Construcción de una biblioteca de plásmidos para la producción de oligopéptidos de variadas secuencias en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Plasmid library construction to produce oligopeptides of various sequences in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Giuliana P. Chavez[1,2], Joshelin Huanca[1,2], Ana A. Kitazono[1,3]

1 Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis, Lima, Perú

2 Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Departamento Academico de Biologia, Lima, Perú

3 Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Departamento académico de Quimica, Lima, Perú

Resumen

Las bibliotecas de plásmidos permiten agrupar fragmentos clonados con diferentes secuencias que pueden emplearse en distintos ensayos de tamizaje. En el presente estudio se construyó una biblioteca de plásmidos con insertos semialeatorios que permite la expresión de oligopéptidos de 18 aminoácidos con la secuencia"Z-X-X-Tir-X-X-X-Tir-X-X-X-Tir-X-X-X-Tir- (Cis or Trp)-Tir" (donde "Z" = Leu, Pro, His, Gln, o Arg y "X" es cualquier aminoácido) para posteriormente identificar aquellos con actividad fotoprotectora. Para la construcción se tomó ventaja de la capacidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para realizar el clonaje de fragmentos *in vivo* por recombinación homóloga. La optimización del protocolo requirió de una prueba preliminar empleando el vector de expresión pEGH, y un fragmento único para la expresión de un oligopéptido compuesto solo de residuos de Trp y Tir (Fragmento WY). Una vez definidos los procedimientos, se clonaron los fragmentos semialeatorios poseedores de secuencias codificantes para aminoácidos aleatorios, y para la expresión de Trp y Tir. Los plásmidos obtenidos de la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* por clonaje *in vivo* fueron luego amplificados en *Escherichia coli* para su purificación para posteriormente determinar las frecuencias de inserción de los fragmentos. Según estos ensayos, las eficiencias de clonaje fueron de 100% para el fragmento WY y de 50% para los fragmentos semialeatorios. En base a estos resultados es posible concluir que el clonaje in vivo en *S. cerevisiae* es un método eficiente para construir bibliotecas de plásmidos.

Palabras clave: recombinación homóloga, clonaje *in vivo*, *Saccharomyces cerevisiae*, biblioteca de plásmidos, oligopéptidos fotoprotectores

Abstract

Plasmid libraries group cloned fragments with different sequences that can be used in several types of screenings. In this study a plasmid library with semi-random inserts that allow the expression of olygopeptides with 18 amino acids with sequence sequence "Z-X-X-Tyr-X-X-X-Tyr-X-X-X-Tyr-X-X-X-Tyr- (Tyr or Trp)-Tyr" (where "Z" = Leu, Pro, His, Gln, or Arg and "X" is any amino acid was constructed to subsecuently identify those with photoprotective activity. For the construction it took advantage of the capability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to make in vivo cloning through homologous recombination. Protocol optimization required a preliminary essay using the expression vector pEGH and a unique fragment for expression of an oligopeptide compounds only by Trp and Tyr residues (WY fragment). Once the procedures were defined, semi-random fragments were cloned. The plasmids obtained from the transformation of *S. cerevisiae* by in vivo cloning were then amplified in *Escherichia coli* for purification and were used to determine the fragment insertion frequency. According to these, the cloning efficiencies were 100% for the WY fragment and 50% for the semi-random fragments. On the basis of these results is possible to conclude that in vivo cloning is an efficient method to construct plasmid libraries.

Key words: homologous recombination, in vivo cloning, *Saccharomyces cerevisiae*, plasmid library, photoprotective oligopeptides

Introducción

Las bibliotecas de plásmidos son herramientas que permiten disponer de una colección de fragmentos previamente clonados en plásmidos, a partir de los cuales se pueden identificar y aislar los fragmentos de interés (Lodish et al. 2000). Su construcción requiere de fragmentos con secuencias variadas, un plásmido adecuado y un método eficiente de clonaje. Los métodos de clonaje comunes están basados en el uso de *Escherichia coli* y se caracterizan por el empleo de diversas enzimas de restricción, numerosos pasos de purificación, ligamiento y elevados costos (Zhang et al. 2012). Este proceso puede ser simplificado con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo que se caracteriza por realizar un proceso de clonaje eficiente conocido como "clonaje *in vivo"* (Folch et al. 2004). Este alto nivel de eficiencia es posible gracias a la recombinación homóloga que realiza, la cual le permite introducir uno o más fragmentos en los plásmidos (Raymond et al. 1999) (Figura 1). El clonaje *in vivo* que desarrolla *S. cerevisiae* no requiere del empleo de enzimas de restricción, prescinde de ensayos adicionales *in vitro*, es independiente de ligamiento y de fácil implementación en el laboratorio (Zhang et al. 2012; Kitazono 2011), pudiéndose generar de forma fiable bibliotecas de más de 10^7 transformantes (Swers et al. 2004). Una de las aplicaciones más importantes de las bibliotecas es la disposición de insertos a partir de los cuales se pueden expresar oligopéptidos de diversas secuencias de aminoácidos que al ser sometidos a un tamizado genético permitan identificar a aquellos oligopéptidos que tengan propiedades funcionales particulares. (Van der Ven et al. 2002). Pese a su simpleza, los oligopéptidos pueden presentar importantes funciones biológicas; como los péptidos antihipertensivos (Kumar et al. 2015), péptidos antimicrobianos (Tucker et al. 2018), y los neuropéptidos que actúan sobre la corteza suprarrenal (Montenegro 2004). Así también, hay péptidos que forman parte del sistema inmune y actúan como un mecanismo de defensa contra microorganismos invasores (Rivera et al. 2010). Debido a los efectos reguladores de estas moléculas, son generalmente conocidas como péptidos bioactivos (Korhonen et al. 1998).

La biblioteca a construir estuvo orientada a la identificación de oligopéptidos con actividad fotoprotectora frente a la exposición a radiación ultravioleta (UV). Según Berlett y Stadtman (1997), esta respuesta está ligada a la presencia de residuos fotosensibles como los aminoácidos aromáticos triptófano (Trp) y tirosina (Tir), los cuales tienen la capacidad de absorber la radiación UV y reemitirla a una longitud de onda más larga y menos energética. Este fenómeno se conoce como fluorescencia, el cual es más intenso en el Trp debido a que presenta en su estructura al cromóforo aromático indol, mientras que la Tir incluye al cromóforo aromático fenol (Fersht 1980 y Donovan 1968). Así, se podría anticipar que los oligopéptidos que incluyan residuos de Trp y Tir presentan un efecto fotoprotector frente a la radiación UV. También es posible que la presencia de otros aminoácidos en un oligopéptido potencie las funciones de Trp o Tir, que la suplan o incluso la superen.

Por esta razón, el presente estudio se basó en la construcción de la biblioteca de plásmidos empleando el proceso de clonaje *in vivo* en *S. cerevisiae*, y también a la determinación de las eficiencias de clonaje. Así, la disponibilidad de esta biblioteca hará factible la posterior realización de tamizados genéticos para la evaluación, selección e identificación de oligopéptidos que demuestren altos niveles de fotoprotección.

Materiales y métodos

Linearización del plásmido de expresión.- 2.5 µg del plásmido de expresión pEGH (Figura 2) fue digerido con 5 µL de la enzima *Sal*I para generar el plásmido linearizado. Se llevó a un volumen final de 100 µL y a incubación a 37°C por 3h.

Obtención de insertos a clonar.- Para la obtención del inserto se diseñaron una plantilla principal (WYdir o SAdir), una plantilla complementaria de extensión EXTrv y los cebadores EG22rv y EG24fw para las reacciones de amplificación (Tabla 1). La plantilla WYdir posee secuencia única de 153 bases y codifica para un oligopéptido con nueve pares sucesivos de aminoácidos Trp y Tir ((Trp-Tir)9); mientras que SAdir es un oligonucleótido semialeatorio de 150 bases con secuencias para la expresión de oligopéptidos que incluyan a los aminoácidos Trp y Tir, y a aminoácidos aleatorios (Figura 3). Todas las reacciones se llevaron a cabo en una termocicladora PTC-200 (DNA Engine) de MJ Research.

Para la amplificación de la plantilla WYdir, se emplearon: 0.5 µL de las plantillas WYdir y EXTrv [5µM], 0.5 µL de los cebadores EG22rv y EG24fw [50µM], 0.2 µL de la enzima Phusion DNA polymerase (Thermo F530), 5 µL del 5X

buffer conteniendo Mg^{2+}, y 0.5 µL dNTPs [10mM]; en volumen final de 25 µL. El programa de PCR usado fue: ciclo 1 (sin incluir cebadores) 95°C por 30s, 66 o 68°C por 30s y 72°C por 20s. Ciclos 2-3 (con cebadores): 95°C por 30 s, 66 o 68°C por 30s, y extensión a 72°C por 20s (Figura 4).
Para la amplificación de la plantilla SAdir, en cada reacción de un volumen final de 50 µL se emplearon: 1 µL de las plantillas SAdir y EXTrv, 1 µL de cada cebador EG22rv y EG24fw [50 mM], 0.5 µL de la enzima Phusion DNA polymerase, 10 µL del 5X buffer contiendo Mg^{2+} y 1 µL dNTPs [10 mM]. Las condiciones del ciclo 1 (sin incluir cebadores) fueron: 95°C por 30s, 69 o 71°C por 30s, y extensión a 72°C por 20s. Ciclos 2-3 (con cebadores): 95°C por 30s, 69 o 71°C por 30s y extensión a 72°C por 20s. Para la verificación de la reacción de amplificación, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y tinción con bromuro de etidio (Mathews 2003).

Clonaje *in vivo*.- Este proceso fue realizado en la levadura *S. cerevisiae* al ser cotransformada con el plásmido y los fragmentos a clonar. Se emplearon 175 ng de plásmido pEGH linearizado y 20 ng del producto de la amplificación (inserto). La transformación se llevó a cabo empleando tratamientos con acetato de litio y choque térmico a 42°C (Sambrook & Green 2012). Después de una incubación de dos horas en caldo YPD; las células se colectaron, se resuspendieron en agua, y se plaquearon en medio sintético carente de uracilo (medio –Ura).

Verificación de presencia de inserto mediante PCR analítico.- Los transformantes fueron seleccionados y aislados en agar -Ura, se incubaron por 24h y se inocularon en caldo –Ura para dejarlos crecer durante 2d (Morris et al. 1981). Se realizó la extracción del ADN total a partir de las suspensiones de células empleando un buffer de ruptura (1.2% SDS, NaCl [100 mM], Tris pH 8.0 [10 mM], EDTA [1mM]) complementado con una ruptura mecánica empleando perlas de vidrio (Schneegurt et al. 2003). Se añadió una mezcla de fenol/cloroformo. El sobrenadante acuoso fue luego tratado con isopropanol y etanol para la precipitación y lavado de los ácidos nucleicos.
Las muestras de ADN total recuperado fueron sometidas a ensayos de PCR analítico para la verificación preliminar de la presencia del inserto en el plásmido. Se emplearon: 1µL de la solución de ADN total obtenido, 0.5µL de los cebadores EG22rv y EG24fw [50µM], 0.2 µL de la enzima ADN polimerasa Taq**,** 2.5 µL del 5X buffer contiendo Mg^{2+} y 0.25 µL de la solución dNTPs [10 mM], en un volumen final de 20 µL. La reacción tuvo las siguientes condiciones: 95°C por 2 min, ciclos 1-31 95°C por 30s**,** 62°C por 30s y extensión a 72°C por 60s.

Amplificación y purificación de plásmidos.- Las muestras de ADN total que incluían plásmidos con insertos (verificadas por PCR analítico), se emplearon para transformar la cepa TOP10 de *E.coli* (*F– mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*) . El inóculo se dejó crecer durante toda la noche, y luego de procesos de centrifugación y enjuague, se resuspendió en suficiente agua fría para lograr una densidad de 2 x 10^{11} cells/mL. Se mezclaron 40µL de la suspensión celular con 1µL de la solución de ADN recuperado de levadura, transfiriendo la mezcla a una cubeta de electroporación para someterla a un pulso eléctrico de 2500V. Se añadió 1mL de caldo LB y se transfirió a tubos de microcentrifuga para la incubación a 37°C por una hora, finalmente se plaqueó en medio LB-Ampicilina.
Las colonias aisladas fueron cultivadas en caldo LB-Ampicilina para la purificación de los plásmidos, que incluyó la adición de la mezcla acetato de potasio 5M/fenol (7:3), y la precipitación del ADN plasmídico con etanol. Los sedimentos de ácidos nucleicos obtenidos fueron disueltos con 50 µL de buffer TE + ribonucleasa 20 µg/mL y finalmente llevados a incubación a 37ºC por 30 minutos.

Confirmación de la obtención de plásmidos recombinantes.- Los plásmidos purificados fueron digeridos con *Bam*HI y *Hin*dIII para la obtención de los fragmentos. Se emplearon 10 µL de la solución de plásmido obtenida, 0.5 µL de cada enzima de restricción, 2 µL del respectivo buffer de reacción 10x, 0.2 µl de BSA 10 mg/mL, y agua destilada estéril para un volumen final de 20 µL. La incubación se realizó en baño maría a 37ºC por dos horas. El análisis de los tamaños de los productos de digestión se realizó por corrida de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Secuenciación de plásmidos.- Las muestras seleccionadas para la secuenciación fueron purificadas empleando el kit Zyppy Plasmid Miniprep de ZYMO RESEARCH. El análisis de secuenciación fue llevado a cabo por Macrogen Inc., Seúl-Korea del Sur (www.macrogen.com).

Resultados

Optimización de los protocolos de PCR.- La optimización se realizó amplificando la plantilla WYdir, y se determinó que a una temperatura de hibridación de 66ºC y solo dos ciclos de amplificación, se prevenía la obtención de productos de otros tamaños, dando como resultado el fragmento WY único de 185 pb (Figura 5). Se realizó la amplificación de la plantilla semialeatoria SAdir con los parámetros previamente establecidos. Se probaron dos temperaturas de hibridación: 69 y 71°C, determinando que la temperatura más apropiada era 69ºC. Se obtuvo como producto final al fragmento semialeatorio (SA) de 182 pb (Figura 6).

Recuperación de plásmido recombinante y análisis mediante PCR analítico.- Se realizó el aislamiento de 14 colonias de transformantes WY de levadura, se cultivaron en caldo –Ura para la recuperación del ADN total y la verificación de la presencia de inserto por PCR analítico (tamaño esperado de 185 pb). De las 14 muestras analizadas; 12 tenían el inserto, obteniéndose un 86% de eficiencia de clonaje. Para la determinación de los transformantes con fragmento SA, se aislaron y analizaron 32 muestras por PCR analítico, de las cuales 22 tenían el fragmento; resultando con una eficiencia de clonaje del 69%.

Purificación y verificación de plásmidos recombinantes.- Las cepas de *E. coli* Top10 fueron transformadas con las muestras de ADN total purificado caracterizadas por PCR analítico y que contienen el plásmido recombinante. El aislamiento de los clones amplificados se realizó en placas LB+Ampicilina.
Luego de la purificación de los plásmidos amplificados por *E. coli*, se seleccionaron 16 muestras positivas con el fragmento SA para el último ensayo de verificación por PCR analítico. De las 16 muestras SA analizadas; 8 muestras tenían el inserto esperado de 185 pb, resultando en una eficiencia del 50%. El tamaño del fragmento amplificado sin inserto fue de 126 pb. Este ensayo no se realizó con las muestras purificadas de fragmento WY, ya que son de secuencia única.

Digestión de plásmidos purificados para la comprobación de presencia de inserto.- Luego de la digestión de los plásmidos verificados por PCR analítico, se obtuvieron fragmentos WY con inserto de 164 pb, y de 161 pb para fragmento SA con inserto. El tamaño esperado para el fragmento sin inserto fue 106 pb Todas las muestras WY y SA analizadas resultaron positivas para la presencia de inserto.

Secuenciación de plásmidos.- El cebador de secuenciación que se empleó fue GEX 5, facilitado por la compañía, y de secuencia GGCAAGCCACGTTTGGTG. La secuenciación se realizó con la finalidad de confirmar el correcto clonaje de los insertos, y el orden de los nucleótidos en cada secuencia.

-Alineamiento y secuenciación de WY.- En la figura 7 se muestra la evidencia de la correcta construcción de los plasmidos WY, la cual codifica para los nueve pares Trp – Tir.

-Alineamiento y secuenciación de SA.- En la figura 8 se presenta los diferentes aminoácidos codificados; los cuales incluyen a los aminoácidos aleatorios y a las repeticiones de Tir en cada fragmento SA.

Discusión

Una biblioteca de plásmidos es un medio ventajoso que permite agrupar diversos fragmentos codificantes previamente clonados, cuyas secuencias pueden dirigirse de acuerdo a los intereses de la investigación. Por ello es de importante el establecimiento de un protocolo adecuado, que permita obtener bibliotecas que agrupen la mayor cantidad de fragmentos.

En la amplificación de los fragmentos a clonar, uno de los factores determinantes para la especificidad de este proceso fue la temperatura que se emplea en la fase de hibridación (Higuchi *et al*., 1993). Así, a mayor temperatura de hibridación, más se dificulta la unión entre el cebador y la cadena molde, haciendo a la reacción más específica (McPherson e*t al*., 1991).

La digestión de pEGH como paso previo al clonaje, favoreció la selección de plásmidos con inserto en las placas –Ura, ya que se induce al sistema de reparación de ADN de *S. cerevisiae*, incrementando así la eficiencia de clonaje *in vivo* (Joska et al. 2014).
En el clonaje de los fragmentos WY, el nivel de eficiencia logrado dependió de la naturaleza del fragmento WY, el cual es un fragmento de secuencia única que se amplificó eficientemente.

Las bases aleatorias de las secuencias de los fragmentos SA fueron importantes para la determinación de su variedad. Pese a esta naturaleza aleatoria, que hace que los fragmentos sean ligeramente inestables, se alcanzó una eficiencia de clonaje óptima.

Los alineamientos de bases de cada secuencia confirmaron la correcta construcción de los plásmidos, además de mostrar las coincidencias de bases entre cada secuencia SA.

El secuenciamiento de los fragmentos de interés semialeatorios SA, permitió la verificación de la naturaleza y variedad del total de 18 aminoácidos codificados, los cuales comprenden 12 aminoácidos diferentes.

Luego de la identificación de la naturaleza de los aminoácidos codificados, se determinó que los de mayor frecuencia relativa fueron la Leucina y Arginina, los cuales pueden ser codificados por cuatro codones distintos. En el caso del Trp, solo se expresó en el fragmento SA4, resultando con la frecuencia relativa más baja

Se logró realizar el clonaje in vivo de las secuencias dirigidas empleando el sistema de *S. cerevisiae*, el cual permitió alcanzar altos niveles de eficiencia, además de su simplicidad y bajos costos. Esto posiciona al clonaje in vivo como un mecanismo que puede ser empleado en la codificación y expresión de oligopéptidos.

Agradecimientos

Agradecemos a “InnovatePerú” (Contrato N°157-PNICP-PIAP-2015) por el financiamiento.

Literatura citada

Berlett B. & E. Stadtman. 1997. Protein oxidation in aging, disease, andoxidative stress. Journal of Biological Chemistry 272:20313–20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313

Donovan J. 1968. Changes in Ultraviolet Absorption Produced by Alteration of Protein Conformation. The Journal of Biological Chemistry 244:1961-1967. PMID: 4889460

Fersht A. 1980. Estructura y mecanismo de las enzimas. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge. Editorial Reverté 343:160.

Higuchi R., C. Fockler, G. Dollinger, et al. 1993. Kinetic PCR analysis: realtime monitoring of DNA amplification reactions. Bio Technology 11: 1026-1030. PMID: 7764001

Jacobus A. & J. Gross. 2015. Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in Escherichia coli. PLoS One 10(3): e0119221. doi: 10.1371/journal.pone.0119221

Joska T. M., A. Mashruwala, J.M. Boyd & W.J. Belden. 2014. A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. Journal of microbiological methods 100:46-51. doi: 10.1016/j.mimet.2013.11.013

Kitazono A. 2011. Optimized protocols and plasmid for in vivo cloning in yeast. Dept. of Biological Sciences, University of Alabama in Huntsville, USA. Gene 484: 86–89. doi: 10.1016/j.gene.2011.06.006

Korhonen H., A. Pihlanto-lepälä; P. Rantamäki, et al. 1998. Impact of Processing on Bioactive Proteins and Peptides. Trends in Food Science and Technology 9: 307- 319. doi: 10.1016/S0924-2244(98)00054-5

Kumar R., K. Chaudhary, J.S. Chauhan, et al. 2015. An in silico platform for predicting, screening and designing of antihypertensive peptides. Scientific reports 5: 12512. doi: 10.1038/srep12512 (2015).

Lodish H., A. Berk, L. Zipursky, et al. 2000. Molecular Cell Biology. 4 ed. W. H. Freeman and Company. 1008 p.

Mathews C., K. Van Holde, G. Kevin. 2003. Bioquímica. 3ed. Madrid, Pearson. 1368 p.

McPherson M.J., P. Quirke & G.R. Taylor. 1991. PCR: A practical approach. Oxford University Press, Estados Unidos. 280 p.

Montenegro R. 2004. Biología Evolutiva Humana. Facultad de Psicología de la Universidad Nacional de Córdoba 355:45.

Morris D. 1981. Plasmid vectors capable of transferring large DNA fragments to yeast. US National Library of Medicine 1(1):27-36. doi: 10.1089/dna.1.1981.1.27

Raymond C.K, T.A. Pownder & S.L. Sexson. 1999. General method for plasmid construction using homologous recombination. Biotechniques 26: 134–138, 140–131. PMID:9894602

Rivera C., L. Flores, C. Pantigoso, et al. 2010. Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de Centruroides margaritatus. Rev. peru. biol. 17(1): 129 – 132. doi: 10.15381/rpb.v17i1.61

Schneegurt M., S. Dore & C. Kulpa. 2003. Direct Extraction of DNA from Soils for Studies in Microbial Ecology. Curren Issues in Molecular Biology 5: 1-8. PMID: 12638659

Swers J., B. Kellog & D. Wittrup. 2004. Shuffled antibody libraries created by in vivo homologous recombination and yeast surface display. US National Library of Medicine 32(3): 36. doi: 10.1093/nar/gnh030

Sambrook J. & M. Green.2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2028 p.

Tucker A.T., S.P. Leonard, C.D. DuBois, et al. 2018. Discovery of Next-Generation Antimicrobials through Bacterial Self-Screening of Surface-Displayed Peptide Libraries. Cell. 172(3): 618-628. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.009

Van der Ven C. 2002. Biochemical and functional characterisation of casein and whey protein hydrolysates. A study on the correlations between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Tesis Doctorado. Nueva Zelanda, Wageningen University. 170 p.

Zhang Y., U. Werling & W. Edelmann, 2012. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. Nucleic Acids Research 40, e55. doi: 10.1093/nar/gkr1288

Tabla 1. Plantillas y cebadores empleados en la amplificación

Plantillas		**Secuencia**
Plantilla WY dir		tcgcatcaccatcaccatcacggtggtggtctagactccatgggtcgacta(TGGTAT)$_9$TAAtcgagctcaagcttaattcatcgtgactgactgacgatctg
Plantilla semialeatoria SA		tcgcatcaccatcaccatcacggtggtggtctagactccatgggtcgac(N$_9$TAY)$_4$TGKTAYTAAtcgagctcaagcttaattcatcgtgactgactgacgatctg
Plantilla complementaria de extensión		cagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagatccgtcagtcagtcacg
Cabadores	**EG22rv**	cagaggttttcaccgtcatcac
	EG24dir	tcgcatcaccatcaccatcacgg

LEYENDA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo para el clonaje *in vivo*

Figura 2. Plásmido de expresión pEGH

Figura 3. A. Secuencia de los insertos semialeatorios. B. Secuencia de los oligopéptidos semialeatorios.

Figura 4. Estrategia para la obtención de los fragmentos que serán clonados en el vector pEGH, a partir de la plantilla principal, la plantilla complementaria, y los cebadores.

Figura 5. Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando las plantillas WYdir y EXTrv y dos diferentes temperaturas de hibridación: 66 y 68 ºC. Alícuotas de 3.5 µL de cada producto fueron cargadas en geles de agarosa 1.2 %. El tamaño del fragmento esperado es de 185 pb.

Figura 6. Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando las plantillas SAdir y EXTrv, a una temperatura de hibridación de 69°C. Alícuotas de 3,5 µL de cada producto fueron cargadas en geles de agarosa 1,2 %. El tamaño del fragmento esperado es de 182 pb.

Figura 7. Confirmación de la correcta construcción de los plásmidos WY que poseen la secuencia $(TAT\text{-}GGT)_9$

Figura 8. Aminoácidos semialeatorios codificados por los fragmentos SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5. Además de los aminoácidos aleatorios, en cada secuencia están presentes las 5 repeticiones del aminoácido Tir, y el aminoácido Cis o Trp.

FIGURAS

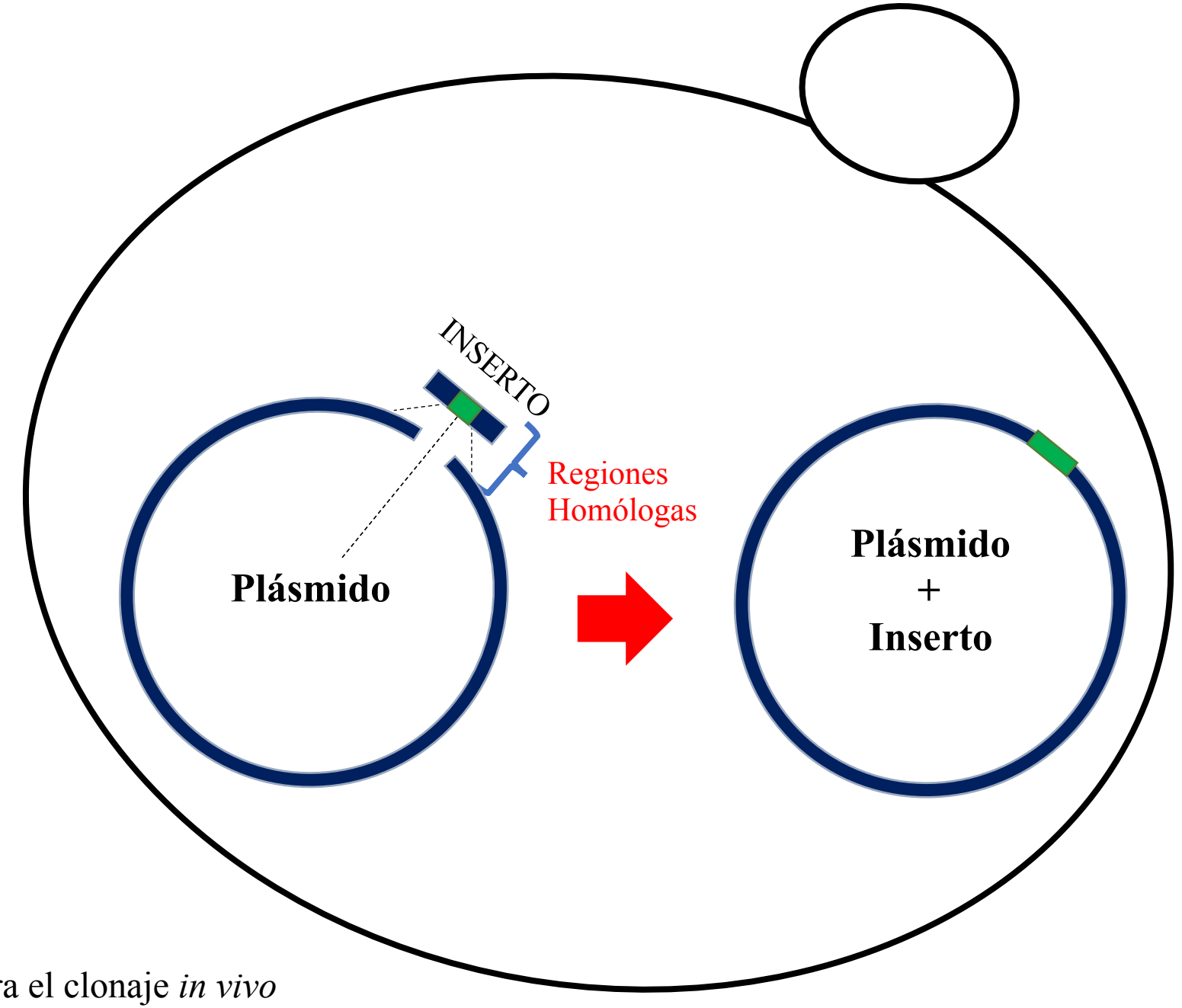
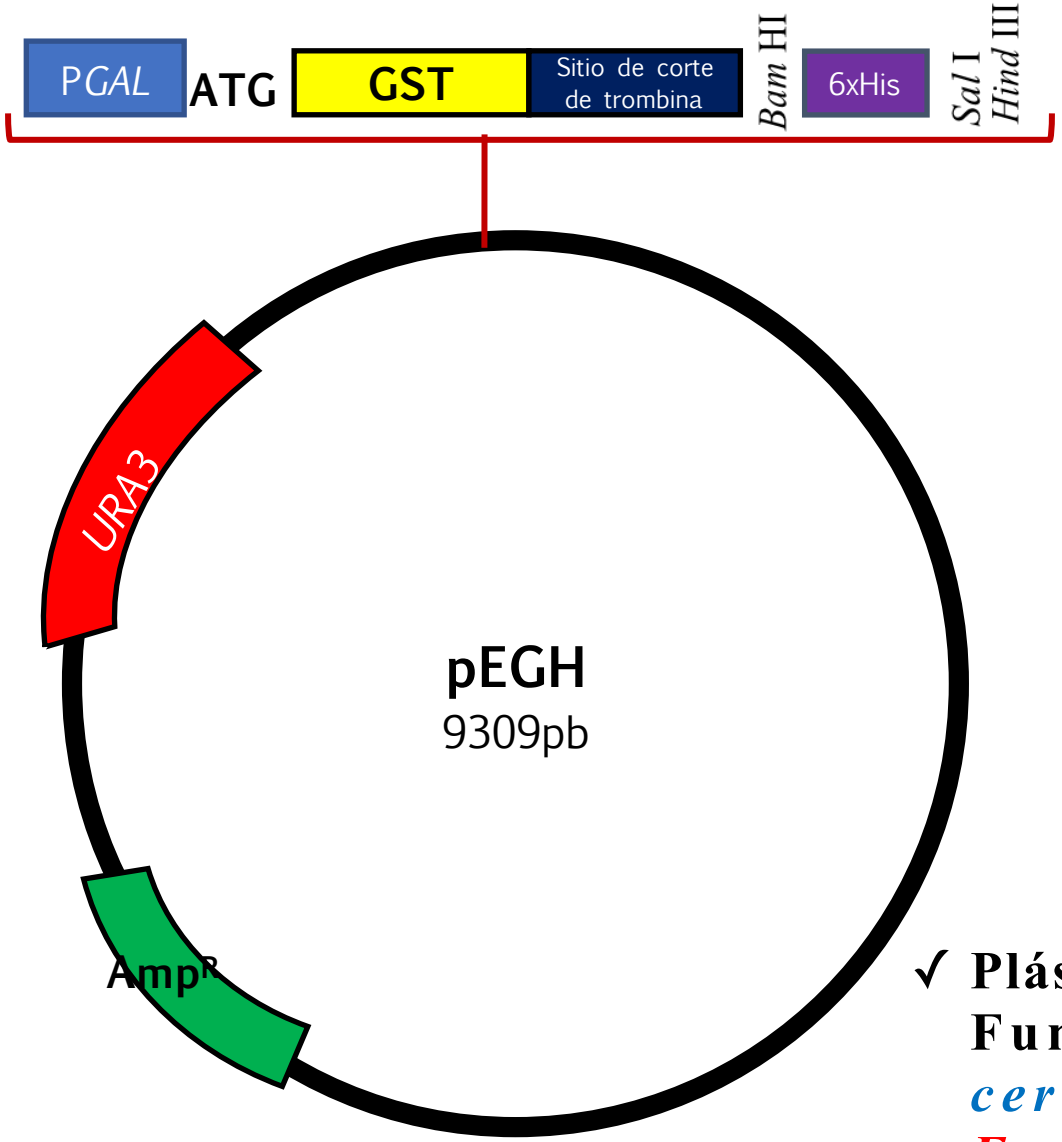


Figura 1. Mecanismo para el clonaje *in vivo*



✓ **Plásmido shuttle: Funciona en *S. cerevisiae* y en *E.coli***

Figura 2. Plásmido de expresión pEGH.

SECUENCIAS DE LOS INSERTOS SEMIALEATORIOS

Plantilla semialeatoria SAdir (150-mer)

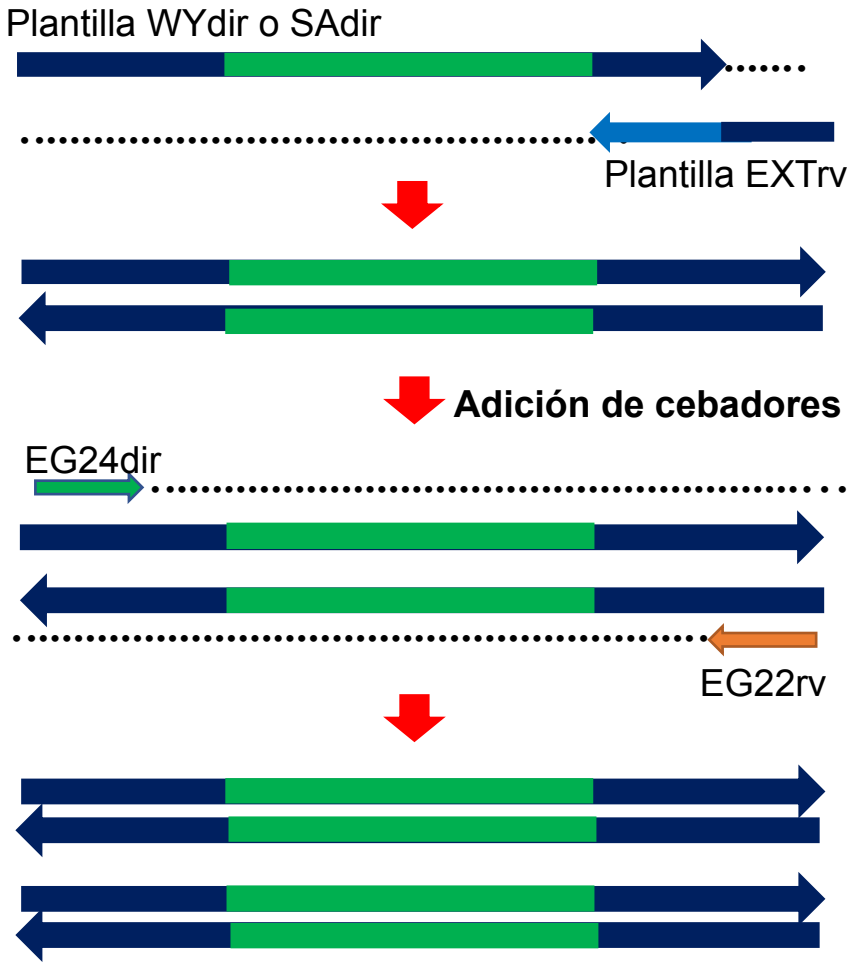
Figura 3. A. Secuencia de los insertos semialeatorios. B. Secuencia de los oligopéptidos semialeatorios.

SECUENCIAS DE LOS INSERTOS Y OLIGOPÉPTIDOS SEMIALEATORIOS

N: cualquier base
Y: T , C
K: G, T

CNN	NNN	NNN	TAY	NNN	NNN	NNN	TAY	NNN	NNN	NNN	TAY	NNN	NNN	NNN	TAY	TGK	TAY	TAA
Leu	X	X	Tir	X	X	X	Tir	X	X	X	Tir	X	X	X	Tir	Trp	Tir	
Arg																		
His																Cis		
Gln																		
Pro																		

OBTENCIÓN DE LOS INSERTOS (materiales y metodos)



Ciclo 1
95°C x30 segundos
66ºC x 30 segundos
72°C x 20 segundos

Ciclos 2-3
95°C x 30 segundos
66°C x 30 segundos
72°C x 20 segundos

Figura 4. Estrategia para la obtención de los fragmentos que serán clonados en el vector pEGH, a partir de la plantilla principal, la plantilla complementaria, y los cebadores.

OBTENCIÓN DEL INSERTO WY

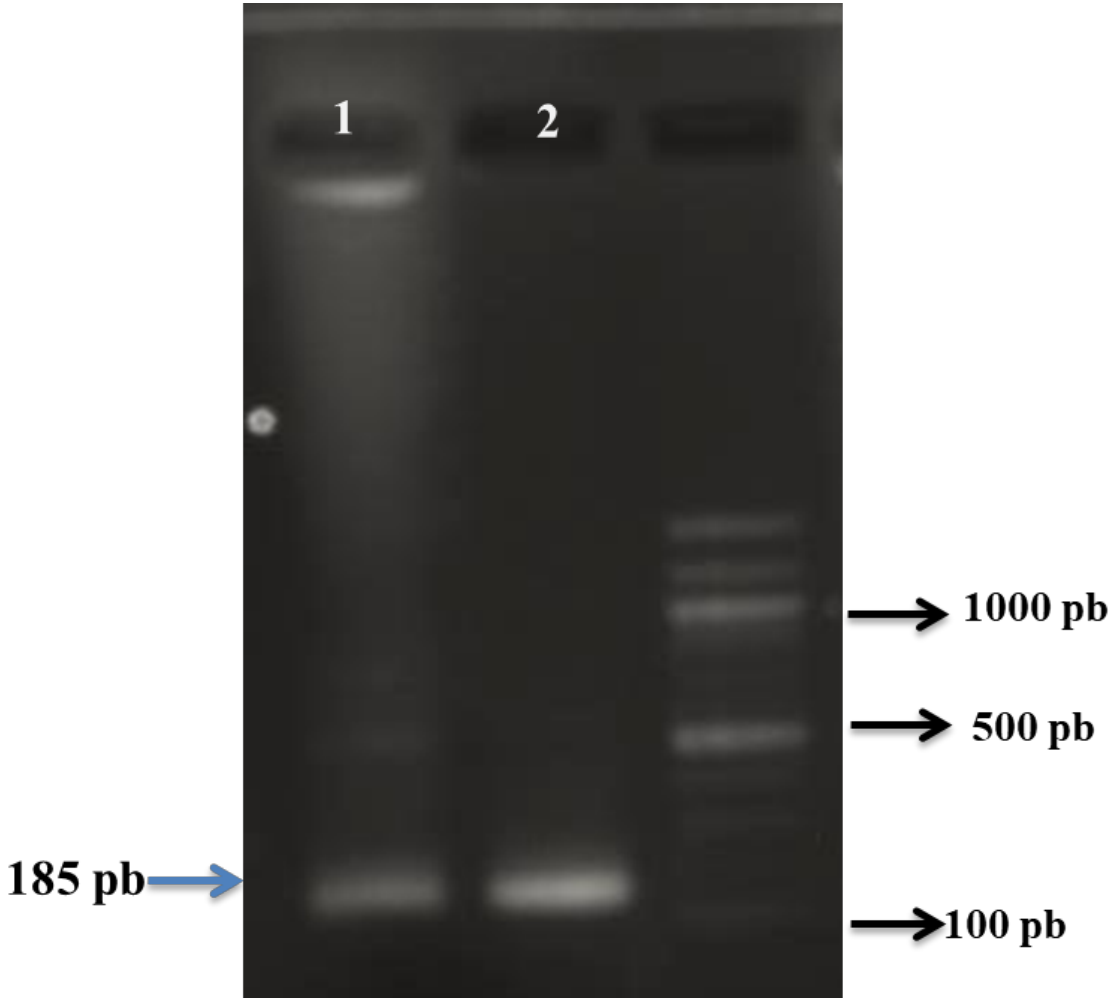


Figura 5. Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando las plantillas WYdir y EXTrv y dos diferentes temperaturas de hibridación: 66 y 68 ºC. Alícuotas de 3.5 µL de cada producto fueron cargadas en geles de agarosa 1.2 %. El tamaño del fragmento esperado es de 185 pb.

OBTENCIÓN DE LOS INSERTOS SEMIALEATORIOS

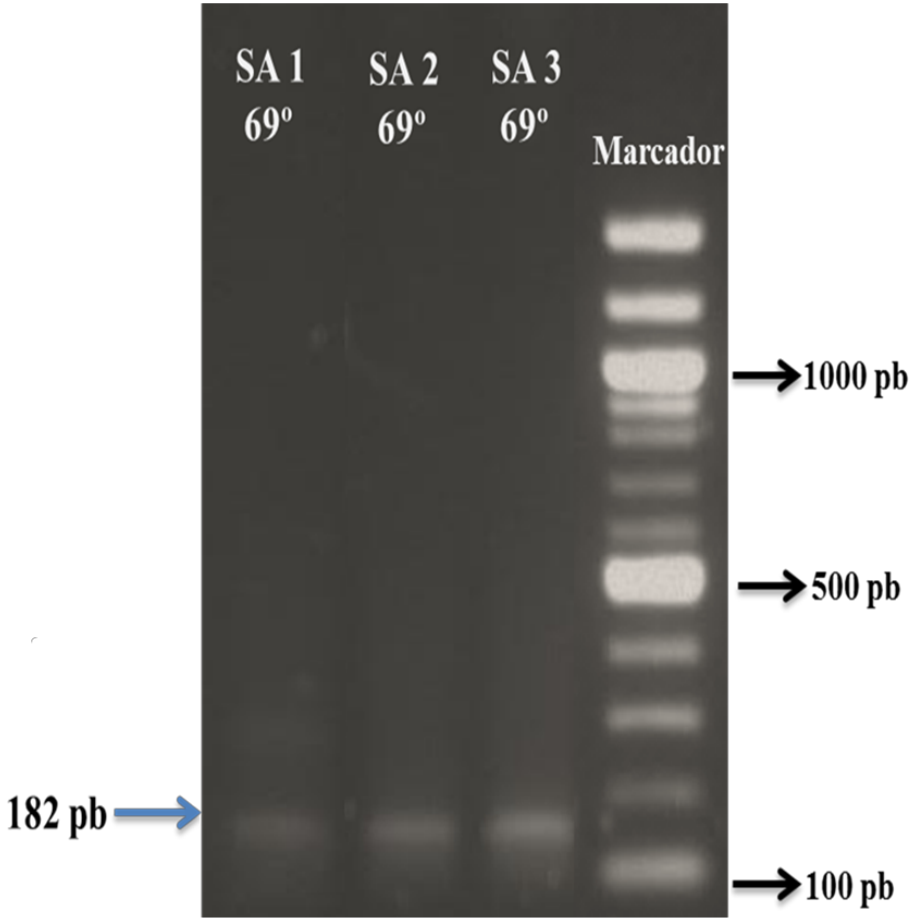


Figura 6. Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando las plantillas SAdir y EXTrv, a una temperatura de hibridación de 69°C. Alícuotas de 3,5 µL de cada producto fueron cargadas en geles de agarosa 1,2 %. El tamaño del fragmento esperado es de 182 pb.

C O N F I R M A C I Ó N - D E - L A - C O R R E C T A CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS WY

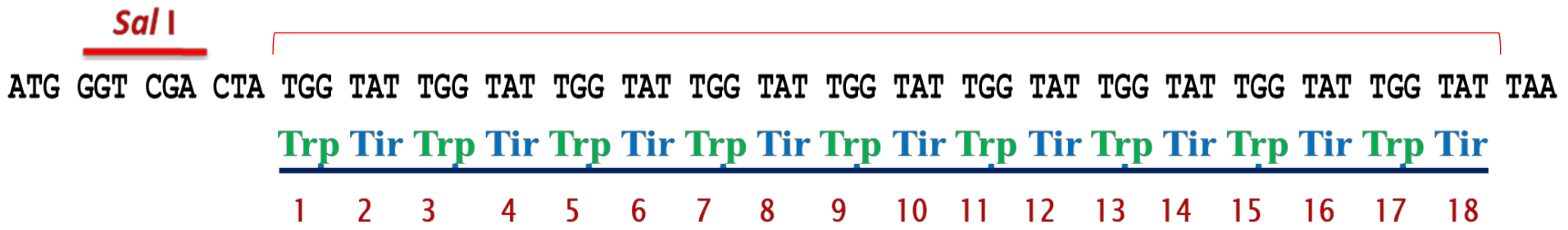


Figura 7. Confirmación de la correcta construcción de los plásmidos WY que poseen la secuencia $(TAT\text{-}GGT)_9$

COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS CODIFICADAS POR LOS FRAGMENTOS SA

Figura 8. Aminoácidos semialeatorios codificados por los fragmentos SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5. Además de los aminoácidos aleatorios, en cada secuencia están presentes las 5 repeticiones del aminoácido Tir, y el aminoácido Cis o Trp.