

# Vectores de expresión y expresión de proteínas recombinantes

Un buen vector de expresión debe

- i) ser adecuado para el sistema u organismo donde se realizaría la transcripción;
  - ii) asegurar la transcripción a ARNm estables, mediante el uso de promotores y potenciadores apropiados;
  - iii) tener secuencias óptimas de iniciación de la transcripción (o sitios de inicio de la transcripción, TSS);
  - iv) contener secuencias de poliadenilación diseñadas para aumentar la vida media, por lo tanto, la estabilidad del ARNm
  - v) mantener el marco de lectura si se va a traducir una proteína de fusión o proteínas con etiquetas;
  - vi) contener secuencias de iniciación de la traducción óptimas y adecuadas para el sistema de traducción (como la secuencias Kozak o RBS, secuencia previa al codón START para una traducción óptima en eucariotas)
- Si la proteína que se traduce tiene que ser secretada, dirigida a una organela, o modificada postraduccionalmente, los motivos de secuencia apropiados (tales como secuencias de localización, secuencias de transporte, fosforilación, etc.) también se deben incorporar a la construcción.
  - En resumen, muchas características deben diseñarse con suficiente antelación para lograr la máxima eficiencia en cada sistema.

# Transcripción y traducción *in vitro*

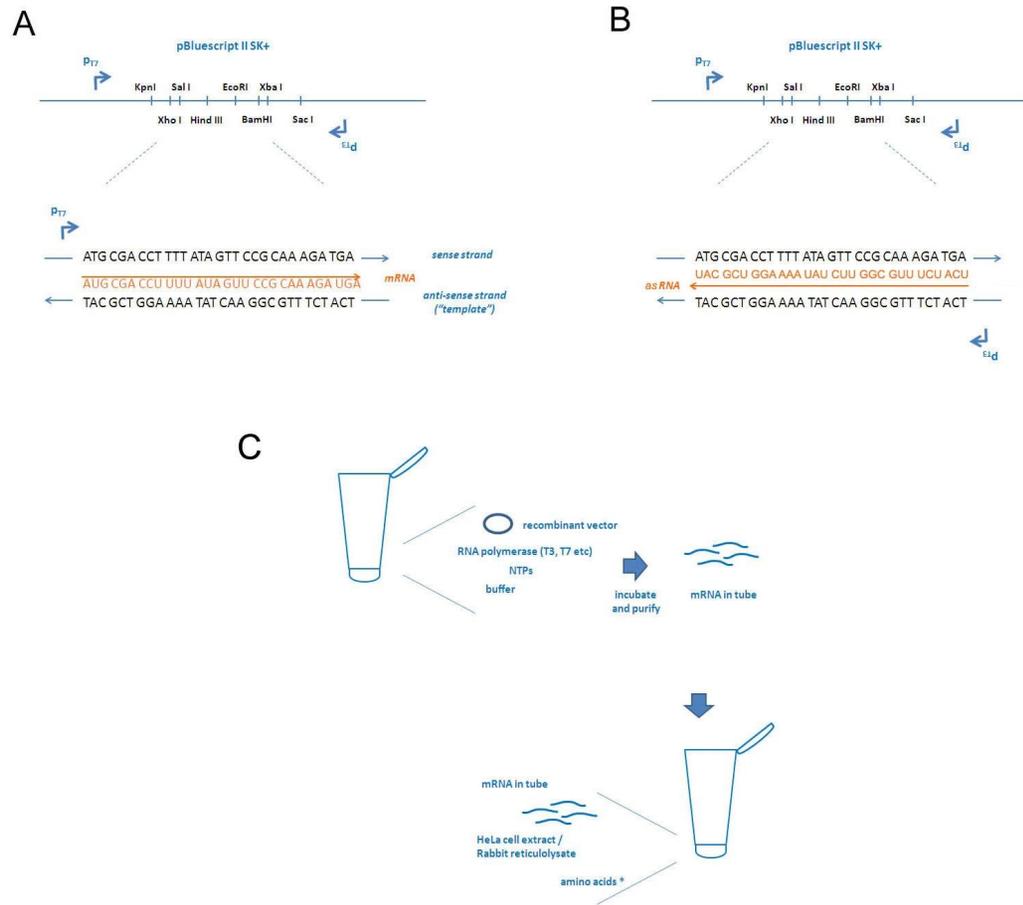
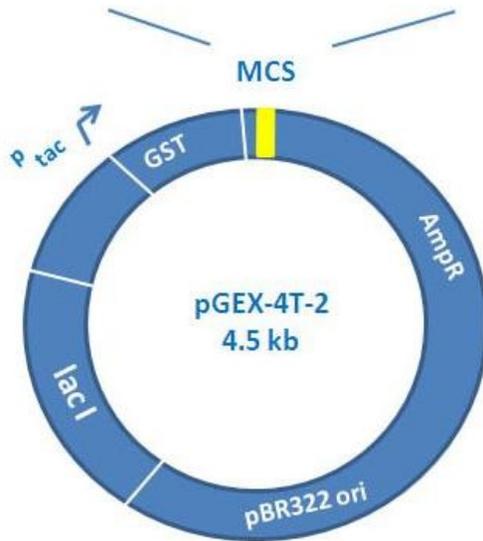
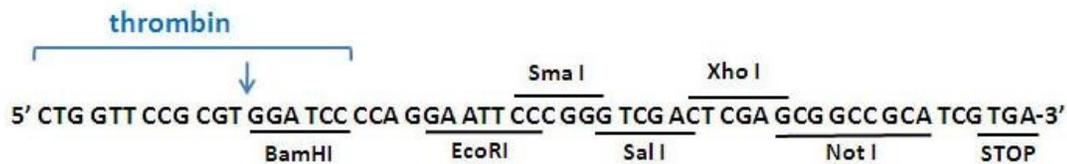


Figura 4.1. Clonado y posterior transcripción y traducción *in vitro*.

(a) el MCS del fagésmdo pBlueScript SK+. Dependiendo de la elección del promotor (T7 o T3), se logra la transcripción sentido o antisentido (b).

(c) Se agrega al vector recombinante la ARN polimerasa del fago (T7 o T3). En el segundo paso (traducción *in vitro*), el producto de ARNm de la 1er reacción se mezclan con lisados celulares (más comúnmente extracto de células HeLa o sistemas basados en extracto de reticulocitos de conejo) y aminoácidos.

# Expresión bacteriana de proteínas.



Secuencia Kozak



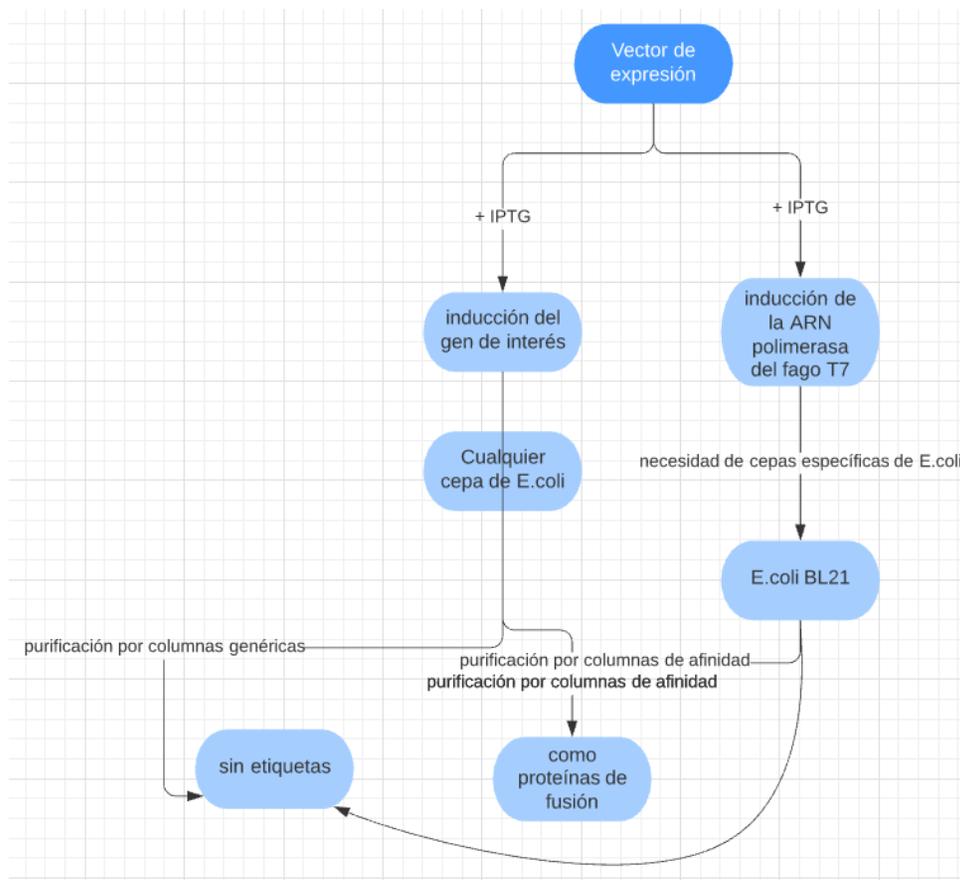
↓ +1 de traducción

Las purinas **A** o **G** en posición -3 y **G** inmediatamente después del codón AUG son las que permiten la óptima iniciación de la traducción

La naturaleza inducible de algunos operones en bacterias se han utilizado para modular la expresión de proteínas bacterianas: algunas de las los plásmidos de expresión bacteriana usan, por ejemplo, el promotor lac del operón lac, o modificaciones del mismo (tac híbrido del promotor lac y del operon del triptófano), para controlar la expresión del CDS del gen clonado. Para la inducción, en lugar de lactosa, se utiliza un análogo de la misma (isopropil-b-D-tiogalactosido, IPTG). (recuerde que la inducción lac se basa en la presencia de un represor regulable en la bacteria huésped: si la bacteria que ha elegido para expresar la proteína tiene un mutación en su gen lacI, que codifica el represor lac, entonces tampoco obtendrá la inducibilidad IPTG!)

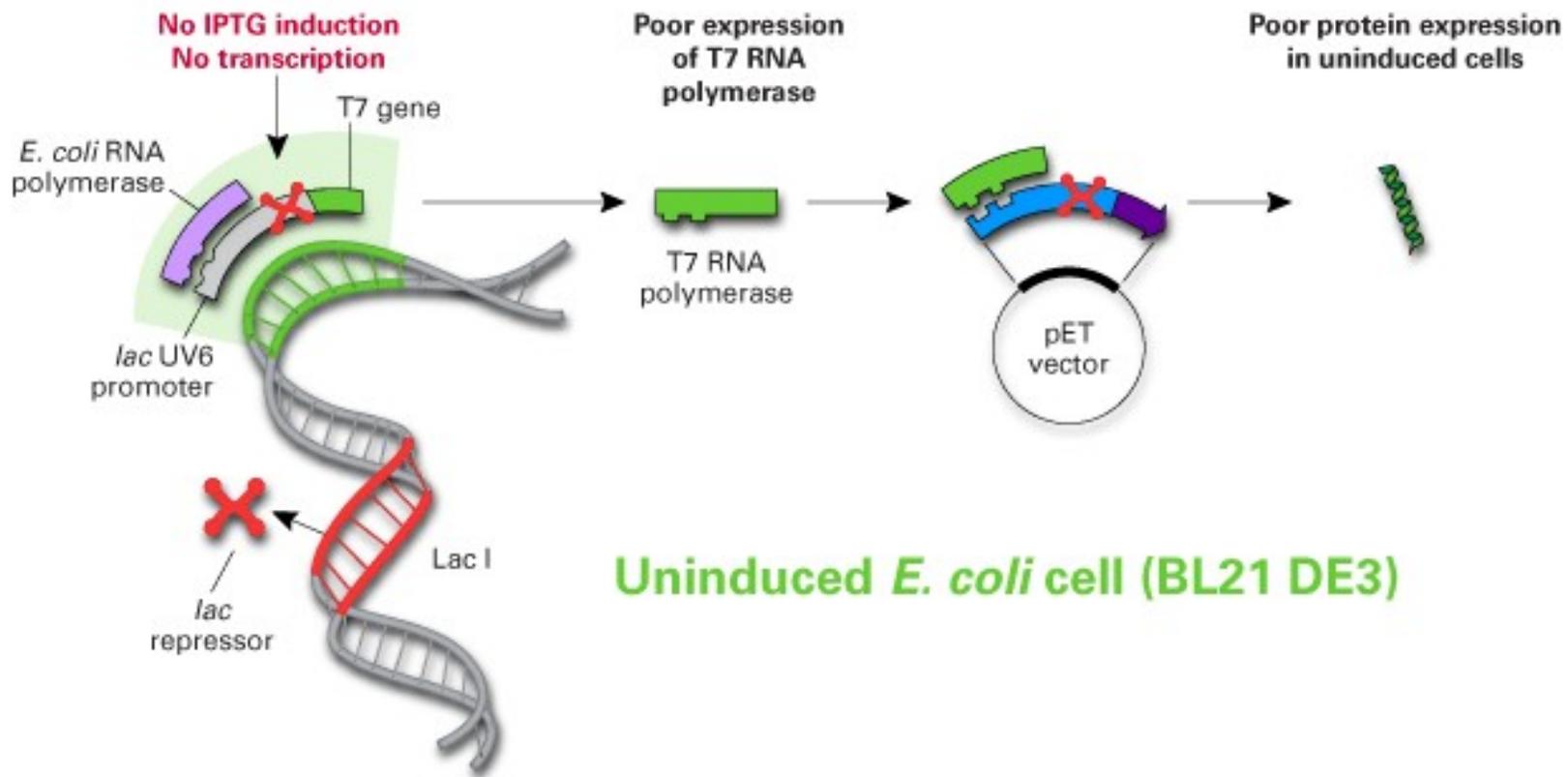
# pGEX 4 T 1 vs pET

Para la expresión de proteínas existen cientos de plásmidos diferentes, cada uno diseñado con propósitos específicos. Sin embargo en su gran mayoría pueden clasificarse de la siguiente manera:



Están los que inducen directamente el gen que se encuentra río abajo del promotor inducible por IPTG y los plásmidos o vectores donde el IPTG induce la ARN polimerasa del fago T7 que está en el cromosoma bacteriano de cepas de E. coli generadas en el laboratorio como la BL21 y todos sus derivados. Estos últimos vectores se conocen con el nombre de pET tienen el promotor dependiente de la T7 río arriba del gen de interés.

# Vectores pET.



# Bacterias

alternativa más barata, rápida y eficiente para expresión de proteínas recombinantes

pero:

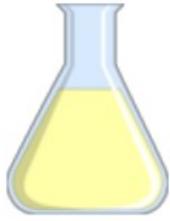
no se forman puentes disulfuro en el citoplasma de E. coli wild-type

bacterias no glicosilan proteínas

proteínas eucariotas sobreexpresadas frecuentemente forman agregados insolubles  
- cuerpos de inclusión



*Jeremy Burgess*



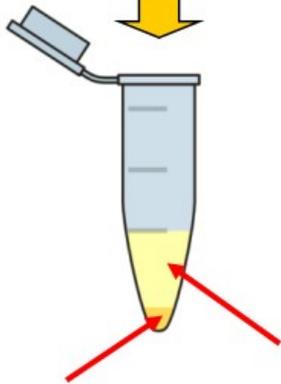
cultivo de bacterias  
(con proteína recombinante inducida)

↓  
centrifugación

↓  
resuspensión en buffer de lisis

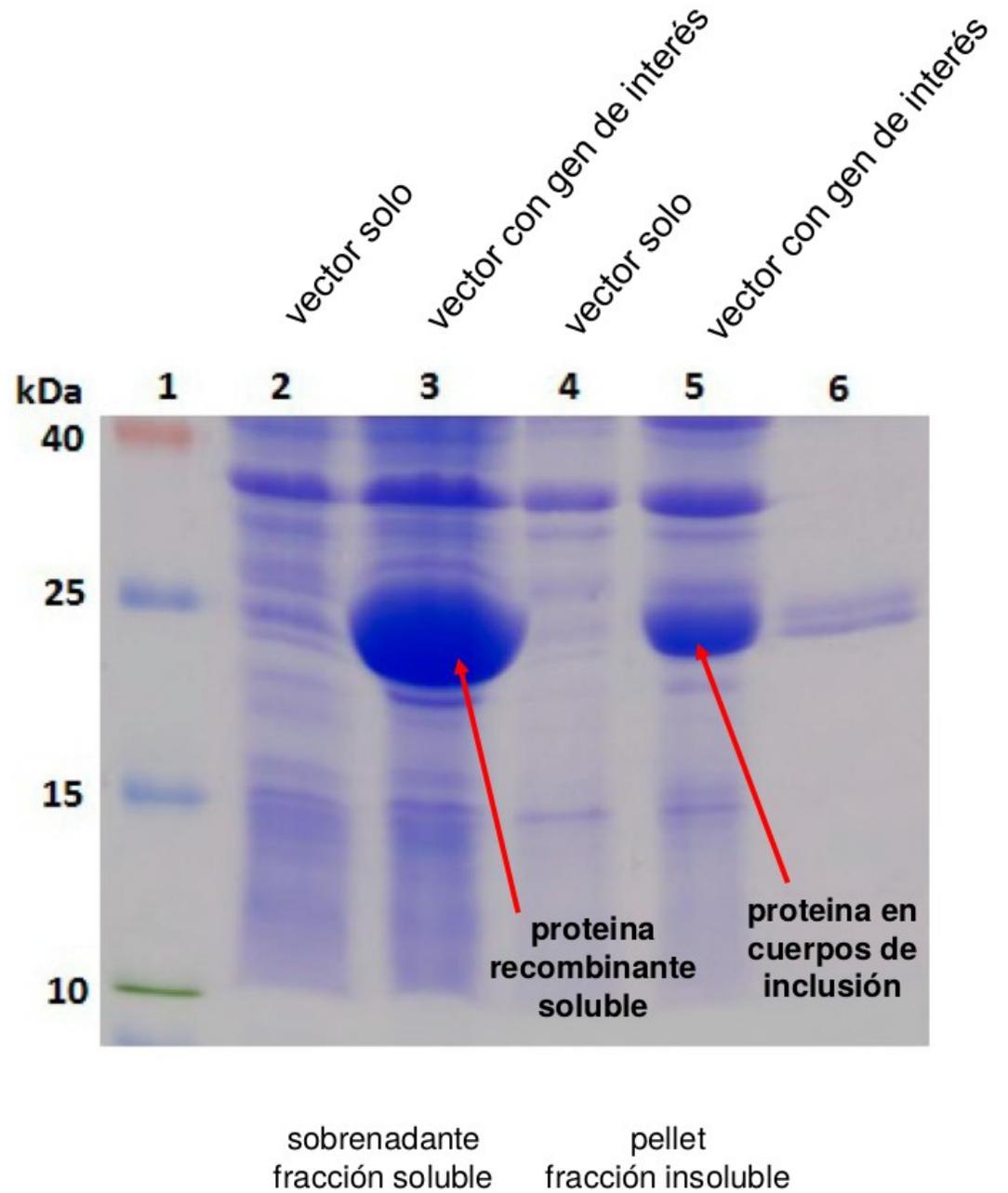
↓  
sonicación  
(lisado de las bacterias)

↓  
centrifugación



fracción insoluble  
(pellet)

fracción soluble



# El repositorio addgene.com

Addgene es un repositorio de plásmidos. Surge por la necesidad de compartir los recursos publicados. Cuando un paper es aceptado es obligación poner a disposición toda la información y reactivos utilizados. Addgene hace el trabajo de mantener y enviar los plásmidos utilizados en los papers por un costo muy inferior al que tiene su producción en el laboratorio. Así que antes de trabajar en el clonado de un gen de interés, lo mejor es ver si no está en addgene.



[Browse Catalog](#) ▾

[Deposit](#) ▾

[Education & Tools](#) ▾

[Help Center](#) ▾



## Browse Addgene's Repository

Browse our collection of over 80,000 plasmids contributed by over 4,000 research labs around the world. If you can't find what you're looking for, contact us at [help@addgene.org](mailto:help@addgene.org).

### Plasmid Collections

Browse our collection of over 80,000 plasmids.

[Bacterial Expression](#)   [Fluorescent Proteins](#)  
[Chemogenetics](#)   [Optogenetics](#)  
[CRISPR](#)   [Viral Plasmids](#)  
[Empty Backbones](#)   [→ View all](#)

### Depositing Scientists and Institutions

Addgene distributes plasmids on behalf of 4,000 research labs from over 900 institutions around the world.

[Depositing Institutions](#)  
[Depositing Scientists](#)  
[Recent Deposits](#)

### Most Requested Items

Learn more about our most highly requested plasmids.

[Blue Flame Awardees](#)  
[Highly Requested Plasmids and Kits](#)

### Browse by Expression System

[Bacteria](#)   [Plant](#)  
[Insect](#)   [Worms](#)  
[Mammalian](#)   [Yeast](#)

### Browse by Species of Gene

[Chicken](#)   [Mouse](#)  
[Fly](#)   [Nematode](#)  
[Frog](#)   [Rat](#)  
[Human](#)   [Zebrafish](#)

### Browse by Vector Type

[AAV](#)   [Luciferase](#)  
[Cre/Lox](#)   [Retroviral](#)  
[CRISPR](#)   [Synthetic Biology](#)  
[Lentiviral](#)

Es momento de realizar un ejercicio.

a) descargue del genbank la secuencia .fasta de su gen de interés (en este caso el gen de la proteína 14-3-3 zeta de humanos).

b) diseñe primers para ORF de la proteína (utilize ORFinder para ubicar el codón START y el STOP). Incluya sitios de restricción según:

NN-EcoRI-ORF-HindIII-NN (NN son dos nucleótidos cualquiera para que la eficiencia de corte por las enzimas sea mayor)

c) obtenga la secuencia del pET24a(+)

d) haga el clonado. Puede utilizar el software NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) o bien descarga la versión gratuita de SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>).

- Aquellos que tengan dificultades se hará una sección de skype, zoom o whiteboard.

# Expresión en levaduras

La levadura es un organismo modelo eucariota muy popular; es unicelular y, por lo tanto, es más fácil de manipular y más fácil de propagar; tiene un perfil de ciclo celular que es muy similar a los eucariotas superiores y, por lo tanto, se usa como modelo para el ciclo celular o estudios de envejecimiento celular; se descifra su genoma (los 12 Mb completos codifican alrededor de 6000 proteínas) y su metabolismo es principalmente conocido, solo por nombrar algunas de las ventajas.

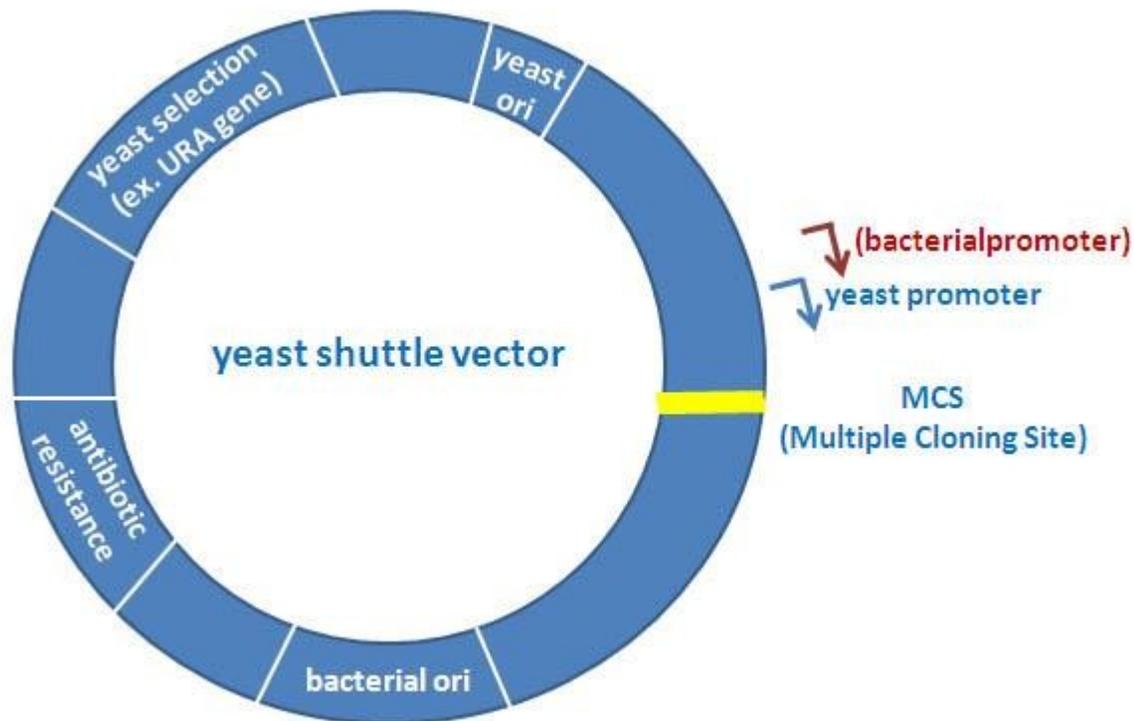


Figura 4.2. Un ejemplo para un vector de levadura, que también podría ser transformado en bacterias (para expresión, ya que hay un promotor para bacterias, que se muestra en rojo). Origen de replicación de levadura (como el 2m ori en 2m plásmidos) se utiliza para mantener establemente el vector sin integración en cromosomas) y el marcador de selección para levaduras (URA). Por otro lado, la selección de antibióticos (como resistencia a la ampicilina) u origen bacteriano de replicación se utilizan para propagación y selección en bacterias.

# Selección en levaduras

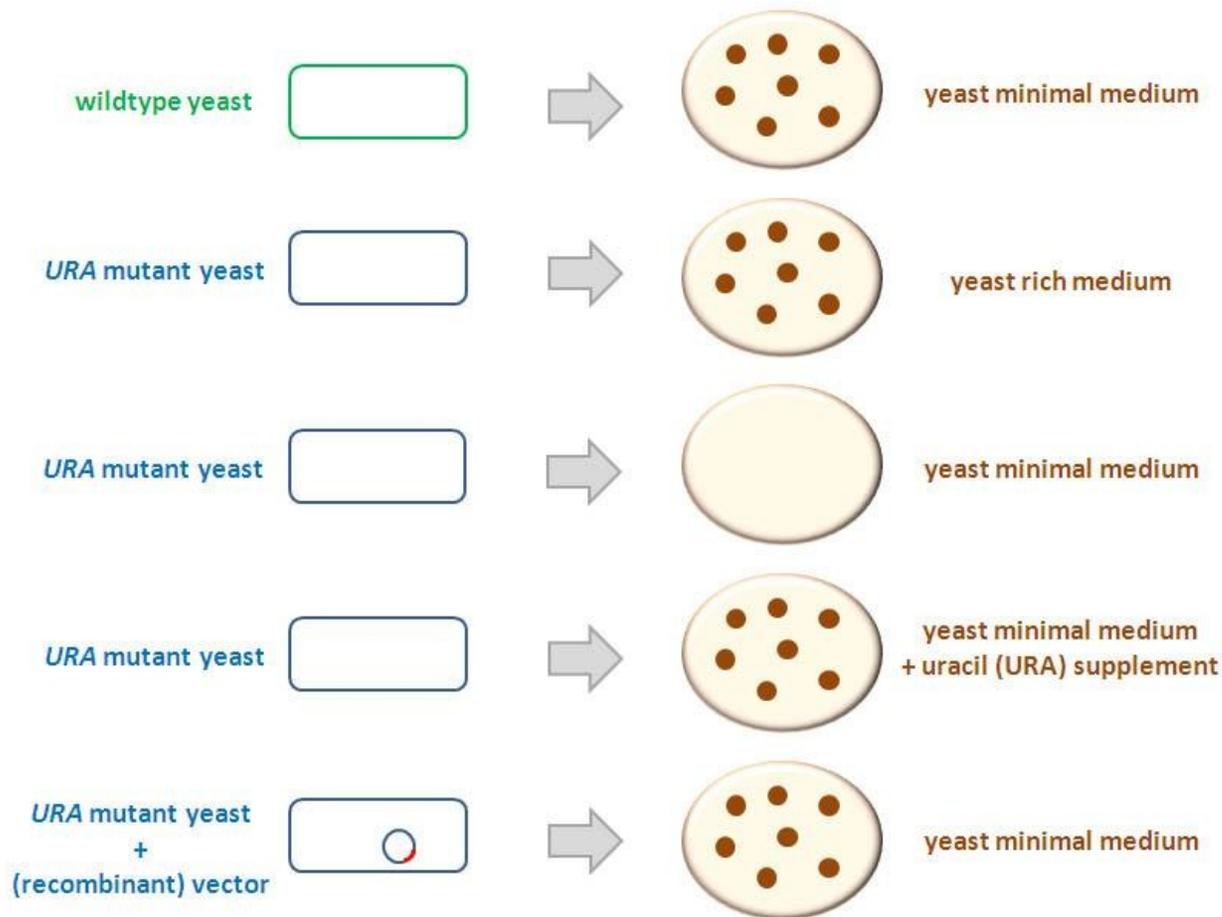
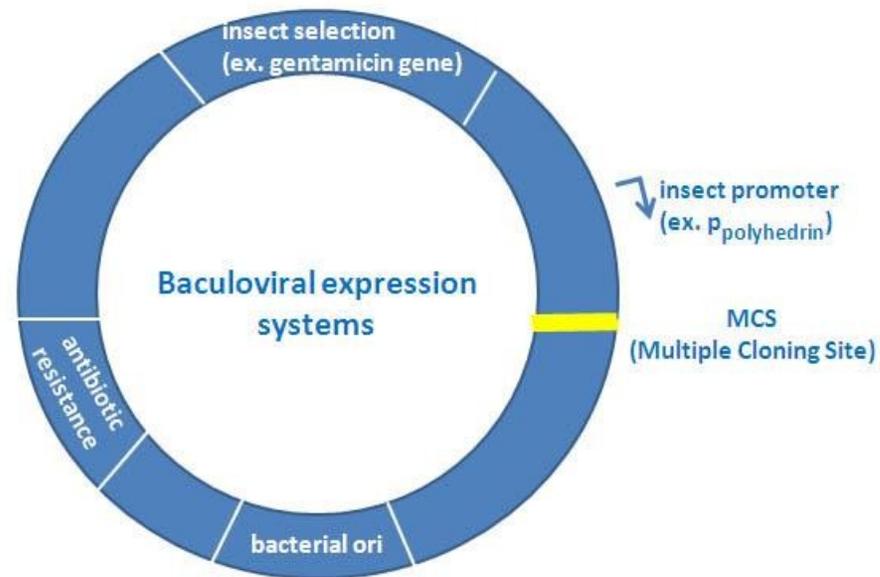


Figura 4.3. El principio básico detrás de la selección en levaduras es que la levadura WT tiene todas las enzimas metabólicas necesarias para sintetizar todo su conjunto de aminoácidos, a partir de precursores básicos presentes en medio mínimo (panel superior). Las levaduras mutantes para URA, que es una enzima necesaria para la síntesis de uracilo, puede crecer en medio rico, que contiene todos los nutrientes, no solo los elementos esenciales básicos (segundo panel desde arriba), pero no en un medio mínimo que carece uracilo (panel central). La misma mutante puede, sin embargo, cultivarse en un medio mínimo que sea suplementado con uracilo (segundo panel de fondo). La única otra forma en que esta mutante puede crecer en medio mínimo es si tiene un vector que codifique para la enzima URA (panel inferior).

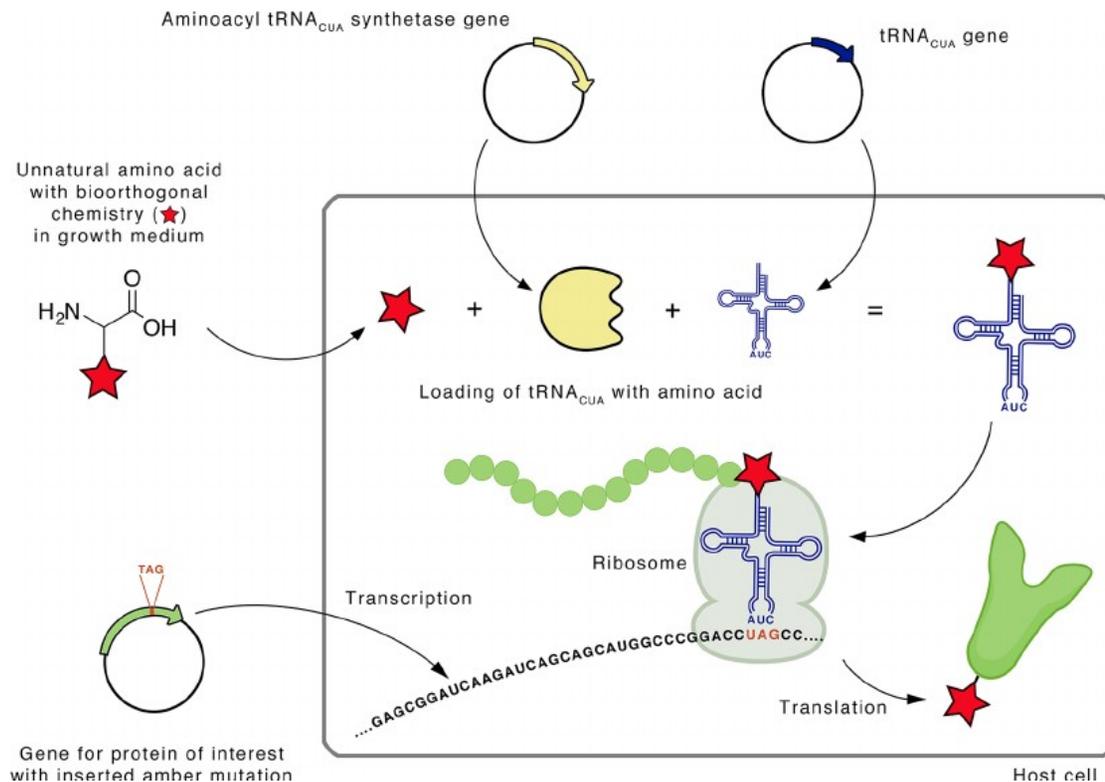
# Expresión en células de insectos.

Las células de insectos se usan con frecuencia para expresar grandes cantidades de proteínas a partir de vectores de expresión baculovirales. Células de insectos, similares a la levadura y otros eucariotas, se prefieren para la expresión de proteínas para el análisis de modificaciones postraduccionales o localizaciones intracelulares, que no pueden abordarse en un simple procarionta que carece de modificaciones o compartimientos intracelulares unidos a la membrana. El sistema de expresión de insectos más común involucra los sistemas de expresión basados en Baculovirus, disponibles en una serie de diferentes empresas. En este sistema, los genes generalmente se clonan después de un fuerte promotor de polihedrina (una proteína de insectos) por lo que se producen altos niveles de expresión.



# Nuevos sistemas de expresión de proteínas en *E coli* para proteínas con modificaciones postraduccionales e incorporación de aminoácidos no naturales

La gran mayoría de las proteínas de origen eucariota tiene modificaciones postraduccionales que las bacterias no pueden hacer. Recientemente, nuevos sistemas de expresión han sido desarrollados. En general funcionan de la siguiente manera, el gen de interés se muta en la posición desea de codón correspondiente a un codón ambar («UAG») que normalmente actúa como codón de stop, pero en *E coli* modificadas (con dos plásmidos extras) el codón ambar es reconocido por un nuevo tRNA que a través de una aminoacil tRNA sintetasa modificada se carga con el aminoácido a insertar (una lisina



acetilada, una serina fosforilada etc). Es necesario que dicho aminoácido esté presente en el medio de cultivo ya que no puede ser sintetizado a partir de precursores por la bacteria.