***C. reinhardtii* chloroplast expression vector pASapI**

**Source** Saul Purton, University College London, UK
**Plasmid** pASapI (6622 bp)
**Vector pUC8**
**Host strain** *E. coli* DH5

**Insert** chloroplast DNA sequence containing *psbH-trnE2* region with an ‘expression cassette’ engineered into the intergenic *Mlu*I site. Cassette comprises of the *atpA* promoter/5’UTR and *rbcL* 3’UTR regions separated by a multiple cloning site. Note: the SapI site in the MCS is designed to allow a perfect translational fusion at the ATG of the gene-of-interest, as illustrated below.

**Selection** ampicillin resistant

**Reference Economou C, Wannathong T, Szaub J, Purton S (2014). A simple, low cost method for chloroplast transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii.* In: Chloroplast Biotechnology (volume editor: Pal Maliga). Methods in Molecular Biology 1132: 401-411**

**Sequence**

**> pASapI chloroplast expression vector - 6622 bp**

agcttggcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcaattcgaatccgcgttttctccgtgaaagggaggtgtcctaggcctctagacgatgggggctttttgttatattttactaaatatatattataattaaaaaaaattgaattgtcaatttttaatgtacacttagttgaaagtgcccctgtccccttggccatatttaacagaagttatttataacgcagctgttttttggagtctataaatttataacatcagttactatggatttccctttagttttatggcctaggacgtccccttccccttcgatgctggaggcatccttttacgggacaataaataaatttgttgcctcgcctatcggctaacaagttccttcggagtatataaatataggatgttaatactgctataaactttagttgcccaatatttatattaggacgccagtggcagtggtaccgccactgcctgcttcgcagtatataaatataggcagttggcaggcaactgccactgacgtcctattttaatactcccaagtttacttgcctaggcagttggcaggcaacaaatttatttattgtccactaaaatttatttgcccgaaggggacgtccactaaaatttatttacccgaaggggacgtcctaatataaatatggggatgtcaatgctccgttaggaagtaactaacgtttttcaaataaattttatcccggagggaagtaggcagtagcccgccactgtcatcctttaagtggatctctcgtcaggcaatttgcttacacctttaaattaaaaattaaatttaaagaaaagtgagctattaacgcgtctccaatatagtagactttattagaggcagtgtttatataccataaacgtcaaaagtcatttttataactggatctcaaaatacctataaacccattgttcttctcttttagctctaagaacaatcaatttataaatatatttattattatgctataatataaatactatataaatacatttacctttttataaatacatttaccttttttttaatttgcatgattttaatgcttatgctatcttttttatttagtccataaaacctttaaaggaccttttcttatgggatatttatattttcctaacaaagcaatcggcgtcataaactttagttgcttacgacgcctgtggacgtcccccccttccccttacgggcaagtaaacttagggattttaatgcaataaataaatttgtcctcttcgggcaaatgaattttagtatttaaatatgacaagggtgaaccattacttttgttaacaagtgatcttaccactcactatttttgttgaattttaaacttatttaaaattctcgagaaagattttaaaaataaacttttttaatcttttatttattttttctttttt**ATGggaagagc**tact**ccatggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcaagctt**gtactcaagctcgtaacgaaggtcgtgaccttgctcgtgaaggtggcgacgtaattcgttcagcttgtaaatggtctccagaacttgctgctgcatgtgaagtttggaaagaaattaaattcgaatttgatactattgacaaactt**TAA**tttttatttttcatgatgtttatgtgaatagcataaacatcgtttttatttttatggtgtttaggttaaatacctaaacatcattttacatttttaaaattaagttctaaagttatcttttgtttaaatttgcctgtctttataaattacgatgtgccagaaaaataaaatcttagctttttattatagaatttatctttatgtattatattttataagttataataaaagaaatagtaacatactaaagcggatgtaGCGCGTttatcttaacggaaggccagtggcagtggcggtgccactgccgaatataaatatggttgagttgcttagtttaccttagcgaaaagaagacttagcagctagccttaacaaacagttttatattttatgtttgtgttaaataaaa**TTAAGAAACTTTAGCTAAAGTTTCCCAACTCATAGAAACGTCATCTAAAATTAAAGAACTGTTGTAAATTTCTAAAATGATTAATAAGAATGCTGCAAATAAAAGGATAAATACAGCCATTAAAACAGTTGTACCCCAGCCTGGTAATACTTTACCTGCTTCTGAGTTAAGTGGACGTAATAAAGTACCTAATGGTGTAACTAAACCAGGTTCTTGGAAGTCTGAATTTACTTTTGATGGTTTAGCTTTAGAAGTTCCTGTTGCCAT**aattgattaaatgaattaagcgttattagcgctattttatttactttctgtaaaaaataaggaaaatattcttcagtgcattccctctcaggattataaatactctgaggataacgttctctcgtcaaggggttgcttcttgtgagtatagaaacctactagcacaagaaataaattgcataaaaatgtatttacctaggaccgcagtaggcagtcccttttccccttcagaactgcctgctttaaaagaatgaaaaaactgccttgtctggtaagtaaaactctttaattactcactaaagacgatcttagaagttctttgttcattttttatttaatataatatttgttatataaaaattaaataatttttaattaatgtttaactttgtaaggacagtttcaaagtgacatgaatggctactgcaaaaacgaagtaagttattctttctcagggcaaaattttgagtagattaattttgtttaaaaatgtgggacacagtcgtcaagtcttttgaactatctaagagatatgttgaaaagagaataattttattattaaatgagctatggaaagtccagcttttttctttaccttttttttatggtttcttctgttaagtgtaactggctattcagtttatgttagttttggtccaccttcaaaaaaattacgtgatccttttgaagaacacgaagattaaacaagttaaaaagtactatttttacaagtgacttcggtgcctctgagaaccctagttatagtgatataaaataactagctaactactttatatttttatgaaagtcattttgtcgagcatataaacaaaaacaaaattgctatactaggcagtcacagtgcaactgtctccgtctccttaaccgagaaagggtaaacgtcttcggtaaagtaacaaactttagttatgttaactgcttgcgagttaaccattttttttcctccgaaggacaacagttggcagttgccaaactttagtggtctaatatttatattaggcagttggcaggcaactgcactgacgtcccgaaggggaaggggtttacttacctcctaacggagtatataaatagaataaaatttatttcctgcgctagcagatttacatactaggattttaatactccgaaggaggcagtggcggtaccactgccactggcgtcctccttccccttcgggcaaatgcattttagtgccacttaagtttacttgcctaggcagttggcaggacgtcagtggcagtggtaccgcgactgcctatatttatatactcctaagtttacttgcctaggcagttggcaggcaactgccactgacgtccttccccttccccttcgggacgtccccttacgggaatataaatattagtggatatttatatactgcgatgtttacatactccgaaggaggagagctagcagttgcctgccaactgcctaatataaatattgggcaagtaaacttagaatgtttacatactccgaaggaggacgtcccttacgggaatataaatattagtggcagtggtaccgccactgcctccttcggagtattaaaatcctagtatataatataccgtaagggacgtcctccgacggtggcagtggcggtaccactgccaccggcgtcctaatatacatattgaagtatttaaacctgttagcgcacgctctaacgagtcagtaaacttcccttttggggcttctaggcagcgcataaattttctaggacgaacgtccactggcgtctcgtaaggagcagtgacaggccactaatgtccccttaatgggtaaataaatggctatcgtctatccatgaagagaccatatattccagtagcaccgttatgatcctcaaagggtaacaccatttgtatagtattatggtgaaatgcatccctttcagggtagatttatatcttacag

1-2404: pUC8 vector (from HindIII [1st base lost during fusion to SphI] to

 SapI/EcoRI junction.

2405-3199: psbH downstream flanking element (0.80 kb).

3200-3798: atpA promoter/5'UTR (to ATG).

**3796-3806: SapI cloning site (nnn/ngaagagc).**

**3811-3850: NcoI-HindIII polylinker.**

3851-4257: rbcL 3' UTR element (stop codon at 3997-3999).

4258-4263: BssHII/MluI join (GCGCGT).

4264-6622: psbH upstream flanking element (2.36 kb) [psbH coding in UPPERCASE

 4676-4410].

6622: 1st base of destroyed SphI site.

**pASapI map**



**Region of pASapI around SapI site:**

 M G R A T P W I L -

aacttttttaatcttttatttattttttcttttttATGggaagagctactccatggatcctctagagtcgacctgcaggc

 SapI NcoI BamHI SalI PstI SphI

atgcaagcttgtactcaagctcgtaacgaaggtcgtgaccttgctcgtgaaggtggcgacgtaattcgttcagcttgtaa

 HindIII

atggtctccagaacttgctgctgcatgtgaagtttggaaagaaattaaattcgaatttgatactattgacaaacttTAAt

**Using *Sap*I to create a clean translational fusion at the ATG:**

