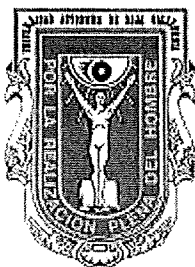


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**



**“Caracterización de microsatélites dinucleótidos y
diseño de cebadores específicos del lobo marino de
California (*Zalophus californianus californianus*)”.**

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

presenta

Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Ensenada, Baja California. Diciembre de 2001.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

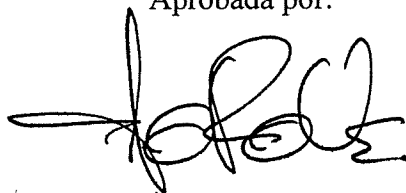
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

**“Caracterización de microsatélites dinucleótidos y diseño de cebadores específicos
del lobo marino de California *Zalophus californianus californianus*”**

**TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS PRESENTA:**

CLARA ELIZABETH GALINDO SANCHEZ

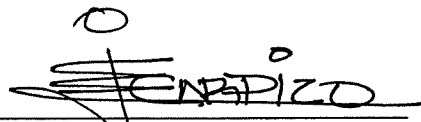
Aprobada por:



Director de tesis
Dr. Jorge de la Rosa Vélez



Sinodal
M. en C. Yolanda Schramm Urrutia



Sinodal
Dr. Eugenio Carpizo Ituarte.

A MIS VIEJITOS,

ROSITA Y MARCELO

- "...porque las cosas hay que hacerlas completas y bien echas, sino mejor no las hagas" ...-

Marcelo Galindo, a su nieta.

RESUMEN

Los microsatélites pueden ser definidos como secuencias cortas repetidas de ADN, con un tamaño de 6 pb o menos. Cientos de microsatélites han sido identificados y han comenzado a aplicarse como marcadores genéticos, a una gran variedad de estudios genéticos de población. Estos marcadores son codominantes, altamente polimórficos y distribuidos densamente a lo largo de todo el genoma eucariótico, lo que permite aislarlos mediante métodos estándares de clonación e hibridación. Se ha observado que microsatélites de una especie pueden ser utilizados en individuos de la misma familia, sin embargo, el grado de polimorfismo desplegado por un microsatélite es variable en especies diferentes. Otro problema presente es que productos del mismo tamaño, pueden provenir de eventos mutacionales distintos (homoplasia). El lobo marino de California (*Zalophus californianus californianus*) es una especie de la cuál genéticamente se conoce muy poco, por lo que es necesario realizar estudios con diferentes técnicas moleculares para obtener más datos acerca de estos organismos. En el estudio de la genética de poblaciones y de la ecología molecular de los pinnípedos, actualmente existen microsatélites de foca gris (*Halichoerus grypus*), foca común (*Phoca vitulina*) y del lobo fino de dos pelos (*Arctocephalus gacella*) que han sido utilizados en otras especies de pinnípedos. Sin embargo, para obtener un marcador molecular que pueda ser eficaz en estos estudios y reducir el intervalo de error por homoplasia, en este trabajo se obtuvieron microsatélites del lobo marino de California. Para la obtención de estos microsatélites se clonaron 910,000 pb del genoma del lobo marino de California en 1,302 clonas de *E. coli* DH5 α . Se realizó un rastreo (screening) de microsatélites dinucleótidos con la sonda (TG)₁₀ y se obtuvieron 52 clonas que hibridaron positivamente con la sonda. Se estimó el tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de estas clonas. En este estudio se obtuvieron 7 microsatélites dinucleótidos y se diseñaron 7 pares de cebadores específicos para el lobo marino de California.

AGRADECIMIENTOS

A la fundación Galindo-Sánchez: mis padres, por su apoyo moral y económico. Sin ellos no podría haber logrado nada, el mérito es de ellos, nunca terminaré de agradecerles su apoyo incondicional y su cariño.

Agradezco al Dr. Jorge de la Rosa Vélez, por haber dirigido esta tesis y aceptarme bajo su tutoría. Principalmente por haber sido un tutor y director en toda la extensión de la palabra, por haberse metido a “chambear” en el laboratorio en los inicios de cada experimento y estar siempre disponible en cada consulta. Por su paciencia y sobre todo, por su amistad. GRACIAS JORGE.

A la M. en C. Yolanda Schramm Urrutia por sus acertados comentarios a lo largo de la elaboración de este trabajo, por su ayuda en el laboratorio, porque sin su apoyo y ayuda no estaría yo aquí, ni terminando esta tesis, todo, desde el inicio hasta el final. Gracias por relacionarme con estos bichos y compartir su conocimiento, por su confianza y por creer en mi. Por ser mi amiga y familia en Ensenada, gracias mil.

Al Dr. Eugenio Carpizo, por sus comentarios y apoyo en esta tesis que fueron de gran ayuda. Gracias por darme el empujón que me faltaba para escribir y darme cuenta de la magnitud de mi trabajo.

A Luis Enríquez, por su paciencia y ayuda, gracias por estar siempre disponible en el mejor de los términos. Por su apoyo técnico y teórico en la realización de esta tesis, por su ejemplo de perseverancia y por hacer mas amenas las horas de trabajo. Gracias Luis por ser un amigo único (@love.com), todo lo único que se puede ser.

Agradezco a Asunción Lago por su apoyo en el laboratorio, sus consejos técnicos, académicos y de vida. Gracias por su amistad y por abrirme las puertas de su casa.

A Faustino Camarena, por su apoyo y amistad, gracias por los “tips” y el trabajo que me permitió “crecer” académicamente. A los compas del laboratorio, por su ayuda y “paciencia” cuando me encontraba histérica en épocas de mucho trabajo. Gracias Ciri Vega, Juan Carlos y Juan Antonio Galarza por los “relax” en el trabajo.

A mi amigo Nujim García Simanovich, gracias por abrirme literalmente la puertas de su hogar en Ensenada, fue el mejor patrocinio que me han dado.

A los “cachunes”: Alejandra (por su grata compañía, y ayudarme a ver el lado despreocupado de la vida), Gaby Prior (gracias brujita) Tona (por soportarme), Zac, Rafa, Leo, Samanta y Lidiah, por alivianarme el trabajo con horas de “sano” esparcimiento.

A mis compañeros de posgrado, por haber sido un grupo unido, y apoyarse en todas las materias. Fabian, Raúl, Isra, Oscar Chacón, Barocio, Rogelio y Juan Flores. También agradezco a Nancy, Pedro, Sinuhé, René, Dulce y Fabiola, por su amistad y ánimos para acabar esta tesis.

A Gerardo y Varinca, por apoyarme con su amistad y alojamiento, a mi amiga Eli, por soportarme un año completito. A la banda, Cesar, Julio, Fausto y Dahren, gracias por su apoyo moral en mis inicios en este lugar, por sus bromas e ironías, gracias por su cariño. Gracias Faus por tus tips en el laboratorio.

Al “Yors”, por ser mi “brother” en Ensenada, por todo lo que nos tocó vivir, gracias.

A la guereja (Alias Gisela), por ser ejemplo de trabajo y organización, por brindarme su apoyo, su casa y hasta su mascota, por ser parte de mi familia aquí (porque los amigos son la familia que uno escoge). Porque lo poco organizada que puedo ser te lo debo a ti, te quiero mucho bruja.

A la Dra. Orellana, por su ayuda, apoyo y amistad.

A ICMME, por el apoyo “logístico”.

A CONACYT, por la beca otorgada para la realización de la maestría.

A la UABC, por el apoyo financiero al proyecto “Estructura genética y reproductiva del lobo marino de California *Zalophus californianus californianus*, en loberas mexicanas” por el que fue posible la realización de esta tesis. Y por sus cursos, excelentes en la mayoría de los casos.

A mi hermano, gracias por tu cariño, de lejos y de cerca.

A todos los que de seguro se me olvidaron, por dejar esta parte como siempre al final, gracias.

INDICE

RESUMEN.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
NDICE DE TABLAS.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Marcadores moleculares.....	1
Microsatélites.....	3
El lobo marino de California, <i>Zalophus californianus californianus</i> (Lesson, 1828) Allen, 1880:	
Modelo de estudio.....	6
Uso de Microsatélites en pinnípedos.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	14
Preparación de ADN genómico de alto peso molecular.....	14
<i>Digestión de tejido.....</i>	<i>14</i>
<i>Método fenol/cloroformo.....</i>	<i>15</i>
<i>Precipitación con etanol/acetato de sodio.....</i>	<i>15</i>
<i>Purificación de ADN.....</i>	<i>16</i>
Digestión del ADN con la enzima de restricción MboI y selección del tamaño.....	16
<i>Digestión.....</i>	<i>16</i>
<i>Selección del tamaño.....</i>	<i>16</i>
Digestión, desfosforilación y ligación.....	17
<i>Digestión con BamHI.....</i>	<i>17</i>
<i>Desfosforilación con fosfatasa alcalina.....</i>	<i>17</i>
<i>Ligación del fragmento de ADN genómico al vector.....</i>	<i>18</i>
Transformación y selección de células transformadas.....	18
<i>Transformación.....</i>	<i>18</i>
<i>Selección de colonias con inserto de ADN genómico.....</i>	<i>19</i>
Rastreo (screening) de biblioteca genómica parcial e hibridación.....	20
<i>Transferencia a membranas.....</i>	<i>20</i>
<i>Marcado de la sonda (TG)₁₀.....</i>	<i>21</i>
Rastreo de la biblioteca genómica parcial.....	21
<i>Lisis y pre-hibridación.....</i>	<i>21</i>
<i>Hibridación.....</i>	<i>21</i>
<i>Incubación con anticuerpos.....</i>	<i>22</i>
<i>Detección.....</i>	<i>22</i>
<i>Guardado de clonas positivas en glicerol.....</i>	<i>23</i>
Estimación del tamaño de los fragmentos clonados.....	23
<i>Amplificación (PCR) y estimación del tamaño de los fragmentos clonados.....</i>	<i>23</i>
<i>Digestión del plásmido de las clonas positivas y estimación del tamaño de los fragmentos.....</i>	<i>26</i>
<i>Extracción del ADN de las clonas positivas (técnica miniprep).....</i>	<i>26</i>
<i>Digestión del plásmido con PvuII y estimación del tamaño de los fragmentos.....</i>	<i>27</i>
Secuenciación y detección de microsatélites.....	28
<i>Secuenciación.....</i>	<i>28</i>
<i>Eliminación de bases ambiguas.....</i>	<i>28</i>
<i>Detección de microsatélites en las secuencias.....</i>	<i>29</i>
Diseño de los cebadores.....	29
RESULTADOS.....	32
Preparación de ADN genómico de alto peso molecular.....	32
Digestión del ADN con la enzima de restricción MboI y selección del tamaño.....	32
Digestión, desfosforilación y ligación.....	33
Transformación bacteriana y selección de células transformadas.....	34
Rastreo (screening) de la biblioteca genómica parcial e hibridación.....	34
Estimación del tamaño del inserto.....	35

<i>Amplificación de fragmentos genómicos clonados (PCR)</i>	35
<i>Digestión de plásmido de las clonas positivas hibridadas con (TG)₁₀</i>	36
<i>Secuenciación y detección de microsatélites</i>	38
<i>Secuenciación</i>	38
<i>Detección de microsatélites en las secuencias</i>	40
<i>Diseño de cebadores</i>	42
DISCUSIÓN	43
<i>Preparación de ADN genómico de alto peso molecular</i>	45
<i>Digestión, desfosforilación y ligación</i>	45
<i>Transfromación bacteriana y selección de células transfromadas</i>	47
<i>Estimación del tamaño del inserto</i>	47
<i>Secuenciación y detección de microsatélites</i>	48
<i>Secuenciación</i>	48
<i>Detección de microsatélites dinucleótidos en las secuencias</i>	50
<i>Diseño de cebadores</i>	53
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	62
LITERATURA CITADA	65
ANEXO 1. PROTOCOLOS COMERCIALES	69
ANEXO 2. SOLUCIONES Y REACTIVOS	75
ANEXO 3. SECUENCIAS	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transferencia de las clonas a otra caja de Petri (con LB sólido) para ordenarlas y clasificarlas. La caja de Petri con las clonas se coloca sobre una plantilla y con ayuda de un palillo, se transfieren a otra caja de petri sobre otra plantilla en la celda adecuada y numerada.....19

Figura 2. En la gráfica se esquematiza los pasos principales del rastreo de microsatélites en las colonias seleccionadas. a) Colonias seleccionadas (blancas); b) las colonias son transferidas a una membrana de nailon; c) hibridación en la membrana con la sonda TG₍₁₀₎; d) detección de las clonas que hibridaron con la sonda en una bolsa de hibridación y e) ubicación de las colonias detectadas en la membrana.....20

Figura 3. Segmento del plásmido (secuencia 5'-3' y su secuencia complementaria) amplificado con los primers Forward y Reverse M13/pUC (GIBCO BRL). Las flechas negras indican la dirección de la amplificación, las flechas azules indican el sitios de corte de BamH1 y el lugar exacto de la inserción del fragmento genómico. La región marcada en amarillo corresponde a la secuencia de los cebadores; la región marcada en azul corresponde al sitio de clonación múltiple (MCS).....25

Figura 4. Plásmido pUC18. Se indican los sitios de corte de PvuII, el corchete indica el fragmento generado con la digestión, y MCS es el sitio de clonación.....27

Figura 5. Electroforegrama en agarosa al 1% de ADN total de 12 organismos de *Z. californianus californianus* de diferentes. Los carriles pertenecen a la iniciales del nombre de cada lobera donde se tomó la muestra, carriles: SJ(San Jorge), Ma(Margarita), L(Lobos), I(Islotes), G(Granito), E(Esteban), Cd (Cedros), C0(Coronados), C(Cantiles), B(Benitos), A(Asunción), y el carril 13(M) corresponde al marcador de peso molecular.....32

Figura 6. Electroforegrama en agarosa al 1% de los productos de digestión del ADN total de *Z. californianus californianu*. A. Carril 1: ADN total sin digerir; carril 2: producto de la digestión con Mbo1; M: marcador de peso molecular de 250 pb. B. Carril 1: Producto del corte efectuado en el gel para obtener fragmentos de entre 400 y 1000 pb; M: marcador de peso molecular de 250 pb.....33

Figura 7. Electroforegrama en agarosa al 1 % de pUC18 nativo y ligado. Carril 1: pUC18 nativo; carriles 2 y 4: pUC18 linearizado con insertos entre 400 y 900 pb; carril 3: pUC18 nativo linearizado; M: marcador de peso molecularde 250 pb.....34

Fig. 8. Electroforegrama en agarosa al 1% de algunos fragmentos amplificados mediante PCR. M: marcador de peso molecular de 250 pb. Los números sobre los demás carriles corresponden a cada clona amplificada.....35

Figura 9. Electroforegrama en gel de agarosa al 1% de pUC18 con inserto genómico, digerido con PvuII. Carril M: marcador de peso molecular (ADN de λ digerido con Hind III). Carril P: pUC18 nativo y digerido con PvuII. Los números sobre los demás carriles pertenecen a las clonas, según su número de identificación..... 37

Figura 10. Secuencias obtenidas a partir de la selección e identificación de microsatélites. Las secuencias de dinucleótidos se encuentran marcadas con color verde. Mientras que los cebadores diseñados son marcados con color azul.....41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Condiciones del termociclador para la amplificación: Columnas 1: Número de ciclos, 2: El tiempo, 3: La temperatura para cada paso del PCR y 4: Los ciclos utilizados durante la amplificación.....24

Tabla II. Tamaño y concentración de los fragmentos elegidos para la secuenciación. Columna 1: número de la clona, columna 2: tamaño calculado (pb) de los fragmentos, columna 3: concentración de ADN (fragmento amplificado).....36

Tabla III. Tamaño y concentración de los fragmentos elegidos para la secuenciación. Columna 1: número de la clona. Columna 2: tamaño calculado (pb) de los fragmentos. Columna 3: concentración de ADN plasmídico.....37

Tabla IV. Secuencias obtenidas a partir de ADN extraído mediante PCR. Columna 1: número de la clona. Columna 2: cebador utilizado para la secuenciación. Columna 3 y 4: el número y porcentaje de N's, respectivamente. Columna 5: obtención de la secuencia. La letra F, representa a los cebadores *forward* y la R a los *reverse*. N: Bases ambiguas. ND: Número de N's sin determinar. (+): obtención positiva de la secuencia. (-): Obtención negativa de la secuencia.38

Tabla V. Secuencias obtenidas a partir de ADN extraído mediante miniprep. Columna 1: número de la clona. Columna 2: cebador utilizado para la secuenciación. Columna 3 y 4: el número y porcentaje de N's, respectivamente. Columna 5: obtención de la secuencia. La letra F, representa a los cebadores *forward* y la R a los *reverse*. N: Bases ambiguas. ND: Número de N's sin determinar. (+): Obtención positiva de la secuencia. (-) Obtención negativa de la secuencia.....39

Tabla VI. Nombre del locus y de microsatélite correspondiente, clasificación, tamaño del producto esperado, T_m de ambos cebadores (*forward* y *reverse*) y posición de la secuencia.....43

Tabla VII. Comparación de cebadores. Las primeras 4 filas corresponden a los loci reportados para otras especies, las siguientes 6 filas, a los loci diseñados para *Z. c. californianus*. Columna 1: loci y números de acceso a GENBANK, columna 2: Cebadores forward y reverse en dirección 5'-3', columna 3: Tamaño del cebador, columna 4: Temperatura de reincorporación, columna 5: Porcentaje de C-G, columna 6 y 7: Dimerizaciones, columna 8: Formación de hairpins, columna 9: Tamaño del producto y columna 10: Formación de productos alternos. (♣) T_m reportadas y probadas en artículo (Allen *et al.*, 1995). (*) Dímeros más estables de lo permitido (ver texto).....59

INTRODUCCION

1. Marcadores moleculares.

En los estudios de genética de poblaciones, se utilizan distintas técnicas moleculares, como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism* o *RFLP*) de ADN mitocondrial (ADNmt), la secuenciación de segmentos de ADN y los VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Sus aplicaciones incluyen la estimación de la variación dentro y entre poblaciones, los niveles de flujo génico, el tamaño efectivo de la población, los patrones de biogeografía histórica y los análisis de paternidad y parentesco entre otros (Dowling *et al.*, 1990). El tipo de marcador molecular que se elige depende en gran medida del nivel de resolución y la problemática que se está abordando.

El ADNmt es un marcador valioso para la determinación de la variación dentro y entre poblaciones, y en estudios filogenéticos. La carencia de recombinación permite que el genoma mitocondrial sea heredado como un solo locus sin par homólogo. Sin embargo, la estimación de la diversidad génica obtenida por este medio puede tener un mayor error estándar que las estimaciones comparables realizadas utilizando un gran número de loci nucleares.

Dado que el ADNmt es heredado maternalmente en muchos animales, se han encontrado discrepancias en algunos estudios poblacionales, cuando el ADNmt y el

nuclear han sido examinados (Burg *et al.*, 1999). Estas discrepancias, se encuentran en análisis de poblaciones de organismos que presentan modelos de migración específica de sexos, especialmente organismos marinos, tales como ballenas jorobadas (Palumbi y Baker, 1994) y focas comunes (Burg *et al.*, 1999). Sin embargo, estas diferencias más que un problema, han sido de gran ayuda para realizar análisis de estructura de poblaciones y migraciones diferencial por sexos en este tipo de organismos.

El descubrimiento de que muchos genomas eucarióticos contienen secuencias de ADN nucleares altamente repetitivos proveyó una nueva fuente de marcadores nucleares polimórficos que pueden ser utilizados para diversos propósitos, incluyendo aplicaciones en ciencia forense, análisis de paternidad, estimación de relaciones genéticas y genética cuantitativa (Carvalho, 1998).

Actualmente, los marcadores nucleares más utilizados son los microsatélites, los cuales pertenecen a un grupo de secuencias repetidas en tándem (VNTR'S) que se encuentran abundantemente en los genomas eucarióticos y son además altamente polimórficos.

Estos marcadores nos permiten obtener datos de parentesco, a niveles de identificación de cada individuo, por lo que es posible realizar análisis de comportamiento reproductivo, conducta, migraciones, índice de endogamia, efecto fundador y estructuración genética de grupos dentro de la población.

2. Microsatélites.

Los microsatélites son secuencias simples de repeticiones cortas en tándem, de no más de 6 pares de bases (Schlötterer y Pemberton, 1994; Lambert y Millar, 1995; Jarne y Lagoda, 1996). Se consideran marcadores codominantes, altamente polimórficos y densamente distribuidos a través de los genomas eucarióticos (Goldstein y Schlötterer, 1999). Estos son capaces de identificar individualmente a un organismo y establecer la variabilidad genética de una población.

Los microsatélites se pueden amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para ser analizados electroforéticamente en función de la variación de su tamaño (Wrihgt y Bentzen, 1994), por lo que estos marcadores proveen una evaluación rápida y representativa de variabilidad en la secuencia nuclear, con niveles de heterocigosis frecuentemente mayores al 70% (Carvalho, 1998).

Existe una relación entre el tamaño de las repeticiones, la composición del microsatélite y la heterocigosis (Weber, 1990). El nivel de heterocigosis está en función del número de variantes alélicas; a mayor heterocigosis, mayor será la resolución para caracterizar individuos y poblaciones, aunque su significancia dependerá del número de loci y de individuos analizados.

El hecho de que los microsatélites se distribuyen a lo largo de todo el genoma eucariótico permite aislarlos fácilmente por medio de métodos estándar de clonación.

Los microsatélites se encuentran flanqueados por secuencias conservadas lo que le confiere especificidad a cada locus de microsatélite (Estoup y Turgeon, 1996). Por lo tanto, una vez que se conoce la secuencia del locus del microsatélite, se pueden diseñar cebadores (*primers*) en las secuencias conservadas que los flanquean.

Los cebadores de microsatélites frecuentemente amplifican secuencias comunes a muchas especies relacionadas filogenéticamente a nivel de género, y ocasionalmente han amplificado entre organismos a nivel taxonómico de familia.

El análisis de bases de datos de ADN reveló que las posiciones de las secuencias conservadas que flanquean a los microsatélites dinucleótidos se encuentran frecuentemente conservadas entre especies de mamíferos, permitiendo la utilización de microsatélites entre especies relacionadas (Moore *et al.*, 1991).

Sin embargo, los niveles de polimorfismo desplegado por un microsatélite en especies diferentes es variable (Moore *et al.*, 1991). La eficiencia con la que los loci de microsatélites específicos pueden ser utilizados en otras especies, debe ser empíricamente determinado en cada especie. Por ejemplo, de 48 cebadores polimórficos y específicos identificados en ganado vacuno, 20 fueron variables en ovejas y ninguno en caballos. (Moore *et al.*, 1991).

Otro problema derivado de trabajar con microsatélites no específicos (de especies distintas), es la homoplasia. Este fue un concepto utilizado por evolucionistas, para caracterizar el hecho de que un carácter presente en dos especies, no es derivado del mismo carácter en una especie ancestral común; la similitud se debe directamente a factores tales como la convergencia, el paralelismo o la reversión (Goldstein y Schlötterer, 1999). Trasladado al nivel genético, esto quiere decir que dos alelos son homoplásicos cuando son idénticos en estado, a pesar de que no son idénticos por descendencia (Goldstein y Schlötterer, 1999)

En el caso particular de los microsatélites, alelos del mismo tamaño pueden provenir de eventos mutacionales distintos. Por ejemplo, en estudios con dos especies de abejas (*Apis mellifera* y *Bombus terrestris*), no fue encontrada ninguna diferencia entre electroformas (productos de PCR del mismo tamaño), que vienen de la misma subespecie (Estoup *et al.*, 1995). En contraste, fueron detectadas diferencias en las secuencias en subespecies relacionadas distantemente, mostrando que el tamaño de homoplasia frecuentemente se presenta en estos niveles de diferenciación de la población (Estoup *et al.*, 1995).

Por lo tanto, para un análisis óptimo con microsatélites, es preferible la utilización de cebadores de la especie que se va a estudiar. Esto ayudará a reducir datos erróneos de homoplasia y de diferencias polimórficas entre especies a partir de un mismo locus de microsatélite específico.

3. El lobo marino de California, *Zalophus californianus californianus* (Lesson, 1828) Allen, 1880: Modelo de estudio.

El lobo marino de California desde 1800 y hasta 1972 se cazó comercialmente (Cass, 1985), lo que diezmo la población. Sin embargo, desde 1982 el lobo marino se encuentra en veda permanente por el gobierno de México (Ley Federal de Pesca, 1986). Actualmente, algunos autores consideran que la población se ha recuperado (Zavala, 1990; Lowry *et al.*, 1992).

Sin embargo, el hecho de que el número de individuos se ha incrementado, no revela por sí solo que la población se encuentre recuperada. Es probable que la población haya sufrido un cuello de botella que haya disminuido su variabilidad genética, como se ha demostrado que sucedió con el lobo marino de Steller (York *et al.*, 1996), especie que también fue explotada.

Actualmente la población del lobo marino en México, se ha estimado en 74,467 individuos en la costa occidental de la Península de Baja California (Lowry *et al.*, 1992) y 28,220 en el Golfo de California (Zavala, 1990). Este número relativamente elevado de organismos, ha generado interacciones con pesquerías, ya que estos organismos se concentran en las zonas de mayor productividad y frecuentemente compiten por la pesca. Debido a lo anterior, es necesario implementar un plan de manejo adecuado para la conservación y regulación de esta especie.

Sin embargo, para poder implementar normas que regulen el manejo adecuado de la especie, es necesario conocer los aspectos genéticos de esta población, que a pesar de haber incrementado su número, se desconoce aún su variabilidad genética.

El conocimiento acerca de la genética de la población del lobo marino de California es limitado, sólo un trabajo ha sido publicado relacionado respecto a este tema (Maldonado *et al.*, 1995). En este trabajo se encontraron diferencias genotípicas a nivel de ADNmt entre las poblaciones del Pacífico y las del Golfo, no obstante, el número de organismos muestreados fue relativamente bajo (40 individuos en total) y sólo cuatro loberas fueron comparadas.

El presente trabajo es parte de un proyecto del grupo de biología molecular de la facultad de ciencias marinas, UABC, que pretende abarcar el estudio genético de las poblaciones del lobo marino de California, tanto en el Pacífico norte, como en el Golfo de California. Este proyecto actualmente es realizado por la M. en C. Yolanda Schramm Urrutia, bajo la dirección del Dr. Jorge de la Rosa Vélez. La primera parte de este proyecto se realizó a través del análisis del ADNmt, mientras que la segunda parte involucrará el análisis de microsatélites amplificados con los cebadores generados en el presente trabajo.

Como se mencionó anteriormente, el análisis de la secuencias de ADNmt, genera información valiosa, relacionados con datos filogenéticos y de estructura genética de la

población en una escala macro geográfica, para un análisis genético completo es necesario complementar esta información con datos obtenidos a nivel nuclear.

Los microsatélites nos permiten obtener información de la estructura genética dentro de la población, así como de eventos poblacionales a una escala de tiempo menor, tales como la endogamia, los cuellos de botella o los efectos fundadores; y al comparar los datos con los obtenidos con el ADNmt, es posible analizar la migración diferencial por sexos.

Los eventos de caza extensiva, la recolonización de esta zona durante la última glaciación, la filopatria al sitio observada en hembras, así como el comportamiento reproductivo estacional y de machos territoriales, hacen de estos marcadores las herramientas moleculares adecuadas para el análisis genético de esta especie.

3 Uso de microsatélites en pinnípedos.

Se han utilizado distintos métodos para el análisis de la estructura de las poblaciones en pinnípedos, así como de su comportamiento reproductivo y ecológico. Las técnicas involucran, marcaje, radiotelemetría y observaciones directas, entre otras.

No obstante, aún quedan problemas y preguntas sin resolver en el estudio de estos organismos. Con el involucramiento de las técnicas moleculares en este campo, se han comenzado a resolver incógnitas que hasta la fecha no habían sido resueltas con las

técnicas habituales. Tal es el caso del comportamiento reproductivo, el cual en varias especies de pinnípedos ha sido documentado mediante observaciones directas en campo de cópulas y comportamiento durante la temporada reproductiva. Sin embargo, los análisis realizados utilizando técnicas moleculares para asignar paternidad y relaciones familiares entre individuos, han demostrado que, en algunos casos, las cópulas observadas de los machos, no coinciden con la paternidad asignada a las crías en el territorio donde se realiza la cópula, como sucede con el lobo fino de dos pelos (Gemmell *et al.*, 2001).

También han aportado datos valiosos en cuanto a las migraciones de estos organismos, midiendo el flujo génico entre poblaciones, datos que complementan los obtenidos mediante telemetría, como sucedió con estudios en foca común (Burg *et al.*, 1999).

La mayoría de los estudios de poblaciones recientes en pinnípedos, involucran algún tipo de marcador molecular en sus estudios, principalmente ADNmt y microsatélites. El poder de resolución de estas dos técnicas ya ha sido discutido ampliamente en los temas anteriores.

El estudio de pinnípedos utilizando la técnica de microsatélites en el análisis genético de estas poblaciones, es relativamente nuevo: En 1995, Allen *et al.*, desarrollaron un grupo de cebadores para microsatélites que representan ocho loci, los cuales fueron utilizados para medir la variación genética y la diferenciación entre dos

colonias de reproducción de foca gris (*Halichoerus grypous*), en Inglaterra. En este estudio, se encontró evidencia de diferenciación genética entre las dos colonias de reproducción, a pesar de que se encontraban separadas por sólo ~500 km. El grado de resolución y la relativa facilidad para realizar análisis a partir de pequeñas muestras de tejido, impulsaron a varios investigadores a seguir obteniendo un grupo más numeroso de loci de microsatélites con lo cuales poder trabajar.

Para foca común (*Phoca vitulina concolour*), Coltman *et al.* (1996) reportaron el rastreo de 5,000 clonas recombinantes, con la sonda dinucleotída (CA)₁₅. Sesenta y seis clonas hibridaron con la sonda, de las cuales 34 tuvieron por lo menos cinco repeticiones de dinucleótidos seguidos. Diseñaron cebadores para 12 loci con al menos 9 repeticiones. De éstos, sólo 7 loci amplificaron exitosamente.

Debido al interés por realizar análisis de pinnípedos con microsatélites Gemmel *et al.* (1997), analizaron 20 cebadores para microsatélites de diferentes especies de pinnípedos, los cuales fueron probados en 18 especies de estos organismos. Se encontró que un gran número de cebadores amplifican loci polimórficos exitosamente en diversas especies de pinnípedos, lo que permitió que a partir de estos loci pudieran seguir realizando estudios genéticos en pinnípedos.

Un año después, se utilizaron estos microsatélites para evaluar la variabilidad genética de la población de foca común (Goodman, 1998), así como también para

analizar el éxito de apareamiento en los machos, demostrando la eficacia del sistema de apareamiento acuático en estos organismos (Gemmel *et al.*, 1998).

En 1999, Burg *et al.*, realizaron estudios de variabilidad genética en varias poblaciones de foca gris, aportando, a la vez, dos nuevos loci de microsatélites en esta especie. Además, probaron la eficacia de estos marcadores al obtener resultados que indicaban una migración más alta por parte de los machos en comparación con las hembras.

Un estudio reciente de análisis de paternidad del lobo fino de dos pelos (*Arctocephalus gacela*), demostró la eficacia de estos marcadores en el estudio del comportamiento reproductivo en pinnípedos. La evidencia genética y de comportamiento en este estudio, sugirió que un número de estrategias alternativas de apareamiento puede existir dentro de esta población (Gemmel *et al.*, 2001).

La foca monje de Hawai también fue objeto de estudio utilizando esta técnica. De 27 loci aislados de otras especies de focas, sólo tres fueron polimórficos en una recolecta inicial de un individuo por cada colonia (Kretzmann *et al.*, 2001). En este estudio determinaron una variación extremadamente baja, consistente con otras medidas de variabilidad genética en esa especie.

La baja cantidad de loci polimórficos fue atribuida principalmente a un cuello de botella severo reciente. Sin embargo, también es posible que este resultado se relacione

con la diferencia de variabilidad en el grado de polimorfismo de un microsatélite en especies distintas.

Como se mencionó anteriormente, el uso de microsatélites pertenecientes a otras especies puede generar que las relaciones entre el tamaño de las repeticiones y la heterocigosis presente en la especie original, no permanezca para nuevas especies (Weber, 1990, Moore *et al.*, 1991).

Las ventajas combinadas de alta diversidad alélica y alta heterocigosis, junto con el potencial para un rápido análisis automatizado de grandes tamaños de muestra, han puesto a los microsatélites en el centro de las propuestas de investigación en genética de poblaciones y ecología molecular.

Es significativo observar que a partir de la obtención de algunos loci de microsatélites en tres especies de pinnípedos, fue posible realizar los trabajos arriba mencionados. Esto hace suponer que con un mayor número de loci, pertenecientes a otros pinnípedos, será posible realizar un número más amplio de estudios en diferentes especies de estos organismos.

Como se mencionó anteriormente, es importante para planes de manejo y conservación la evaluación de la variabilidad genética y de la estructura poblacional del lobo marino de California. Sin embargo, a pesar de que ya existen loci de microsatélites

para otras especies de pinnípedos, la mayoría pertenece a diferentes familias taxonómicas, principalmente a fócidos (familia Phocidae).

Es importante tener en cuenta que si se quiere obtener una mejor especificidad y sensibilidad de estos marcadores para conseguir resultados eficientes en el análisis poblacional, es de suma importancia la utilización de marcadores genéticos específicos para la misma especie. Por lo que el objetivo principal de este trabajo fue la obtención de microsatélites dinucleótidos a través de la clonación de fragmentos de ADN, rastreo (*screening*) con una sonda dinucleótida y finalmente el diseño de los cebadores específicos para los loci encontrados.

Se espera que a partir de estos cebadores se pueda contribuir a realizar el estudio de la estructura poblacional y del comportamiento reproductivo en el lobo marino de California.

MATERIALES Y METODOS¹.

1. Preparación de ADN genómico de alto peso molecular.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de tejido epidérmico de *Zalophus californianus californianus*. Fueron probadas 11 muestras de diferentes loberas del Pacífico de Baja California y del Golfo de California. Estas muestras fueron proporcionadas por la M. en C. Yolanda Schramm y obtenidas bajo el permiso No. D00750.8106/97 de SEMARNAP, para colecta de muestras. La muestra utilizada pertenece a un organismo de la lobera San Jorge, localizada en el Golfo de California, México.

1.1 Digestión de tejido.

Para la extracción de ADN se cortó finamente 0.5 g de tejido, con la ayuda de bisturí y pinzas. Se realizó la digestión del tejido con 40 µl de proteinasa K (concentración final 10 µg / ml), 40 µl de SDS (concentración final 1 %) y 400 µl de amortiguador de extracción durante aproximadamente 20 horas con agitación constante a temperatura ambiente. Para la separación de proteínas y la extracción de ácidos nucleicos, se utilizó el método fenol-cloroformo, seguido por una

¹ Nota: Los protocolos de los kits empleados en este estudio se encuentran en el anexo 1. La preparación de los reactivos utilizados en los procedimientos se encuentran en el anexo 2 y los acrónimos son presentados al final de este anexo.

precipitación con etanol/acetato de sodio (Sambrook *et al.*, 1989; Palsbøl, 1991²) que se describe a continuación.

1.2 Método fenol/cloroformo.

El producto de la digestión enzimática se centrifugó a 5,000 x g durante 5 minutos. Se agregaron 400 µl de fenol equilibrado y se agitó enérgicamente hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo que contenía 200 µl de fenol equilibrado y 200 µl de cloroformo: alcohol isopropílico (24:1) y se agitó. Se centrifugó a 12,000 x g durante 7 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo que contenía 400 µl de cloroformo : alcohol isopropílico y se agitó. Posteriormente se centrifugo a 12,000 x g durante 3 minutos. Finalmente, se repitió el paso anterior.

1.3 Precipitación con etanol / acetato de sodio

Se agregaron 50 µl de acetato de sodio 3M y 1 ml de etanol absoluto frío. Se dejó precipitar durante 2 horas a - 80°C y se centrifugó a 12,000 x g a 4°C por 10 minutos. El precipitado obtenido fue lavado con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó bajo las condiciones anteriores. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado completamente.

² Per Pasbøl, 1991. Informe Interno. Department of Population Biology, Zoological Institute, University of Copenhagen.

Después de resuspender el precipitado en 200 µl de amortiguador TE, la concentración fue medida utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 80 volts, mediante una comparación visual contra un estándar de ADN, sometido a las mismas condiciones de electroforesis (Sambrook *et al.*, 1989).

1.4 Purificación de ADN

Para eliminar el ARN presente en la muestra, se añadieron 20 µl de solución de ARNasa 1x a los 200 µl de la solución de ADN. Se realizó una purificación para eliminar sales y otros contaminantes, para lo que se utilizó un kit comercial (GLASSMAX DNA Isolation Spin Cartridge System, GIBCOBRL®) y se resuspendió en 200 µl de agua destilada y estéril.

2 Digestión del ADN con la enzima de restricción Mbo1 y selección del tamaño.

2.1 Digestión.

Se digirieron aproximadamente 50 µg de ADN genómico con 1µl (10u) de la enzima Mbo1 (GIBCOBRL®) (sitio de restricción: GATC) durante 12 horas a 37°C. Para producir un número grande de fragmentos que se encontraron en el intervalo de interés (100 pb - 2,500 pb).

2.2 Selección de tamaño.

Los productos de la digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% a 80 voltios por 1 hora, junto con un marcador de peso molecular con intervalos de 250

pb (GIBCOBRL®). Los fragmentos con un tamaño entre 400 y 1000 pb se extrajeron del gel utilizando el kit CONCERT™ Gel Extraction Systems (GIBCOBRL®). Con una hoja de bisturí se cortó la sección de gel que contenía los fragmentos deseados.

El protocolo del kit comercial fue ligeramente modificado, ya que se incrementó a 65°C y 20 minutos la temperatura y el tiempo de solubilidad del gel, respectivamente. Para recuperar el ADN, se utilizaron 50µl de TE a 70°C. Finalmente fue precipitado con etanol / acetato de sodio y resuspendido en 15 µl de agua destilada y estéril.

3 Digestión, desfosforilación y ligación.

3.1 Digestión con BamHI.

Se digirieron 50 ng del vector pUC18 con 10u de la endonucleasa de restricción Bam HI (GIBCOBRL®) (sitio de restricción GGATCC). Esta mezcla se incubó por 10 minutos a 37°C y se inactivó a 65°C durante 15 minutos. Los extremos generados por la enzima Bam HI son compatibles con los fragmentos generados a partir del ADN genómico por la enzima MboI.

3.2 Desfosforilación con fosfatasa alcalina.

Para desfosforilar el vector se utilizó 1u de fosfatasa alcalina de camarón (Boehringer Mannheim). El producto se incubó por 10 minutos a 37°C y se inactivó a 65°C durante 15 minutos.

3.3 Ligación del fragmento de ADN genómico al vector.

Fueron utilizados 150 ng de ADN genómico digerido con Mbo1, 50 ng del plásmido digerido con BamH1 y desfosforilado, y 5u de la enzima ligasa T4 (Boheringer Mannheim). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (45 min., a 80V) para comprobar la ligación de los fragmentos con el plásmido.

4 Transformación y selección de células transformadas.

4.1 Transformación.

Las células competentes *E. coli* DH5 α (MAX EFFICIENCY, GIBCOBRL[®]) fueron transformadas mediante el protocolo proporcionado por el fabricante, con algunas modificaciones, las cuales se describen a continuación.

Se colocaron 50 μ l de células competentes en 2 tubos (Eppendorf) de 1.5 ml previamente enfriados. En un tubo se adicionó 1 μ l (8 ng) de la reacción de ligamiento y en el otro 0.5 μ l (5 ng). Se incubaron las células en hielo durante 30 minutos y se realizó un choque térmico durante 1 minuto en baño maría a 42°C, sin agitar. Se colocaron las células en hielo por 2 minutos y se le añadieron 900 μ l de medio de cultivo SOC. Se incubaron con movimiento (250 r.p.m.) a 37°C durante una hora.

4.2 Selección de colonias con inserto de ADN genómico.

En dos cajas de Petri que contenían LB sólido, IPTG, (concentración final 20µg/ml), X-Gal (concentración final, 200 µg / ml) y ampicilina (concentración final 100µg / ml), se esparcieron 100 µl del cultivo en cada caja y fueron incubadas a 37°C durante 16 horas (Sambrook *et al.*, 1989). Las colonias blancas que contenían el fragmento fueron seleccionadas

Las colonias con inserto (clonas) fueron transferidas a cajas de Petri con medio LB sólido y ampicilina, para clasificarlas, mediante el uso de una plantilla numérica que permitió ordenar las clonas en función de un código alfanumérico (Fig. 1).

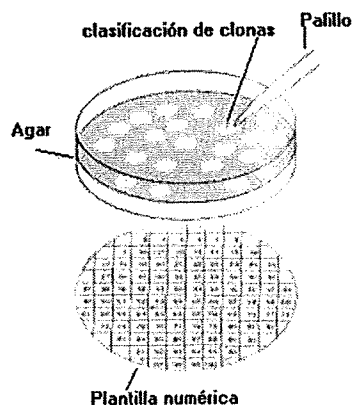


Figura 1. Transferencia de las clonas a otra caja de Petri (con LB sólido) para ordenarlas y clasificarlas. La caja de Petri con las clonas se coloca sobre una plantilla y con ayuda de un palillo, se transfieren a otra caja de Petri sobre otra plantilla en la celda adecuada y numerada.

Cada clona fue transferida por duplicado. Una serie de cajas de Petri con las clonas fue guardada a 4°C, mientras que la otra serie fue utilizada para la hibridación de las colonias como se describe a continuación.

5 Rastreo de la biblioteca genómica parcial e hibridación.

5.1 Transferencia a membranas.

Las clonas fueron transferidas a membranas de nailon cargadas positivamente (Roche Diagnostics GmbH) y marcadas para indicar el orden de la primera colonia (Fig. 2a, b). Se colocó una membrana sobre cada caja de Petri durante 10 minutos, y se ejerció presión suave sobre la membrana. Se transfirieron las membranas (lado bacteriano hacia arriba) con la ayuda de pinzas, sobre las hojas de papel (Whatman®, #3) empapadas con la solución de desnaturalización. Se dejó reposar durante 10 minutos.

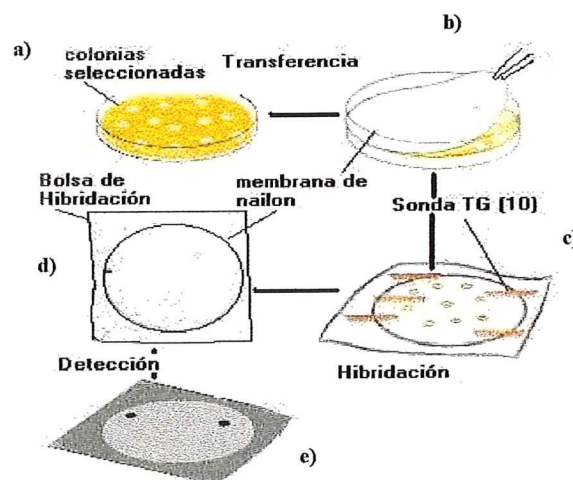


Figura 2. En la gráfica se esquematiza los pasos principales del rastreo de microsatélites en las colonias seleccionadas. a) Colonias seleccionadas (blancas); b) las colonias son transferidas a una membrana de nailon; c) hibridación en la membrana con la sonda TG₍₁₀₎; d) detección de las clonas que hibridaron con la sonda en una bolsa de hibridación y e) ubicación de las colonias detectadas en la membrana.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento con la solución de neutralización (pH 7.5) y, posteriormente, con la solución de lavado. Finalmente, las membranas con las clonas fueron fijadas a 80°C durante 2 horas.

5.2 Marcado de la sonda (TG)₁₀.

El rastreo de microsatélites en la biblioteca genómica parcial, fue realizado con el oligonucleótido (TG)₁₀. Este oligonucleótido fue previamente marcado con digoxigenina. Para el marcaje de la sonda se utilizó el protocolo de DIG-High Prime (Boehringer Mannheim GmbH) y para la cuantificación de la sonda marcada, el protocolo del kit DIG DNA Labeling and Detection (Boehringer Mannheim GmbH).

5.3 Rastreo de la biblioteca genómica parcial.

5.3.1 Lisis y pre-hibridación.

Las membranas con las clonas se colocaron en tubos de hibridación de 250 ml (3 membranas por tubo). La lisis de las clonas fue realizada en una solución de 250 µl de proteinasa K (concentración final de 10 µg / ml) y 25 ml de la solución de lavado 1(L1) dos veces, durante 10 minutos a 45°C. En 50 ml de amortiguador de hibridación se realizó una pre-hibridación durante 2 horas a 45°C.

5.3.2 Hibridación.

Para la hibridación se utilizó la sonda (TG)₁₀ marcada con digoxigenina a una concentración final de 2 ng/µl en 6 ml de solución amortiguadora de hibridación

durante 16 horas (toda la noche) a 45°C (Fig. 2 c). Se lavó 2 veces en 50 ml de la solución de lavado 1 (L1) durante 15 minutos, seguido de otro lavado (2 veces) en 50 ml de la solución de lavado 2 (L2) durante 10 minutos. Se realizaron dos últimos lavados, uno en 50 ml de amortiguador B1 durante 5 minutos y otro en 70 ml de amortiguador B2 durante 40 minutos. Todos los lavados fueron realizados a 45°C.

5.3.3 Incubación con anticuerpos.

Las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en 50 ml de amortiguador B2 con 10 µl de Anti-Digoxigenin-AP (750 mU) (Boehringer Mannheim GMBH) (concentración final de 150mU/ml).

5.3.4 Detección.

Las membranas producto de la incubación con anticuerpos se lavaron dos veces en 50 ml de amortiguador B1 por 12 minutos y una vez en 50 ml de amortiguador B3 durante 5 minutos; ambos lavados fueron realizados a temperatura ambiente.

Las clonas fueron detectadas colocando cada membrana en una bolsa de hibridación (Fig. 2 d, e) con 10 µl de amortiguador B3 y 150 µl de de NBT/BCIP , y se guardó por 2 horas en cuarto oscuro.

Las clonas positivas detectadas a partir del rastreo fueron seleccionadas de la serie previamente guardada a 4°C y transferidas a una caja de Petri con medio LB y

ampicilina (100µg/ml). Esta caja de Petri fue marcada con el nombre del microsatélite y se reclasificó la biblioteca parcial.

5.4 Guardado de clonas positivas en glicerol.

Con ayuda de un palillo estéril, se tomó una fracción de una colonia y se colocó en un tubo de polipropileno (de 12 ml) con 3 ml de LB con ampicilina. Se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante (225 rpm).

En un tubo de 1.5 ml (Eppendorf) se añadieron 700 µl del cultivo del medio LB líquido y 300 µl de glicerol estéril. Las fases del cultivo y el glicerol, se mezclaron y congelaron con hielo seco y etanol. Finalmente fueron guardadas a -80°C.

6 Estimación del tamaño de los fragmentos clonados.

Para la estimación del tamaño los fragmentos clonados, se utilizaron dos técnicas alternativas. La primer técnica se realizó mediante la amplificación de los fragmentos clonados y la segunda por medio de lisis alcalina seguida de digestión enzimática del inserto en pUC18.

6.1 Amplificación (PCR) y estimación del tamaño de los fragmentos clonados

Se extrajo el plásmido de las clonas positivas que hibridaron con la sonda, realizando una lisis de las bacterias en 20 µl de agua destilada y estéril, a 100°C durante 5 minutos. Se utilizaron 3 µl diluidos 1:1 en agua destilada y estéril.

Para la amplificación se tomó 1 μ l de la solución con ADN como molde, 10 pmoles de cada cebador M13 / pUC *forward* y *reverse* (GIBCO BRL®) (fig. 3), y 20 μ l de PCR super Mix (Tris-HCl 22 mM (pH 8.4), KCl 55 mM, MgCl₂ 1.65 mM, dGTP 220 uM, dATP, dTTP 220 uM, dCTP 220 uM, *Taq* polimerasa recombinante 22 u/ml.; GIBCO BRL®). Para esta amplificación se utilizó el termociclador DNA Thermal *Cycler* modelo 480 (PERKIN ELMER). El desarrollo de la amplificación se llevó a cabo según el protocolo descrito en la Tabla I.

Tabla I. Condiciones del termociclador para la amplificación. Columnas 1: número de ciclos, 2: el tiempo, 3: la temperatura para cada paso del PCR y 4: los ciclos utilizados durante la amplificación.

Número de ciclos	Tiempo	Temperatura	Ciclo
1 ciclo	5 minutos	96 ° C	Desnaturalización inicial
5 ciclos	1 minuto	96 ° C	Desnaturalización
	1 minuto	60 ° C	Reincorporación
	4 minutos	72 ° C	Extensión (síntesis)
25 ciclos	1 minuto	94 ° C	Desnaturalización
	1 minuto	43 ° C	Reincorporación
	4 minutos	72 ° C	Extensión (síntesis)
1 ciclo	10 minutos	72 ° C	Extensión (síntesis) final

Para verificar el tamaño del producto amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (45 min, a 80V), junto con un marcador molecular con intervalos de 250 pb.

Los cebadores M13/pUC amplifican a partir de una región cercana al inicio del sitio de clonación múltiple (MCS) del plásmido, cuyo tamaño es de 122 pb (Fig.3). Por lo que para la determinación del tamaño real de los fragmentos genómicos se restó al tamaño estimado dicha región (122 pb).

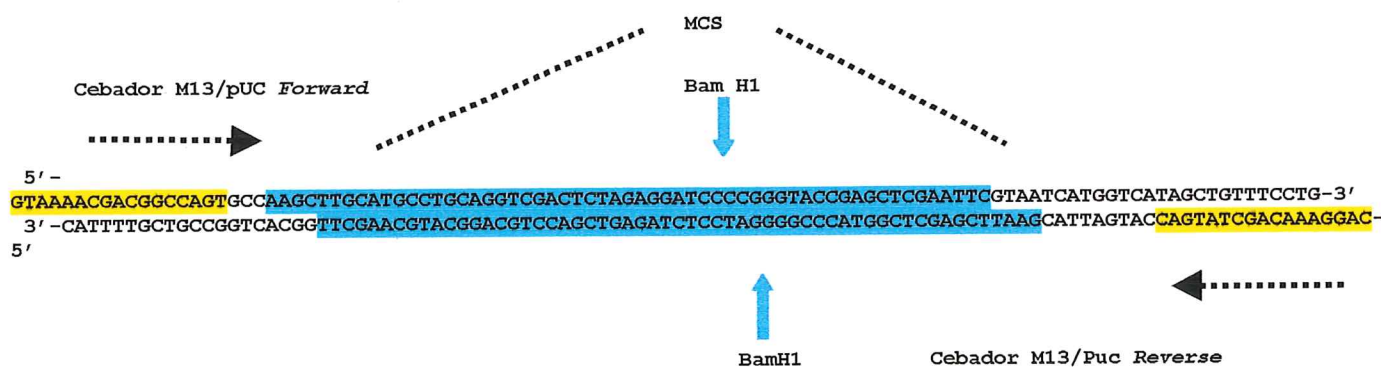


Figura 3. Segmento del plásmido (secuencia 5'-3' y su secuencia complementaria) amplificado con los cebadores *Forward* y *Reverse* M13/pUC GIBCOBRL®). Las flechas negras indican la dirección de la amplificación, las flechas azules indican el sitios de corte de BamH1 y el lugar exacto de la inserción del fragmento genómico. La región marcada en amarillo corresponde a la secuencia de los cebadores; la región marcada en azul corresponde al sitio de clonación múltiple (MCS).

Finalmente, se extrajo del gel el fragmento amplificado de tamaño deseado (entre 400 pb y 1000 pb) con ayuda del kit CONCERT™ Gel Extraction Systems (GIBCOBRL®) para su posterior secuenciación.

6.2 Digestión del plásmido de las clonas positivas y estimación del tamaño de los fragmentos.

6.2.1 Extracción del ADN de las clonas positivas (técnica miniprep³).

Se inoculó cada clona en 3 ml de LB líquido dentro de un tubo de polipropileno de 12 ml y se incubó toda la noche a 37°C. Cada tubo fue marcado de acuerdo al número de la clona correspondiente. Se centrifugaron los 3 ml de cada cultivo, divididos equitativamente en 2 tubos de 1.5 ml (Eppendorf) a 12,000 x g durante 2 min.

Se descartó el medio de cultivo y se resuspendió cada precipitado en 150 µl de GTE. A cada tubo se adicionaron 300 µl de solución de lisis recién preparada y se mezcló enérgicamente. Posteriormente se incubó durante 5 minutos en hielo.

La solución resultante se centrifugó 12000 x g, a 4°C durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, al cual se le agregaron 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isopropílico 24:24:1. Esta mezcla se agitó vigorosamente hasta hacer una emulsión. Inmediatamente se centrifugó 12,000 x g por 1 minuto y el sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 1 ml de etanol absoluto frío. El contenido del tubo se mezcló completamente e incubó en hielo durante 10 minutos.

Se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante (etanol). El precipitado obtenido fue lavado con 1 ml de etanol al 70% y centrifugado bajo las

³ Nota: **miniprep** viene de la palabra en inglés *minipreparation*.

condiciones anteriores. Se repitió el paso anterior. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado completamente. Este precipitado fue resuspendido en 100 μ l de TE.

El ARN fue eliminado añadiendo 10 μ l de solución de RNasa 1x a los 100 μ l de solución con ADN. Se realizó una purificación para eliminar sales y otros contaminantes utilizando el kit CONCERTTM PCR Extraction Systems (GIBCOBRL[®]).

El producto de la purificación fue guardado y etiquetado para su uso posterior, tanto en la digestión, como en la secuenciación.

6.2.2 Digestión del plásmido con PvuII y estimación del tamaño de los fragmentos.

Se digirieron 20 μ g del plásmido con 20u de la enzima de restricción PvuII (GIBCOBRL[®]), que corta un fragmento de 322 pb el cual incluye la región de inserción del plásmido (MCS) (Fig. 4). Esta digestión se incubó a 37°C durante aproximadamente 36 horas.

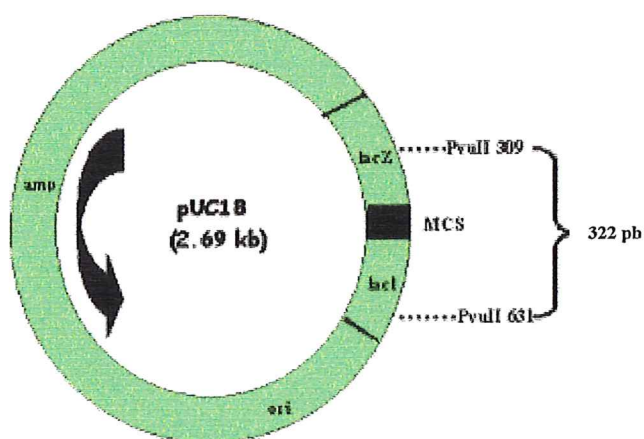


Figura 4. Plásmido pUC18. Se indican los sitios de corte de PvuII, el corchete indica el fragmento generado con la digestión, y MCS es el sitio de clonación.

El tamaño del fragmento digerido se verificó por medio una electroforesis en gel de agarosa al 1% (45 min, a 80V), junto con un marcador de peso molecular con intervalos de 250 pb.

7 Secuenciación y detección de microsatélites.

7.1 Secuenciación .

Los productos de la extracción del gel (técnica PCR) y de la extracción del plásmido (técnica miniprep), que presumiblemente contenían microsatélites fueron enviados para su secuenciación al Microchemical Core Facility (San Diego State University, E.U.), donde utilizan el secuenciador ABI Prism 377 DNA. Para la secuenciación fueron utilizados los cebadores universales -21 M13 *forward* y *reverse* (Fig. 3), para obtener la secuencia 5'-3' y la hebra complementaria de cada fragmento clonado.

7.1.1 Eliminación de bases ambiguas.

La eliminación de las bases ambiguas (N's) se realizó utilizando el programa **DNASTar**, donde se acoplaron ambas secuencias (*forward* y *reverse*) (Fig. 3).

Se editaron las secuencias con “**Edit Seq**” (del programa **DNASTar**) eliminando la secuencia perteneciente al plásmido (secuencia conocida). Se utilizó “**Reverse Complement**” dentro del editor “**Edit Seq**” con cada *secuencia reverse* para generar una copia complementaria (*secuencia forward-r*).

Ejemplo:

Secuencia reverse:

3' -CATTGTGCTGCCGGTCACGGTTGGAACGTACGGACGTCCAGCTGAGATCTCCTAGGGGCCCATGGCTCGAGCTTAAGCATTAGTACCAGTATCGACAAAGGAC-5'

Secuencia forward-r generada a partir de la *secuencia reverse*:

5' -GTAAACGACGGCCAGTGCCTGCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG-3'

Cada *secuencia forward-r* fue alineada con su *secuencia forward* utilizando “MegAlign” (opción “Clustal”) y las N’s fueron eliminadas por comparación.

7.2 Detección de microsatélites en las secuencias.

Se seleccionaron las clonas cuyas secuencias contenían microsatélites (secuencias simples) de más de 5 repeticiones sin ambigüedades (N’s). Los microsatélites obtenidos fueron clasificados en compuestos, perfectos e imperfectos, según lo propuesto por Weber (1990).

8 Diseño de los cebadores

Los cebadores se diseñaron y seleccionaron en el programa “DNASTar” para PC, utilizando “Primer Select” de acuerdo a los siguientes criterios:

- A) Ambas secuencias (forward y reverse), deben ser leídas inequívocamente (sin nucleótidos indeterminados).
- C) No se deben encontrar ni demasiado cerca, ni demasiado lejos del microsatélite (deben generar fragmentos de entre 100 pb a 250 pb).

- C) El tamaño de los cebadores debe oscilar entre 18 y 25 secuencias nucleotídicas al azar (sin repeticiones y con una sucesión al azar de nucleótidos).
- E) Deben presentar un alto contenido de G y C (no menos de 50%), distribuido regularmente a lo largo de la secuencia del cebador (evitar series de A y T de más de 5 nucleótidos).
- F) El T_m de los dos pares de cebadores debe ser aproximadamente igual y oscilar entre los 45°C y 65°C.
- G) Los cebadores no deben formar estructuras secundarias (hairpin).
- H) La formación de dímeros debe ser baja (sin homologías intra-cebador, ni inter-cebadores).
- I) Se debe evitar la formación de productos alternos.

Como estrategia alternativa, a partir de aquellas secuencias que el programa no pudo generar cebadores, se diseñaron al azar cebadores forward (denominados como *upper* en el programa) de la región 10 a partir del microsatélite en dirección 3'-5', hasta la región 100. Este cebador se utilizó dentro de **Primer Select** para que el programa generara el o los cebadores complementarios. Aquellos cebadores que presentaron dimerización, tanto consigo mismos como con su complementario de más de 3 pb, fueron eliminados. Se utilizó también la opción "**Upper Primer Workbench**" o "**Lower Primer Workbench**" (dependiendo del cebador), la cual permitió ir eliminando bases al mismo tiempo que se analizaba la formación de dímeros.

Para validar el diseño teórico de los cebadores, se realizó un análisis y comparación con 4 pares de cebadores de microsatélites pertenecientes a organismos del mismo Suborden (Pinnipedia): Tres pares de foca gris (*Halichoerus grypus*) y un par de foca común (*Phoca vitulina*) (Allen *et al.*, 1995). Estos cebadores han sido utilizados eficazmente en distintos análisis poblacionales y de ecología molecular de pinnípedos.

RESULTADOS

1 Preparación de ADN genómico de alto peso molecular

De la extracción realizada a partir del tejido epidérmico de 12 organismos de diferentes loberas, se obtuvo ADN de calidad adecuada (Fig. 5). Todas las extracciones presentaron una alta concentración de ADN y nula degradación, con excepción del carril 11 (Fig. 5).

Se eligió la extracción de ADN total del organismo de la lobera San Jorge (carril 1, Fig. 5) para efectuar la clonación. La concentración, fue de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, previa a la limpieza del producto de PCR. La concentración final fue estimada en 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

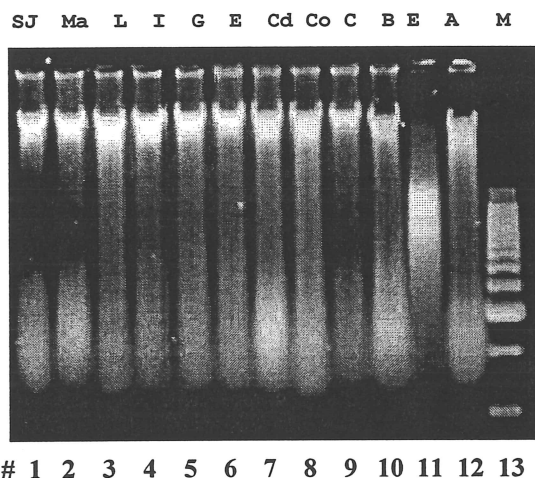


Figura 5. Electroforegrama en agarosa al 1% de ADN total de 12 organismos de *Z. californianus californianus* de diferentes. Los carriles pertenecen a la iniciales del nombre de cada lobera donde se tomó la muestra, carriles: SJ (San Jorge), Ma (Margarita), L (Lobos), I (Islotes), G (Granito), E (Esteban), Cd (Cedros), Co (Coronados), C (Cantiles), B (Benitos), A (Asunción), y el carril 13 (M) corresponde al marcador de peso molecular.

2 Digestión del ADN con la enzima de restricción MboI y selección del tamaño.

Los fragmentos obtenidos a partir de la digestión del ADN genómico con la enzima MboI, correspondieron a un tamaño aproximado entre 100 y 2500 pb (Fig. 6A). El corte

efectuado en el gel fue para obtener fragmentos de entre 400 y 1000 pb (Fig. 6B). La concentración final de este intervalo de tamaño fue de 150 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$.

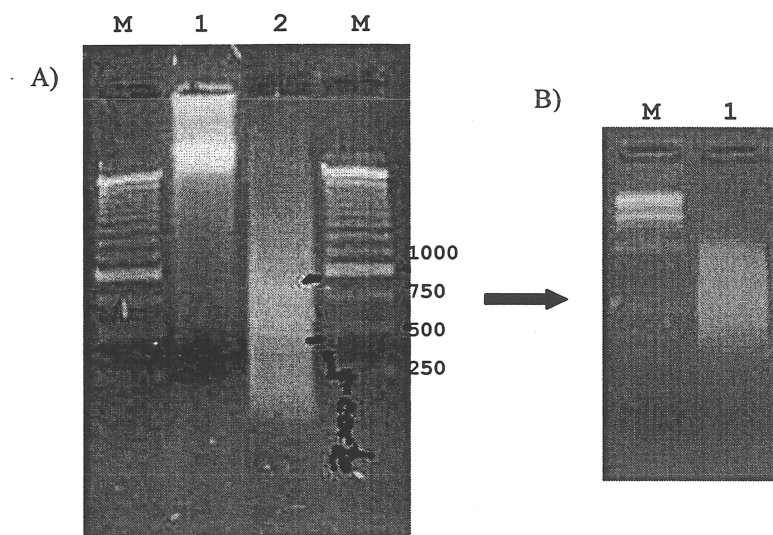


Figura 6. Electroforegrama en agarosa al 1% de los productos de digestión del ADN total de *Z. californianus californianus*. A) Carril 1: ADN total sin digerir; carril 2: producto de la digestión con MboI; M: marcador de peso molecular de 250 pb. B) Carril 1: Producto del corte efectuado en el gel para obtener fragmentos de entre 400 y 1000 pb; M: marcador de peso molecular de 250 pb.

3 Digestión, desfosforilación y ligación.

La digestión con BamHI linearizó adecuadamente al plásmido pUC18, lo cual se constató mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 1 hora a 60V (Fig. 7).

Una vez realizada la ligación, se comprobó la efectividad de ésta digiriendo al pUC18 nativo y con inserto con BamHI, y efectuando una electroforesis en agarosa al 1%, durante 1 hora a 60V (Fig. 7). Las bandas reveladas indicaron la presencia de fragmentos ligados con tamaños entre 400 y 1,000 pb.

4 Transformación bacteriana y selección de células transformadas.

Una biblioteca genómica parcial de 1302 colonias se obtuvo de la transformación realizada con las células competentes de *E.coli* DH5 α (GIBCOBRL®). El promedio de fragmentos fue de 700 pb, por lo que se clonó aproximadamente un total de 9.1×10^5 pb del genoma del lobo marino de California.

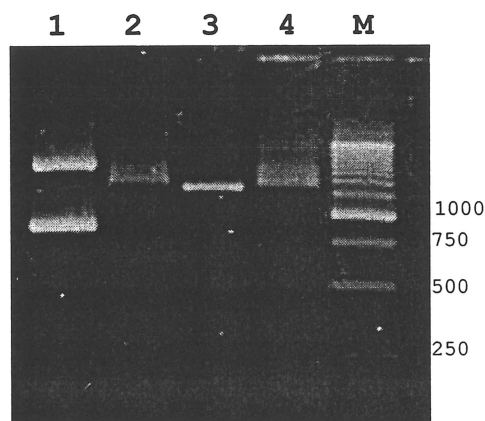


Figura 7. Electroforegrama en agarosa al 1% de pUC18 nativo y ligado. Carril 1: pUC18 nativo; carriles 2 y 4: pUC18 linearizado con insertos entre 400 y 900 pb; carril 3: pUC18 nativo linearizado; M: marcador de peso molecular.

5 Rastreo (screening) de la biblioteca genómica parcial e hibridación.

La concentración de la sonda (TG)₁₀ marcada con digoxigenina fue de aproximadamente 400 ng/ μ l, de la cual se utilizaron 80 ng por cada 3 membranas en la hibridación de las clonas transferidas a la membrana de nailon.

Un total de 52 clonas que hibridaron positivamente con el oligonucleótido (TG)₁₀ se obtuvieron del rastreo realizado en la biblioteca genómica parcial de 1302 clonas. Las clonas reclasificadas y transferidas a una caja de Petri con LB y ampicilina/(100mg/ml), fueron nombradas de acuerdo al número en la plantilla.

6 Estimación del tamaño del inserto.

Se presentan los resultados de las dos técnicas alternativas utilizadas para estimar el tamaño del inserto: PCR y digestión con la enzima PvuII.

6.1 Amplificación de fragmentos genómicos clonados (PCR).

De 14 clonas seleccionadas al azar a partir de las que hibridaron, se amplificaron los fragmentos de ADN plasmídico resultando en insertos desde 500 a 900 pb (Fig. 8).

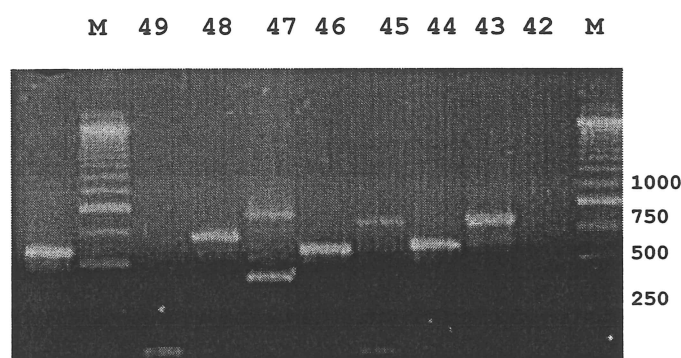


Figura 8. Electroforegrama en agarosa al 1% de algunos fragmentos amplificados mediante PCR. M: marcador de peso molecular de 250 pb. Los números sobre los demás carriles corresponden a cada clona amplificada.

La clona 47 presentó una aparente contaminación con otra clona. Como se aprecia en la figura 8, aparecen dos bandas de diferente peso molecular. Debido a esto, la clona se reamplificó y los productos fueron aislados mecánicamente por escisión del gel de cada producto por separado.

El fragmento más pequeño corresponde a la clona 46, con un tamaño aproximado de 600 pb (Fig. 8). El tamaño de la región del plásmido que se amplifica corresponde a un fragmento de únicamente 68 pb (Fig. 8), por lo que el resto del fragmento corresponde al ADN de *Z. c. californianus*. El fragmento más grande corresponde a la clona 47, con un

tamaño de aproximadamente 900 pb (Fig. 8, Tabla II). Se seleccionaron los 10 fragmentos de mayor tamaño para llevar a cabo la secuenciación (12, 15, 20, 24, 43, 44, 45, 46, 48, y 47) (Tabla II).

Tabla II. Tamaño y concentración de los fragmentos elegidos para la secuenciación. Columna 1: número de la clona, columna 2: tamaño calculado (pb) de los fragmentos, columna 3: concentración de ADN (fragmento amplificado).

Clona	Tamaño pb	Concentración ng/μl.
12	800	20
15	700	50
20	400	50
24	400	100
43	800	125
44	600	50
45	800	20
46	600	100
47	900	50
48	750	100

6.2 Digestión de plásmido de las clonas positivas hibridadas con (TG)₁₀.

Esta técnica alternativa se aplicó a 34 clonas seleccionadas al azar, de las cuales se purificó individualmente el ADN plasmídico utilizando la técnica de miniprep, el cual fue digerido con PvuII para linearizar y separar los insertos (Fig. 9).

El resultado de esta digestión fueron fragmentos que oscilaron entre 600pb y 1, 400 pb, aproximadamente. Sólo una colonia presentó un fragmento de menos de 500 pb (Fig. 9).

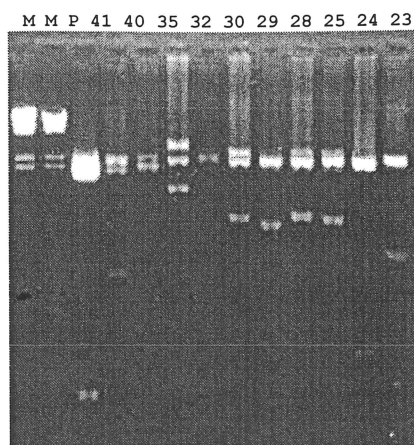


Figura 9. Electroforegrama en gel de agarosa al 1% de pUC18 con inserto genómico, digerido con PvuII. Carril M: marcador de peso molecular (ADN de λ digerido con Hind III). Carril P: pUC18 nativo y digerido con PvuII. Los números sobre los demás carriles pertenecen a las clonas, según su número de identificación.

Para la secuenciación se seleccionaron 10 clonas cuyo fragmento de ADN genómico osciló entre los 600 y los 1,300 pb (tabla III). Esta selección es dada por la relación del segmento obtenido mediante la digestión con PvuII (400-900 pb) más el fragmento del plásmido (322 pb).

El intervalo de tamaños de los fragmentos obtenidos fue entre 600 y 1400 pb (fig. 9). En la Tabla III se presenta una relación de las clonas seleccionadas y sus tamaños. Las colonias seleccionadas con base en el tamaño, fueron secuenciadas (3, 11, 25, 28, 29, 30, 35, 37, 40 y 41).

Tabla III. Tamaño y concentración de los fragmentos elegidos para la secuenciación. Columna 1: número de la clona. Columna 2: tamaño calculado (pb) de los fragmentos. Columna 3: concentración de ADN plasmídico.

Clona	Tamaño pb	Concentración ng/ul.
3	1050	200
11	1000	200
25	890	250
28	900	300
29	880	250
30	900	300
35	1300	200
37	1000	200
40	600	200
41	700	250

7 Secuenciación y detección de microsatélites.

7.1 Secuenciación⁴.

Las secuencias obtenidas a partir de ADN extraído de las clonas mediante PCR, presentaron una mayor cantidad de bases ambiguas (N's). El porcentaje más alto fue de 54.58% de N's, mientras que el más bajo fue de 5.94% de N's (Tabla IV). El ADN perteneciente a la clona 12 no pudo ser secuenciado, tanto con el cebador *forward*, como con el *reverse* (Tabla IV).

Tabla IV. Secuencias obtenidas a partir de ADN extraído mediante PCR. Columna 1: número de la clona. Columna 2: cebador utilizado para la secuenciación. Columna 3 y 4: el número y porcentaje de N's, respectivamente. Columna 5: obtención de la secuencia. La letra F, representa a los cebadores *forward* y la R a los *reverse*. N: Bases ambiguas. ND: Número de N's sin determinar. (+): Obtención positiva de la secuencia. (-): Obtención negativa de la secuencia.

PCR				
CLONA	CEBADOR	Num. N's	% N's	Obtención
12	M13F	ND	ND	-
12	M13R	ND	ND	-
15	M13F	239	28.37	+
15	M13R	311	27.69	+
20	M13F	322	28.37	+
20	M13R	ND	ND	-
24	M13F	296	27.64	+
24	M13R	193	18.67	+
43	M13F	86	9.20	+
43	M13R	57	5.94	+
44	M13F	169	16.80	+
44	M13R	259	23.96	+
45	M13F	506	54.58	+
45	M13R	ND	ND	-
46	M13F	206	21.26	+
46	M13R	ND	ND	+
47	M13F	159	15.59	+
47	M13R	133	12.96	-
48	M13F	156	16.17	+
48	M13R	254	25.43	+

⁴ Nota: Todas las secuencias obtenidas son mostradas en el anexo 3.

La clona 20 no pudo ser secuenciada con el cebador *reverse*, mientras que con el *forward* se obtuvo una secuencia con 28.37% de N's (bases ambiguas) (Tabla IV). La clonas 45 y 46 no pudieron ser secuenciadas con el cebador *reverse*. Mientras que con el cebador *forward* para la clona 45, se obtuvo una secuencia con 54.58% (tabla IV) de N's, la cual fue el porcentaje más alto de las muestras secuenciadas. Para la clona 46 se obtuvo una secuencia con 21.26% de N's (Tabla IV). La clona 15 presentó una cantidad elevada de N's, con el *forward* de 28.37% y con el *reverse* de 27.69% (Tabla IV).

La clona 43 presentó el menor porcentaje de N's, tanto con el cebador *forward* (9.20%), como con el *reverse* (5.94%) (Tabla IV), con menos del 10% de N's. La clona 47 obtuvo también una concentración baja de N's, de menos del 20% para ambos cebadores (Tabla IV).

Los fragmentos seleccionados a partir de las digestiones con PvuII y extraídos mediante miniprep fueron secuenciados posteriormente y presentaron una menor cantidad de bases ambiguas. Todos los fragmentos pudieron ser secuenciados (Tabla V).

El porcentaje máximo de N's en estas secuencias fue de 5% (Tabla V). La clona 11 mostró la mayor cantidad de N's, tanto con el cebador *forward* (4.14%), como con el cebador *reverse* (5.10%) (Tabla V).

El porcentaje más bajo de N's obtenido con ambos cebadores, fue para la clona 29, con 1.99% (*forward*) y 1.91% (*reverse*) (Tabla V). Para las demás clonas, el porcentaje de N's dentro de las secuencias, osciló entre el 2% y el 4%.

Tabla V. Secuencias obtenidas a partir de ADN extraído mediante miniprep. Columna 1: número de la clona. Columna 2: cebador utilizado para la secuenciación. Columna 3 y 4: el número y porcentaje de N's, respectivamente. Columna 5: obtención de la secuencia. La letra F, representa a los cebadores *forward* y la R a los *reverse*. N: Bases ambiguas. ND: Número de N's sin determinar. (+): Obtención positiva de la secuencia. (-): Obtención negativa de la secuencia.

MINIPREP				
CLONA	CEBADOR	Num N's	% N's	Obtención
3	M13F	28	2.69	+
3	M13R	37	3.49	+
11	M13F	44	4.14	+
11	M13R	54	5.10	+
25	M13F	24	2.17	+
25	M13R	28	2.57	+
28	M13F	18	1.63	+
28	M13R	27	2.47	+
29	M13F	22	1.99	+
29	M13R	21	1.91	+
30	M13F	19	1.69	+
30	M13R	36	3.28	+
35	M13F	44	3.99	+
35	M13R	38	3.50	+
37	M13F	36	3.43	+
37	M13R	28	2.69	+
40	M13F	25	2.25	+
40	M13R	21	1.92	+
41	M13F	24	2.14	+
41	M13R	23	2.07	+

7.2 Detección de microsatélites en las secuencias.

De las 20 clonas que se secuenciaron, se obtuvieron un total de 6 loci de microsatélites, cuyas repeticiones de dinucleótidos van desde 5 hasta 14. Los microsatélites fueron nombrados con las iniciales del nombre de la persona que clonó, el número de la clona y las iniciales del nombre científico de la especie (Fig. 10).

Tres microsatélites se consideraron compuestos (GC48ZCC, GC3ZCC y CG11ZCC), uno fue imperfecto (CG46ZCC) y dos perfectos (CG35ZCC y CG37ZCC).

GC48ZCC

GATCAAAGGT AGACAAGAAG TTGTGTTACC CTACTTGAAC ATCCAAACAA GCTCTGAAGG TCCATTGTGA GGCAAAGGTA 80
 GGAGAGTCAA GCTTCTCAGA CTCCAGACAC ATCCAAATGA GGGCTGCAT TTGGCAGTCT GCCTTTATTT AAAAAAGGTT 160
 CCACTGGAGA GATAAGAGTG TTTCCTACAA GGCAAGTATA GGCAGGTGTT TCAATGAACA GGGATGAATT GTGGCAACTT 240
 GCAACAGATA AGATAAATAA AAAATTAGAC TGGGAAATGA CCATTGGATT TAACAACGTG GAAGTTATTG ATGACCTCTC 320
 TCTCTCTCTC TCTCAGACAC ACACACACAC ACACACACAC AGCAACTGC TCCCCACCC TCACTCCCCA TAGTGGAGCT 400
 GATAGGAGGA CAGGAATGAG ACACACAAAC ACTGTCAAGA AGTTTTTTGT CAATAGGAGC AGACAATGGG GTGGTACCTA 480
 AAGACTGTCTG TAAGATGAAA AGAACAGTAT TTGTGCTTAT AAGATAGAAG AAATTAATGT AATTTGTCTAT GCTTGTCTCTG 560
 CATGATC 567

GC46ZCC

GATCAGGAGA ATGCCTCCAG AGGAGACTGA GCCTCAGGCA GGGAAAGGGC TTGCAATANG AGAGCGTCAC CATTACAGGAA 80
 ATGTTAGGTA TAGAGGGGGC TAGAGCATGG GTTTCAAAGA AGGGTCAGTG GGGAGGAAGC TAGGAGATAG ACAGGGGGGCA 160
 TATTTTCAA GGGTGTCTGT GTTCTCTTAT GGCATTGGA AGAAAAAGG GAGTATTGAC AGAT TGTGTG TGTGGGGTGT 240
 GTGTGTGTGT CTAAAATGAG GAATAGTGAT AGATTAATGT TTTAGAAAGT TCACTCCAAT GGTAGAATGA AGGATAAAGT 320
 GGAGCAAAGT GAAACTTGA AGCAGAAAGA TTAATCTGGA AGCTGAGCTA ATTTAGTAAT CCAGGAAACC CATCATGAAG 400
 ACCCACACTG AGGAAGTAGT GGAGGGACTG GAGATAAGAC AACAAAGGAGA GGGATC 456

GC11ZCC

GATCTAAATG GTAGTGGGGT AGGGGGGTAG GGGAGGACAG GGCAAGTAGG AAAGGAAGGG AAGGTTAGAA GCATTGTGCT 80
 TTGTTACAGA GTTGCAATGT TGGTCTTAG GGAATAAAT GTCAACCACC AGGTAACAAA AAGAGATTCT TAAGTAAAAA 160
 TCAAGTTAAA CAAAACATTT TGTCCTTGCT TGCTTACTTT GTGTGCGTGT GTGCATTTTT TGTGTGTTTG 240
 GTGGGGTAGA GAACTGATAG AGCATACACA GTTCTACTTG ATTCCAGCCA CACATTCAAT ACCATCTGTC ACAGGTTGAG 320
 TTCTTCAGAA GCAGATGCTA AAACAAAGAT TGAGTTGCAA TATATAGGGA TTAACCTCAA AGAAAGATGA AGAAGAACCT 400
 GGCAAAATGGA GAAGTCAAACT TGTAATGCAA AACTTCTCTA TGAGCTCTGG AAAAAGTATT TCTATTTAAG TACATTGGAG 480
 ATGCTTTAG GATACACTGG ACTGAAATGC CTGCATTTTA ATGAATCCCC ACACCTGTGC CAGTTTCACTC AGGCTGCCTT 560
 GGAAGGGCAT GGGTCCAAGG CAGTGTGGCT CTTGTAGCTG AGGCCAAAAA GCTGGAGATG TCTGCAGTTT TGCTCATTGT 640
 TCTCTCNTAA AATTACGCAN GAAATGTTTT TTTCTTAAAN AAGGAATC 720

GC3ZCC

GATCTGAAAA GAGCCCCAGA TTCTTGCCCTG GAAAAAATTT ACTCTCCTTT TAAGAGACAG ACATCTGACA CCCAGGAGAA 80
 GCTCACCAG AGAAACCGAG CCCCTTTCAG AATGTGGGCA GTTGGGGCCT TGCTGTAATG ATATGGCCCC ACTAATTCTC 160
 CCTCTCCCT CCTCGGAGC TCGCTGTCTT CAACTGTAG CAGGAGAAGG CAAGCTGTGA ACAGGTTGGG AGTGGGAAGC 240
 CTCTGGAAAT CAGAGGCTGT ACCTACCTGT TTCCAAGGCT TCTGGTGAGC ATCTCTAACT GGGGAGACTC TGTGAGTGTG 320
 TGTATGTGTG TGTGTGAGCA TGTGTGTGTG CACTTGTGCA CGTTCAATTT AGCAGAGGAA GTCAAGGCAA ATAGTTTAAAT 400
 CACAACCATC CCTCGAGGCA ATCTGGAATA ATTTTCTCAT TAGAGAATGT AACCGTGCAG CATGACTAAT GTTCAATCAG 480
 ACAGTAGCTT CGAGTCCCCG TGCTCACCAG CATTACACGG GCCTCAGCTC TGATTAATGG GGGAGGGCGT CTGTCTCTACC 560
 TTTCTGGGCC TGGGATGGTG GCTGGAGTCT GGTGATGGGG AGGAGAAAGG CAGGGGAGGG AAAATCTCTT TTCAAATATAT 640
 AAACATTGAG NAAATAAAAT AATGGGACCC CTCAGTTGCT TTCCANGCTG CTGTGATTAG ATC 703

GC35ZCC

GATCTTCCTC AGTCTTGAAG GACACATCTC TTCTTGTTGC ATATTTAGCA TATTCATTG TTTTCCTTC AAGCTTAATT 80
 TAAGTCTGG GGAATTTCTT GATGACACTA ACGCATAGCA GTCTCTTCTT TTTTAAAC TTCCAGTAGT TTTTATAGCC 160
 AATATGACTT ATTAATACTT TTTTCCTAAG TATTCAAACT GTTATTACAT GTCACATCA TTAATCACTA AATATTTGAG 240
 TTACCACCAT GTGCAAGCA CTGTGCCCAG AGCTATGTTT AACACTTTTA CTTTAGTTAC ATTTAACTTT TTTATTTTTT 320
 TAAAGCTATT ATGGCATATA ATGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT TCACTCCAGA 400
 GTTAGACCAT AAGCAACTTG AGGACAGATC CCAGGGTCTT GGGATTGAGC CCCACATTGG GCTCCTTGCT TGGCAGGGAG 480
 CCTGCTTCTC CTCTGTGCC TGCTGTGCC TCCGCTGCT TGTGTCTCTG CTCTTGCTAT CTCTCTTCT ATCAAAATAAA 560
 TAAATAAAAT CTTTAAAAAT AACTAACTAA CTAAATAAAT AAATCTGTAT CTCCTTATTG CAAAGNGGGC AGAAGTATC 639

GC37ZCC

GATCTACACA AATCATGAGT AAGAAAAACG TTCAAAGAAT TTTGAAACGC AATACATTAG CCGATTTAAT AAAACTGGAA 80
 TATTAACCA CACCAGGTAA AGAAATATTT TAAATGAGA AAAGTGCTGC CTGTACTTAG AAAGCGCACA GGAAATAGTT 160
 TAATTCCTTC CGTTTCCAAA GGTGGATTTA TTTTATAAT TACATTGATA GTTTTAATCT TGCTTCAAAA TGTATGTAAC 240
 ATATTTGACA TTAAATATTA TACACTAATA TATGGCAGTA TGTATATCTT TGTGTTACTA AGAATATTTT CACATTTTAT 320
 ATCTCTCCA TTTTGTTC A GCAACTCGG GCAAAGCAAT AAACATTTTT CAGTGTTTAC TGTCTGTCAA CATCTGTTGG 400
 ATTCAGGGA CATAATGATG AATAAACAC AGTCCTTTTC CTCAGGATT GTATAGTATA TGTGAAGTGG TCAGGGAATT 480
 AGATAGGAAA ACAAGTAATA TAATACAAAT ATATTGTTTC TTTAAATTGA TTTTGTACTT AATATTCCAG CATAATTATT 560
 ATCTGATGCT ATTATTTTCT ACAGTATCAT TTCAATGAAT ACATTATTTA CTGTTGTTAA TATATAATTA GCATCATGAA 640
 TCTTCTATCA CAGAATATTT ATGTCTTTCT ATTTTGGATT TAGGCTATAA TGGTTTCAAT TAAAAAGAAA GATTTTTTTG 720
 GGTAAAAGAT TTATTTATTT GGTCAAGAGA GAGAGAGAGC AGCCCAAGCA GGGGGGAGTG GCCCAGCCAG GGGAGAGAAA 800
 GCCAGCTCC CTGCTGGAGC CAAGGGAACC CCAACACNGG GGACTTGAT N 851

Figura 10. Secuencias obtenidas a partir de la selección e identificación de microsatélites. Las secuencias de dinucleótidos se encuentran marcadas con color verde. Mientras que los cebadores diseñados son marcados con color azul.

8. Diseño de cebadores.

De los 20 fragmentos secuenciados, fueron descartados aquellos que presentaron un porcentaje de cerca del 30% de N's para alguno de los cebadores y sin obtención de secuencia para la hebra complementaria. Esto, debido a que no fue posible eliminar ninguna de las N's por alineamiento y comparación (ver métodos). Un segundo criterio de selección fue elegir aquellas clonas sin bases ambiguas o que pudieron ser eliminadas por comparación) en la secuencia de microsatélite, así como de la región seleccionada para diseñar los cebadores. La distancia mínima para esta región se encuentra entre las 10 y las 60 pares de bases (ver métodos). La excepción fue la clona 46, ya que presentó un porcentaje de 21.26% de N's, pero la secuencia del microsatélite y de la región seleccionada para el diseño de los cebadores estuvo fuera de las indeterminaciones.

A partir de las características reportadas en la metodología los cebadores de cada microsatélite fueron seleccionados, utilizando el programa PRIMER SELECT de DNASTar. Ninguno de los cebadores presentó dímeros mayores de 3 pb consigo mismo o con su pareja (*forward* y *reverse*). Todos los cebadores presentaron al menos una estructura secundaria (*hairpin*), sin embargo ninguno presentó productos alternos. En la Tabla VI se muestra un resumen de los microsatélites encontrados y los cebadores diseñados.

Tabla VI. Nombre del locus y de microsatélite correspondiente, clasificación, tamaño del producto esperado, Tm de ambos cebadores (*forward* y *reverse*) y posición de la secuencia.

Locus	Microsatélite	Clasif.	Tamaño del Producto	Tm (°C)	Cebadores	Posición (pb)
CG48ZCC	(TC) ₉ (AC) ₁₄	compuesto	149 pb	46 50.7	F5' -ATTAGACTGGGAAATGACCA-3' R5' -TGTCCTCCTATCAGCCTCCACA-3'	264-283 412-389
CG46ZCC	(TG) ₅ GGG(TG) ₆	imperfecto	161 pb	58 56	F5' -AGGCTGTCTGTGTTCTCTTA-3' R5' -ACTTTGCTCCACTTTATCC-3'	170-189 312-330
CG35ZCC	(TG) ₂₃	perfecto	188 pb	36.4 50.6	F5' -TGCAAAGCACTGTGCCAGAG-3' R5' -GCCAAGCAAGGAGCCCAATG-3'	273-292 460-443
CG37ZCC	(AG) ₆	perfecto	223 pb	58.6 59.1	F5' -TATTTATGTCTTTCTATTTTGG -3' R5' -TTTCTCTCCCTGGCTG-3	253-273 475-456
CG3ZCC	(TG) ₂ A(GT) ₄ A(TG) ₅ AGCA(TG) ₅	compuesto	233 pb	51.4 51.1	F5' -GAGTGGGAAGCCTCTGGAA-3' R5' -TGCTGCACGGTTACATTCTC-3'	230-248 462-443
CG11ZCC	(TG) ₃ TA(TG) ₄ CG(TG) ₃	compuesto	233 pb	51.4 51.1	F5' -GGAAAGGAAGGGAAGTTAGAAG-3' F5' -TGTCACCTGATTCAGCC-3'	48-71 293-275

DISCUSIÓN

En pinnípedos, se han caracterizado loci de microsatélites para foca común, foca gris, lobo fino de dos pelos, lobo fino sudamericano (*Arctocephalus australis*) y recientemente morsa (*Odobenus rosmarus*). La mayoría de estos loci pertenecen a la familia Phocidae, y en menor porcentaje se han caracterizado y probado en la familia Otariidae, a la cual pertenece el lobo marino de California.

Este trabajo pretende ser la base para la realización de estudios aplicados en genética de poblaciones para el lobo marino de California y para otros pinnípedos. Principalmente, para conocer la estructura genética de las poblaciones del lobo marino de California, medir el flujo génico diferencial por sexos, estimar el índice de endogamia y evaluar la factibilidad de la existencia de cuello de botella.

En este trabajo se caracterizaron 6 loci de microsatélites dinucleótidos para la especie *Zalophus californianus californianus*. No obstante, es importante mencionar que el resto de las colonias bacteriales, con los fragmentos clonados que hibridaron con la sonda dinucleótida y que no fueron secuenciadas, se mantienen en glicerol a -80°C , para que posteriormente pueda realizarse la caracterización del resto de los microsatélites obtenidos en la clonación.

El método tradicional para aislar clones de microsatélites consiste en generar un inserto pequeño a partir del genoma total de la especie de interés, para conformar una

biblioteca genómica parcial valiéndose de un vector adecuado, y entonces seleccionar clonas que contengan los insertos deseados por rondas repetidas de hibridación, con oligonucleótidos del microsatélite conocido.

La obtención de microsatélites cuenta actualmente con técnicas más eficientes y que consumen menor tiempo. Tales técnicas son denominadas “protocolos enriquecidos”. Los protocolos enriquecidos han sido desarrollados para incrementar la proporción de clonas en una biblioteca dada, conteniendo el microsatélite de interés (Paetkau, 1999). Sin embargo, estas técnicas presentan inconvenientes debido al elevado costo de los reactivos utilizados. En laboratorios que cuentan con un presupuesto limitado, la compra de estos reactivos supone un impedimento para la realización de dichos protocolos.

Por lo tanto, es necesario adecuarse a estos presupuestos e implementar técnicas que no supongan un costo demasiado elevado para su realización. En el presente trabajo se utilizaron métodos tradicionales para la obtención de microsatélites.

A continuación se discuten los resultados obtenidos en las técnicas utilizadas para la obtención de microsatélites y el diseño de sus cebadores.

1 Preparación de ADN genómico de alto peso molecular.

En este trabajo se aisló ADN de alto peso molecular (más de 3,000 pb) para asegurarse que los fragmentos que son utilizados para realizar la inserción en el plásmido, presentaran extremos apropiados. Es decir, una mayor integridad de estos, permite una menor posibilidad de que las secuencias de microsatélites se encuentren cortadas.

El ADN extraído de cada organismo perteneciente a distintas loberas también presentó una concentración (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y un grado de pureza de ADN elevada, esto último es importante debido a que concentraciones elevadas de sales pueden interferir con las reacciones de las enzimas utilizadas durante los procesos de clonación.

La excelente calidad del ADN obtenido en las extracciones, se encuentra relacionada principalmente con una adecuada preservación de las muestras.

2 Digestión, desfosforilación y ligación.

La enzima utilizada (MboI), que tiene una secuencia de reconocimiento de 4 pares de bases en el ADN genómico, produjo una gran cantidad de fragmentos en el intervalo de interés. Los fragmentos obtenidos a partir de esta digestión fueron de tamaño comprendido entre 200 a 5000 pb. Sin embargo, la mayor cantidad de fragmentos obtenidos oscilaba entre los 200 y los 2000 pb, determinado esto último por una mayor

intensidad en las bandas de ese tamaño en el gel. Esto nos permitió elegir los fragmentos de entre 400 y 1000 pb, asegurando la obtención de una concentración elevada de estos fragmentos para la clonación.

El tamaño promedio de los fragmentos con microsatélites obtenidos después de la clonación en este trabajo fue de 772.1 pb. Se ha observado que el tamaño óptimo del inserto es de alrededor de 600 pb. Este tamaño es suficientemente corto para poder ser secuenciado, dependiendo del tipo de secuenciador que se utilice, y suficientemente grande para poder analizar una proporción grande del genoma con un número moderadamente bajo de clonas (Estoup y Turgeon, 1996).

Por otra parte, este tamaño reduce la probabilidad de que las repeticiones se encuentren cerca de los extremos que los flanquean y, por lo tanto, que los cebadores para los microsatélites puedan ser diseñados.

Las técnicas utilizadas para recobrar fragmentos selectivamente así como para realizar rastreos (*screening*) y clonación, frecuentemente dan como resultado una sobre representación de fragmentos pequeños (Estoup y Turgeon, 1996). Esto se debe a que una proporción de fragmentos pequeños no migra en la posición esperada sobre el gel, así como a que los fragmentos pequeños son más fácilmente insertables en el plásmido vector.

Por ejemplo, el tamaño medio de los fragmentos es de 650 pb cuando los fragmentos de 400 - 900 pb son selectivamente recobrados. En la práctica, sin embargo, el tamaño del fragmento medio efectivo se encuentra alrededor de las 500 pb (Estoup y Turgeon, 1996). Debido a lo anterior, en este trabajo se escogieron los fragmentos de entre 400 y 1000 pb, para tratar de obtener la mayor cantidad de fragmentos con el tamaño óptimo esperado.

3. Transformación bacteriana y selección de células transformadas.

El tamaño del genoma obtenido en la biblioteca parcial para el lobo marino (910,000 pb), concuerda con la cantidad de genoma clonado en otras especies utilizando esta técnica (Ej. Estoup *et al.*, 1993, Chapuisat, 1996), lo que indica que se obtuvo una eficiente clonación de fragmentos genómicos en este trabajo.

4. Estimación del tamaño del inserto.

El tamaño promedio mayor de los insertos corresponden a los fragmentos obtenidos mediante el segundo método (*miniprep*). Sin embargo, la obtención de fragmentos mayores con este método puede resultar meramente azarosa, debido a que sólo representa una pequeña muestra de 10 clonas.

El tamaño promedio general de todos los fragmentos analizados es de 798.5 pb, lo que concuerda con el tamaño esperado (700 pb). Sin embargo, este dato no es representativo de todas las clonas obtenidas, debido a que la estimación de este

promedio solo representa un porcentaje de 0.76% del total de los fragmentos de todas las clonas (1,302 clonas).

La obtención de un fragmento con un tamaño de 1300 pb (ver resultados), nos indica que posiblemente junto con el fragmento, se haya unido otro plásmido. En el alineamiento de este fragmento, se detectó la secuencia del extremo 3' del plásmido, seguida de una secuencia desconocida (fragmento clonado) con la presencia de un microsatélite y al final, se observó nuevamente la misma secuencia del extremo 3' del plásmido. No obstante, la secuencia perteneciente al fragmento clonado fue de un tamaño de 550 pb y con un porcentaje bajo de bases ambiguas, por lo que fue posible realizar el análisis de esta secuencia y detectar la presencia de un microsatélite.

5. Secuenciación y detección de microsatélites.

5.1 Secuenciación.

Las secuencias obtenidas a partir de fragmentos extraídos por amplificación y recuperación de la banda a partir del gel (PCR), presentan un mayor porcentaje de N's, así como de fragmentos que no pudieron ser secuenciados.

Los porcentajes de N's presentes en las secuencias indican que las muestras con una menor concentración de ADN, presentaron una mayor cantidad de N's. Es decir, existió una relación inversa, entre la concentración de ADN en la muestra y la cantidad de N's obtenidas en el fragmento secuenciado.

Esta relación se mantuvo en el análisis de las secuencias obtenidas a partir de los fragmentos extraídos mediante la técnica de miniprep. A pesar de que la diferencia en cuanto a la concentración de N's es menor, las secuencias con una menor concentración de ADN en las muestras enviadas, presentaron la mayor cantidad de N's.

Si comparamos los porcentajes, podemos observar que el menor porcentaje obtenido mediante la primera técnica (5.94%) fue mayor que el porcentaje máximo obtenido mediante la segunda.

De esta comparación se obtiene que la extracción de los fragmentos (dentro del plásmido) mediante la técnica miniprep es la más adecuada para obtener secuencias limpias y confiables.

Sin embargo, existe otro factor que puede modificar las concentraciones y, por lo tanto, la relación inversa con los porcentajes de N's. Este factor es el método utilizado para la extracción de ADN en la primera técnica. Para extraer y limpiar el ADN, producto de la amplificación, los fragmentos amplificados fueron aislados mecánicamente por escisión del gel de cada producto preparado.

A pesar de que esta técnica nos permite separar los fragmentos y prevenir que el producto de la amplificación sea secuenciado con contaminación la cantidad obtenida es más baja que la obtenida con la extracción directa del producto.

Es posible que este factor sea el verdadero motivo de la baja concentración de ADN obtenida con la primera técnica, así como del alto porcentaje de N's presentes en las secuencias obtenidas.

Por lo anterior, la secuenciación a partir de muestras con fragmentos contenidos en el plásmido (*miniprep*) o de fragmentos obtenidos y purificados directamente a partir del producto de PCR son las técnicas más viables. No se recomienda la secuenciación a partir de muestras obtenidas mediante extracción del gel (ya sea a partir de *miniprep* o PCR); ya que esta última técnica genera productos con concentraciones bajas para una correcta resolución durante la secuenciación, e incrementan por lo tanto, la presencia de bases ambiguas.

5.2 Detección de microsatélites dinucleótidos en las secuencias.

Es importante analizar los microsatélites obtenidos en este estudio, debido a que en el presente trabajo, no se llevó a cabo la prueba de polimorfismo, ni el análisis de la resolución de este locus. Por lo que a continuación se presenta una exploración teórica y bibliográfica de los microsatélites encontrados.

En este estudio se caracterizaron microsatélites dinucleótidos debido a que son más utilizados que los trinucleótidos y tetranucleótidos para estudios de genética de poblaciones y ecología molecular. Esto se debe a varios factores; uno de ellos es que son más abundantes en el genoma eucariótico, por lo que esto facilita su localización y clonación para el desarrollo de cebadores.

Otro de los factores es que los trinucleótidos pueden encontrarse ligados a enfermedades, por lo que no conforman las expectativas clásicas mendelianas y están lejos de considerarse neutrales (Rubinsztein, 1999, citado en Goldstein y Schlötterer, 1999). Además que los dinucleótidos presentan intervalos de mutación 1.5–2.0 más altos que los tetranucleótidos (Chakaborty *et al.* 1997, citado en Goldstein y Schlötterer, 1999).

Se ha observado que los microsatélites interrumpidos pueden en general estar caracterizados por una varianza más alta en el número de repeticiones y consecuentemente con un intervalo de homoplasia más baja que en los simples. De esta manera, los microsatélites interrumpidos (imperfectos o compuestos) podrán ser los más apropiados para los estudios de diferenciación poblacional y relaciones evolutivas entre poblaciones distantes (Estoup *et al.*, 1995). Por lo tanto, los microsatélites interrumpidos (compuestos e imperfectos) obtenidos en este trabajo podrían ser utilizados para dichos estudios.

El primer parámetro que influencia la estabilidad de los microsatélites independientemente del tipo, es el número de repeticiones. Se ha encontrado que el polimorfismo de marcadores se incrementa, cuando se incrementa la media del número de repeticiones (Weber, 1990), por lo que microsatélites con un tamaño mayor, pueden llegar a ser más polimórficos.

Un segundo parámetro que influencia substancialmente la estabilidad de los microsatélites independientemente del tipo de repeticiones, es la pureza del microsatélite. Las bases interrumpidas parecen estabilizar al microsatélite, reduciendo la posibilidad de pérdida de alineamiento y resultando en niveles más bajos de polimorfismo que los microsatélites sin interrupciones (simples) con un número similar de repeticiones (Chung *et al.*, 1993; Richards y Sutherland, 1994; Pepín *et al.*, 1995; citados en Goldstein y Schlötterer, 1999).

Como se mencionó anteriormente, en este estudio se obtuvieron dos microsatélites dinucleótidos simples, y uno de los cuales presenta además 46 pb de longitud ((TG)₂₃), por lo que se espera que puedan llegar a presentar un polimorfismo elevado en *Z. c. californianus* y puedan ser útiles en estudios geográficos, historia de la población, detección de cuellos de botella y endogamia, entre otros.

6. Diseño de cebadores.

Uno de los parámetros más críticos para el éxito del PCR es el diseño de los cebadores. Un buen diseño de los cebadores puede ahorrar tiempo y reducir costos, dado que los cebadores son uno de los componentes más caros para realizar el PCR.

a) Zona para el diseño de cebadores.

Es conocido que los microsatélites se encuentran flanqueados por secuencias conservadas (Estoup y Turgeon, 1996), lo que permite diseñar en esas regiones cebadores específicos para estos microsatélites. Sin embargo, se ha observado que la conservación alrededor de los microsatélites, varía entre loci (Moore *et al.*, 1991), por lo que no existe una zona determinada que se recomiende por su conservación para el diseño de cebadores.

Se ha observado que los cebadores diseñados para microsatélites deben amplificar fragmentos con un tamaño entre 100 y 250 pb, debido a que migran más rápido sobre el gel y presentan una mejor resolución (Valsecchi y Amos, 1996). Por lo que la distancia y la zona a partir de la cual se deben diseñar los cebadores, se encuentran relacionados con el tamaño deseado del producto. En este trabajo se obtuvieron cebadores que amplificarán fragmentos dentro del rango mencionado (100 a 250 pb).

b) Características de los cebadores diseñados.

Muchas de las reglas para el diseño de los cebadores son empíricas y no garantizan el éxito. Sin embargo, un cuidadoso apego a estas reglas debe sin duda, incrementar la probabilidad de éxito en la amplificación de los fragmentos deseados (Sharrocks, 1994).

Los parámetros principales que se deben considerar para obtener cebadores con altas probabilidades de amplificar, se mencionan a continuación.

Tabla VII. Comparación de cebadores. Las primeras 4 filas corresponden a los loci reportados para otras especies, las siguientes 6 filas, a los loci diseñados para *Z. c. californianus*. Columna 1: loci y números de acceso a GENBANK, columna 2: Cebadores forward y reverse en dirección 5'-3', columna 3: Tamaño del cebador, columna 4: Temperatura de reincorporación, columna 5: Porcentaje de C-G, columna 6 y 7: Dimerizaciones, columna 8: Formación de hairpins, columna 9: Tamaño del producto y columna 10: Formación de productos alternos. * T_m reportadas y probadas en artículo (Allen *et al.*, 1995). * Dímeros más estables de lo permitido (ver texto).

Locus/# de acceso	Cebador 5'-3' Forward y Reverse	Tamaño	Tm (°C)	GC (%)	Dímeros		Hair pin	Tamaño del producto	Productos alternos
					Auto	Par			
Hg8.10 G02093	AATTCTGAAGCAGCCCAAG GAATTCTTTCTAGCATAGGTG	19	53*	52.63	5	12*1	5	190pb	0
		23	55*	34.78	7	12*1	8		
Hg8.9 G02094	TGTTAACTATCTGGCACAGTAAG TTTCCTATGGGTTCTACTCTC	25	48*	40	9*1	/	10	205pb	0
		21	50*	42.86	3	/	4		
Hg6.3 G02092	CAGGGGACCTGAGTGCTTATG GACCCAGCATCAGAACTCAAG	21	58*	57.14	7	/	5	224pb	0
		21	60*	52.38	5	/	3		
SgpV9 G01096	TAGTGTITGGAAATGAGITGGCA ACTGATCCTGTGAATCCCAGC	23	50*	39.13	6	14*3	8	164pb	0
		22	52*	47.8	7*1	14*3	7		
GC48Zc	ATTAGACTGGGAAATGACCA TGTCCTCCTATCAGCCTCCACA	20	46.0	40	4*1	9	4	149pb	0
		22	50.7	54.55	4	9	6		
CG46Zc	AGGCTGTCTGTGTCTCTTA ACTTTGCTCCACTTTATCC	20	43.6	45	3	4	3	161pb	0
		19	43.2	42.11	2	4	1		
CG3Zc	GAGTGGGAAGCCTCTGGAA TGCTGCACGGTTACATTCTC	19	51.4	57.89	7	10	6	233pb	0
		20	51.1	50	5	10	3		
CG11Zc	AGGAAAAGGAAGGAAGGTTAGAAG GTGTGGCTGGAATCAAGTG	24	54.7	45.83	6	8	4	246pb	0
		19	48.2	52.63	6	8	3		
CG35Zc	TGCAAAGCACTGTGCCAGAG GCCAAGCAAGGAGCCCAATG	21	58.6	57.14	4	3	1	223pb	0
		20	59.1	60	6	3	4		
CG37Zc	TATTTATGTCTTTCTATTTGG TTTCTCTCCCTGGCTG	22	41.3	22.73	5	9	7	145pb	0
		17	47.7	58.82	8	9	7		

c) Tamaño del cebador y T_m

Este es uno de los parámetros críticos, ya que se encuentra relacionado con la especificidad y la temperatura de reincorporación (T_m , por sus iniciales en inglés). El intervalo recomendado para el diseño de los cebadores varía, aunque la mayoría de los autores recomiendan un tamaño entre 18 y 25 pb, debido a que empíricamente proveen una T_m óptima y similar entre los pares de cebadores (Sharrocks, 1994).

Como se puede observar en la tabla VII, todos los cebadores diseñados, excepto el cebador reverse para el locus GC37ZCC, entran dentro de este intervalo. Este cebador tiene un tamaño de 17 pb, sin embargo, su T_m es de 47.7°C, teniendo una diferencia de 6.4°C con el cebador forward (T_m 41.3°C).

A pesar de que es importante tener pares de cebadores con T_m s similares (Sharrocks, 1994), se ha observado que diferencias de 4°C a 6°C entre los pares, no parecen afectar la producción del PCR (Dieffenbach *et al.*, 1995). Es por lo tanto, poco probable que esto represente un problema para la amplificación del microsatélite.

Los cebadores analizados de las otras especies, se encuentran dentro del intervalo de 19 pb hasta 25 pb (Tabla VII), según fueron reportados en el artículo, y sus T_m s se diferencian por 2°C. Sin embargo, es necesario aclarar que el cálculo de la T_m realizado para nuestros cebadores es meramente teórico, y depende del algoritmo utilizado por el

programa Primer Select (DNASTAR). Este cálculo es sólo un acercamiento teórico de la T_m y puede ser modificado y mejorado en la práctica.

d) Porcentaje de C-G.

La composición de los cebadores es un factor que influye también en la T_m . En general, se sugiere que el intervalo de porcentaje de C-G sea de entre 45% y 65% (Dieffenbach *et al.*, 1995); aunque porcentajes de entre 35% y 65%, también son permitidos (Alkmi Biosystems Primer Design Tips). Este porcentaje de C-G es sugerido para obtener una unión específica y obtener una eficiente reincorporación durante el PCR (Sharrocks, 1994).

Todo los porcentajes de C-G en los cebadores diseñados en este estudio entran dentro de los intervalos sugeridos, excepto el cebador *forward* para el locus CG37Zc (22.73%) (Tabla VII). Sin embargo, el cebador *reverse* del locus Hg8.10 también presenta un porcentaje más bajo del intervalos sugerido (Tabla VII) y ha sido utilizado exitosamente en otros estudios (Allen *et al.*, 1995; Gemmel *et al.*, 1997, Gemmel *et al.*, 2001). Por lo tanto, el cebador con el porcentaje de C-G menor, es probable que también amplifique. Sin embargo, en caso de que no amplifique en la práctica, este problema puede ser solucionado añadiéndole una serie de C y Gs al extremo 5' del cebador y de esta forma aumentar la eficiencia en la reincorporación (Dieffenbach *et al.*, 1995).

e) Formación de dímeros y estructuras secundarias (*hairpin*).

En el diseño de los cebadores deben ser evitadas las homologías de las secuencias, tanto intra-cebadores, como inter-cebadores (Sharrocks, 1994). Debido a que esto puede generar la formación de dímeros, ya sea con el mismo cebador o con su cebador antisentido, e interferir con la reincorporación al templete. De la misma forma, debe ser evitada la formación de estructuras secundarias, dentro del mismo cebador.

Una regla general, es que no exista homología que involucre más de 4 bases seguidas (Sharrocks, 1994). La estabilidad de una doble hebra en particular se encuentra relacionada con el número de las uniones de hidrógeno formadas. Sin embargo, el orden de las secuencias también es un componente de estabilidad.

Por último, es recomendable evitar la complementaridad en el extremo 3' del cebador, ya que es en esta región, donde el cebador debe ser más específico, debido a que es donde da inicio la polimerización. En el análisis realizado mediante el programa *Primer Select* (DNASTAR), se tomaron en cuenta los parámetros arriba mencionados.

Del esquema comparativo que se presenta en la Tabla VII, se observó que los cebadores reportados por Allen *et al.* (1995) presentan en general, una mayor cantidad de dímeros y *hairpins*, según el reporte del *Primer Select*. Los cebadores de los loci Hg8.10, Hg8.9 y Hg6.3, presentan una estabilidad mayor en la formación de sus dímeros

(Tabla VI). Mientras que para los loci Hg8.9 y Hg6.3 el programa no pudo realizar el diseño en par de los cebadores reportados (*Forward* y *Reverse*) (Tabla VII).

Los pares de cebadores aquí diseñados presentan una menor cantidad de posibles dímeros y *hairpins*, siendo el locus CG3ZCC, el que presentó una mayor cantidad de dímeros (Tabla VII). Sólo el cebador *forward* del locus CG48ZCC presentó un posible dímero más estable de lo permitido (Tabla VII) por los parámetros arriba mencionados.

El hecho de que nuestros cebadores tengan una menor probabilidad de formación de dímeros y de *hairpins*, tanto en cantidad como en calidad que la de los cebadores reportados, sugiere una eficiente reincorporación durante el *PCR*.

En la práctica, la formación de dímeros y *hairpins* pueden ser evitada variando la temperatura y haciendo menos estable la reincorporación de las secuencias homólogas.

f) Especificidad.

Sin duda, uno de los parámetros más importantes es el de evitar la presencia de productos alternos. Los cebadores deben hibridar eficientemente con la secuencia blanco y tener poca o nula hibridación posible a otras secuencias que estarán presentes en la región que se amplificará (Sharrocks, 1994).

La presencia de productos alternos da como resultado la formación de bandas extras o en forma de barrido en el gel, lo cual puede proporcionar datos erróneos y finalmente un análisis equivocado.

Ninguno de los pares de cebadores, tanto los diseñados en este trabajo, como de los reportados en otras especies, generan según el análisis, productos alternos (Tabla VII). Esta es una característica que comparten ambos grupos de cebadores. Lo que sin duda garantiza la obtención de datos correctos durante el análisis de los microsátélites.

Como se mencionó anteriormente, los cebadores a nivel taxonómico de familia, con los que fueron comparados los cebadores específicos producidos en este estudio, fueron utilizados para el análisis de microsátélites en pinnípedos y ha sido reportada su eficacia.

El hecho de que los cebadores a nivel taxonómico de familia compartan ciertas características con los específicos, y que, teóricamente, algunos de ellos tengan mayor probabilidad de formar dímeros y *hairpins*, sugiere que los cebadores diseñados en el presente trabajo puedan amplificar más fácilmente y generar productos para un análisis adecuado de las poblaciones del lobo marino de California y otros pinnípedos.

CONCLUSIONES

► De la estimación del tamaño del inserto mediante la amplificación de fragmentos genómicos clonados (PCR), las clonas analizadas presentaron un tamaño promedio de 675 pb. Mientras que con la estimación mediante la digestión del plásmido de las clonas positivas, se obtuvieron fragmentos con un tamaño promedio de 880 pb.

► Se observó una relación inversa entre la concentración de ADN en la muestra y la cantidad de nucleótidos no determinados en el fragmento secuenciado.

► El factor responsable de la baja concentración mediante la técnica de amplificación es el paso obligado de extracción de ADN a partir del gel utilizado y no la técnica propiamente.

► Del análisis de los fragmentos secuenciados, se obtuvieron tres microsatélites compuestos $((TC)_9(AC)_{14})$, $(TG)_2A(GT)_4A(TG)_6AGCA(TG)_5$ y $(TG)_3TA(TG)_4CG(TG)_3$, uno imperfecto $((TG)_5GGG(TG)_6)$ y dos perfectos $((TG)_{23})$, $(AG)_6$.

► A partir de las secuencias que flanquean a estos microsatélites, fueron diseñados 6 pares de cebadores.

► El tamaño de los productos esperados a partir de la amplificación con los cebadores diseñados es de 148 pb a 246 pb. Esto garantiza que la utilización de nuestros cebadores facilite el análisis de los microsatélites durante la electroforesis, ya que estos tamaños les permitirá migrar más rápido en el gel y presentar una mejor resolución.

► Casi todos los cebadores diseñados presentan tamaños, T_m , porcentajes de C-G, formación de dímeros y de *hairpins* que entran dentro de los parámetros permitidos para una adecuada amplificación durante el PCR.

PERSPECTIVAS

► Como se mencionó en la introducción, este trabajo es parte de un proyecto más amplio para evaluar la genética del lobo marino de California. Los análisis con ADNmt, ya han sido realizados por la M. en C. Yolanda Schramm Urrutia (datos sin publicar), aportando datos filogenéticos y de estructura genética de las poblaciones a un nivel macro geográfico.

► El segundo análisis será realizado utilizando los microsatélites obtenidos en el presente estudio, por lo que se pretende continuar con este trabajo y diseñar más cebadores para otros microsatélites. Se cuenta con clonas congeladas (-80°C) que contienen fragmentos con microsatélites, las cuales no han sido aún secuenciadas.

► Se continuará con la búsqueda de más microsatélites a partir de las clonas mencionadas y el diseño de más pares de cebadores. Se evaluará en la práctica la eficacia de los cebadores diseñados, y se analizará el polimorfismo de los microsatélites en esta especie.

► Los pasos a seguir serán los siguientes:

- Se sintetizarán los cebadores diseñados.
- Los cebadores sintetizados, serán probados en el PCR, según la T_m calculada inicialmente. Se visualizará en geles y se analizará la presencia del producto deseado.
- En caso de que se tenga problemas en la amplificación se variarán los parámetros y se estandarizará la amplificación de cada par de cebadores.
- Para la evaluación del polimorfismo en cada locus, los cebadores serán probados con 30 organismos de la misma especie sin relación alguna entre ellos.

► Parte de este trabajo será realizado en colaboración con el Dr. Ciro Rico de University East Anglia en Norwich, Inglaterra.

► Los microsatélites obtenidos serán utilizados además para realizar análisis del comportamiento reproductivo del lobo marino, en las loberas de los Islotes, combinando análisis de paternidad y asignación de parentesco por haplotipos, con marcaje y datos obtenidos a partir de observaciones directas.

► Otro trabajo que se beneficiará con la obtención de estos loci, será el estudio de la diversidad genética en el lobo marino de California, en Galápagos Ecuador, la subespecie endémica *Zalophus californianus wollebeacki*. Donde se pretende utilizar

análisis de ADNmt y de microsatélites para obtener información, sobre la estructuración de las poblaciones en esas islas, ya que al parecer, cada isla presenta al menos, un desfase en los tiempos reproductivos, así como características oceanográficas distintas entre algunas islas. También parece haber cierto grado de endogamia, provocada por eventos del niño, donde la mortandad principalmente en los machos es extremadamente elevada. Además se ha reportado también la presencia más o menos frecuente de organismos albinos.

► Estos son sólo algunos de los análisis que se pretenden realizar con los microsatélites caracterizados, sin embargo, es posible que puedan también ser utilizados en otras especies de pinnípedos.

LITERATURA CITADA

- Allen P.J., W. Amos, P.P. Pomeroy y S.D. Twiss. 1995. Microsatellite variation in grey seals (*Haliophoca grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Molecular Ecology*. 4: 653-662.
- Burg T., W. A. Trites y M.J. Smith. 1999. Mitochondrial and microsatellite DNA analyses of harbour seal population structures in the northeast Pacific Ocean. *Canadian Journal of Zoology*. 77: 930-943.
- Carvalho G.R. 1998. Molecular Ecology: Origins and Approach. En *Advances in molecular Ecology* (ed. Carvalho, G.R.), pp. 9 y 10, NATO Science Series, Scicily, Italy.
- Cass, V.L. 1985. Exploitation of California sea lions, *Zalophus californianus californianus*, prior to 1972. *Marine Fisheries Rev.* 47 (1): 36-38.
- Chapuisat M. 1996. Characterization of microsatellite loci in *Formica lugubris* B and their variability in other ant species. *Molecular Ecology*. 5:599-601.
- Coltman D.W., W. Don Bowen y J.M. Wright. 1996. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolor*) microsatellites amplify polymorphic loci in other pinniped species. *Molecular Ecology*. 5: 161-163.
- Dieffenbach, C.W., T.M.J. Lowe y G.S. Dveksler. 1995. General Concepts for PCR Primer Design. En *PCR Primer, A Laboratory Manual* (ed. Dieffenbach, C.W. y G.S. Dveksler), pp. 133-155, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Dowling T.E., C. Moritz y J.D. Palmer. 1990. Nucleic Acids II: Restriction Site Analysis. Pp. 250-317. En: *Molecular Systematics*. (eds., D.M. Hillis y C. Moritz). Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA. 588 pp.

- Estoup A., T. Christian, J.-M. Cornuet, y M. Solianac. 1995. Molecular Biological Evolution. 12: 1074-1084.
- Estoup A., M. Solianag, M. Harry y J-M. Cornuet. 1993. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. Nucleic Acids Research. 21:1427-1431.
- Estoup A. y J. Turgeon. 1996. Comunicación personal.
<http://www.inap.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>
- Goldstein D.B. y C. Schlötterer. 1999. Microsatellites, Evolution and Applications. Prefacio, Oxford University Press, New York.
- Gemmell N.J., P.J. Allen, S.J. Goodman y J.Z. Reed. 1997. Interspecific microsatellites markers for the study of pinniped populations. Molecular Ecology. 6: 661-666.
- Gemmel N.J., T.M. Burg, I.L. Boyd y W. Amos. 2001. Low reproductive success in territorial male Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*) suggests the existence of alternative mating strategies. Molecular Ecology. 10: 451-460.
- Jarne P. y P.J.L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology & Evolution. 11:424-429.
- Kretzmann M.B., N.J. Gemmel y A. Meyer. 2001. Microsatellite Analysis of population structure in the Endangered Hawaiian Monk Seal. Conservation Biology. 15: 457-466.
- Lambert D.M. y C.D. Millar. 1995. DNA science and conservation. Pacific Conservation Biology. 2: 21-38.

Ley Federal de Pesca. 1986. Diario Oficial de la Federación. Noviembre 26 de 1986.

Lowry M.S., P. Boveng, R.J. DeLong, C.W. Olivier, B.S. Stewart, H. de Anda y J. Barlow. 1992. Status of the California sea lion (*Zalophus californianus*) population in 1992. Administrative Report LJ-91-32. National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Center. La Jolla, California. 24 pp.

Maldonado, J.E., D. Orta, b.s. Stewart, E. Geffen y R.K. Wayne. 1995. Intraspecific genetic differentiation in California sea lions (*Zalophus californianus*) from Southern California and the Gulf of California. *Marine Mammals Science*. 11:46-58.

Moore S.S., L.L. Sargeant, T.J. King, J.S. Mattick, M. Georges y D.J.S. Hetzel. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*. 10: 654-660.

Paetkau D. 1999. Microsatellites Obtained Using Strand Extension: An Enrichment Protocol. *BioTechniques*. 26:690-697.

Palumbi , S.R. y C.S. Baker. 1994. Constraining population structures from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*. 11(3):426-435.

Sambrook J, E.F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.

Schlotterer C. y J. Pemberton. 1994. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. Pp. 203-214. En: *Molecular Ecology and Evolution* (eds.B. Schiertwater, B. Streit, G.P. Wagner y R. DeSalle): Approaches and applications. Vol. 69. Birkhaeuser Verlag: Basel, Switzerland; New York, USA. 622 pp.

- Sharrocks A.D. 1994. The Desig of Primers PCR for PCR. Págs. 5-10. En PCR TECHNOLOGY Current Innovations (Eds. Griffin H. G. y A. M. Griffin). CRC Press, Inc. U.S.A. 5- 6 pp.
- Valsecchi E. y W. Amos. 1996. Microsatellites markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology*. 5:151-156.
- Weber J. L., 1990. Informatives of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- Wright, J.M. y P. Bentzen. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. En: G.R. Carvallo y T.J. Pitcher, eds. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4: 384-388.
- York, A.E., R.L. Merrick y T.R. Loughlin. 1966. An Analysis of the Steller Sea lion Metapopulation in Alaska. Pp. 259-292. En: *Metapopulations and Wildlife Conservation* (ed. D.R. McCullough). Island Press Washington Conservation. Washington, D.C./ Covelo, California. 459 pp.
- Zavala G. A. 1990. La población del lobo marino de California *Zalophus californianus* (Lesson, 1828) en la region de las grandes isles del Golfo de California, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 253 pp.

ANEXO I

PROTOCOLOS COMERCIALES

A. Protocolo del kit GLASSMAX DNA Isolation Spin Cartridge System, GIBCOBRL®

1.- Incubar a 65°C, 100 µl de amortiguador TE o agua destilada y estéril por cada muestra que será purificada.

2.- Agregar 4.5 volúmenes de la solución de unión (NaI) por volumen de solución de ADN.

3.- Agregar 600 µl (o menos) de la solución con ADN / NaI al cartucho del filtro.

Nota: Volúmenes > 600 µl requerirán más de una carga.

4.- Centrifugar a 13,000 x g durante 20 segundos. Vaciar el tubo.

Nota: Guardar la solución hasta confirmar que el ADN se recuperó.

5.- Agregar 0.4 ml del amortiguador de lavado (washing buffer) frío al tubo con el cartucho de filtro (spin cartridge).

6.- Centrifugar a 13,000 x g durante 20 segundos. Vaciar el tubo. Repetir el paso dos veces más.

7.- Centrifugar a 13,000 x g durante 1 minuto.

8.- Transferir el cartucho del filtro a un tubo de recuperación. Agregar 40 µl del amortiguador TE o agua que fue precalentada a 65°C al cartucho con el filtro.

9.- Centrifugar a 13,000x g durante 20 segundos para resuspender el ADN.

B. Protocolo del kit CONCERT™ Gel Extraction Systems (GIBCOBRL®)

1.- Corte del gel.

- Cortar con la ayuda de un bisturí la zona con los fragmentos entre 400 y 900 pb.
- Pesar un tubo eppendorf (1.5 ml).
- Añadir la muestra.
- Pesar el fragmento del gel.

Nota: Precalentar el TE a 70 ° C y el horno a 50 ° C.

2.- Solubilización del gel.

- Agregar 30 µl de amortiguador de solubilización del gel (L1) por cada 10 mg de gel.

- Incubar a 50°C por 15 minutos, agitando cada 3 minutos para diluir el gel (fragmentos de gel mayores pueden tomar más tiempo en diluirse).
- Una vez que el fragmento de gel se haya disuelto, incubar otros 5 minutos.

3.- Cargamento del cartucho.

- Colocar en un cartucho la mezcla anterior (con pipeta) e introducir este cartucho en el tubo de lavado.
- Centrifugar la mezcla en una micro centrífuga a 12,000 x g por 1 minuto.
- Descartar el líquido.

Nota: No cargar más de 400mg de agarosa por cartucho.

4.- Lavado del cartucho.

- Colocar el cartucho de nuevo en el tubo de lavado.
- Agregar 500 µl del amortiguador de solubilización del gel (L1) al cartucho.
- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Centrifugar a 12,000 x g por 1 minuto.
- Descartar el líquido.

5.- Lavado del cartucho.

- Colocar el cartucho de nuevo dentro del tubo de lavado.
- Agregar 700 µl del amortiguador de lavado (L2) al cartucho.
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 x g por 1 minuto.
- Descartar el líquido.
- Centrifugar de nuevo por 1 minuto para remover el L2 residual.

6.- Resuspensión del ADN.

- Colocar el cartucho dentro de un tubo de recuperación.
- Agregar 50 µl del amortiguador TE (70°C) directamente al centro del cartucho.
- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 x g por 1 minuto.
- Utilizar el ADN o guardar a -20°C.

Nota: Se recomienda resuspender el ADN en menor cantidad de TE (30 µl). Y en caso de que se obtenga una concentración muy baja, se recomienda precipitar con acetato de sodio / etanol y resuspender en 10 µl de TE o agua destilada.

C. Protocolo de DIG-High Prime (Boehringer Mannheim GmbH)

- 1.- Agregar 1 µl de ADN y aforar a 16 µl con agua destilada y estéril.
- 2.- Desnaturalizar el ADN en agua hirviendo durante 10 minutos. Enfriar rápidamente en hielo con sal (NaCl).
- 3.- Agregar 4 µl de DIG – High Prime, mezclar y centrifugar brevemente.
- 4.- Incubar 20 horas a 37 ° C.
- 5.- Detener la reacción a 65 ° C durante 10 minutos.

D. Protocolo de cuantificación para ADN de DIG Quantification Testrips y DIG Control Testrips (Boehringer Mannheim GmbH)

- 1.- Preparación de una serie del ADN de la sonda (prueba) marcado con DIG en agua (destilada y estéril) o en amortiguador de dilución (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0 (20 ° C), 50 µg/ml de ADN de esperma de salmón).

- Diluir 1 µl de la reacción marcada con 39 µl de agua a una concentración final de 1µg / ml. Preparar enseguida la siguiente serie de diluciones:

Pasos de dilución	Dilución en agua	Concentración final
1.- 1:3.3	10 µl / 23 µl	300 pg / µl (A)
2.- 1:10	5 µl / 45 µl	100 pg / µl (B)
3.- A diluido 1:10	5 µl (A) / 45 µl	30 pg / µl (C)
4.- B diluido 1:10	5 µl (B) / 45 µl	10 pg / µl (D)
5.- C diluido 1:10	5 µl (C) / 45 µl	3 pg / µl (E)

- Colocar 1 gota de cada una de las 5 diluciones sobre los rectángulos de la tira de prueba (DIG Quantification Testrips); dejar secar durante 2 minutos.

- 2.- Preparación del procedimiento de detección.

- Para cada serie de detección preparar 5 micro-cubetas y marcarlas del 1 al 5.

Tubo 1: Agregar 2 ml de amortiguador 2 (solución bloqueadora, "blocking solution").

Tubo 2: Agregar 2 ml de la solución de anticuerpo (1:2000 en el amortiguador 1).

Tubo 3: Agregar 2 ml del amortiguador 1

Tubo 4: Agregar 2 ml del amortiguador 3

Tubo 5: Agregar 2 ml de la solución color-sustrato ("color-substrate solution").

a) Procedimiento de prueba:

- Sumergir las tiras de prueba (una tira de prueba de cuantificación y una tira de prueba control deberán ser colocadas al mismo tiempo) en la solución preparada de acuerdo a la secuencia y para los tiempos de incubación dados en la siguiente tabla.

Micro-cubetas	Solución	Tiempo
1	Bloqueadora	2 minutos
2	Bloqueadora con anticuerpos	3 minutos
1	Bloqueadora	1 minuto
3	Lavado	1 minuto
4	Equilibración	1 minuto
5	Reacción de color	5-30 minutos (en oscuridad)

Nota: Secar el exceso de líquido en un papel absorbente entre paso y paso.

- Detener la reacción de coloración (el último paso) después de un máximo de 30 minutos con agua destilada.
- Secar en una hoja de papel Whatman protegido de la luz (el papel aluminio puede ser útil).

b) Soluciones (preparación)

Amortiguador 1(amortiguador de ácido maléico): Ácido maléico 0.1 M, NaCl 0.15 M; ajustar con NaOH (sólido) a pH 7.5 (20 ° C).

Amortiguador 2 (amortiguador solución bloqueadora): Prepara de la solución bloqueadora ("blocking solution") 1X diluida en el amortiguador 1 1:10.

Amortiguador 3 (amortiguador de detección): Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5 (20 ° C).

Solución color-substrato: Agregar 40 µl de una solución de NBT/BCIP a 2 ml del amortiguador 3 (preparar al momento).

Solución de anticuerpo: Diluir anti-DIG-AP (750 U/ml) 1:2000 en el amortiguador 2. Concentración final de 375 mU/ml.

Protocolo del kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System (GIBCOBRL®)

Nota: Precalentar el TE que se va a utilizar a 65°C. Verificar que el etanol haya sido adicionado a la solución de lavado (H2).

1. Preparación de la muestra.

- Agregar 400 µl de la solución de unión (H1) a la reacción de amplificación y mezclar. La remoción del aceite NO es necesaria.

Nota: Utilizar 400 µl de solución de unión (H1) para reacciones de amplificación menores a 100 µl. Para reacciones de amplificación mayores a 100 µl, ajustar el volumen a un ratio de H1: reacción de amplificación > 4:1(v/v).

2. Cargamento del cartucho.

- Colocar en un cartucho la mezcla anterior e introducir este cartucho en el tubo de lavado.
- Centrifugar la mezcla a 12,000 x g por un minuto.
- Descartar el líquido.

3. Lavado del cartucho.

- Colocar el cartucho de nuevo dentro del tubo de lavado.

- Agregar 700 μ l de la solución de lavado (H2) al cartucho.
- Centrifugar a 12,000 x g por 1 minuto.
- Descartar el líquido
- Centrifugar de nuevo a 12,000 x g por 1 minuto para eliminar la solución de lavado (H2) residual.

4. Resuspensión del ADN.

- Colocar el cartucho dentro de un tubo de recuperación.
- Agregar 50 μ l del amortiguador TE (65°C) directamente al centro del cartucho.
- Incubar por un minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12,000 x g por 1 minuto.
- Guardar la solución con ADN a -20°C o utilizarla.

ANEXO 2

SOLUCIONES Y REACTIVOS.

1.1 Digestión de tejido.

- **Amortiguador de extracción**

NaCl 0.1 M (SIGMA[®])

Tris [hidroximetil] aminometano Cl 10 mM (SIGMA[®])

EDTA (Ácido etildinitrilo tetracético) 1mM (SIGMA[®]) (pH 8.0)

- **Proteinasa K** (10 mg / ml) (SIGMA[®])
- **SDS** (10%) (GIBCOBRL[®])

1.2 Método fenol cloroformo.

- **Fenol equilibrado** (SIGMA[®]) (pH 7.5)
- **Cloroformo: alcohol isopropílico** (24:1) (SIGMA[®])
- **Acetato de sodio** 3.0 M (pH 4.8) (SIGMA[®])
- **Etanol** (Alcohol etílico) (SIGMA[®]) al 100 % y al 70 %.
- **Amortiguador TE**
Tris Cl 10 mM (SIGMA[®])
EDTA 1mM (SIGMA[®]) (pH 8.0)

1.3 Electroforesis

- **Agarosa** (GIBCOBRL[®]) al 1% y 1.5 % en amortiguador TBE
- **Amortiguador TBE** (0.5X)
Tris-borato 0.045 M
EDTA 0.001 M

1.4 Digestión de ARN

- **ARNasa 1X** (Boehringer Mannheim GmbH)
- **SOC** (pH 7.0)
Tryptona 2 % (SIGMA[®])
Extracto de levadura 0.5 % (SIGMA[®])
NaCl 10 mM (SIGMA[®])
KCl 2.5 mM (SIGMA[®])
MgSO₄ 20 mM (SIGMA[®])
Glucosa 0.6 % (SIGMA[®])

2 Transformación y selección de células transformadas.

- **Base de caldo LB** (GIBCOBRL[®])
- **IPTG** (20mg / ml) (GIBCOBRL[®])

- **X-Gal** (200 mg / ml) (GIBCOBRL®)
- **Ampicilina** (100mg / ml) (GIBCOBRL®)

3 Transferencia a membranas

- **solución de desnaturalización**
NaOH 0.5 M (SIGMA®)
NaCl 1.5 M (SIGMA®)
- **solución de neutralización** (pH 7.5)
Tris-HCl 0.5 M (pH 7.5) (SIGMA®)
NaCl 1.5 M (SIGMA®)
- **solución de lavado**
SSC 2X (NaCl 0.3 M, citrato de sodio 30 mM, pH 7.5) (SIGMA®)

4 Rastreo de la biblioteca genómica parcial.

- **solución de lavado 1(L1)**
SSC 2X (SIGMA®)
SDS 0.1 % (SIGMA®)
- **solución de lavado 2 (L2)**
SSC 1X (SIGMA®)
SDS 0.1% (SIGMA®)
- **amortiguador de hibridación.**
SSC 5X (SIGMA®)
Blocking solution (solución bloqueadora) (10%) (Boehringer Mannheim GmbH),
SDS (0.02 %) (SIGMA®)
N-laurilsarcosina (1 %) (SIGMA®)
- **amortiguador B1 (pH 7.5)**
Acido maléico 0.1 M (SIGMA®)
NaCl 0.15 M (SIGMA®)
NaOH (SIGMA®)
- **amortiguador B2**
Solución bloqueadora 1X ("blocking solution") (Boehringer Mannheim GmbH), diluida a 1:10 en el amortiguador 1.
- **amortiguador B3**
Tris – HCl 0.1 M (pH 9.5)
NaCl 0.1 M
MgCl₂ 50 mM

- **NBT / BCIP**

BCIP 17.5 µl (Boehringer Mannheim GmbH)

NBT 22.5 µl (Boehringer Mannheim GmbH)

Amortiguador B3 5 ml

6 Digestión de plásmido de clonas positivas.

➤ **GTE**

Glucosa 50 mM

Tris-HCl (pH 8.0)

EDTA 10 mM (pH 8.0)

➤ **Solución de lisis**

NaOH 0.2 N

SDS 1%

ACRÓNIMOS

Tris: [hidroximetil] aminometano

EDTA: Ácido etildinitrilo tetracético

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

TE: Tris-EDTA

TBE: Tris-Borato-EDTA

LB: Luria-Bertani

IPTG:

X-Gal: X-galactosidasa

SSC:

NBT:

BCIP:

GTE:

ANEXO 3

SECUENCIAS

Secuencias obtenidas a partir de los fragmentos clonados. Las secuencias se muestran tal y como fueron obtenidas en el secuenciador ABY 377, con los cebadores M13/pUC Forward y Reverse. El número de la clona es mostrados con negritas.

CLONA 3

REVERSE

AAGNCAGAGNCNCNGANACTAATCGACTCGGTACCCGGGGATCTAATCACAGCAGCTCGAAGCACTGAGGGGTCCCATTATTTATTTCTCATGTTTATA 100
TTTGAAAAGAGATTTTCCCTCCCTGCCTTTCTCTCCCATCACCAGACTCCAGCCACCATCCAGGCCAGAAAGGTAGGACAGACGCCCTCCCCAT 200
TAATCAGAGCTGAGGCCGTGTAATGGCGGTGAGCAGGGGACTGCAAGCTACTGTCTGATTGAACATTAGTCATGCTGCACGTTACATTCTTAATGAG 300
AAAATTATTCAGATTGCCTCGAGGGATGGTTGTGATTAACTATTGCTTACTCTCTGCTAAATTGAACGTGCACAAGTGCACACACATGCTC 400
ACACACACACATACACACTCACAGAGTCTCCCGAGTTAGAGATGCTCAGCCAGAGCCTTGGAAACAGGGTAGGTACAGCCTCTGAATTCCAGAGGCTTC 500
CACTCCCAACCTGTTACAGCTTGCCTTCTCTGCTACAGTTTGAAGACAGCGAGGCTCCGAGGAGGAGAGGGGAGAATTANTGGGGCCATATCATTAC 600
AGCAAGGCCCACTGCCACATTCTGAAAGGGGCTCGGTTTTCTCTGGGTGAGCTTCTCTGGGTGTCAGATGTCTTGTCTCTTAAAGGGGAGAGTAAT 700
TTTTTTTTTCCAGGCCAAAGAATCTGGGGGCTTCTTTTTCANNAATCCTNNTAGAGTCNACCTGCAAGGCATGCAAGCCTTGGCACTGGCCCGTCGTTTTT 800
ANAAACGTTCTGTTGACCTGGGGAAAAACCTNGCCGNTTACCCNAACCTTAATCGCCCTTGGCANCAAAATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGNCGTAATAN 900
CGAANAAGGCCCNANCCGANTCGCCCTTTCCCAACAAGTTGNCACACNTGAAATGGCCAAAGGGCNCCTGGAAGCCNGGTTTTTTTTCTTTACNC 1000
CATTGGNGGCGGNNTTTTNCCANCCGNTATNGGGGGCCTTCTCAATACAANT 1056

CLONA 11

REVERSE

TGAGNNAGAGGGCNCNTGATACNATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTTTAAGAAAAAACTTTCTGCCTAATTTTAGAGAGAACAATGAGCAAACTGC 100
AGACATCTCCAGCTTTTTGCCTCAGCTACAGAGCCACACTGCCTTGGACCATGCCCTTCCAAGACAGCCTGGATGAACGTACAGGGGTGAGGGGATTAT 200
AAAATGCAGGCATTTCAGTCCAGTGTATCTAAATGTATCTCAATGTAACCTTAATAGACAATACTTTTTCCAGAGCTCCTGAGAAGTGTTCGATTAC 300
AGTTTACTTCTCCATTGCCAGGTTCTTCTTCTATCTTTCTTTTGTAGTTAATCCCTATATATTGCAACTCAATCTTTGTTTTAGCATCTGCTTCTGAAGA 400
ACTCAACCTGTGACAGATGGTATTGAATGTGTGGCTGGAATCAAGTGACACTGTGTATGCTCTATCAGTTCTCTACCCACCAAAACAACAAAAATGCA 500
CACACGCACACACATACACAAAGTNAGCAAGCAAGACAAATAGTTTGTGTTAACTGATTTTTACTTAAGAATCTCTTTTTGTTACCTGGTGGTTN 600
GACATTTTTTTCCCTAAAGAACCAACATTGCAACTGCTTGAACAAAGCAATGCTCCTAACCTTCCCTTCTCTTCTACTTGCCTGTCTCCCTTA 700
CCCCCTACCCCACTTACCATTTCAGATCTCTTAGAAGTCGACCCCTGCNANGCATGCAANCCTTGGCCACTGGCAGCTCCGTTTTTACAACGGTCTNT 800
GANTGGGGAACCCCTGNCGTTACCCCAANTTAAATCGCCTTTGACNANATNNCCCTTTNCCNGCTTGGCGNATATTANAGNAAGAAGGGCCCN 900
GCACCGATCNGCCCTCNCANNANGTGGCNCAGCTCTTGNATTGGCGAAATGGGCGCCTTGATNCCGNNATTTTCTCTTTACGCNATTGNGCCGGTT 1000
TTTACACCNNTNTTNGGCGNCTCTTNANCNACANATCTNNNTTNNGTCCCNCT 1057

CLONA 15

FORWARD

TCCTNCAGGTGAGCNCCTAGAGGATCTTACATTTGTGACAACATGAGATGAACTACGAGAGTATTATGCCAAGTGAAATAAGTGAGAGAGAGAAAGACA 100
AATATCATATGATTTCACTTATATGTGAATCTAAACAAACCAACCAACCAACAAACAAACAAAGAGACTCATAAATACAGAGAACAAAC 200
TGGTGGTTNCCAGAAAGAGGTGGGTNCGCAGAGGNGCANGCTTCCCTCCAGCTATAAACTAAGTANGTCACAAGAAATGANAAGTTTAGCATAGGACGT 300
TANCNAGNNANNNCANNGTACGNTNCNTCNGCNGGCCCTTCGCNCAAGTGTGNGGTGTCGTAACCTTCCCTGTCATCGGCGNGGGGNCNTNGNCCTNGNNTATCNCNGCNGNACTCTC 400
TGCTCANGNCCTGTCTNNCAGNANNCCCTTTTNCCTGNCCTCCCTGTCATCGGCGNGGGGNCNTNGNCCTNGNNTATCNCNGCNGNACTCTC 500
TNTTCANCGCNCNTGNTGTTGTNNANNGCNCGTGCNCNTNTTCCCGNNGGGGNGCNCNANNNCCNCGANGNNCNTCCCTNGCTNNNCNGNN 600
CGGNNNTGTAGNGCNGGGCGGNCNTTGNNNCNCNGCGGGTACCCNGCNGCNGGGGCGGNCNTNGNNGNTGNCCTGGTGNNTGCGNNGGNGCNCNTN 700
GANNCCCTCNGATANNNGNCCCTNNGCTGGGTNCGCNCNCCNCGGNTCANATCGTNTATGTGNCNGCCCTTNNANGACACCCCTTNGNGNTNGCTN 800
NNNGCNCACNCNCCCTGNGGGGNNNNCCNNTNTGTGNGCNGCCGNTNGGNTGTCNCGGNCNGCNCNNNNNTGCTGGCACNNCCGNCNTNCGA 900
TGNGCCCGAGTCGGNGCTTGGCCGACNNCTCAAGCACNCGGCACACNTNNGTGTGNGGNGNCNANTNNCNNTNNGCNACGGTTGTNNNGCTTNTN 1000
CCGNGCCNNNNCCAGTNCCTCTTNCAGGCGCTGNNCANGCGCNGCNGAGCCCNCCC 1059

REVERSE

ACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCAAGTCTGCATCAGGGCTCCCTGCTCAGCAGGGAGTCTGCTTCTCCCTCTGACCTCCCCCTCTCATGCTC 100
TATCTCATTTCTCTCTCAAATAAAATAAAATCTTAAAAAAATAACTCCTTTTATAAAGTATNAANTGCAANTATATNAGAANATGAGACGNGAGGA 200
NNGAACNTNACACNGTNAGNGNATNAANGGGGATTNCCNACANAANNNGAGCTNTGGGNCAGTGNNGNNNCCATNNANNANGCANCCANANNANA 300
AGNNCGATGNNANGNATGTANATGGNNGNANTNNGTNAGNAANGCNTGGCAAAANTANANGANATTNNCGGNGACNNAAGAGCNCNANNNTGNANGAG 400
CCTNNANCAGNAANAAGAGGCGAGNGNNGAGNNGNNNNCNAGNAAGAAGNNGGAATNANGNNGAGNGAGAGTTNTNANNNGNANNATAGNANANANANG 500
NTAANGNTGGTGACCGGCATGNTCAANTANCNTAAATGATGACGACAGCTATTAAANNANATGANGNTGTTANGTTAANACAGCGGATANGNNAGGCAN 600
NNACGNNNNNTGAAANNNTGGGAAANNAGCAAGACNAAAGGANGNNGNAGNNGNNGNNGCATANNAGTNGANCNATTANANNANNNNATNTNTNTN 700
AGNTNNGGNGNTNNNTGAGANNNCNAANGAGANAGTNNNNAAGANNAGNANNNGTGCACNNGAGNACCAGNAGAGAATNATACNANTNTTNTTNG 800
GNNNGACGNCNTGTTAGNNGGAANGNAGNNNAAGNTGNANNGTNCANGNNGGAAAGNNAANANTGAGAAGAGATNGACNGNCAGACNANGGGNAATA 900
ANNNGGAGNNGNNTTNGNTCGNAGNANTNTTGANNANTAGNATCGNAGGGNGATCAGCNAATNAGAGCATCGNCGCGTNNNAGNNAATGNTNAA 1000
TNATNGANAGNANANTTTNGGNTNCAGNAGTAANTGGNCAANAGTNNNAATAACTGTGNAACGGNCANNAANAANNAGAANTNTNCGCATGCGACA 1100
GTCAAGCNGNNGGGANGAGN 1123

TCTTTAAATTCCTTTTTTTTTTAAAGATTTATTATTATTATTATTGACAGAGAGAGACACAGCGAGAGAGGGAACACAANCAGGGGGAGTGGGGGAAAAG 800
 GGAAAACAGCTTCCCGCTGAACAGGGAGCCTGGTGCAGGGCTCGATCCTNTAAANGTCGACCTGCNGCATGCNAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTNNCA 900
 ACGTCGNGACTGGGNAACCCCTGGCCTTNNCCCAACNTTAATTGCCTTGNAGCANATCCCCCTTTCCCACTGGNGTTATTACCNAAAAGGCCCCACCGA 1000
 TCGCCTTNNCAANANTTGGCCCCACCTTNAATGGNAAATGGGNCCCGGTGCGGGNTTTTTTCNTTCCCATTTGGGNGGGTTTTNACN 1087

CLONA 28

FORWARD

CTTGCTGCCTGCAGGTGCTAGAGGATCTCCTTTATATATGTAATCTTTAAAAAAGTCCAACTCAGAACAGAGTAGAATGCTGGTTACAAAG 100
 GGCCTGGGGAAATGGGGGAAAAGGGGAGATGCTAACAGAAGGGTCCAACTTTCAGTTACAAGATGAATAAATAAGAGTATCTACTGTAAAGCATGGTGATA 200
 TAGTTAATAGTACTGTACTGTATAAATGAAATTTGCTAAGAGATTAAATCACAACACTTCTCACCACACACACAAGAAAGTTACCTATGGGAGATAATG 300
 TATGTATTAACTGCTGATTGTGGTAATCCTATCAAAAAGTATACATACATCAATCATCATCTTACACTTTAAATACATACCCTTGTATGTCAATTA 400
 TACCTCAATAAAGCAGGGGTGGGGTAAGAGGGGAAGAAGATTCTAGTCACCAGCCCTTGAGCTGCCTCAGGTGATTCTGAGTAAAGACAAAGTTGTCCC 500
 TGTACACCATGCCCCAAATCATGAGATTCAAGAAAAATAAATGTTGTTCTTGCTCTGAGTCACATTTTGTAGTGAAGAAGTTCTGCAGCAACAGACA 600
 CTTTAAATGAAGCAAACTATCTTCAGAAATGTTAGGTAAACAAGGGGAAAATAAATCTAAGCAATAGGGGAAGAAAATAGTTGAGAATTTGCAATTCG 700
 TTTACAGTAGTCCACAAATAGTTTTCATAATCTCACAACCACTTGATTCTCAAATTGAACAAGGAAATGAATATGCACAAAGAAATGAAATAGAATT 800
 CTTTAAAAAACATAATGTCTCAAATAAATTANATAGCTGGCCTGAATTTATTTTGTACTTTAAAAAATAAATCNTNTGATTGTGANATGATCCCCGGT 900
 TNCCGAACCTCGAATTCGTAATCATGGGNCATACTGGTTTCTGTGGTGAATTTGGTTNTCCGCTCACAATTCACCAACATACNAACCCGGAAACCNTA 1000
 AATGTTAAACCCGGGGNGCCTAATGAGTGAACCTACCTCCCATTTAATTGCGTTGGGCTCNCTGNCCNTTTCCAATTCGGGAAACNTNTTTGCCACN 1100
 TTTT 1104

REVERSE

CNATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCATCTCACAATCAGAGATTTTTTTTTTTAAAGTTCAAAAATAAATTCAGGCCAGCTATCTAATTTATTGAGACA 100
 TTATGTTTTCTAAAGGAATTTTCAATTTCTTTGTGCATATTCTTTCTTGTCAATTTGAGAAATCAAGTGTGTTGTGAGATTATGAACTATTT 200
 GTGGACTACTGTGAACGAATTGCAAACTCTCAACTATTTCTTCCCTATTGCTTAGATTATTATTTTCCCTTGTGTTACCTAACATTCGAAGATAGT 300
 TTGCTTCAATTTAAAGTGTCTGTTGTGTCAGAACTTCTTCTCACTAAAAATGTGACTCAGAGCAAGAACAACTTTATTTTCTTATGAATCTCATGATT 400
 TGGGCATGGTGTGACAGGGACAACCTTTGTCTTTACTCAGAATCACCTGAGGCAGCTCAAGGGCTGGTGACTAGAATCTTCTCCCTCTTACCCCCACC 500
 CTGCTTTATTGAGGTATAATTGACATACAAGTGGTATGTAATTTAAAGTGTCAATGTGATGATTTGATGTATGTATCTTTTGTAGGGATTACCACAAT 600
 CAGCAGTTAATACATACATTATCTCCCATAGGTAACCTTTTCTTGGTGTGTTGGTGAGAAATGTTGTGATTTAATCTCTTAGCAAATTCATTTATACA 700
 GTACAGTACTATTAATATATCACCATGCTTTACAGTAGATCTCTTATTTATTCATCTTGAAGTAAANGGTGGACCCCTCTGTAGCATCTCCCCCTTTC 800
 CCCATTTCCCAACCTTTGTAACCAAGCATCTACTCTGTCTGAGTTGGACTTTTTTTTTTAAAGATTNCTNTTTAAAGGAGAAACCTTANAATCNACC 900
 TGCAGGCATGCCAACCTTGGCACTGGNCGTCCGTTTNNCCAAACCCCTCGGACTGGGGAAAACCTTGGCGTTACCCACTTAATTCGCTTTGGAACANAATCCC 1000
 CTTTCCCANNTTGGNGTTAAAAACNAAAAGGGCCCNCCGAATTNCCNTTTCCAAAAATTTGNCCCNCCCTNAATGGNNAANGGCCCN 1092

CLONA 29

FORWARD

CTTGCTGCCTGCAGGTGCTAGAGGATCCACCCTGAGCTGAAATCAAGAGTTGAATGCTTAACTGACTGAGCCACTCAAGCTCCCTAGTTTTTGACC 100
 ACTAGAAAAATTTATTAATATTTAAGCTTTTGTAAATAATTGTAAGTCTGATGGCTACTAAATTTAACTTGAAAAAGTTTTTCTGGATTTTTCT 200
 TTGTAAGGTTTAGGAACAATTTTTATGACTTATTAATATATAAGGTTTCCAGAAAGGTAATAAAAGGTTTAGGTTTATGGCCTAAAGAAACCTAA 300
 AGAAACCTAAAGAAACCTTCAAGTTATATGAAGAAATCTTAGGATAAGCTATTCCATGTTTGTATTACTTTTTAGACATGTTTCTATTTTTCTCATA 400
 AATTCTCTCTAGGTTACAGAAATTAATAATCATAATCAGATTGTAAGAAAAAATTAAGCAGATAACTGAGAAAAAATGTCTGTGGAAGAGAGAGCT 500
 ACCAATTTGGAAGATACGCTAAGGGAAGAGGAAAAAGTGTAAAGGTAAAGTTAGTTTGTAGTTCTTAAACAGTCACAGAATCTAGCAATAGTGAATTAG 600
 ACTCTTGAATTAGGGAGTAGGAGGCTTTTAAAGANGCTCTGCTTTCTGGTGTGACCACATTTGTAATCAGAATTTTGAATGTTGGACTCCCTTTTTGT 700
 ATGTGGCTTCTGAAGATGTTTCTGGCTTCTCTCTTAAAGCTCTACTTCTNCTTTTGTCTTACTTTTACATTTGCCTTGTCTTCTTCAAGGTAGCC 800
 CTCCCCCTGTGATCCCCGGGTACCGAATTCGAATTCGTAATCTGGGCCATANCTGGTTTCTGTGTGNAATTTGGTATTCGCTTACAATTTNCCCAA 900
 CATTACNANCCGGAACCTTAAAGTGGTAAACCCCTGGGGNGCCTTATGGAGTGGACCTAATCACAATTTAATTGCGTTGCGCTTCTTGNCCGCTTTCC 1000
 AATCNGNAAANCTGCCGNGCCAACCTGGCNTTAATTGAATCGGCCAACCCCGGGGAAAAGNGGGNTTTCCTTNTTNGCNCNTTTCCGTTTCCC 1100
 GGTTNG 1107

REVERSE

AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCAGAGGTGAGGGCTACCTTTGAAAGAAGACAGCCAAGGCAATGCTGAAAGTAAAGCAAAAGGAGAAGTAGAAGC 100
 TTTAAGAGAGAAGGCCAGAAACATCTTCAGAGCCACATACAAAAAGGGAGTCCAACAACCTCAAATTTCTGATTACAAATGTGGTCACACCAGAAAGCAG 200
 AGCCTCTTAAAGACCTCTACTCCCTAATTGCAAGAGTCTAATTCATCTATTGCTAGATTCTGTGACTGTTTAAAGAACTAAACTTTACCTTTAC 300
 ACTTTTTCTCTTCCCTTAGCGTATCTTCCAAATTTGGTAGCTCTCTCTTCCACAGACATTGTTTTCTCAGTTATCTGCTTTAATTTTTCTTACAATC 400
 TGATTATGATTTTAAATTTCTGTAACCTAGAGAGAATTTATAGGAAAAAATAGAAAACATGTCTAAAAAGTAATACAAACATGGAATAGCTTATCCTA 500
 AGATTTCTTCATATACTGAAGGTTTCTTAGGTTTCTTTAGGTTTCTTTAGGCCATAAACCTAAACCTTTTTTATTACCTTTCTGGAACCTTATATAT 600
 TTAATAAGTCATAAAAAATATTGTTCTTAAACCTTTACAAAGAAAAATCCAGGAAAACTTTTTTTCAAGTTTAAATTTAAGTAGCCATCAGTTTACA 700
 ATTATTTTAAACAAAGCTTAAATATTTAATAATTTTCTAGTGGGTCAAAAACCTAGGGAGCTTGAGTGGCTCAGTCAGTTAAGCATTCAACTCTTGATTA 800
 GCTCAGGGTGTGATCCTNTAAAGTCAGCTGCAGGATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTTACAAACGTCGTGGCTGGGAAACCTTGGCGGTTAC 900
 CCAACNTTAATCGCCTTGNAGCAACATCCCCCTTTCGCCAATGGGCGTNTAAACNAAAAGGCCCGCNCCTGATCGCCTTTCCAANAGTTGGCNCACC 1000
 CTGAATGNCAANGGNCCTGAGCCGNTTTTTCTTACCATTTGNCGGNTTTCACCCGANTTGGGGCCTTTTANTNCAATTTGGGTNTGGANG 1098

CLONA 30

FORWARD

CTTGCTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCACCTGAGCTGAAATCAAGAGTTGAATGCTTAACTGACTGAGCCACTCAAGCTCCCTAGTTTTTGCAC	100
ACTAGAAAAAATTATTAATATTTAAGCTTTTGTAAATAATTGTAACCTGATGGCTACTAAATTATTAACCTGAAAAAAGTTTTTCTGGATTTTTCT	200
TTGTAAGAGTTTAGGAACAATATTTTTATGACTTATTAATATATAAGGTTTCCAGAAGGTAATAAAAGGTTTAGGTTTATGGCCTAAAGAAACCTAA	300
AGAAACCTAAAGAAACCTTCAAGTTATATGAAGAAATCTTAGGATAAGCTATTCCATGTTTGTATTACTTTTTAGACAGTGTTTTCTATTTTTTCTCATA	400
AATTCCTCTCTAGGTTACAGAAAATTAATAATCATAATCAGATTGTAAGAAAAAATAAAGCAGATAAATGAGAAAAACATGTCTGGGAAGAGAGCT	500
ACCAATTTGGAAGATACGCTAAGGGAAGAGGAAAAAGTTAAGTAGTAAGTTTAGTTTTAGTTCTTAAACAGTACAGAAATCAGCAATAGTGAATTAG	600
ACTCTTGCAATTAGGAGTAGGAGGTCCTTTTAAGANGCTCTGCTTCTGGTGTGACCACATTTGTAATCAGAAATTTGAGTTGTTGGACTCCCTTTTTGT	700
ATGTGGCTTCTGAAGATGTTTCTGGCCTTCTCTCTTAAAGCTCTACTTCTNCTTTTGCTTTACTTTACATTTGCCTTGCTGCTTCTTCAAGGTAGCC	800
CTCCCCCTGTGATCCC CGGGTACCGAACTCGAATTCGTAATCTGGGCCATANCTGGTTTCTGTGTGNAAATTGGTATTCCGCTTACAATTCNCCCAA	900
CATTACNANCCGGAACCTTAAAGTGGTAAACCCCTGGGGNGCCTTATGGAGTGGACCTAACTCACATTTAATTGCGTTGCGCTTCCTTGNCCGCTTCC	1000
AATCNGGNAANCTTCCGNGCCAACCTGGCNTTAATTGAATCGGCCAACCCCCCGGGGAAAAGNGGNTTTCCTTNTNGGNCNTTTCCGTTTCCC	1100

GGTTNNG 1107

REVERSE

REVERSE

CNAATTCN	GCTCGGT	ACCGGGG	ATCGAGT	CCACAT	CGGGCT	CCCTGCT	CAGCGGG	GAGTCT	GCTTCT	CCCTCT	GACCCCT	CTTCCCT	CTCAT	GCTCTGT	100
GCTCTC	CATTCT	CTCTCT	CTCAAA	TAAATA	AAAAAC	TTTAAAA	AAAAAT	GAGCTA	ATTACT	TTTCAA	AAGCAG	GAGGTGA	ATGTTCT	CCGTAA	ACC 200
TCATCT	TACGCA	GGCTTA	AGGTA	AGACAG	TTAGA	ATCCTT	GGAATTT	TGACTCT	ACTTGT	CTGAG	GGAAGCT	CCTCCT	CTTGT	TTCTCCA	ACAGCTG 300
GTATGCT	TTCTTT	CCCACTA	AGAAGT	CTTTAA	AAACAC	CACTCAG	TATATC	CAACTGG	TCCTTT	TCATAG	TTTTTACT	TTTCTT	TATTTCT	TGAGTACT	GAG 400
TGGCACT	ACCCAGG	TGACCGG	TACAG	CACAGG	AGAGG	TCTTAC	TGCTG	GGAAGCT	TACACT	TGTGCT	GTGTTCC	CACTCT	TTTCTC	CACTTG	GGCT 500
CTTCTCG	GGTTTCT	CTCAGT	CACTCT	TTTATC	CTTCA	TTTGTAG	TAGTGA	GGCAGG	CACTCT	CTATAG	GAGCCCT	GTGCTT	CTGCTT	TGCA	TTTCTCTGGG 600
TGACCT	CTCTTCT	TNCGG	ACATCCT	TTTTCAT	TGCAT	GAAGACA	ACTCTT	TTTTTTTT	TTTTTA	AGGAAT	AAAAGTT	TATTTAT	TATG	TGGTAT	GTTAAT 700
CACCATA	CACATAC	ATTCG	TTTTGAT	GTAA	GGGTCCA	TGATTCA	TATG	GTGGC	CAATA	ACACCC	AGGGCTC	CAATT	CGA	ANACCT	TNTTTTGAAC 800
TTCATT	TAGGCT	TCNCC	TTTNG	GTCTT	TACCN	NGGGGT	TTAGCA	CAACCT	TTCTN	AAAGAA	AAACCT	CAAACT	TTTGN	ATG	ATCCTTTANAATC 900
NACCTG	CAGGCAT	CGAANC	TTNGNA	ANTT	GGCCG	TNTTTTT	TACA	CCCCGG	AGCTT	NGGAA	AAACCT	GGGGT	TNCC	AA	NTTTAATNCCNTGGGAANAA 1000
ATCCCCC	CTTTNCC	NA	NTTGGG	NTA	ANAAC	NA	AAAGGG	CCNCC	CNATG	CCCTTT	TGCAAA	ANTN	NCCCCC	CTTAA	AGGGAAAGGGCCCTTTTCNGN 1098

CLONA 35

FORWARD

FORWARD	
CTTGTGCTGCCAGGTCGAGTCTGAGGATCTTCCTCAGTCTTGAAGGACACATCTCTCTTGTTCATATTTAGCATATTCATTTGTTTTCTTTCAAG	100
CCTTAATTTAAGTCCTGGGGTAATTCCTGATGACACTAACGCATAGCAGTCTCTTCCTTTTTTAAACCTCCAGTAGTTTTATAGCCAATATGACTTATT	200
AATACTTTTTTCCTAAGTATTCAAACCTGTTATTACATGCTACTATCAATTAATCACTAAATATTGAGTTACCACCATGTGCAAAGCACTGTGCCAGAG	300
CTATGTTTAAACACTTTTACTTTAGTTACATTTAACTTTTTTATTTTTTTAAAGCTATTATTGGCATATAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	400
GTGTGTGTGTGTGTGTTTTCTACTCCAGAGTTAGACCATAAGCAACTTGGAGCAGATCCCAGGTCCTGGGATTTGAGCCCCACTTGGCTCTTGTGTTG	500
GCAGGGAGGCTGCTTCTCCCTCTGTCCCTGCCACTCGCCCTGCTTGTGTTCCTGTCTTGCCTATCTCTTCTTATCAATAAATAAATAAAATCT	600
TTAAAAATCACTAACTCAATAAATAAATCTGTATCTCCTTATTGCAAAGNGGGCAGAAGTATCTGTCTTATAAGGGGTTTCTTAAGACAGTTTAAA	700
GAAAGAATGCGTGACTCAACANTAATTNNTTAGCAAAATGATAGCTAGAAAAAATCAACCTAANAATTTGGAAAATGCCAATTCCCANAACTTTAGGAA	800
ANTNTCNANANCTCTCGGACFCATNGNCTTGGGTNAAGGCAAGNGGGAATATGNTCTGNCCTAAAAATTCATGGACNTTNCCTGGANGGCATTNNCCCT	900
NTTNTTCATATNCCCCATNCCCCNCTTCCCTAAATNCCATAAAATTTCCCCCNNTNNAAGACCCNATNCTTGTGGGGGAAAAANGGNGGAAATG	1000
CCCGGAAAGNCTGGGGNTAAAAAACCGCTTTTTTTTTTTGNNAAAAAAAGGCAGTTCCCCTCNCCNTGTTTGGCCGGTAAACCCNCCCTT	1100

TNC 1103

REVERSE

REVERSE	
CNANTCNGCTCGGTCCCGGGGATCAAGAGTCAGATGCTTAAACAGACTGAGCCACCCAGGCACCCCTGTAACAAATCCTGTCCAAATAGTATTTTACTGAA	100
GGAGGCTTAGAGATATATTTTGCAGCCAATGCAAATCTCTTTTCCCAATCTCTTCTGGGAAGTGGGAGTATACACAGCAACTATATGCCTTAGTTAAC	200
TTTTTTATTGGCAAGGAGGTGGGGCTAGGTTTACAGGAACAAACATAGGTAAGTTGGAACAATTGCACATTTTCTTCTGCACAAATGAAGAAATAGCCTGTT	300
TTTTTACCCCGAGCTCTTCCGTCATTCTTCTCCCTTTCTTCCACAACATGTATTGAGCTCTTTCTATGTGTGAATTTTAGGGATTTAGGGAAGTGG	400
GGATGGGGATATGGAAGAGGAGAGATGCCATCAAGAAAGTCATGAATTTAGGACAGCAACCATATACCAGCTGCCTTACCAAGCCGATGACTCANAGCTCT	500
GATACCTCTCTAAGCTCTGGAATTCGATTTTCCAATTTTGGTTAGTTATTTTTTCTAGCTCATCATTNGCTAACAAATTACTGTTGAGTCACGCATTCTTTCT	600
TTAAACTGTCTTAAAAAACCCCTTATTAAGACAGATACTcTTGCCACTTTGCAATAAGGAGATACAGATTATTTATTATTAAGTTAGGTAAGNATTTTFTA	700
AAGATTTATTTATTTATTTGATACAAAGAGAGATAGCAAGAGCANGAACACAANCANGCGGANTGGCANGCAGGGACAGAAGGAAAAACAGGCTCTCGCC	800
AACAAGGAGCGCCAAATGTGGGGCTCAATCCCAGGACCCCTGGGATCTGTCTCAAGTTGCTTATGNGNCTAACCTTGTGNGTGGAAANAAAAAACNNACACN	900
CACNCAATCACACNNNNAGCACACACNAATTTTTTTTGCTAATAGCTTTAAAAAAATAAAAAAGTTAATGGGACTNAAAGNAAAGTGTAAAAAATAC	1000
TTTNGGCNCAANGCNTTGGCCATGGGGGGACCCNAAATTTAGGGATAAATGGAAGGGGCTTNTNAAACCCNTGGNAACCTNNGANS	1086

CLONA 37

REVERSE

REVERSE

GNNAGAGGGNATGNTACGATTACAGTCTCGGTACCCGGGGATCAAGTCCCGTGTTGGGTTCTTGCTCAGCAGGGAGGCTGCTTCTCTCCCTGCTGGCCACT	100
CCCCCTGCTTGTGCTCTCTCTCTCTCTGACAAATAAAATAAAATCTTTACCAAAAAAATCTTTCTTTAATTGAAACATTATAGCCTAAATCCAAAAATA	200
GAAAGACATAAAATATTTCTGTGATAGAAGATTATCATGATGCTAATTATATATTAACAACAGTAAATAATGATTATTCATTGAAATGATACGTAGAAAAATAA	300
GCATCAGATAATAAATTATGCTGGAATATTAAGTACAAAATCAAAATTTAAAGAAACAATATATTTGTATTTATATTCACTTGTTTTCCTACTAATTCCTGAC	400
CACCTTCACATATACTATACAATCCTTGAGGAAAGCACTGTGTTTTATTTATCATATTATGCTCCCGGAATCCACAGATGTTGACAGACAGTAACACTGA	500
AAAATGTTTTATTGCTTTGCTCCCGAGTTGGCTGAAACAACTGTTGGGAGATATAAAATGTGGAAATATTCTTAGTAACACAAAGATATACATACTGCCATAT	600
ATTAGTGATAAATATTAATGTCAAATATGTTACATACATTTTTGAAGCAAGATTAAGCAATCAATGTAATTATAAAAAATAAATCCACCTTTGGNAAAC	700
GGAAGGAATTAAGCAATTTCTGTGCGCTTTCTANTACAGGCAGCACTTTTCTCATTTTTAAAAATATTTTCTTTACCTGGTGNNGGTTTAATAATTTCC	800
AGTTTTTATTAAAAATCGGGCTAATGNTATTGCNGTTTTTCAAAATCTNTTTGAACCACTTTTTTCTTACCTCATGAATTTGGGGTAGANCCCTNTAANAG	900
TCCAACCTCGCANGCATGCAAAANCNTTGGCNCCTGGCCCTNTTTTTACNAACNCTCNGGACTGGGNAAAACCCCTGGCGTTTCCCCAACTTAANTCGCCT	1000
TGCAATNACTTTCCCCCTTTTNTCCCAANTTTGGCGTTTNGGTAGTTAATACATAC	1052

CLONA 40

FORWARD

CTTGCTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCAAGGTAATTGTGGCCTAATAAAACAAGTTTGGAAAGTTTCCCTCCATTCTATTTTTTGGAAACAGTTTC 100
 AGGAGAATAGGTATTAATTCTTCTTGAATGTCTGATAGAATCCCCGGAAGCCATCTGGCCCTGGGCTTTTGTGTTGGGAGATTTTTGATGACTG 200
 CTTCATTTCCCTTAGTGGCTATAGGTCTGTTCAGGTTTTCTATTTTTCTGGTTCAATTTTGGTAGTTGATACATCTCTAGGAATGCACCCATTCTTCC 300
 AGGTTATCTAATTTCTGGCATAGAGTTGCTCATAATATGTTCTTATAATTGTTTGTATTCTTTGGTGTGGTGTATCTCTCCCTTTTCATTCATGA 400
 TTTTGTGCTTTGGGTCAATTTCTCTTTTCTTTTGTATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTCTGTGTGAATTTGTTAT 500
 CCGCTCACAAATCCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC 600
 TGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGANGCGGTTTGCATATGGGCGCTCTTCCGCTT 700
 CCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGGTTCGGCTGCCGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACCGGGTATCCACAGAATCAAGGGGA 800
 TAACGCAGGAAAAGACATGTGAACAAAAGGCCAGCAAAANGGCCAGGAACCGTAAGGCGCGGTTGNCCTGGCGTTTTTNCATANGCTTCCGCCCC 900
 CCTTGACGAAGCNTCACAAAAATCGACCCCTTNAAGTCANANGGTGGCGAAACCCCGNCCGGGCTTTTAAAGATCCAGGCGGTTTNCCTTGGAAACC 1000
 TCCTTCTGCCGCTTTCTGGTTCGACCTTGCCGGTACC GGGNACCTGGTCCNCTTTTCCCTTNGGGAANCNGNGCCTTTTTTANAACCTACCCCTGG 1100
 NGGGNTNT 1108

REVERSE

AATTCAGCTCGGTCGCCGGGATCAAAAAGAAAAGAGAAATGACCCAAAGCAACAAAATCATGAATGAAAGGGGAGAGATAACAACCAACACCAAGAAAT 100
 ACAACAATTTATAAGAATATATTAGGCAACTCTATGCCAGGAAATTAGATAACCTGGAAGAAATGGGTGCATTCCTAGAGATGTATCAACTACCAAAA 200
 TTGAACCAAGGAAAAATAGAAAACCTGAACAGACCTATAGCCACTAAGGAAATTAAGAGCTCATCAAAAATCTCCCAACAAACAAAAGCCAGGCGCAGA 300
 TGGCTTCCAGGGGAATTTCTATCAGACATTTCAAGAAGAAATTAATACCTATTCTCTGAACTGTTCCAAAAATAGAAATGGAAGGAAAACCTTCCAAAC 400
 TTGTTTTATTAGGCCACAATTAACCTTGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAA 500
 CCCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCGACATCCCTCTTTCGCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGC 600
 GCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTC 700
 TGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCCAACACCCCGCTGACGCGCCCTTGACGGGCTTTGTCTGCTCCCGGCATTCGCTTAAAAACAAA 800
 GCTGGGGACCGTCTTCCGGGAGCTGCATGTTGTCAAAAGGTTTTACCCGCTCATACCGAACGCGCANACNAAGGGCCTTCGGGATCCCTATTTTTTA 900
 TAGGTAATGGCATGGANAATAANGGTTCTNAACGTTANGNGGCCTTTTGGGGGAAATGTCGNCGGGAACCCCTNTTGGTTTTTTTCAANCCCTTC 1000
 NAAATNTGNTCCGTCATGAAAAATAANCCCNGANAAAGCTTTAATATTTTGGAAAAAGGAANANTGAATTTTCAACATTTTCNGGGCNCCTNT 1095

CLONA 41

FORWARD

CTTGCTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCGGTATTAAGGAGGGCAGCTTCTGCGTGAGCACTGGGTGTTATGCACAAAATGAATCATGGAACACT 100
 ACATCAAGAAATAATGATGTAATGTATGGTGATTAAACATAACAATAAAAAATTAAGGAAATGCACTTGTGTGATGAGTACTAGGTGATGTATG 200
 GAGTTGCTGAATCACTATCTGTACACCTAAACATAATATAACACTGTATGTTAACTATACTTAAATATAATATAGATGTGTACACACACACA 300
 CACACAAAAGAAATTTAGCTGTGCTTCGGATGAATGCCGGAAGGATTTTCTCAATGATAAATATCCAAAGATAGATGGTGTACTTCAGATAGTACATC 400
 AATAAGATAAATCTGTAAGATTCCATAGTTATGATTACATTAATTGCTTACATGCCCTTTGTTACTATTATTTCAAAGTTGATCCCGGGTACCGAGCTC 500
 GAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACATTTCCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGG 600
 GGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCTTGGCTTCCGCTCACTGAGCTGCGCTCGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCCGGTATCAG 700
 AACGCGCGGGGAGANGCGGTGCGTATTGGGCGCTTCTCCGCTTCCGCTCACTGAGCTGCGCTCGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCCGGTATCAG 800
 CTCCTCAAANGCNGNAATTCGGGTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCANGAANAACATGTGAACCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCCGTA 900
 AAAAGGCCCGGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGGTCCCGCCCTTGACNACATTACNAAAAATCGACNCTCAAGTCAAAAAGGNGNGAAACCCGNCNGGA 1000
 CTTTAAAGATNCNGGCCGTTTTNCCCTGGNAANTCCTGNGCCCTNTCTGTTCACCTTGCGCTTTNCCGGAACCCCTNTCCCTTTTCTTTG 1096

REVERSE

ATTGAGCTCGGTCGCCGGGATCAACTTTGAAATAATAGTAACAAGGGCATGTAAGCAATTAATGTAATCATAACTATGGAATCTTACAGATTTATCTTA 100
 TTGATGTAATCTGAAAGTAACACCATCTATCTTTGGATATTTATCATTGGAGAAATCCTTCCGGCATTTCATCCGAAGCACAGCTAAATCTTCTTTGTG 200
 TGTGTGTGTGTGTACACATCTATATTTTATTTTAAATGCCAGTATAGTTAACATACAGTGTATATTTAGTTTGTAGGTGTACAGTATAGTGATTGAGCAAC 300
 TCCATACATCCTAGTACTCATCAACAAGTGCAATTTCTTTTTTTTAAATTTTTTATTGTTATGTTAATCACCATACATTACATCATTTATTTCTTGAT 400
 GTAGTGTTCATGATTGTTTGTGCTAACACCCAGTGCTCCACGCAGAAGCTGCCCTCTTAAATACCGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGC 500
 AAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACACGCTGCTGACTGGGAAAACCTTCCGCTTACCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCTTTCGCGAGCTGG 600
 CGTAATAGCCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTNCCAACAGTTGCGCAGCTGAAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTG 700
 TGGCGTATTTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTGATGCCCCGATAGTTAAAGCCAAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGGTGACC 800
 GCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGNATTNCGCTTACANACAAGCCTGGGACCGTTTTCCGGGAAGCTGCATGTTGTCAAAGGTTTTACCGCTCATCA 900
 ACCGAAACCCNCGAAAACGAAAAGGGCCCTCGTGAACCCCTTATTTTTTATAGGGTAATGGCCATGNANAAATAANGGTTCTTAAACGTCANGGN 1000
 GGCCNTTTTCNGGGGAAATGGGGCCCGGAACCCCTNTTGGTTATTTTTCTTAAACCATCNAAATTTTTTNCNCTCATGAAAAATAAACCNNGNAAA 1100
 GGCTTNNAN 1109

CLONA 43

FORWARD

TTCNTCCTNCAGGTCNGACTCTAGAGGATCAGTTTTCTTACATTAAATCAACCTTCCACAAAAGAAATAAACCCAGCTCAATAATGATATATTAATATTT 100
 TTGTACATAGTTAGATTTTACTGCTAAAGTTTTGTTTATGATTTTGCATGTATGCTAATGAATGAAATGACCTCTAATTTTTCTTTCTTGTGCTACC 200
 CTGTGCAAAATATGCTAGTGTGCTAAGTCAGGAATATGTCTCCTTATCTATACTCCAGAATAGTTTAAAGTTGGAAATATTTTTTGTCTTAATGTTT 300
 GATAAATCTTCTGTAATCCAAAAAGAAAAAGGGACTTCCCCCAGCAATTGTATAATCATCACTGCTCACACACTTAGCTACATGCTGCAATTAC 400

TAGTTCTCCAGCACTCATCCATCACCTAGATGACTGCAGGGGAAGGTAAGAACTGTACTGACCCACAGGCCAAGAGTTATGCCCTCACTGCTTGCCA 500
 CCTGCACTGCTCTCAGACAGAGCACAATACACCTGCAGGGTCCCACTTCGAGGCCTGCTTTTCCAGGGAGTGTGCCTGGCTGGTTCTAGAAAGCAGGCCCTCGAA 600
 TGAGGTGAGGTGTCAAGCTAATGCTTTATGAGGAGGCTCAACCTGGAGAGTAAGAGTGAGGGGCAGTGGGAGGAAAACACTCAAGACACACAACCAAGT 700
 TGCCCATGCTTTTGAGGGAACCTGATCCCNCGNACCCGAGCTCGAATNCGTAATCANGGGCATAGCTGGNTCCTGTGTGGAAATTTGTATCCGCTANG 800
 NNNNAAACCNNGNNGNNNNNGNNNNNNAGNCGNCNTNNTNCCNNTCNGNNGTNGNCGNNGNNNNCTNNCCGCCNNTNANGGNNNNNNNCGNTNN 900
 CTNNCCGNAGNNNCCNNNNNGCNCCTCNGG 934

REVERSE

CGAGCCGGTACCCGGGGACAGGGGTTTCTCAAAGCCATGGGAACCTTGGTTGTGTCTTGTAGTGTTCCTCCCACTGCCCTCACTCTTACTCTCCA 100
 GGGTTGAGCCTCCTCATAAAGCATTAGCTGTACACCTCACCTCAGGCTCTCTTTCCAGGGAGTGTGCCTGGCTGGTTCTAGAAAGCAGGCCCTCGAA 200
 GTGGGACCTGCAGGTGTATTGTGCTCTGTCTGAGAGCAGTGCAGGGTGGCAAGCAGTGAGGGCATAACTCTTGGCCTGTGGGTCACTACAGTTTCTTAC 300
 CTTCCCTGCAGTCATCTAGGGTGTAGTGTGCTGGGAGAACTAGTAAGTGCAGCATGTAGCTAAGTGTGTGAGCAGTGTATATACAAATTCGTG 400
 GGGGGAAGTCCCTTTTTTCTTTTTTNGGATTACAGGAAGATTTTATCAAACATTAAGCAAAAAAATAATCCAACTTAACTATTCTGGAGTATAGAT 500
 AAGGAGCAATATCTGACTTACGACACTAGCATAAATTTTGACAAGGTAGCACAAGAAAGGAAAAATAGAGGTCAATTTTATTATAGCATACATGC 600
 AAAATCATAAACAAAACCTTAGCAGTCAAAATCTAATATGTACAANAATATTAATATATCATTATTGGAGCNGGNTTTATTTTCTTTTGTGGGAAGG 700
 NTGGATTTAATTGAAGGAAAACTGNATCCNTCTNGGAGTNGACCTGCAGGNCATGCAANGCTTTGGCAACTTGCCGCTGTGNTTACCAACNNTCG 800
 GGGCGCTGGGNTTCCATTAAANACGNCNGCTCNGTGNNCTTAAANGNCCNATNTNTTACCCANCTAANTGNAGNNCCANGNNNNAGNCAACGNT 900
 NCCTNTGGCCTATGNCACATAGATTGANTNNANGTNCANATGNACNNANTTGACGTNG 959

CLONA 44

FORWARD

TTCTCCTNCAGGTCGCTCTAGAGGATCAGAGCNGAAATAAATGAGACTAAAAAGAGTAGGGAAAAAATAATCAGCCCCCTCCCCAGAAGACCAAGTG 100
 CAAACCTGCCAACACCATCTNTGGACACTCATGTTTGTGGGACTCCGCTCTGAGGGGGCAGGTGACCTTTCATAAGCACACTACTATCCACTTTG 200
 TTAACATGCTTCTCCCTACTGGGAACCAACAGTCCCCAAAAAGGGCAAGAGAACCTNTGCAGACAACCTGGACTGGAGGAAGAAGACACCAAGACT 300
 CCACAGAGCATGTGTGGCACACATGGGAGACTCTGTGAAGTGTGAGGCCCTAGGGAAACAGGGGACACTACAGGGCATTACTGGACCTATTCTTCATAAGG 400
 CTNCTACCGCTAAGACCAAGAGAAGCNGCTGGCTTTCTAACACACACACACAAAAACAGAGCAACAAAANGNAGGGGNCACAGANATAGATCCCCG 500
 GGTNCCGGGCTCGAATTNGTAATCATGGGTCTAGGTGTGCTTGTGTGAAATTGNTNNTCCGGGTNNGNCTCNNNNNGCNCNNNGGGGNNCGGNNNTGG 600
 NNNCNGNCGNNGGNTGTGCGNCCGNNNNCTCNCAGNNGNNGNNGCNCNGCNGCTNTCTNNGGNTGCGNNGNCGNGGGGNCNNGAGGGGTGCC 700
 CGGCCGNGTCCGNNNGNCCANGGCGNGGGGNGGCCGAGTNGGNNGCCCGGNACTACGNTGGNGGGGNGCGNNGGGGNCGGGANTTGNNGNC 800
 GNCAACGNTNCNAGCGGGGCTNCTGNGGNGGNANNNNGCGCTGNNNNNTTNGGNNCGCNGCNGTNGGNGGTTNGCCNNGGNCNNGGNGGNN 900
 CNGCGGNGCGGGTGCNGGNCNTCGNGGCGCCNCGNNNGAGNCCNGTNGCGGCTNATNNNNNTNTNCGGATCGNGGNGNGCGNCAACGNNNNANC 1000
 NGCNGG 1006

RRVERSE

CTCGGACCCGGGATCTATTCTGNNTNTCTNCTTTTGGNTAGCNANTAGTATNTGAGTNNNGTNTTGTGAGGGAAGCCAGCATGCTTCTCTTGGTC 100
 TTAGCGGTAGTAGCTTATNAAGATATGTCCAGTAATGCCCTAGTGTCCCTGTTCCTAGGGCCTGACACTTCACAGAGTCTCCCATGTGTGCCAC 200
 ACATGCTCTGTGGAGTCTNNGGTCTTNTTCTNCACTCCAGNNGTCTGCAGAGGTCTCTTTGCCCTNTTTGGGACTGTNTGGGTNNCCAGTNGGGGCG 300
 GAANCATGNTTAAACAAAAGTTGGNNTACGTNGTGTNGCTTATGAAANGGTNACCTGCCCCATNAGAGNNGGAGGTNGCCACAAAACATCGAGTGCCTN 400
 AGANGATGNTNTGTAGNCAGGGGTANTGCACTGATNTTNTTGGGGGNGGGGCGNNGGNTNATTGNTTNTNCCNNNNNCNTTNGTTAGTNNNCNT 500
 NTNNNAGCGCATGNGCAGGACNCTGNNNACCANGCCTNNNNNGNCTACGANAGCTTGGCNCNTGNCGAGGCTNGAATTAAGCNGGGNAANGGNGGAT 600
 NAAGNGNANNCNNANNTGNTGGNNNTGNGGGNNAANGGCGATGCCNANGGGTNGGCGNTNNGGNGTNGAGGTTANGNCANNCTNTGNGCTATCNG 700
 CGGNATGACNTNNAAGACGTGGAGNNGTNTGNGNAGGATGGGNGNAGGTTTNNNGNTNCTTCNCNCGNTNCGNGAAAANTGNGNTGNTANNTGNAN 800
 NACNNACATAATNNNTNGGAGNNTNTNGGATNNGNTANGTGNNANNCNANNNNTNCGNATNNNNATGANNGNCNNAANNTAACGGATGTGTTGC 900
 CTNGTGCNNTANGNNGTTNCNTNNTNACGNTCGCNGGCTATNAGCTNANNNGNAGANNTNCGNAGCAGGANGNCCNTNANGTNTNAGANTNN 1000
 ATTTGNTTCCAGAAATCANGNAGNNTGANGCNGGATGNTCGGANGNATGNNNGACNAGNAGTANGC 1069

CLONA 45

FORWARD

CTTGCTGCCTGCAGGTGCACTCTAGAGGATCGAGTCCCGCATCGGGCTCCCTGCTCAGCAGGGAGTCTGCTCCTCCCTCTGACTCCCCCTCTCGTGCTC 100
 TCTCTATCTATCTCATTCTCTCTCAAATAAATAAATAAATCTTTAAAAAATATATATAGACTGGGGAGCAATTGAGATTCTTAAATTTATCAAAA 200
 AGGTTTTTTTTTAATTGAAAAACACTGATTTAGAGAAGACCCCTTAGCTTTTCAATTAATTTTGTATTATTTGGCTGGGAATATACAGGTCTCTGTAATGAGTC 300
 TGCATAAGTAGCCTAAAATCACCTTTCTGAAGTTGTGCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 400
 NNN 500
 NNN 600
 NCNN 700
 NNN 800
 NNNNANNN 900
 NNNNNNNANTNNNNNNNNNNNNNC 924

CLONA 46

FORWARD

TTCTNCCTCAGGTCNGCNTCTAGAGGATCAGGAGAATGCCTCCAGAGGAGACTGAGCCTCAGGCAGGGAAGGGCTTGCAATANGAGAGCGTCACCATT 100
 AGGAAATGTTAGGTATAGAGGGGGCTAGAGCATGGGTTTCAAAGAAGGGTCAGTGGGGAGGAAGCTAGGAGATAGACAGGGGGCATATTTCAAAGGCTG 200
 TCTGTGTTCTTATGGCATTTGGAAGAAAAAGGGAGTATTGACAGATTGTGTGTGTGGGGTGTGTGTGTGTCTAAAATGAGGAATAGTGATAGATT 300
 AATGTTTTAGAAAGTTCACTCCAATGGTAGAATGAAGGATAAAGTGGAGCAAAGTGAACTTGAAGCAGAAAGATTAATCTGGAAGCTGAGCTAATTTA 400
 GTAATCCAGGAACCCATCATGAAGACCCACACTGAGGAAGTAGTGGAGGGACTGGAGATAAGACAACAGGAGAGGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAA 500

[illegible]

CLONA 47

FORWARD

[illegible]

REVERSE

TCGAGCTCGGACCCGGGGATCAAACTAAACTATGGGTCCAGGGTACGTTTCGAGATTAAAGAACTTTTAGTATTAGGCTGTACACTATTCCAATTTGAA	100
TTTAGGAAAATCTGTTGGGGTGGACAAAGGCAATCCTAAATTAGGCCAATTATAACTTTGTGGCCCAACAAAAGACCATGGCTCCAGAAAATTTTAAAAA	200
ATAACCATGAGAGACTATGGACTCTGAGAAACAAACTGAGGGTTTATAGGGGGAAGAGGATGTGGTGATGGGTTTGCCCAAGTGATGGGAATTAAGGAGGG	300
CACTGTATTGCATTGGAGCACGTGAGTGTTATATGCAACAACATGAATCATGGGAACACTACATACAAAACATATGATGTACTGTATGGTGACAAACACA	400
CATAATAATAATAATAAATAAACAATTAATAAAGCAATTAAGCANNATAAGCCGTGAGCNCACNACACACACACNACACACACAGTACACANNTTGAG	500
GGAGAGGGCCGANTNGAGGNCCTACCTTATGCAAGNATCCATTACNGCANGCCNCTGTGTATTCCCNCGNCNAGNNTNACNCAAGNTGTNTTTGNAGGGNN	600
GGCGGGNNTNTCTTANAGTTCAGGNGTCTNNTCAATTAANANNAANCNTTNGNTGGTNNNNNTNNANANGNNCNCNGTTTGCGCCCCGCGTGGNNAT	700
ATTNTNNTTNTGTNTNANCGGGTCTNCTNNTTGNCTCTNCGGNNCAGGACGNGTANTGGCGNANTNGCTTNGANGCGCCCCCTANTATGGNTGCG	800
CCNTCNCGNAGCGCGCGCTCNNNCNACTNTNCTTGTNNNGGCGGCNGNCCNNTCNCNCGCNTGGGTCCGCGNATTAGGCNNTNGNNTNGATCTCG	900
NGGTGATAGGCGCGGTTGAGNNNNTANGGGGGTGTGACTCGACANNNCGGTNCNCCGGNCGNANCTGCTGTCNCTCTGGTACGCGNGTCCNCTCNGTNC	1000
NGCTGCTGGTCCGTTTCCG 1021	

CLONA 48

FORWARD

TGTTCTCTNCAGGTCGACTCTAGAGGATCAAAGGTAGACAAGAAGTTGTGTTACCTTACTTGAACATCCAAACAAGCTCTGAAGGTCATTGTAGGCAAA	100
GGTAGGAGAGTCAAGCTTCTCAGACTCCAGACACATCCAATGAGGGCTGATTTGGCAGTCTGCCTTTATTTAAAAAAGGGTCCACTGGAGAGATAAG	200
AGTGTTCCTACAAGGCAGTATAGGCAGGTGTTTCAATGAACAGGGATGAATTGTGGCACTTGCACACAGATAAGATAAATAAAAAATAGACTGGGA	300
ATGACCAATTGGATTAAACAACGTGGAGTTATTGATGACCTCTCTCTCTCTCTCACACACACACACACACACACAGCAACTGCTCCCCA	400
CCCTCCTCTCCCCATAGTGGAGCTGANAGGAGAGACAGAATGAGACACANACACTGTCAAGANTTTTTTGTCAATAGGNGCAGACAATGGGGTGGNC	500
CTAAAGACTGTGCGTAAGANGAAAAGNACAGTATTTGTGCTTATNAGANAGNAGAAATTAATGTAATTNTGTCATGCTTGNTCTGCATGATCCCCGGGTA	600
CCCGAGCTCCGAATTCGTAATCANGGACATAGCTGTTCTGNGAGAAATTGTTATCCGCTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	700
NGNCNNNCNTNNNNNNNNNGCGCNGC	800
TAANGGNGGGNNNANGCCACGTGTGGCCNCCNANNNGACGNNCGNNGNNCGNNNNNANGCNGGNGNNNNCCGNTANGCNGCNGCNGCNGCNGC	900
GGACGACGCGGNNNGGNNNNNGGNNNNNGGCGGTNGNTNGGCGGACNGGNNCNGGCGCGCGCG 965	

REVERSE

[illegible]