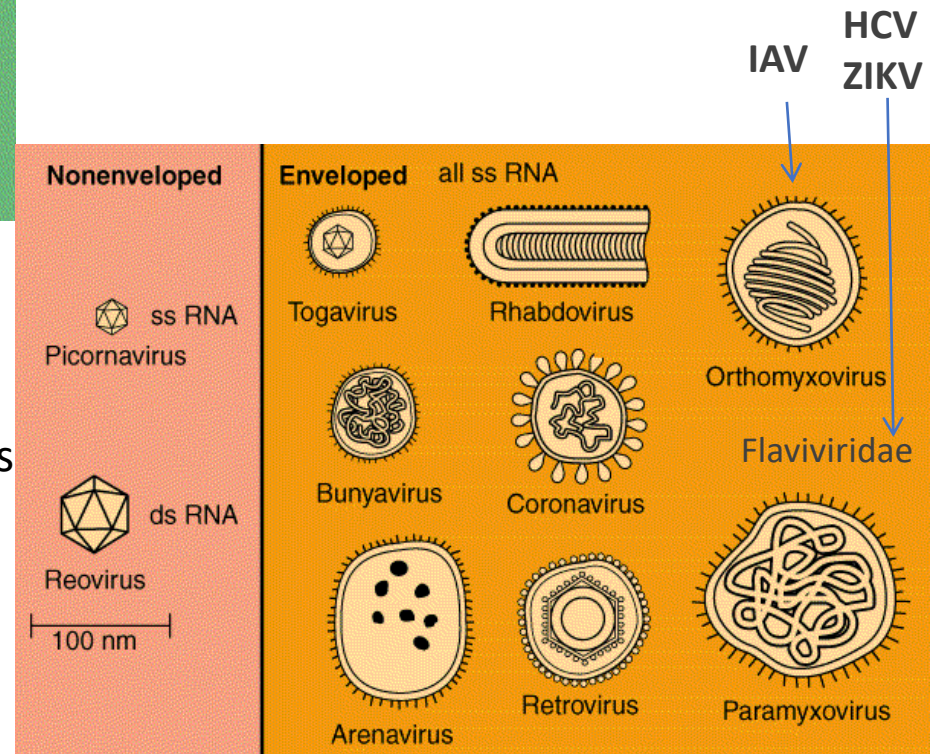
Animal virus diversity



Most are smaller than prokaryotic cells
(0.02-0.3 μm) *E. coli* (0.5 x 2 μm)

The type of nucleic acid is irrelevant to the shape and size of the genome

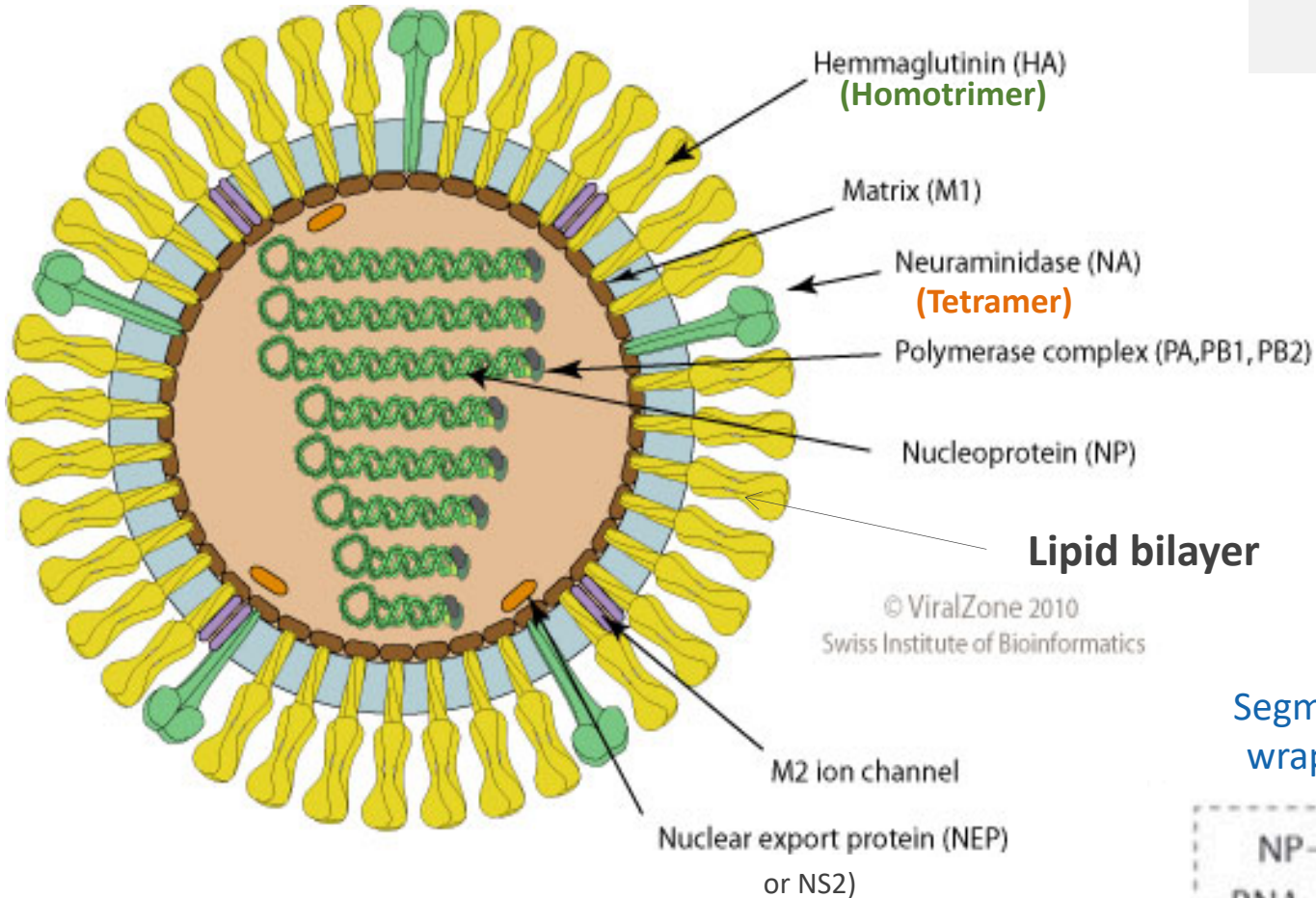
- **Plant** and **bacterial** cells are surrounded by a cell wall outside the plasma membrane; **so few enveloped virus** are known in these type of cells
- Plant viruses tend to have ss RNA genomes



Influenza A virus (IAV)

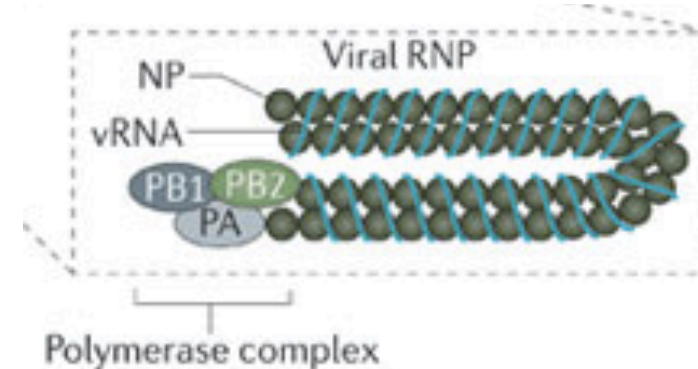
Envelope

- Lipid bilayer
- Viral transmembrane proteins
 - . HA (80%),
 - . NA (17%),
 - . M2 (16-20 mol/virion)



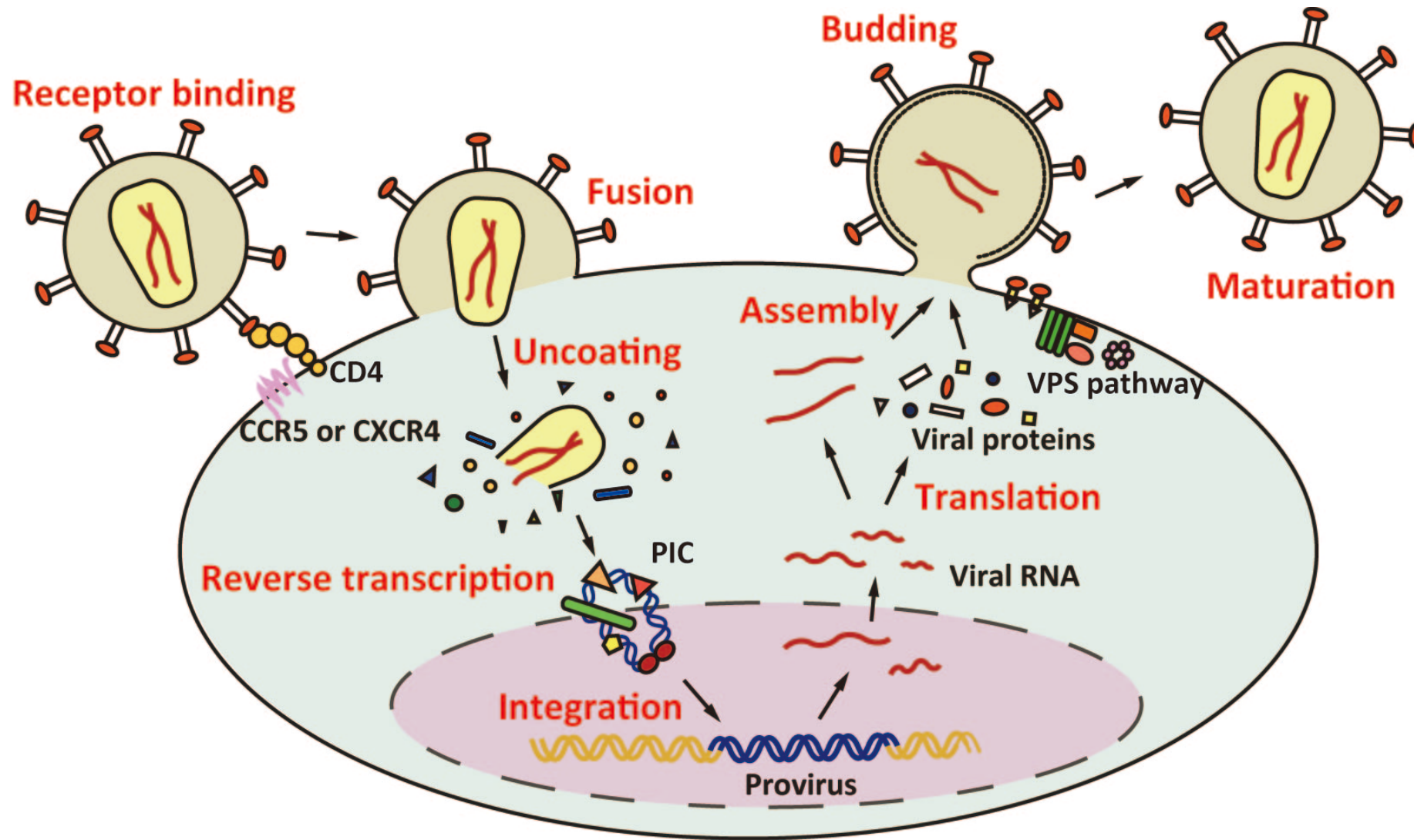
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/6.html

Segmented ssRNA(-) linear genome wraps around NP (nucleoprotein)



polymerase acidic protein (PA)
polymerase basic protein 1 (PB1)
polymerase basic protein 2 (PB2)

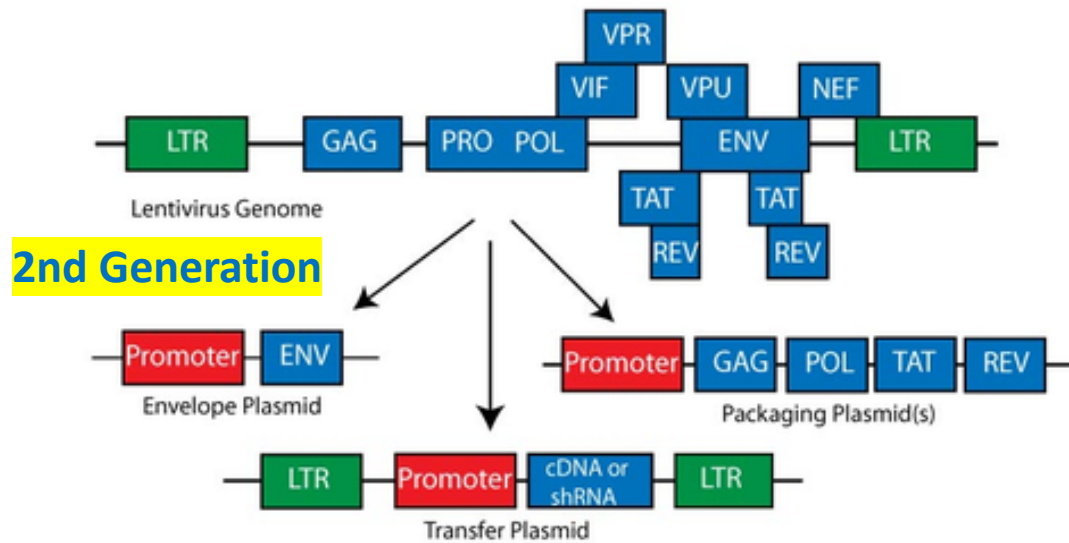
HIV-1 replication



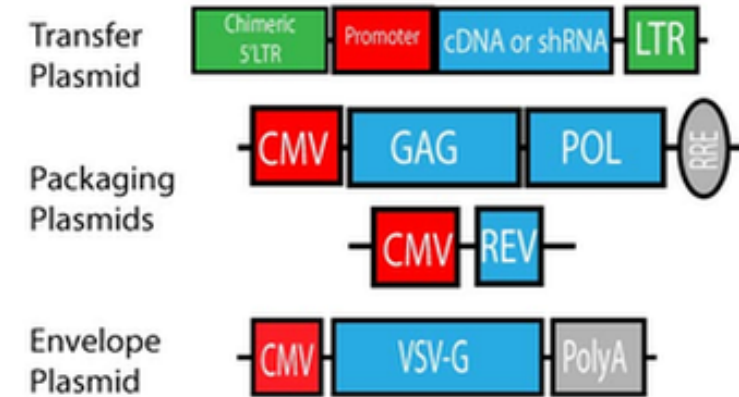
Integrated viral DNA, called the provirus, serves as a transcription template for the synthesis of viral mRNA and genomic RNA

[Lentiviral Vector System](#)

Lentiviral components and 2nd and 3rd generation of lentiviral vectors



3rd Generation



Gag - Matrix, Capsid, and Nucleocapsid components

Rev - Binds to the Rev Response Element (RRE) within unspliced and partially spliced transcripts to facilitate nuclear export

REV - Binds to the Rev Response Element (RRE) within unspliced and partially spliced transcripts to facilitate nuclear export

TAT - Trans-activator; binds TAR to activate transcription from the LTR promoter

5'LTR - Acts as an RNA pol II promoter

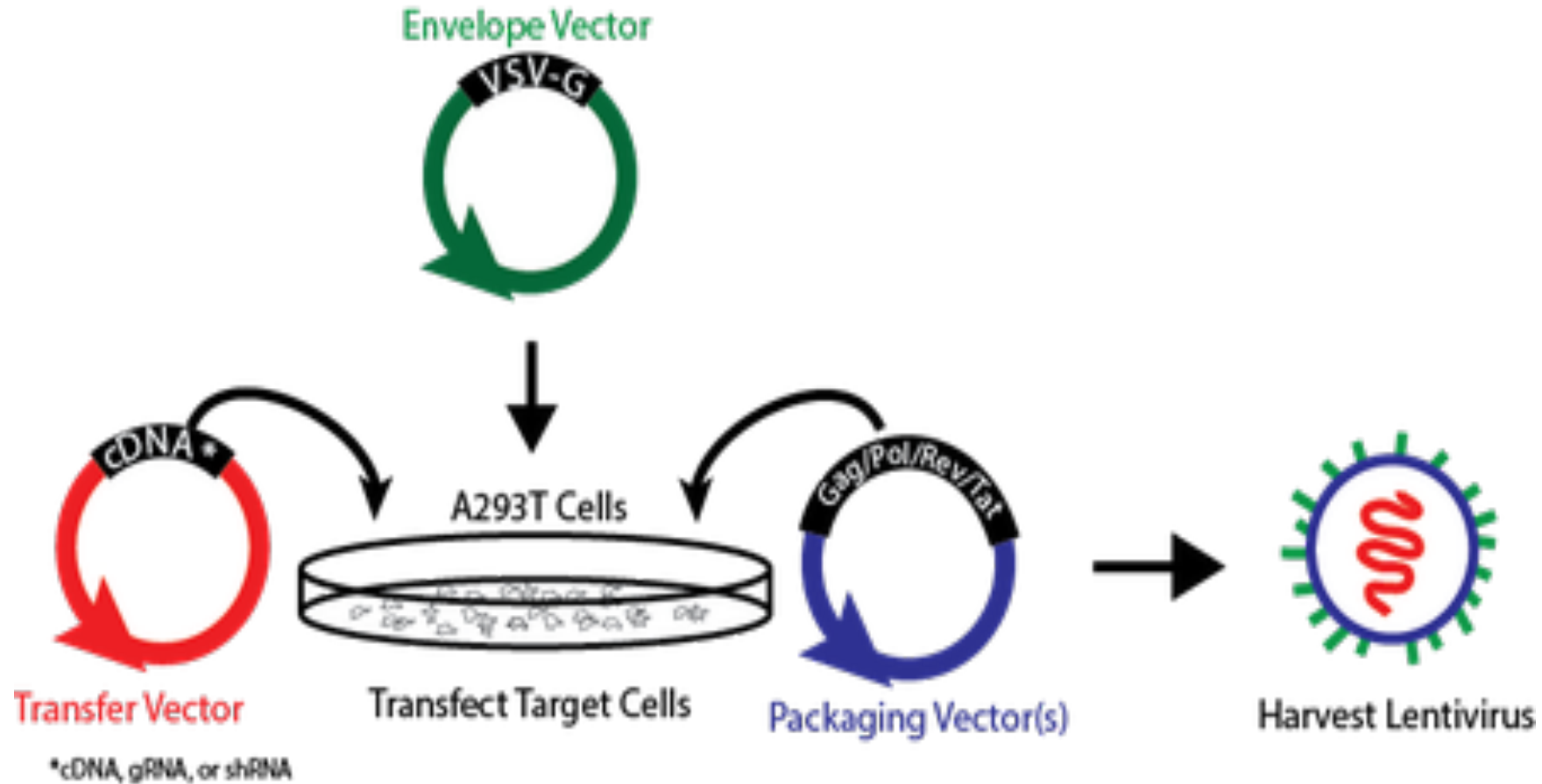
3'LTR - Terminates transcription started by 5' LTR by the addition of a poly A tract

Viral vectors production

Ex. Lentiviral vectors (2nd generation plasmids)

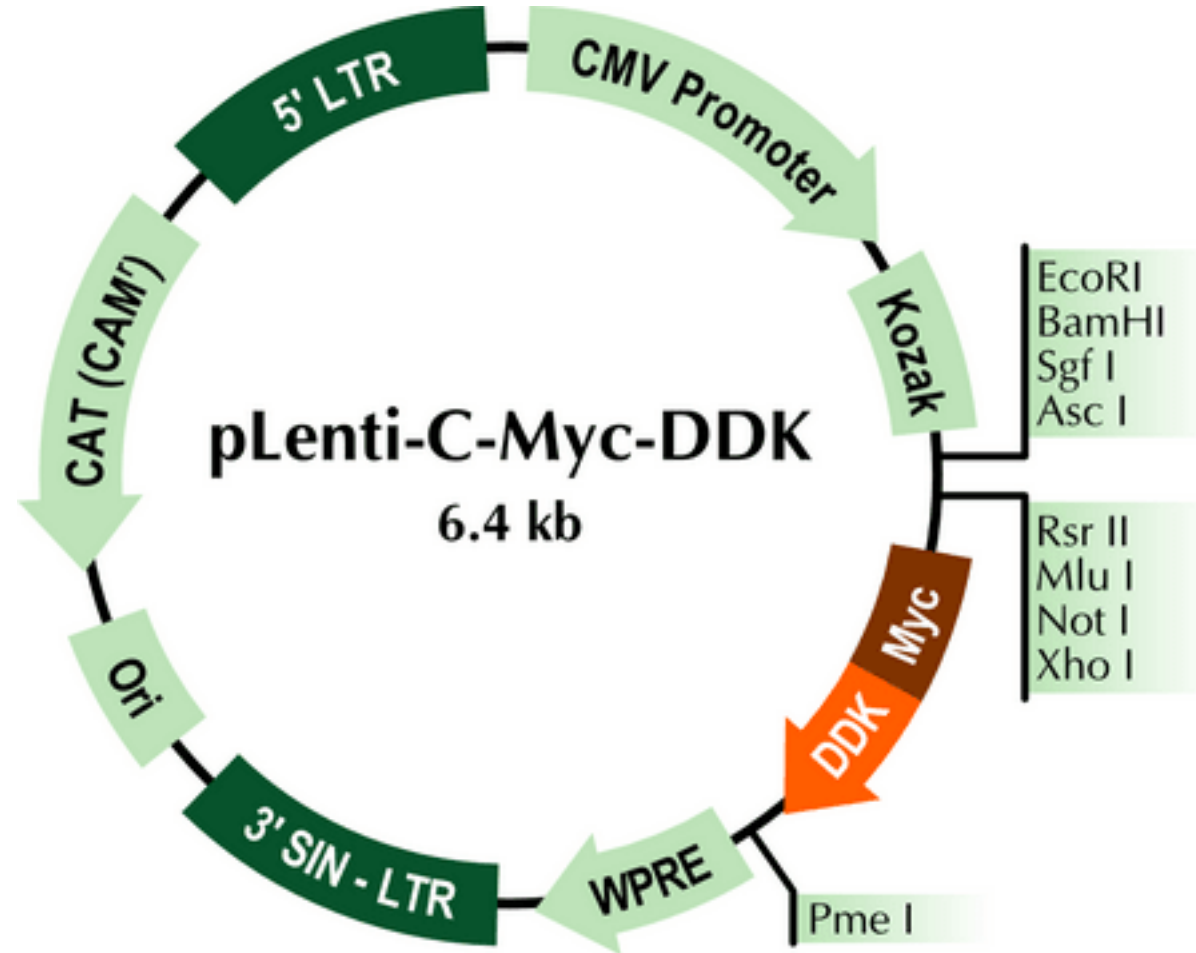
Co-transfection of three essential ingredients:

- the lentiviral packaging vector
- the plasmid coding for an envelope
- the transfer vector including the gene of interest



Viral vectors

Ex. Lentivirus vectors



WPRE – Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; sequence that **stimulates the expression of transgenes** via increased nuclear export

Myc – tag sequences

DDK – tag sequences

[ORIGENE](#)

A

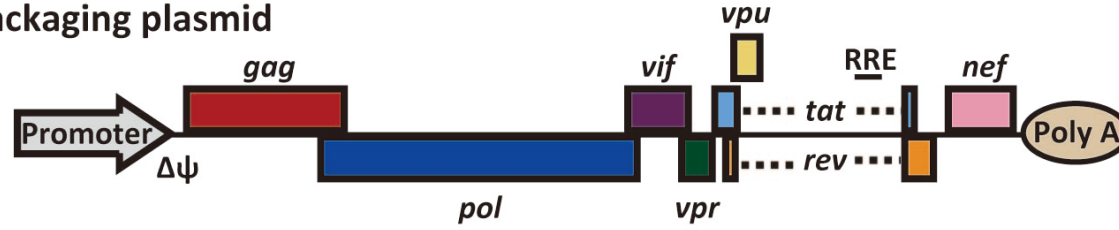
i) Transfer vector plasmid



iii) Envelope expressing plasmid



ii) Packaging plasmid

**B**

i) Transfer vector plasmid



iii) Envelope expressing plasmid



ii) Packaging plasmid

**C**

i) Transfer vector plasmid



iii) Envelope expressing plasmid



ii) Packaging plasmid



iv) Rev expressing plasmid



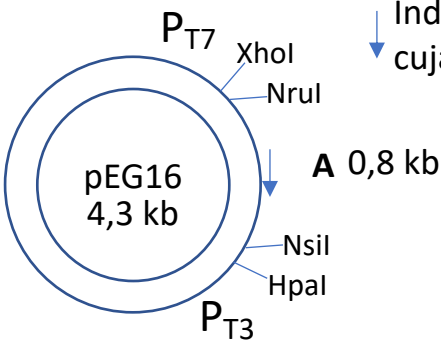
When sub-cloning

Common enzymes

Isoschizomers

Compatible cohesive ends

1- Considere que pretende subclonar, no vector pUC18, o fragmento A de 0,8 kb contido plasmídio pEG16 abaixo representado.



Indica o sentido da transcrição do gene A, cuja cadeia codificante é a da cadeia de fora

a) Com os dados fornecidos, que locais de restrição de pEG16 e de pUC18 escolheria para realizar esta clonagem? Justifique a resposta.

b) De acordo com as enzimas que escolheu, como confirmaria posteriormente a presença do inserto no clone recombinante? Seja o mais preciso(a) possível, mas sem necessidade de uma resposta longa.

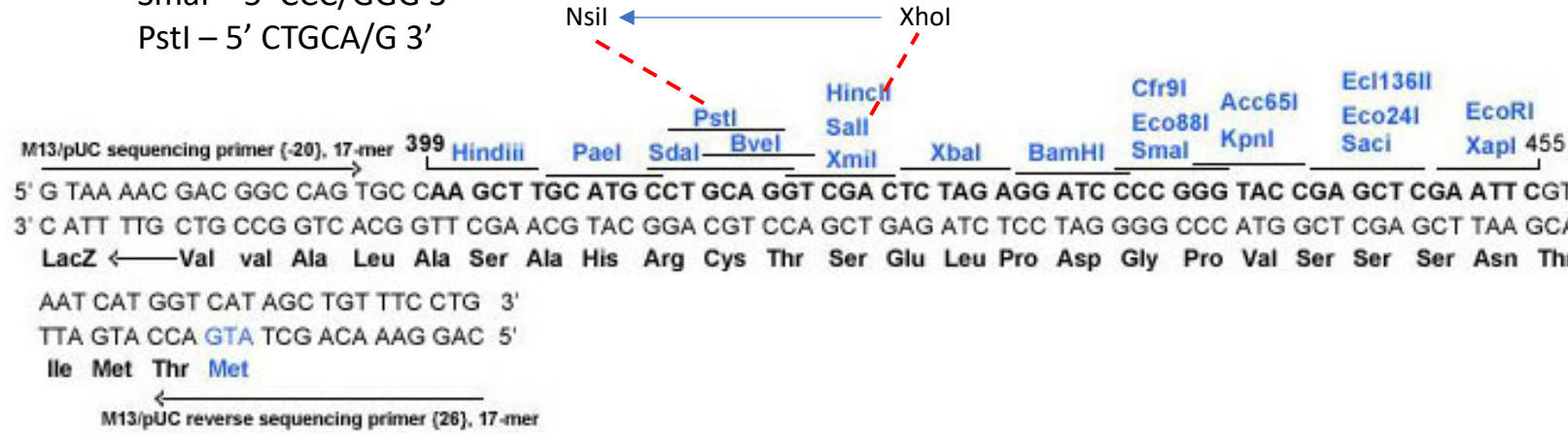
Locais de corte no plasmídio pEG16

- XhoI - 5' C/TCGAG 3' (compatível com Sall)
- NruI - 5' TCG/CGA 3'
- NsiI - 5' ATGCA/T 3' (compatível com PstI)
- HpaI - 5' GTT/AAC 3'

Locais de corte no polylinker de pUC18

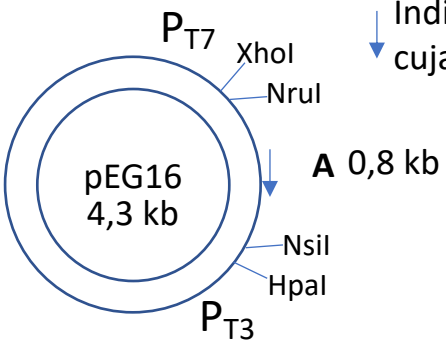
- Sall - 5' G/TCGAC 3'
- SmaI - 5' CCC/GGG 3'
- PstI - 5' CTGCA/G 3'

Nota: A barra indica o local de corte na sequência de reconhecimento.



- a) XhoI (pEG16) // Sall (pUC18)
NsiI (pEG16) // PstI (pUC18)
orientação gene A ficará a ser a mesma de lacZ
- b) Ex. HindIII/XbaI que ladeiam os locais PstI e Sall

1- Considere que pretende subclonar, no vector pUC18, o fragmento A de 0,8 kb contido plasmídio pEG16 abaixo representado.



Indica o sentido da transcrição do gene A, cuja cadeia codificante é a da cadeia de fora

a) Com os dados fornecidos, que locais de restrição de pEG16 e de pUC18 escolheria para realizar esta clonagem? Justifique a resposta.

b) De acordo com as enzimas que escolheu, como confirmaria posteriormente a presença do inserto no clone recombinante? Seja o mais preciso(a) possível, mas sem necessidade de uma resposta longa.

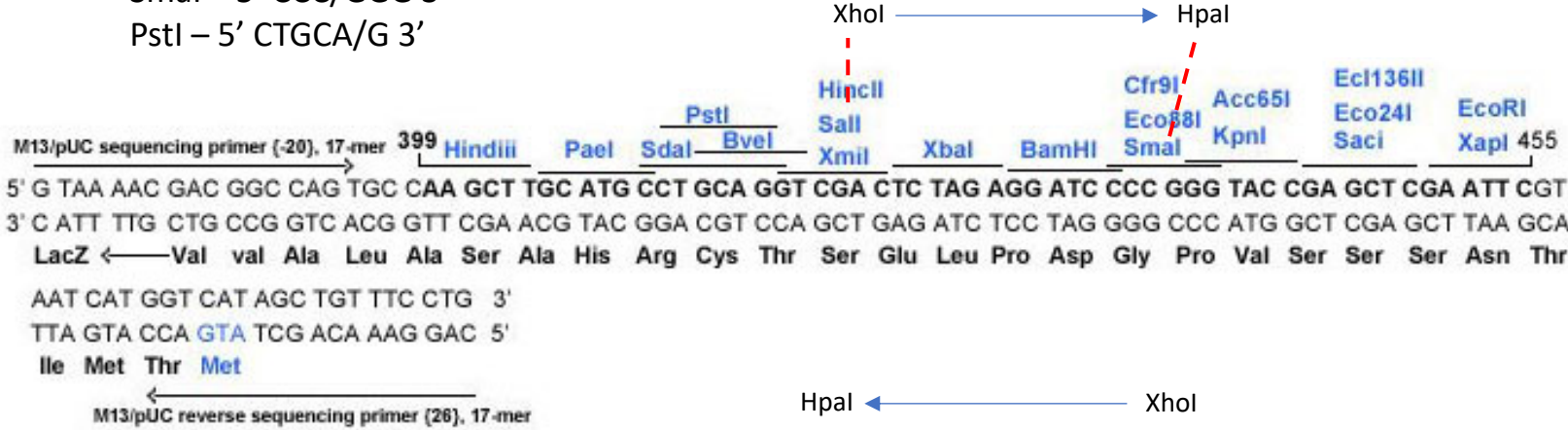
Locais de corte no plasmídio pEG16

- XhoI - 5' C/TCGAG 3' (compatível com Sall)
- NruI - 5' TCG/CGA 3'
- NsiI - 5' ATGCA/T 3' (compatível com PstI)
- HpaI - 5' GTT/AAC 3'

Nota: A barra indica o local de corte na sequência de reconhecimento.

Locais de corte no polylinker de pUC18

- Sall - 5' G/TCGAC 3'
- SmaI - 5' CCC/GGG 3'
- PstI - 5' CTGCA/G 3'



- a) XhoI (pEG16) // Sall (pUC18)
NsiI (pEG16) // PstI (pUC18)
orientação gene A ficará a ser a mesma de *lacZ*
- b) Ex. HindIII/XbaI que ladeiam os locais PstI e Sall

- a) XhoI (pEG16) // Sall (pUC18)
HpaI (pEG16) // SmaI (pUC18)
a orientação gene A fica invertida/oposta à de *lacZ*
- b) Ex. HindIII/RcoRI que ladeiam os locais Sall e SmaI

Resumo das clonagens possíveis e suas principais características que, dependendo do objetivo, nos poderão a levar a escolher uma e não outra.

DIGESTÕES ENZIMÁTICAS

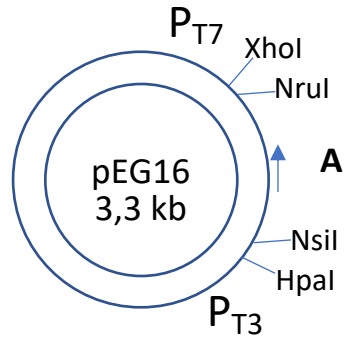
pEG16	pUC18	
XhoI	Sall	Clonagem dirigida
NsiI	PstI	Orientação gene A ficará a ser a mesma de <i>lacZ</i> NÃO A ESTRATÉGIA IDEAL POIS OS LOCAIS DE CORTE NO VECTOR FICAM MUITO PRÓXIMOS
XhoI	Sall	Clonagem dirigida
HpaI	SmaI	Orientação gene A fica oposta/invertida em relação a <i>lacZ</i> OK
NruI	SmaI	Clonagem dirigida
NsiI	PstI	Orientação gene A ficará a ser a mesma de <i>lacZ</i> OK
NruI	SmaI	Clonagem não-dirigida e de extremidades cegas (menos eficiente que uma clonagem não dirigida envolvendo extremidades coesivas) Deverá obter-se os dois clones diferentes com as duas possíveis orientações do gene A, relativamente a <i>lacZ</i>
HpaI		

NOTAS: Atendendo a que o vector pUC18 é um vector adequado à clonagem de segmentos de DNA, em que se tira unicamente partido da α -complementação para seleção de recombinantes, a orientação do fragmento na clonagem é irrelevante. Assim escolheria as alternativas 2 ou 3 por serem clonagens que envolvem extremidades coesivas.

Se, noutro vector de expressão, a orientação do fragmento clonado fosse importante para que ocorresse expressão génica da informação génica nele contida, teria que escolher a estratégia de clonagem que me colocasse a cadeia a ser transcrita no sentido da transcrição do promotor (no vector)

Problema 8 do Manual de laboratório

8. Considere que pretende subclonar, no vector pUC18, o fragmento A de 0,5 kb contido plasmídio pEG16 abaixo representado.



↑ Indica o sentido da transcrição do gene A,
cuja cadeia codificante é a da cadeia de fora

- Que locais de restrição de pEG16 e de pUC18 são adequados para realizar esta clonagem? Justifique a resposta.
- Represente as sequências nas zonas de junção resultantes da clonagem.
- Como confirmariam a presença do inserto? Justifique a resposta. Poderiam utilizar a enzima *BfaI*?

O plasmídeo pEG16 foi digerido com as enzimas *NotI/HpaI*, nas seguintes condições:

DNA pEG16	5 μ l (500 ng/ μ l)
<i>NruI</i>	0,5 μ l (10 U/ μ l)
<i>HpaI</i>	0,5 μ l (10 U/ μ l)
Tampão 10	4 μ l
H ₂ O MiliQ estéril	30 μ l
	<hr/>
	40 μ l

- Que volume de digestão utilizaria para visualizar o fragmento A e qual a concentração adequada do gel de agarose?
- Como procederia para subclonar o fragmento A num vector de 4,5 kb, se a concentração de vector e inserto purificado fosse, respectivamente, 10 ng/ μ l e 6 ng/ μ l. Refira-se aos volumes e quantidades de DNA vector e inserto a utilizar, indicando também as condições de reacção apropriadas.
- Como faria a selecção de clones recombinantes resultantes da clonagem no vector pUC18? E nos vectores pNM? Justifique a resposta.

Consultar tabela: Compatible cohesive ends and generation of new restriction sites

<https://international.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/compatible-cohesive-ends-and-generation-of-new-restriction-sites>