

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Producción de ARNdh de la región específica femenina del gen *doublesex* como blanco para eliminar hembras de *Anopheles albimanus*, principal vector de la malaria en Centroamérica

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Claudia Cecilia Alfaro Contreras  
para optar al grado académico de  
Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2019



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




Producción de ARNdh de la región específica femenina del gen *doublesex* como blanco para eliminar hembras de *Anopheles albimanus*, principal vector de la malaria en Centroamérica

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Claudia Cecilia Alfaro Contreras  
para optar al grado académico de  
Licenciado en Bioquímica y Microbiología


Guatemala

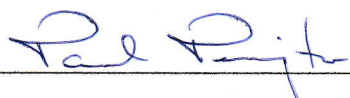
2019


Vo. Bo.:

(f)   
Licda. Claudia Paiz

Tribunal examinador:

(f)   
Licda. Claudia Paiz

(f)   
PhD. Pamela Pennington

(f)   
PhD. Dalia Lau

Fecha de aprobación: Guatemala 4 de diciembre de 2019

## PREFACIO

Agradezco a todas las personas e instituciones que estuvieron involucradas en la realización de este trabajo de graduación. En especial, quiero mencionar a:

A mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria. Aprecio mucho cada consejo y toda su paciencia que tuvieron hacia mí durante el desarrollo de mi tesis. Gracias por llenarme de alegría cada vez que lo necesitaba y por hacerme ver lo mucho he logrado desde que inicié mi camino en la universidad. Sin ustedes, no sería la persona de la que estoy orgullosa de ser. Agradezco de todo corazón a mi hermana: tu apoyo diario y tus palabras de ánimo siempre me ayudan a enfrentar lo que sea.

A la Licenciada Claudia Paiz, asesora de este trabajo de investigación, por todo su apoyo en la realización de este proyecto. Gracias por toda su ayuda en los momentos en que los experimentos se tornaron complicados y cada vez que aprendía un procedimiento nuevo. Agradezco su constante asesoramiento y todos sus consejos que permitieron el éxito de este proyecto y mi crecimiento personal. Agradezco que siempre estuviese pendiente de cualquier inconveniente que necesitara y todas las enseñanzas que dejó en mí.

A la doctora Pamela Pennington, por su asesoramiento constante en el progreso del proyecto. Gracias por siempre estar pendiente del curso de los experimentos y su ayuda en la toma de decisiones importantes. Agradezco cada uno de los consejos brindados para este proyecto y para mi vida profesional. Gracias por animarme cuando lo necesitaba y retarme a dar siempre lo mejor de mí.

A MSc. Stefany Argueta y la Licenciada Gabriela Lara, por su invaluable apoyo en transcurso de esta investigación. Gracias por cada enseñanza que me dejaron, por su compañía diaria y ayuda en cualquier aspecto que necesitara. Agradezco cada risa, cada lágrima y cada historia que compartí con ustedes en el laboratorio. Gracias por todos los consejos que ambas me dieron y su apoyo honesto en guiarme a ser una mejor persona y profesional. Aprecio muchísimo su espíritu de ayuda y vocación de enseñanza que siempre logró hacerme disfrutar aún más toda esta experiencia.

A los financistas, por haber brindado los recursos necesarios para que este proyecto se llevara a cabo. Agradezco al Centro de Estudios en Biotecnología (CEB), Centro de Estudios en Salud (CES) y al Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, por permitirme llevar a cabo esta investigación en sus instalaciones y utilizar cualquier equipo. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto.

A la Universidad del Valle de Guatemala, por haberme formado como una profesional integral y haberme dado todas las bases necesarias para realizar este trabajo. Gracias por todas las herramientas que se me proveyeron en mis años de estudio. Agradezco el conocimiento que se me transmitió y las múltiples oportunidades que se me dieron a lo largo de mi carrera.

# ÍNDICE

LISTADO DE CUADROS .....	ix
LISTADO DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xiv
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS.....	3
A. Objetivo general.....	3
B. Objetivos específicos .....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO.....	6
A. Malaria .....	6
1. Descripción de la enfermedad.....	6
2. <i>Plasmodium</i> : parásito de la malaria .....	6
3. Incidencia y distribución.....	8
4. Tratamientos .....	10
5. Vector de la malaria y transmisión.....	11
B. <i>Anopheles albimanus</i> .....	11
1. Generalidades.....	11
2. Ciclo de vida .....	12
3. Distribución .....	14
4. Diferenciación sexual.....	14
C. Gen <i>doublesex</i> .....	17
1. Estructura .....	17
2. Función .....	19
3. Factores que interactúan con el gen <i>doublesex</i> .....	20
4. Proteínas codificantes .....	20
5. Relevancia para el control vectorial.....	21
D. Métodos de control vectorial.....	21
1. Insecticidas.....	21
2. Técnicas moleculares .....	22
E. Evaluación de la expresión génica .....	25

1.	Extracción de ARN .....	25
2.	Síntesis de ADN complementario .....	26
3.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa .....	26
V.	ANTECEDENTES .....	28
A.	Expresión de isoformas específicas de macho en pupas y adultos hembra.....	28
B.	Cebadores de amplificación de 154 y 782 pb del gen <i>dsx</i> : .....	28
C.	Evidencia de expresión de isoformas específicas de hembra en <i>A. albimanus</i> .....	28
D.	Cebadores diseñados para formas específicas de hembra en <i>A. albimanus</i> .....	29
E.	Silenciamiento efectivo de isoforma femenina de <i>dsx</i> para eliminación de hembras en <i>Anopheles gambiae</i> .....	30
F.	Eliminación de hembras de la población de <i>Aedes aegypti</i> mediante el silenciamiento de <i>dsx</i> .....	30
G.	Vector de clonación pGEM-T Easy .....	31
VI.	METODOLOGÍA .....	32
A.	Sitio de estudio.....	32
B.	Sujetos de estudio.....	32
C.	Diseño, enfoque y tipo de investigación .....	32
D.	Tipo y tamaño de muestra.....	32
E.	Criterios de inclusión y exclusión .....	32
F.	Variables .....	32
G.	Hipótesis .....	34
H.	Metodología .....	35
1.	Identificación de un fragmento específico de hembra en las isoformas femeninas del gen <i>doublesex</i> . .....	35
2.	Clonación de la región compartida de las isoformas femeninas del gen <i>doublesex</i> en bacterias <i>E. coli</i> XL1 Blue y HT115 (DE3) .....	36
3.	Producción de ARNdh de una región femenina específica del gen <i>doublesex</i> en bacterias <i>E. coli</i> HT 115 (DE3) .....	39
4.	Diseño de oligonucleótidos para la cuantificación de las isoformas femeninas del gen <i>doublesex</i> en <i>A. albimanus</i> .....	40
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
A.	Amplificación de la región compartida de las isoformas femeninas del gen <i>doublesex</i> 41	
B.	Clonar un fragmento de la región compartida de las isoformas femeninas del gen <i>dsx</i> en bacterias <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	45



C. Analizar las secuencias nucleotídicas de los fragmentos del gen <i>dsx</i> clonados en los plásmidos pGEMT.....	47
D. Clonación del fragmento específico femenino del gen <i>doublesex</i> en <i>E. coli</i> HT115 (DE3).....	49
E. Inducción y extracción de ARNdh de un fragmento específico de hembras del gen <i>doublesex</i> .....	56
F. Diseño de cebadores específicos para cada una de las isoformas femeninas del gen <i>doublesex</i> .....	63
VIII. CONCLUSIONES .....	71
IX. RECOMENDACIONES .....	72
X. BIBLIOGRAFÍA.....	73
XI. ANEXOS.....	79

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Síntomas y distribución para cada especie de <i>Plasmodium</i> .....	7
Cuadro 2. Secuencias de cebadores elaborados por Paiz (2018) para la amplificación de los fragmentos de interés del gen <i>dsx</i> .....	28
Cuadro 3. Secuencias de cebadores elaborados por Argueta y Lara (2019) para la amplificación de las isoformas femeninas del gen <i>dsx</i> .....	29
Cuadro 4. Variables involucradas en el experimento.....	33
Cuadro 5. Concentraciones de ADN plasmidial para los clones con fragmentos de <i>dsx</i> .....	47
Cuadro 6. Concentraciones de ADN plasmidial con inserto de <i>dsx</i> y promotor T7.....	52
Cuadro 7. Concentraciones promedio de ARNdh obtenidas en la primera réplica.....	58
Cuadro 8. Concentraciones promedio de ARNdh obtenidas en la segunda réplica.....	60
Cuadro 9. Cebadores diseñados para las isoformas femeninas del gen <i>dsx</i> .....	63
Cuadro 10. ADN plasmidial de clones con inserto del gen <i>dsx</i> entre el exón 4 y 5.....	68

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	8
Figura 2. Distribución de malaria en el mundo.....	9
Figura 3. Incidencia de la malaria en Guatemala durante el 2017 y 2018.....	10
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Anopheles</i> sp.....	13
Figura 5. Distribución de especies de <i>Anopheles</i> en el mundo.....	14
Figura 6. Cascada para la determinación sexual de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	16
Figura 7. Comparación de la cascada de diferenciación sexual en <i>D. melanogaster</i> , <i>Aedes aegypti</i> y <i>Anopheles gambiae</i> .....	17
Figura 8. Estructura del gen <i>dsx</i> en <i>Anopheles gambiae</i> .....	18
Figura 9. Estructura de <i>dsx</i> en <i>D. melanogaster</i> y en <i>A. gambiae</i> .....	19
Figura 10. Mecanismo de acción de ARNi.....	23
Figura 11. Localización de los cebadores de <i>dsx</i> diseñados por Argueta y Lara (2019) en las isoformas específicas de sexo .....	30
Figura 12. Mapa del vector pGEM-T Easy.....	31
Figura 13. Diagrama de la metodología.....	35
Figura 14. Expresión de fragmentos de las isoformas femeninas de <i>dsx</i> en ambos sexos.....	41
Figura 15. Amplificación de fragmentos específicos de <i>dsx</i> con ADNc de adultos de cinco días.....	44
Figura 16. Transformación exitosa de <i>E. coli</i> XL1 Blue en placas de LB con tetraciclina 12.5µg/mL, carbenicilina 100µg/mL, IPTG 0.4 mM y X-gal luego de la ligación del producto de amplificación del gen <i>dsx</i> .....	45
Figura 17. Análisis de la secuencia de fragmentos de <i>dsx</i> .....	46
Figura 18. Adición exitosa del promotor T7 a fragmentos del gen <i>dsx</i> .....	50
Figura 19. Tamizaje de clones con fragmentos de <i>dsx</i> y promotor T7.....	51

Figura 20. Presencia de un único inserto en los plásmidos con fragmento de <i>dsx</i> y promotor T7.....	52
Figura 21. Alineamiento entre clones 8A y 10A con la secuencia original de <i>dsx</i> .....	53
Figura 22. Alineamiento entre clones 9A y 6A con la secuencia original de <i>dsx</i> .....	54
Figura 23. Crecimiento de <i>E. coli</i> HT115(DE3) en placas de LB con tetraciclina 12.5µg/ml y carbenicilina 100µg/mL.....	55
Figura 24. Presencia de insertos del gen <i>dsx</i> en clones de <i>E. coli</i> HT115 (DE3).....	56
Figura 25. Presencia del inserto en la colonia utilizada en el precultivo .....	57
Figura 26. Presencia de bandas de ARNdh de <i>dsx</i> extraído de la primera réplica .....	59
Figura 27. Presencia de bandas de ARNdh de <i>dsx</i> extraído de la segunda réplica .....	61
Figura 28. Posición de los cebadores diseñados para las isoformas en la secuencia de <i>dsx</i> .....	64
Figura 29. Amplificación de secuencias entre exón 4 y exón 5 de <i>dsx</i> .....	66
Figura 30. Tamizaje de clones con insertos de los exones 4 y 5 de <i>dsx</i> .....	67
Figura 31. Alineamiento de fragmento entre exón 4 y 5 de <i>dsx</i> con los clones tamizados.....	69
Figura 32. Gel de integridad de ARNdh con menor intensidad de UV .....	173
Figura 33. Gel de integridad de ARNdh con mayor intensidad de UV .....	173

## LISTADO DE ABREVIATURAS

*A.aegypti*: *Aedes aegypti*

*A.albimanus*: *Anopheles albimanus*

*A.gambiae*: *Anopheles gambiae*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AH: adulto hembra

AM: adulto macho

ARN: ácido ribonucleico

ARNdh: ácido ribonucleico de doble hebra

ARNi: ácido ribonucleico interferente

Carb: Carbenicilina

CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades

*Dsx*: *doublesex*

*E. coli* HT 115 (DE3): *Escherichia coli* cepa HT115 (DE3)

*E. coli* XL1 Blue : *Escherichia coli* cepa XL1 Blue

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

LB: medio de cultivo Lauria Bertani.

nm: nanómetros

OD600: densidad óptica, por sus siglas en inglés, medida a 600 nm

OD1: dominio de oligomerización 1

OD2: dominio de oligomerización 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PH: pupa hembra

PM: pupa macho

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real

RPM: revoluciones por minuto

RT-PCR: reacción en cadena polimerasa retrotranscrita

SDS: Dodecil sulfato sódico

SIT: técnica del insecto estéril

*Sxl: sex lethal*

Tet: tetraciclina

*Tra: Transformer*

*Tra2: Transformer 2*

UV: ultravioleta

## RESUMEN

La malaria es una enfermedad febril aguda ocasionada por el parásito *Plasmodium* y transmitida por picaduras de mosquitos del género *Anopheles*. Una de las principales formas de abordar el problema es mediante el control del vector. Es importante buscar nuevas estrategias de control, como lo es la técnica del insecto estéril (SIT, por sus siglas en inglés). La técnica del insecto estéril consiste en separar ambos sexos de los insectos, esterilizar a los machos y luego liberarlos en focos de transmisión. Como resultado, se disminuye la población general del vector en el área. Sin embargo, el primer paso de la técnica es un paso limitante: no hay una forma eficiente de separar a las hembras de los machos. Una estrategia que se ha empleado en otros insectos para superar esta barrera es el silenciamiento de genes de determinación sexual que tengan una forma específica femenina, como lo es el gen *doublesex* (*dsx*). En otros mosquitos se ha demostrado que existen dos isoformas específicas de hembra para dicho gen. Por ello, el presente estudio buscaba apoyar la producción de machos de *A. albimanus* estériles identificando un fragmento específico femenino del gen *dsx*, que pueda ser silenciado y empleado para eliminar a las hembras mediante la técnica de ARN de interferencia (ARNi). Para realizarla, se emplea ARN de doble hebra (ARNdh) específica del gen de interés. Se clonó y produjo ARNdh específico para una región compartida entre las dos isoformas femeninas del gen *dsx* en *Anopheles albimanus*. Fue posible identificar una región específica de hembras de 656 pb dentro de la región común de las isoformas femeninas del gen, clonarla en bacterias *Escherichia coli* XL1 Blue y verificar que la secuencia del fragmento específico correspondiera a *dsx*. Posteriormente, se logró generar una bacteria *Escherichia coli* HT115 (DE3) con el inserto de *dsx*, y se verificó con éxito que fuese capaz de producir ARNdh del fragmento de 656pb para silenciar el gen. Se obtuvo una concentración de ARNdh menor a 3 ng/μL. Por otro lado, se diseñaron cebadores para PCR cuantitativa específicos para cada una de las isoformas femeninas del gen *dsx*. De esta forma, se podría realizar una cuantificación de la expresión de cada isoforma antes y después de silenciar el gen. En la siguiente fase, se evaluará el potencial del silenciamiento de *dsx* en *A. albimanus* para la eliminación de hembras en una población.

# I. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades tropicales con más relevancia en el mundo, es la malaria o paludismo. Su cuadro sintomatológico se caracteriza por la presencia de fiebres crónicas y en algunos casos, puede llevar a la muerte. La infección de malaria es ocasionada por el parásito *Plasmodium*, transmitido por mosquitos del género *Anopheles* que actúan como vector. Esta enfermedad afecta alrededor de 220 millones de personas al año a nivel mundial. Es característica de los trópicos y tiene una incidencia mayor en los países del tercer mundo.

En Guatemala, se tiene como objetivo alcanzar la eliminación de la malaria para el 2025, utilizando como primordial estrategia la prevención de las picaduras de mosquitos mediante el rociamiento con insecticidas y el uso de mosquitos tratados con los mismos. No obstante, ha comenzado a emerger una preocupante resistencia a diversos insecticidas, por lo que se han buscado otras estrategias para controlar la población de mosquitos. Una estrategia ampliamente utilizada es la técnica del insecto estéril (SIT, por sus siglas en inglés). Esta técnica busca la supresión de mosquitos silvestres mediante la liberación de machos estériles que fueron irradiados; estos, al ser liberados al medio ambiente, copularán con hembras silvestres y no generarán descendencia. Uno de los inconvenientes que han surgido con esta técnica es el daño somático causado por la irradiación, además de tener un rendimiento menor al esperado y la duración de su vida más corta. Así también, dentro del proceso SIT es necesario llevar a cabo una eficiente separación de machos y hembras, ya que la liberación de hembras estériles aún puede contribuir a la transmisión de malaria. Por ello, se han explorado métodos moleculares para la esterilización de los mosquitos y el control de su población.

Como se mencionó anteriormente, es importante tener en cuenta solamente deben liberarse machos estériles. Aún si las hembras no son capaces de generar descendencia, sí pueden actuar como vectores, siendo imperativo evitar su liberación. Esto genera la necesidad de desarrollar métodos de sexado eficientes. Los métodos moleculares como el ARN de interferencia (ARNi) y CrisprCas9 cuentan con el potencial para desarrollar una técnica de sexado sencilla y rápida si actúan con genes que se asocien a uno de los sexos. Este es el caso del gen *doublesex* (*dsx*), involucrado en la cascada de determinación sexual. Estudios previos han demostrado que existen isoformas características para cada sexo: dos de hembras y una para machos. Esto lo convierte en una diana ideal para el desarrollo de técnicas moleculares para el sexado de mosquitos. Sin embargo, en el mosquito *Anopheles albimanus* dichas isoformas no se encuentran aún caracterizadas por lo que es de vital importancia describirlas. De esta manera será posible enfocar las moléculas de silenciamiento a la forma específica de hembra del gen, sin generar algún efecto secundario en machos.

Con este trabajo de investigación se busca apoyar la producción de machos de *A. albimanus* estériles identificando un fragmento específico femenino del gen *dsx*, que pueda ser silenciado y empleado para eliminar a las hembras. Se pretende clonar y producir ARNdh específico para una región compartida entre las dos isoformas femeninas del gen *dsx* en *Anopheles albimanus*. Se diseñarán los oligonucleótidos para



demostrar el silenciamiento génico mediante ARNdh utilizando la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR).

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Desarrollar estrategias moleculares para el sexado de *Anopheles albimanus*, vector de la malaria en Latinoamérica y el Caribe.

### B. Objetivos específicos

1. Identificar una región de ADN copia del gen *dsx* específica para hembras mediante su amplificación por transcripción reversa, seguida de reacción en cadena de la polimerasa.
2. Clonar un fragmento de la región compartida de las isoformas femeninas del gen *dsx* en bacterias *E. coli* XL1-Blue.
3. Analizar las secuencias nucleotídicas de los fragmentos del gen *dsx* clonados en los plásmidos pGEMT.
4. Clonar y producir ARNdh de la isoforma femenina de *dsx* en bacterias *E. coli* HT115 (DE3).
5. Diseñar oligonucleótidos para la cuantificación de las isoformas femeninas de *dsx* en *A. albimanus*.

### III. JUSTIFICACIÓN

La malaria es una enfermedad que afecta a la población a nivel mundial, principalmente aquella que se sitúa en los trópicos. Es ocasionada por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmite con la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de fiebre aguda y, en ocasiones, puede llevar a la muerte (Nadjm & Chb, 2012).

La malaria se presenta principalmente en países pertenecientes al tercer mundo, como lo es Latinoamérica y África. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2018 se reportaron alrededor 435 mil muertes en todo el mundo. Los números son alarmantes ya que no se presentó ninguna disminución significativa respecto al 2016 y 2017 (OMS, 2018). Si bien ha ocurrido una reducción en los casos reportados, se evidencia que aún no se han logrado avances importantes para el manejo de esta enfermedad. En Guatemala, se reportaron 1449 en 2017; no obstante, para las primeras 25 semanas del 2019, ya se habían reportado 963 casos en toda la población (Sagastume, 2018). La malaria, es considerada una enfermedad desatendida y es urgente encontrar métodos de prevención y control. De hecho, dado que representa un problema de salud pública importante, se tiene como un objetivo de desarrollo sostenible la eliminación de esta enfermedad a nivel mundial para el año 2030 (OMS, 2017).

Una de las estrategias utilizadas para la reducción de la transmisión de la enfermedad es la disminución de la población de insectos que actúan como vectores por medio de la técnica del insecto estéril (SIT). Esta técnica busca la esterilización de elevados números de machos con radiación, para que luego puedan ser liberados al medio ambiente. El objetivo es que estos se apareen con hembras silvestres sin generar alguna descendencia, resultando así en la reducción de mosquitos de la población (Lees, Gilles, Hendrichs, Vreysen, & Bourtzis, 2015). Sin embargo, esta técnica repercute de manera directa en los machos, puesto que se disminuye tanto su aptitud para atraer hembras, como la duración de su vida (Oliva *et al.*, 2012). Por ello, actualmente se están desarrollando técnicas moleculares que puedan tener un impacto en la población de mosquitos. Es importante tener en cuenta que estos métodos no deben liberar hembras, ya que aunque sean estériles, son capaces de transmitir al *Plasmodium*. De aquí surge la necesidad de sexar los mosquitos de manera eficaz y separar así a las hembras de los machos. Las tecnologías moleculares de CrisprCas9 y ARN de interferencia (ARNi), cuentan con el potencial para desarrollar un método de sexado sencillo.

La técnica de ARNi cuenta con la capacidad de silenciar un gen específico, como lo son aquellos involucrados en el proceso de la determinación sexual. El último gen de esta cascada es *doublesex (dsx)* el cual codifica para una proteína con variaciones según el sexo del mosquito. Por ello, ha sido utilizado como diana para su silenciamiento en otros mosquitos. De este procedimiento se han obtenido resultados prometedores, como la mortalidad de hembras de la población (Whyard *et al.*, 2015) y la reducción en el número de hembras viables (Taracena *et al.*, 2019). *Anopheles albimanus* es un mosquito poco estudiado, en el cual las isoformas del gen *dsx* no se encuentran aún caracterizadas por lo que es de vital importancia

describirlas. De esta manera será posible enfocar las moléculas de silenciamiento a la forma específica de hembra del gen, sin generar algún efecto secundario en machos.

Con este estudio se busca apoyar la producción de machos de *A. albimanus* estériles eliminando el desarrollo de las hembras mediante el silenciamiento del gen *dsx* femenino. Se pretende amplificar, clonar y producir ARNdH específico para una región compartida entre las dos isoformas femeninas del gen *dsx* en *Anopheles albimanus*. Se diseñarán oligonucleótidos para amplificar selectivamente las isoformas femeninas del gen *dsx* mediante PCR cuantitativo (qPCR). Esto ayudará a demostrar el silenciamiento génico posterior a la alimentación de *A. albimanus* con ARNdH.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. Malaria

#### 1. Descripción de la enfermedad

La malaria, también llamada paludismo, supone una infección grave ocasionada por parásitos del género *Plasmodium*. Este microorganismo logra llegar al torrente sanguíneo de la persona mediante la picadura de un mosquito hembra. De este punto, los esporozoítos plasmódicos viajan desde el tejido subcutáneo de la piel hacia los vasos capilares y linfáticos locales, a manera de llegar al tejido hepático y posteriormente colonizar los eritrocitos (Nadjm & Chb, 2012). Una vez han terminado de desarrollarse, liberan toxinas y los síntomas de la enfermedad se evidencian. El tiempo en que estos tardan en aparecer depende directamente de la especie de *Plasmodium* que se encuentre dentro del organismo (Miller, Baruch, Marsh, & Doumbo, 2002).

La característica principal de esta infección es la presencia de fiebre aguda. Entre las primeras manifestaciones de la enfermedad también se encuentra el dolor de cabeza y los vómitos de intensidad media. Si la malaria no se trata en las primeras 24 horas, esta puede avanzar a un grado severo y con frecuencia llevar a la muerte. Entre otros síntomas importantes en niños se encuentra la anemia severa, la acidosis metabólica o la malaria cerebral (OMS, 2014). Por otro lado, en adultos se presenta un involucramiento de órganos múltiples durante la infección. En países donde la enfermedad no es muy común, los síntomas se diagnostican erróneamente hacia una gripe pasajera, dejando al paciente sin un tratamiento efectivo. Adicionalmente, estas personas tendrán que tratar con los efectos secundarios de medicinas equívocas mientras la enfermedad se agrava gradualmente (Amexo, Tolhurst, Barnish, & Bates, 2004).

#### 2. *Plasmodium*: parásito de la malaria

##### a. Correlación de especie y síntomas

Existen cinco especies de este género que son capaces de ocasionar la enfermedad de malaria en humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Los primeros dos mencionados son los más comunes, siendo *P. falciparum* el más letal (OMS, 2014). Cada especie suele estar asociada a un área geográfica determinada, así como a síntomas específicos y objetivo de acción (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Síntomas y distribución para cada especie de *Plasmodium*

<b>Especie</b>	<b>Distribución</b>	<b>Detalles clínicos</b>
<i>Plasmodium falciparum</i>	Trópicos	Ocasiona la mayor cantidad de síntomas y fatalidades.
<i>Plasmodium vivax</i>	Trópicos y subtropicos con excepción de África occidental	Genera recaídas por hipnozoitos. Requiere del antígeno Duffy para entrar.
<i>Plasmodium malariae</i>	Distintas regiones en el mundo	Infecciones crónicas y síndrome nefrótico tardío.
<i>Plasmodium ovale</i>	Distintas regiones en el occidente de África y el suroccidente del Pacífico	Recaídas por presencia de hipnozoitos hepáticos.
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Malasia, Indonesia y sureste de Asia	Enfermedad severa

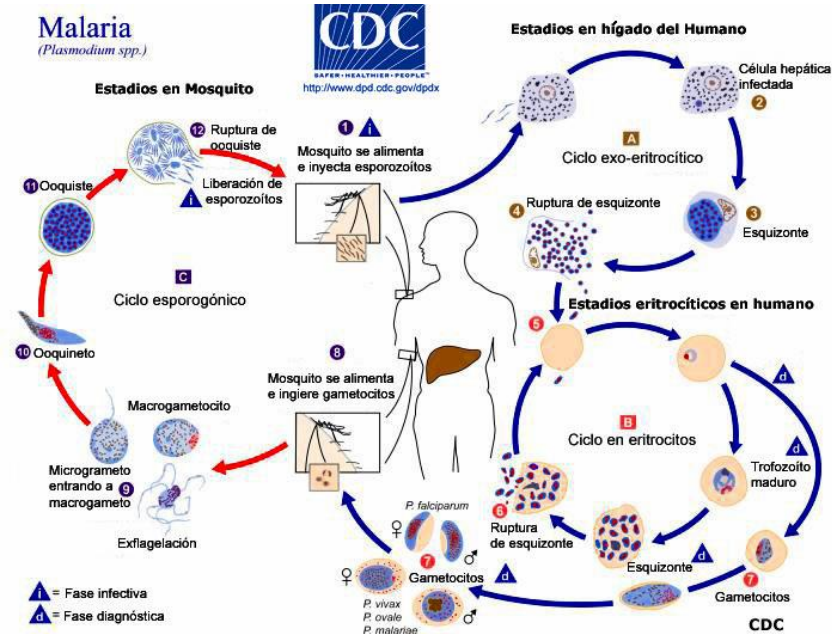
Fuente: Modificado de Nadjm & Chb (2012)

#### b. Ciclo de vida

Los mosquitos inyectan los esporozoítos parasíticos en el tejido subcutáneo y algunas veces directamente en el torrente sanguíneo. De aquí, estos viajan con la sangre hasta llegar al hígado. Al atravesar varios hepatocitos, los esporozoítos se dividen en varios miles de merozoítos, cada uno de los cuales es capaz de invadir un eritrocito saliente del hígado. Una vez en este punto, pueden comenzar con su reproducción asexual, dando inicio así a la enfermedad (Bassat & Alonso, 2011). Estos se multiplican dentro de la célula, pasando por varias formas como lo es el anillo, el trofozoito y esquizonte inmaduro y maduro. Este ciclo puede durar hasta 48 horas, prosiguiendo con la liberación de nuevos merozoítos. Se estima que *P. falciparum* y *P. vivax* pueden producir 20 merozoítos más después de madurar. Cada uno de ellos invadirá otro eritrocito, aumentando la gravedad de la malaria (Spencer, Gómez, & Collovini, 2016). El ciclo de vida del parásito se presenta en la Figura 1.

Una proporción pequeña de los parásitos se convierte en gametocitos para iniciar la reproducción sexual. Con la presencia de ellos, la persona se convierte en potencial transmisora, ya que son estos los que al ser ingeridos por un mosquito, los vuelve sus vectores. El desarrollo hacia la formación de gametocitos es un punto diferente entre las especies *P. falciparum* y *P. vivax*. Esta última se caracteriza por liberar parásitos con reproducción sexual desde el momento de la liberación del hígado, volviendo a la persona en transmisora desde antes de mostrar síntomas. *P. falciparum*, en cambio, tarda bastante más en alcanzar el desarrollo de estos organismos (Miller *et al.*, 2002). Al ser ingeridos, ocurre la fertilización en el tubo digestivo del mosquito. El cigoto se forma y se genera un ooquiste, de donde se liberan los esporozoítos que invaden las glándulas salivares del vector para la siguiente transmisión (Spencer *et al.*, 2016).

Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium*



Fuente: CDC., 2015

### 3. Incidencia y distribución

#### a. A nivel mundial

La malaria es la infección que ha matado a más personas en la historia. Hoy en día, todavía cuenta con elevados niveles de mortalidad en más de 100 países alrededor del mundo. Es importante tener en cuenta, que es popular en países subdesarrollados ya que hay un acceso limitado al tratamiento, aumentando así la cantidad de infectados (Tuteja, 2007).

Para el 2004, se calculaba que la malaria era responsable de más de un millón de muertes al año, de las cuales el 90% se ubicaban en la región del Sub-Sahara en África. La mayoría de los afectados eran niños de menos de cinco años de edad (Moree & Ewart, 2004). Hoy en día, la distribución de la malaria cubre los trópicos y grandes partes de los subtropicos. Se calcula que si bien ha disminuido su incidencia a 435 mil muertes anuales, aún existen más de 3.4 billones de personas en riesgo de contraer esta enfermedad (OMS, 2018).

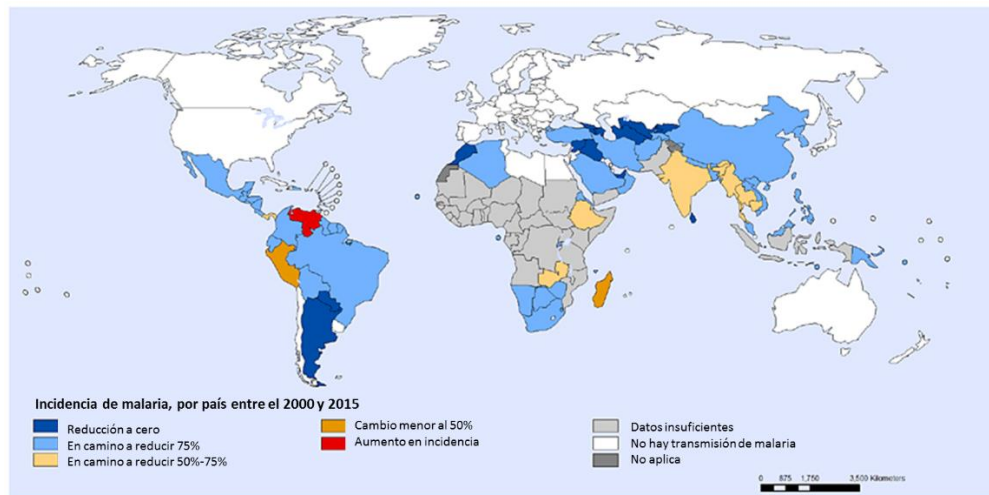
En el caso de Estados Unidos, el número de personas afectadas ha permanecido estático (alrededor de 1500 casos). Sucede lo mismo en el Reino Unido, donde en 2010 se reportaron 1762 casos de malaria. Si bien la incidencia no es alta relativamente, la reducción de pacientes afectados ha sido muy poca (Nadjm & Chb, 2012).

En un futuro, se estima que la enfermedad podrá extenderse hacia áreas que actualmente todavía son muy frescas para la ocupación del vector. De hecho, se estima que los organismos del género *Anopheles*

alcanzarán la mayor parte de Norteamérica para el 2050, así como grandes regiones de Europa del norte (Rogers & Randolph, 2000).

Debido a la variación en las proporciones de eliminación de malaria en el mundo mostrada previamente, se suele dividir a los países según su estado respecto a la enfermedad. La primera categoría se conoce como “controlando la malaria” y la segunda con el nombre de “eliminando la malaria”, buscando ambos llegar a un estado de libres de malaria. Sin embargo, cada categoría está ligada a varios factores como lo es la salud pública y la economía del país. Por ello, los países menos desarrollados caben en la primera categoría, mientras que los desarrollados están en la segunda (Feachem *et al.*, 2010). En la Figura 2 se muestra un mapa que muestra la distribución de la malaria en el mundo y la categoría a la pertenece cada país donde esta acontece (Chávez, 2019).

Figura 2. Distribución de la malaria en el mundo



Fuente: Modificado de OMS (2015)

## b. En Guatemala

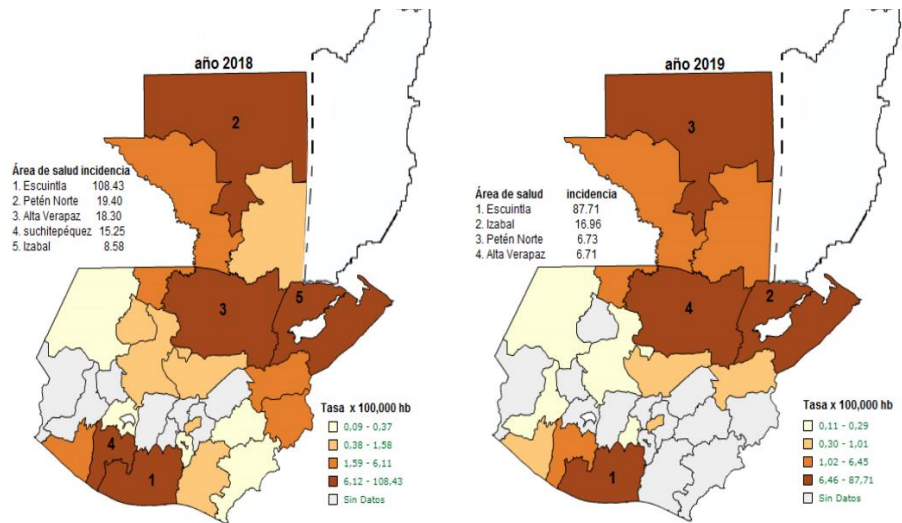
Guatemala cuenta como objetivo la eliminación de la malaria para el año 2025. Por ello, se han intensificado los esfuerzos para su erradicación mediante el fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica. Para el año 2017, se contó con total de casos de 1449, lo cual representa una reducción significativa respecto a los 2808 pacientes reportados en el año 2016. En ambos años el departamento de Escuintla contó con la mayor cantidad de casos (1199), seguido por una marcada diferencia por Izabal (60) y Suchitepéquez (59). Estos tres departamentos abarcan el 83% de casos reportados en todo el país. Esta distribución geográfica se debe a que el mosquito no se desarrolla a temperaturas menores a los 15°C y no suele encontrarse a alturas mayores a los 1200 metros sobre el nivel del mar (Chávez, 2017). Este patrón vuelve a repetirse en el 2018, donde el 91% de los casos de malaria se concentraron en estas regiones (OPS, 2018).



Para las primeras 25 semanas del 2018, los mismos departamentos presentaron una mayor incidencia: Escuintla nuevamente fue el mayor, con 815 casos. En total, durante este año se reportaron 3128 casos, representando un 23% menos que el 2017. Sin embargo, Alta Verapaz ocupó el segundo lugar con 121 casos. En total hubo 1196 pacientes disminuyendo respecto a lo reportado el año anterior. Además, el grupo de personas entre 15 y 39 años presentaron la mayor incidencia de malaria en la población. En la Figura 3 se observa un mapa que compara la incidencia en Guatemala en el año 2017 y 2018 (Sagastume, 2018).

Para el presente año, se reportaron 963 casos solo en las primeras semanas. En el primer trimestre del 2019 todos los grupos de edad contaron con casos registrados presentando una incidencia más elevada entre los jóvenes de 25 y 39 años. Otros grupos en los que destaca el número de casos son el de niños menores de un mes y los adultos mayores de 70. Además, es de especial relevancia el hecho que el grupo de niños menores a 10 años representa el 29% de los casos anuales. Para toda la población, existe una distribución aproximada entre ambos sexos. Adicionalmente, no se reporta ninguna muerte por malaria durante el año 2019 (Chávez, 2019).

Figura 3. Tasas de la malaria en Guatemala durante el 2018 y 2019



Fuente: Chávez (2019)

#### 4. Tratamientos

El tratamiento de la malaria depende en gran medida de la especie de *Plasmodium* que involucre. Por ello, el primer paso para el manejo de la enfermedad es la determinación de la especie en cuestión. Para ello, basta una muestra de sangre y realizar una microscopía acompañada por una cada en reacción de polimerasa (PCR). Mientras se logra encontrarla, se debe tratar la enfermedad como si se tratara de *P. falciparum* (Lalloo *et al.*, 2007; Nadjm & Chb, 2012).

En cuanto a medicamentos, la malaria se trata con terapias que contengan artemisina. Esta actúa sobre todos los estados de vida de *Plasmodium* en el eritrocito, disminuyendo así la carga parasítica presente en el paciente. Además, elimina las formaciones tempranas y previene que formas más maduras logren establecerse en una nueva célula. El principal problema con esta medicina es lograr llevarlo a todos los pacientes, principalmente aquellos que viven en condiciones de pobreza (White, 2008).

Cada especie de parásito es capaz de afectar el organismo de una forma característica, lo cual lleva a requerir también de otros medicamentos guiados a cada tipo específico (CDC, 2013). Para la malaria de *P. falciparum* se recomienda también el uso de artesunato, gluconato de quinidina, y quinina dihidrocloruro, variando en las dosis según la gravedad de la enfermedad. En cambio, para la malaria *no-falciparum*, se sugiere utilizar cloroquina, quinina o artesunato. Es importante tener en cuenta que algunos medicamentos pueden ocasionar resistencia por parte del parásito (Lalloo *et al.*, 2007).

## 5. Vector de la malaria y transmisión

La malaria se transmite de manera exclusiva mediante las picaduras de mosquitos de género *Anopheles*. Existen alrededor de 20 diferentes especies de ellos que tienen una relevancia a nivel mundial. La mayoría pican durante la noche y se reproducen en el agua (OMS, 2014). Si bien la transmisión suele ser más intensa en lugares donde el mosquito puede vivir más, los factores del ambiente, de la inmunidad del huésped y del parásito también influye considerablemente. Un ejemplo son las condiciones climáticas: patrones en la lluvia, la temperatura y la humedad, tienen un efecto directo sobre la vida del mosquito (Bledsoe, 2005). En la sección B del marco teórico, se desarrollará más sobre la especie *Anopheles albimanus* por su relevancia en la transmisión de la malaria en Guatemala.

### B. *Anopheles albimanus*

Los mosquitos del género *Anopheles* son los responsables de la transmisión de la malaria ya que actúan como vectores de esta enfermedad. Actualmente se conocen más de 400 especies de este mismo género, de las cuales 30 han sido reportadas como vectores de la malaria (OMS, 2017).

#### 1. Generalidades

Según Faran (1980), la especie *A. albimanus* muy probablemente se originó en Centroamérica, a una etapa bastante temprana de la línea evolutiva común del resto del grupo. Estas observaciones se justifican por contar con las características más ancestrales de los mosquitos de la región. A pesar de su amplia distribución geográfica, su morfología es muy homogénea. Esto ha llevado a una reproducción cruzada entre diferentes cepas de los países de Centroamérica (OPS, 1996).

Esta especie se caracteriza por contar con una amplia variedad de lugares elegidos para los criaderos de larvas: desde huellas de vehículos hasta depósitos de agua, pasando por charcas de agua y en ocasiones canales de drenaje. La calidad del agua para la ovipostura suele ser variable ya que esta incluso puede encontrarse contaminada con algas o bien tener poco contenido orgánico (OPS, 1996). Esta variabilidad es

un factor determinante en su actividad como vector de enfermedades. Asimismo, la interacción con el ser humano ha resultado ser beneficiosa para esta especie. Esto se debe a que las áreas habitadas por humanos proveen una constante generación de hábitats efímeros para los mosquitos, que se adecúan de manera ideal a su ciclo de vida (Faran, 1980).

Los mosquitos *A. albimanus* prefieren realizar picaduras a los seres humanos durante la noche. Estudios han demostrado que en el rango de 18:00 a 21:00 horas, estos organismos alcanzan tanto su frecuencia máxima de picadura como su mayor actividad. Además, se ha observado que su tasa de picadura humana es mayor al aire libre que en el interior (OPS, 1996).

## 2. Ciclo de vida

Los mosquitos *A. albimanus* cuentan con ciclo de vida compuesto por cuatro fases: huevo, larval, pupa y adulto. Las tres primeras se llevan a cabo en un medio acuático. Según las condiciones en las que se encuentren, los mosquitos pueden completar todo el ciclo en 5 a 14 días (González & de la Cruz, 2017). En la Figura 5, se presenta el ciclo de vida de *Anopheles* sp.

### a. Huevos

Las hembras colocan huevos en diferentes lotes durante la ovoposición de manera directa sobre el agua. Estas pueden poner desde 20 hasta 300 unidades en cada lote (Rozeboom, 2016). Los huevos cuentan con estructuras similares a flotadores, una a cada lado, a manera de lograr completar su desarrollo en el agua (González & de la Cruz, 2017). Se aproxima que la eclosión sucede después de 2 o 3 días en condiciones óptimas. Es decir, las primeras larvas suelen estar listas solo con 48 horas de desarrollo, mientras que las últimas pueden llegar a requerir más de 50 horas (Ramírez, Medina, Fajardo, & González, 1986; Rozeboom, 2016).

### b. Larvas

Las larvas de *A. albimanus* cuentan con una cabeza bien desarrollada y cepillos bucales empleados para la alimentación. Su tórax es largo con un abdomen segmentado (SENEPA, 2013). En contraste con otros mosquitos, estas larvas no cuentan con un sifón respiratorio, por lo que es importante que se posicionen paralelo a la superficie del agua. Por esto mismo, las larvas cuentan con espiráculos en el octavo segmento abdominal. Como consecuencia, deben salir a la superficie con frecuencia (CDC, 2016).

Las larvas se alimentan de algas, bacterias y otros microorganismos que se encuentren en su medio. Para nadar realizar movimientos sin dirección con todo el cuerpo, o bien emplean la propulsión con su boca (CDC, 2016). No es normal que estas se sumerjan en las profundidades relativas del agua (González & de la Cruz, 2017).

El desarrollo larval se completa después de cuatro estadíos, conocidos como L1, L2, L3 y L4. Al terminar cada uno, el organismo muda de exoesqueleto para permitir un mayor crecimiento. Una vez terminadas todas las fases, la larva experimenta la metamorfosis hacia una pupa (Rozeboom, 2016).

### c. Pupas

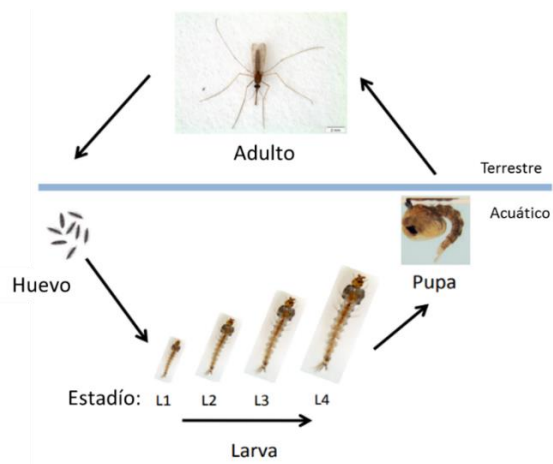
Vista de lado, las pupas de los mosquitos tienen forma de coma y cuentan con un color similar al de la larva en un inicio. Tienen la capacidad de mucha movilidad pero usualmente se encuentran quietas sobre la superficie del agua (SENEPA, 2013). La cabeza y el tórax se encuentran combinados en una estructura conocida como cefalotórax. El abdomen se encuentra debajo de este último. Las pupas deben moverse hacia la superficie con frecuencia para poder respirar mediante las trompetas respiratorias. Una vez la superficie dorsal del cefalotórax se rompe, el mosquito sale (CDC, 2016). La duración de esta etapa depende fuertemente de las condiciones ambientales en las que se encuentra (Rozeboom, 2016). Según Ramírez et al. (1986), en un clima y humedad apropiada, esta etapa puede durar dos días en promedio.

### d. Adultos

La morfología de un adulto de *Anopheles* sp. cuenta con tres secciones: cabeza, tórax y abdomen. La primera se caracteriza por su función en la adquisición y procesamiento de información. Cuenta con ojos, un par de antenas segmentadas y una probóscide prolongada para la alimentación. El tórax juega el papel de la locomoción del organismo, empleando los tres pares de patas y las alas. Por último, el abdomen se encarga de la digestión y el desarrollo de huevos (CDC, 2016). Estos mosquitos se diferencian de otros por su posición: su cuerpo y probóscide se encuentran casi en ángulo recto con el sustrato de alimentación (SENEPA, 2013).

Los mosquitos adultos copulan a los pocos días después de emerger del estado pupal. Los machos pueden vivir alrededor de una semana, alimentándose de diferentes fuentes de azúcar. Las hembras requieren de sangre para poder desarrollar los huevos y luego colocarlos (CDC, 2016). Estas últimas pueden vivir incluso hasta un mes si han sido capturadas, pero en la naturaleza no logran extender su vida más de dos semanas. Su sobrevivencia depende en altamente en las condiciones de temperatura y humedad (González & de la Cruz, 2017).

Figura 4. Ciclo de vida de *Anopheles* sp.



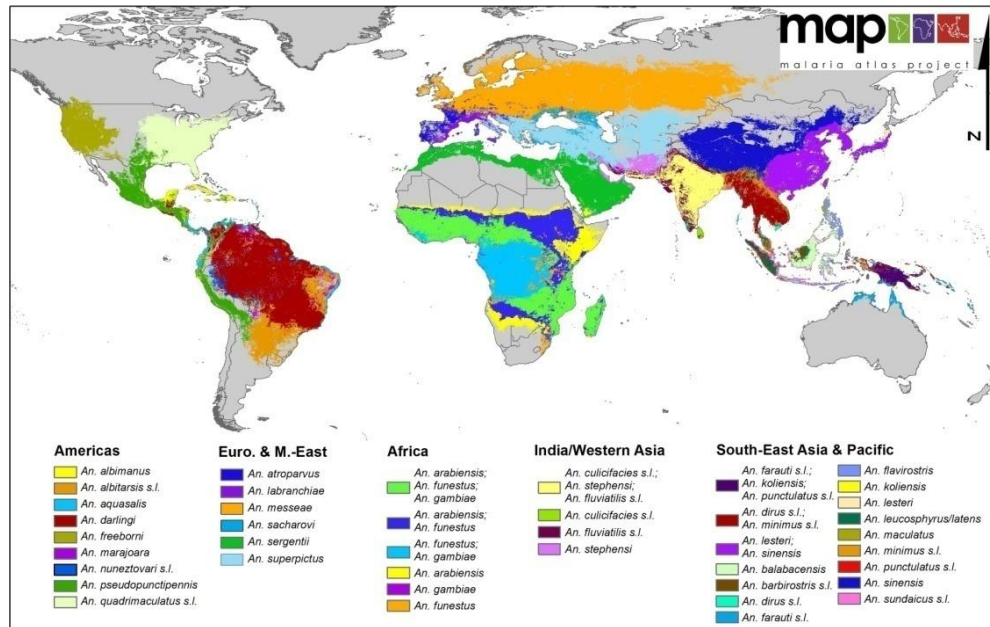
Fuente: Modificada de Williams & Pinto, (2014)

### 3. Distribución

La distribución de los *Anopheles* es variada a lo largo del mundo, pero cada especie cuenta con una región en la cual frecuentemente es localizada (Figura 5). La especie *Anopheles albimanus* cuenta con especial relevancia en Centroamérica, por lo cual esta investigación tiene énfasis en ella. Hoy en día se conoce que es predominantemente tropical y muy abundante a elevaciones menores a los 100 metros sobre el nivel del mar. Por ello, sus poblaciones más grandes se localizan alrededor de cuerpos de aguas costeros (Pinault & Hunter, 2012). Es posible encontrarlo desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Perú, incluyendo las islas de Antigua, Bahamas, Barbados, Barbuda, Cuba, Jamaica, entre otras (Bejarano, 2003; Olano, Brochero, Sáenz, Quiñonez, & Molina, 2000).

Como se describió previamente, el mosquito tiende a vivir a poca altura, en zonas con clima cálido. A pesar de esto, su presencia también se ha registrado en el litoral Pacífico como en el Atlántico, donde puede llegar a llover a lo largo del año. Habita en zonas con vegetación variada: se encuentra en bosques de hoja caduca hasta la sabana abierta, e incluso en la selva tropical húmeda y en los alrededores cultivados (OPS, 1996).

Figura 5. Distribución de especies de *Anopheles* en el mundo



Fuente: Sinka, (2013)

### 4. Diferenciación sexual

La cascada de diferenciación sexual en *A. albimanus* aún cuenta con ciertos vacíos. Sin embargo, esta ya se ha descrito para el organismo modelo *Drosophila melanogaster* y para otros mosquitos. En las siguientes sub-secciones (a y b) se hablará respectivamente de cada uno de ellos, así como lo que se conoce de *A. albimanus*.

a. En *Drosophila melanogaster*

La cadena de diferenciación sexual en *D. melanogaster* ha sido arduamente estudiada para poder ser relacionada con la de otros insectos. Se ha confirmado que la determinación se encuentra ordenada de manera jerárquica, buscando que el producto de un gen controle el procesamiento determinado del pre-ARN mensajero (pre-ARNm) del siguiente gen (Sánchez, 2010). Esta jerarquía puede observarse en la Figura 6.

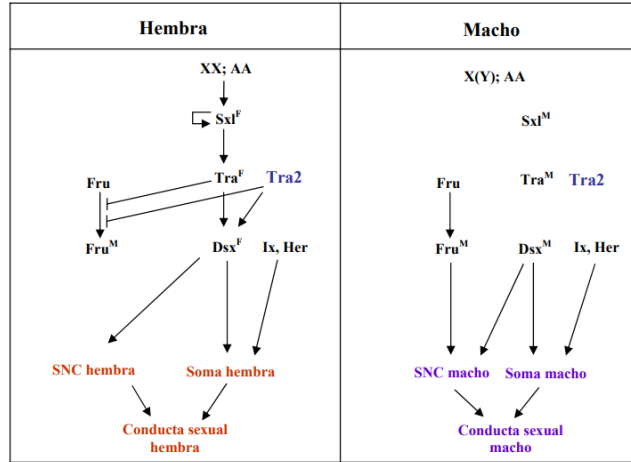
El primer gen de esta cascada se conoce como *Sexlethal* (*Sxl*). La región río arriba de *Sxl* cuenta con dos promotores: *P<sub>temprano</sub>* y *P<sub>mantenimiento</sub>*. La señal que emita la concentración de los elementos asociados a X, llevará a la activación de alguno de los promotores. Por ello, un organismo diploide XX activará el promotor temprano, mientras que uno XY alcanzará la activación del de mantenimiento (Verhulst, Van de Zande, & Beukeboom, 2010). La transcripción del promotor temprano de *Sxl* resultará en un transcrito que tendrá un empalme para codificar una proteína temprana SXL funcional. Este producto llevará a la producción de proteínas SXL tardías funcionales, manteniendo así el corte y empalme específico para hembras mediante autoregulación (Sánchez, 2010).

Adicionalmente, SXL permite un corte y empalme específico para el gen *transformer* (*tra*), mediante la unión a un tracto de polipirimidina en el primer intrón. Como resultado se obtiene una proteína TRA funcional, que interactúa con la proteína no específica de sexo transformer 2 (TRA2). Luego, esa se une al ARN primario de *doublesex* (*dsx*), produciendo así un ARNm y proteínas específicas para hembras (DsxF), que le da al organismo las características morfológicas de hembras (Verhulst *et al.*, 2010).

En machos no se alcanza la concentración necesaria de elementos asociados a X para activar el promotor temprano de *Sxl*. Por ello, no se sintetiza una proteína temprana SXL y se previene la autorregulación de esta misma (Yamamoto & Koganezawa, 2013). Como resultado, se forma un pre-ARNm de *Sxl* del promotor tardío que lleva a una proteína no funcional TRA. Sin ella, se genera el corte y empalme normal de *dsx*, llevando a una proteína macho específica DSX (Sánchez, 2010; Verhulst *et al.*, 2010).

El complejo TRA-TRA2 regula el corte y empalme específico para hembra del gen *fruitless* (*fru*), que lleva a una forma no funcional de la proteína codificante. En los machos la proteína TRA está ausente, por lo que el corte y empalme tradicional de *fru* se lleva a cabo y se obtiene una proteína funcional del gen, exclusiva para este sexo (Sánchez, 2010; Yamamoto & Koganezawa, 2013).

Figura 6. Cascada para la determinación sexual de *Drosophila melanogaster*



Fuente: Sánchez, (2010)

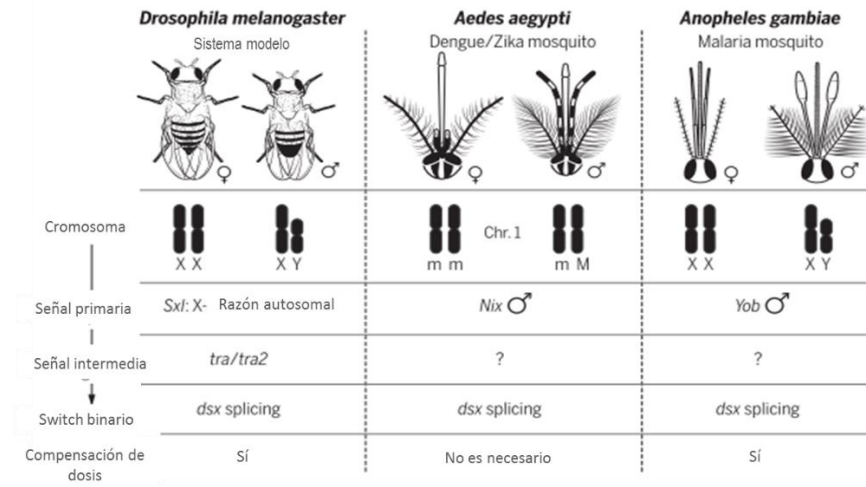
#### b. En mosquitos

La evidencia genética de los mosquitos indica que su determinación sexual está controlada por un factor M. Este se encuentra localizado en el cromosoma Y en los mosquitos de *Anopheles*. Como se mencionó previamente, este factor M se encuentra ausente en los organismos de *D. melanogaster* y la cascada de diferenciación prosigue sin la necesidad del mismo (Adelman & Tu, 2016).

Los estudios han demostrado que algunos genes de la cascada de diferenciación sexual, como *dsx* y *fru*, se encuentran altamente conservados en las especies de mosquitos. De hecho, el empalme específico para sexo se ha reportado en una amplia variedad de insectos, reflejando así potenciales funciones conservadas en la diferenciación sexual. Para las especies de *Aedes* y *Anopheles* se ha descrito una actividad que sugiere la presencia la actividad de la proteína TRA (Scali, Catteruccia, Li, & Crisanti, 2006). Es más, se han encontrado elementos reguladores cis que cuentan con elevada probabilidad de corresponder a sitios de unión de TRA-TRA2 en ambos mosquitos. Aún si no se ha encontrado un gen *tra* como tal, existe la probabilidad de que el factor M, en conjunto con otros factores, afecte el empalme de TRA-TRA2 para volverlo sexo específico (Adelman & Tu, 2016).

Para una variedad de insectos se ha podido evidenciar un patrón en la cascada de diferenciación: la mayoría cuenta con el gen *dsx* como último escalón y tienen al inicio el gen *sxl* (Verhulst *et al.*, 2010). Sin embargo, se han notado diferencias inherentes a la evolución propia de cada especie estudiada. Por ello y dado que aún no hay información completa al respecto, es posible adaptar la cascada conocida de *D. melanogaster* para *A. albimanus*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que no supone más que una guía y que debe modificarse para los descubrimientos propios de este mosquito. De ella, se ha confirmado únicamente la presencia de *tra-2* en *A. albimanus* (Sánchez, 2010). En la Figura 7 se muestra la jerarquía de diferenciación sexual conocida para *Anopheles gambiae*, con aquellos genes cuya presencia se conoce o se desconoce.

Figura 7. Comparación de la cascada de diferenciación sexual en *D. melanogaster*, *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae*



Fuente: Sinkins, (2016)

### C. Gen *doublesex*

El gen *doublesex* (*dsx*) supone el último escalón en la jerarquía de diferenciación sexual estudiada. Este se transcribe en ambos sexos pero el resultado difiere en cada uno, debido al procesamiento alternativo distinto que sucede en hembras y en machos (Sánchez, 2010). En algunas especies de insectos, como *Aedes aegypti*, se han descrito dos isoformas del gen para hembras, mientras que para machos solo hay una (Price, Egizi, & Fonseca, 2015). En el caso de *Anopheles gambiae*, la base de datos IsoPlot también propone el mismo caso para las isoformas del gen. Dado que es un gen encontrado tanto en vertebrados como en invertebrados, este ha sido ampliamente estudiado. En el caso de insectos, ha sido caracterizado para *D. melanogaster*, *Ceratitis capitata*, *Bactrocera tryoni*, *Bactrocera oleae*, varias especies de *Anastrepha*, entre otros. Para el género *Anopheles*, solamente hay reportes describiendo este gen para *A. gambiae*, aún si se conoce que está presente en otras especies (Verhulst *et al.*, 2010).

#### 1. Estructura

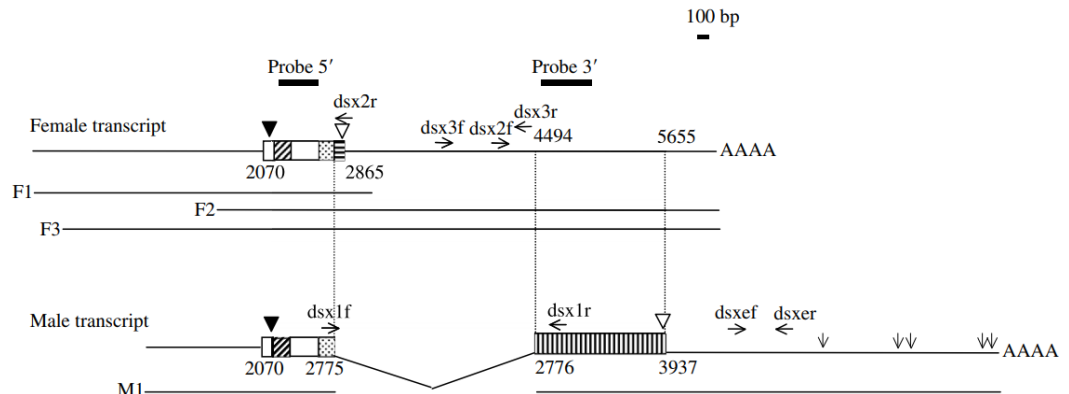
Actualmente se carece de una descripción específica del gen para *A. albimanus*. Sin embargo, Scali, Catteruccia, Li, & Crisanti (2005) realizó la caracterización del gen *dsx* para la especie *A. gambiae*, la cual puede ser la más aplicable para el estudio de *A. albimanus*. En la caracterización se reflejó que el segmento guarda una homología entre el 80-82% de similitud con el gen descrito en *D. melanogaster*. Se encontró que la versión femenina de la sección estudiada del gen cuenta con un mayor largo a la masculina, sugiriendo que existen varios puntos de corte y empalme para *dsx* en los machos.

El gen *dsx* presenta diferentes dominios altamente conservados. Entre ellos se encuentran los N-terminal que son únicos para la unión de los dedos de zinc que están relacionados con los dominios de



oligomerización 1 (OD1) (Salvemini *et al.*, 2011). De la misma manera, los dominios de oligomerización 2 (OD2) conservan la característica de terminar al inicio de las regiones específicas de sexo. Por último, los dominios C-terminal de las proteínas femeninas revelan alto grado de conservación. En el caso de los machos, la longitud del transcrito es muy similar a otras especies, con varios aminoácidos repetidos y regiones ricas en prolina, serina, glutamato y treonina (Scali *et al.*, 2005). En la Figura 8 se presentan los dominios estudiados para *A. gambiae*.

Figura 8. Estructura del gen *dsx* en *Anopheles gambiae*

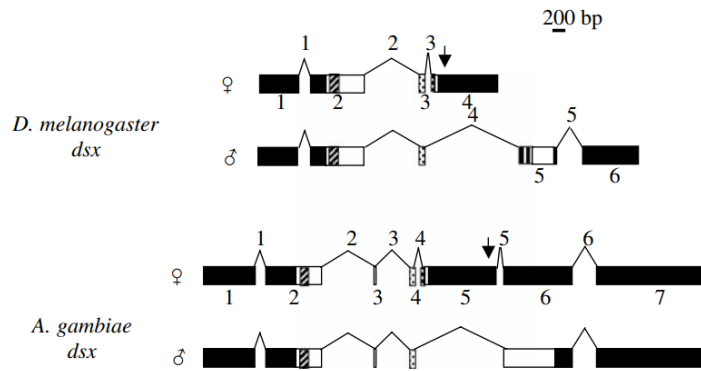


Fuente: Scali *et al.*, (2005)

En la Figura 8, los cuadros sombreados con líneas diagonales indican un dominio de unión a ADN. Aquellos que se encuentran rayados horizontalmente corresponden a una región específica de hembra, mientras que los rayados verticalmente son de macho. Por último, los cuadros punteados indican un dominio que no es específico para un género.

Se plantea que en *A. gambiae*, el gen *dsx* consiste en una región de 85kb. Aquí se encuentra siete exones, de los cuales los primeros cuatro codifican para una región común en la proteína. El exón 5, de aproximadamente 1.7 kb, es específico para hembras, mientras que el exón 6 es la secuencia codificante específica para machos, que es no codificante para hembras. Por último, el exón 7 es una región no codificante (UTR), para ambos sexos (Scali *et al.*, 2005). Sucede lo mismo en *D. melanogaster*, los primeros cuatro exones son comunes y hay variaciones en el quinto y sexto según sea el sexo del organismo (Hertel, Lynch, Hsiao, Liu, & Maniatis, 1996). Entre otras características que lograron elucidarse, destaca el hecho que *dsx* es un gen de una única copia (Scali *et al.*, 2005). En la Figura 9 se muestra la estructura del gen *dsx* tanto en *A. gambiae* como en *D. melanogaster*.

Figura 9. Estructura de *dsx* en *D. melanogaster* y en *A. gambiae*



Fuente: Scali *et al.*, (2005)

Cada cuadro presentado en la Figura 9 representa un exón. Aquellos que se encuentran rellenos son UTRs, mientras que las vacías son regiones codificantes. El OD1 se encuentra representado en cuadros con líneas diagonales. Los recuadros con líneas horizontales y verticales, son regiones específicas para hembras y machos, respectivamente. Los números indican los exones e intrones respecto a los transcritos femeninos (Scali *et al.*, 2005).

## 2. Función

El gen *dsx* supone un punto de divergencia clave para la regulación de las funciones inherentes de cada sexo. Este gen puede compararse con un doble switch, en el que se selecciona una de las dos programaciones sexuales alternativas con las que cuenta un organismo (Scali *et al.*, 2005).

En el caso de los machos, el locus *dsx* reprime la expresión de los genes hacia abajo que se necesitan para la diferenciación femenina. Aquellos genes que se asocian a la diferenciación masculina no son reprimidos, lo cual resulta en el desarrollo de un organismo macho (Sánchez, 2010). Dado que aún no se conoce algún empalme específico previo para el género masculino, se cree que la expresión de *dsx* en machos es la forma estándar del gen. Es decir, a menos que haya una señal previa en la cascada, el gen *dsx* se expresa sin modificaciones, como se encuentra en los organismos de este sexo (Baker & Wolfner, 1988).

En el caso de hembras, existen diversos factores que generan un empalme específico en los primeros pasos de la cascada. Como consecuencia, la expresión de *dsx* es distinta a la de los machos. Este gen es necesario para la diferenciación sexual somática de las hembras, así como la funcionalidad de la línea germinal y la transcripción de los genes asociados al cromosoma X (Hoshijima, Inoue, Higuchi, Sakamoto, & Shimura, 1991). De la misma manera, ayudado por los genes *tra* y *tra-2*, se logra reprimir la función de *dsx* masculino y su diferenciación. Dado que todos los genes hacia abajo responsables de la diferenciación femenina no están reprimidos, estos se expresan y permiten la diferenciación de un organismo hembra (Baker & Wolfner, 1988).

Dado que *dsx* cuenta con una dualidad de función, se ha indicado que este gen es doblemente activo. En pocas palabras, se le describe así por dar como resultado dos polipéptidos distintos, de los cuales cada uno lleva al desarrollo de un sexo específico según las modificaciones de transcripción que haya experimentado. Sin importar en cuál de las 2 proteínas resulte, la expresión de *dsx* será siempre activa y funcional (Wilkins, 1994).

### 3. Factores que interactúan con el gen *doublesex*

Es importante tener en cuenta que si bien *dsx* está presente en todos los insectos, los factores que llevan a las diferencias en corte y empalme pueden llegar a variar considerablemente. En el caso de *Anopheles* y de *D. melanogaster*, se ha identificado al gen *tra* como influyente en el procesamiento alternativo (Burtis & Baker, 1989). Por otro lado, existen factores feminizantes, macho determinantes e impresiones genómicas determinantes, que son exclusivos únicamente para algunas especies de insectos. No obstante, todos convergen en un procesamiento alternativo que llevará a una expresión diferente de *dsx* en hembras y en machos (Verhulst *et al.*, 2010).

El gen *dsx* cuenta también con elementos reguladores (*dsxRE*) que ayuda en la diferenciación sexual. Estos consisten en secuencias de 270 nucleótidos con 6 repeticiones de 13 nucleótidos. Se caracterizan por ser ricos en purinas y encontrarse entre las repeticiones 5 y 6. Estos son necesarios para el uso de las proteínas Tra y Tra2, específicas para el desarrollo de las hembras. En *D. melanogaster*, se conoce que Tra-2 se une a *dsxRE* para facilitar el proceso de corte y empalme requerido (Hertel *et al.*, 1996).

Por último, destacan los elementos silenciadores y proteínas potenciadoras, en ambos tipos de corte y empalme. Estos elementos presentes en el ARN como diferentes motivos, son reconocidos por otras proteínas y controlan así el empalme del gen. Destacan dos tipos principales: los miembros de la serina-arginina y las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) (Shukla & Nagaraju, 2010). Los primeros cuentan con un dominio de reconocimiento y otro con repeticiones de serina y arginina. Una vez estos se unen a la molécula, se facilita el ensamblaje del complejo relacionado al empalme en el intrón adyacente (Graveley & Maniatis, 1998). Los segundos actúan como silenciadores, ya que al unirse a motivos silenciadores llevan a la inhibición del corte y empalme (Shukla & Nagaraju, 2010).

### 4. Proteínas codificantes

Como se mencionó en las secciones previas, el gen *dsx* puede resultar en dos proteínas: hembra (*DSX<sup>F</sup>*) o macho (*DSX<sup>M</sup>*). Ambas comparten un dominio N-terminal pero cuentan con distintos dominios C-terminal. Esta diferencia se debe a las diferencias en corte y empalme que experimenta el pre-ARNm (Jursnich & Burtis, 1993). Estudios han indicado que la parte común es responsable de la unión al ADN y que ambas proteínas reconocen la misma secuencia. Además, aquí se encuentra un sub-dominio que controla las interacciones proteína-proteína. Los dominios distintos funcionan como reguladores específicos de sexo y contienen sus propios subdominios que se encargan de mediar las interacciones correspondientes (Waterbury, Jackson, & Schedl, 1999).

En *A. gambiae*, el transcrito completo femenino contiene un marco de lectura (ORF) de 795 pb. Este segmento codifica para una proteína de aproximadamente 265 aminoácidos. Se asume que la traducción inicia en el exón 2 y termina en el 5, con la sección específica de hembra. Cuenta con dos codones de terminación sucesivos. En el caso del macho, el transcrito es de 1866 pb resultado en una proteína de 622 aminoácidos. El punto de inicio es el mismo, pero este termina en el exón 6, en la parte específica de macho (Scali *et al.*, 2005).

Las mutaciones en cualquiera de estas proteínas, llevan a un desarrollo incompleto del insecto. La principal evidencia de un cambio en *dsx* es la formación incompleta y malformaciones en los genitales, llevando así a un estado intersexual. El comportamiento del organismo también se ve fuertemente afectado (Waterbury *et al.*, 1999).

## 5. Relevancia para el control vectorial

Debido a que los mosquitos del género *Anopheles* son el vector de la malaria en el mundo, es de vital importancia encontrar una manera para controlar su población. Una manera novedosa de hacerlo es mediante las técnicas del insecto estéril (SIT) o algunos métodos moleculares, temas que se desarrollarán a profundidad en la siguiente sección. Para estas se requieren de genes candidatos que puedan controlar la predisposición del insecto para la reproducción. Dado que *dsx* está ligado con la diferenciación sexual, puede ser utilizado para controlar la población de *Anopheles*, ya sea mediante esterilización o silenciamiento (Scali *et al.*, 2005).

## D. Métodos de control vectorial

Uno de los primeros pasos para lograr el control de las enfermedades transmitidas por vectores, es comprender la dinámica de esta población. Luego, partiendo de este punto, es posible diseñar estrategias que permitan controlarla, y con ella, al parásito. Para lograr esto, se precisa considerar su hábitat, sus patrones de comportamiento y susceptibilidad hacia los tratamientos presentes para controlarla (CDC, 2015).

### 1. Insecticidas

Uno de los principales métodos para evitar a los vectores de enfermedades son los insecticidas. En el caso de infecciones transmitidas por mosquitos, existen dos principales técnicas para el uso de insecticidas: mosquiteros de larga duración y la fumigación de interiores. Ambas medidas han demostrado ser eficientes, logrando una disminución en la cantidad de casos reportados con malaria. Sin embargo, estas medidas no pueden llegar a todos los potenciales afectados y, en algunos casos, no se mantienen de manera sostenible (OMS, 2016).

Para el año 2015, se recomendaba que las familias fumigaran con más de 15 compuestos, ya que se encontraba emergiendo un nuevo problema: la resistencia a insecticidas (OMS, 2016). Actualmente, la OMS se encuentra implementando un plan para manejar la resistencia en los vectores de la malaria. Esta cuenta con algunas recomendaciones pero muy pocos países aplican el plan descrito. Por otro lado, se solía utilizar mucho el diclorodifeniltricloroetano (DDT) para la fumigación de los interiores. Si bien tiene una eficacia

residual larga, su uso se prohibió en el Convenio de Estocolmo debido a su acción como contaminante. No obstante, varios países aún utilizan este producto para luchar contra los vectores de la malaria (OMS, 2016).

## 2. Técnicas moleculares

### a. Técnica del insecto estéril (SIT)

La SIT fue uno de los primeros métodos de control de insectos diseñado para aplicaciones en grandes áreas. Aún si se volvió conocida en los programas de erradicación, ahora se le reconoce como una estrategia para la prevención, confinamiento, supresión y erradicación de pestes (Mehta, 2007). La SIT supone colocar elevados números de la especie de insecto en cuestión y exponerlos a rayos gamma para inducir la esterilidad sexual (Oliva *et al.*, 2012). A continuación, estos insectos se liberan en la población objetivo, a manera de que los machos estériles copulen con las hembras y se prevenga su reproducción. La irradiación puede realizarse en los diferentes estadios de vida del insecto. No obstante, los adultos suelen ser más frágiles por lo que se prefiere irradiarlos en su estado de pupas. Dado que no cuenta con regulaciones, es común encontrar la SIT combinada con otras para el estudio de un área en específico (Lees, Gilles, Hendrichs, Vreysen, & Bourtzis, 2015).

En el caso de mosquitos, es necesario disminuir la cantidad de hembras en la población ya que son ellas quienes actúan como vector. Sin embargo, se ha demostrado que la competitividad sexual y la vida de los mosquitos estériles se ve afectada significativamente al aplicar esta técnica (Lees *et al.*, 2015). Esto puede deberse a varios factores, entre los cuales destaca el proceso de esterilización en sí. Los rayos gamma suelen ocasionar mutaciones letales en las células germinales. Algunas consecuencias evidentes en la vida del mosquito son su disminuida sobrevivencia y su aptitud para encontrar hembras y transferir su semen. De la misma manera, es posible que el macho, acostumbrado a la copular en las condiciones de laboratorio, no sea capaz de adaptarse a las condiciones de campo (Oliva *et al.*, 2012).

Estudios en *A. albimanus* demostraron que si bien se logra tener un impacto en la población, los mosquitos liberados se encontraban ya cansados de las manipulaciones experimentadas (Taracena *et al.*, 2019; Whyard *et al.*, 2015). Como consecuencia, su rendimiento era menor al esperado (Dyck, Hendrichs, & Robinson, 2005).

### b. ARN de interferencia (ARNi)

El silenciamiento de genes mediante la interferencia con ARN es un método de control vectorial ampliamente utilizado en las últimas décadas. Dado que es capaz de interrumpir la expresión de genes específicos, sin modificarlos genéticamente, no presenta las mismas limitantes que los organismos transgénicos (Noriega, Valencia, & Villegas, 2016). Adicionalmente, los efectos secundarios que se evidencian con la técnica SIT se ven reducidos drásticamente al emplear ARNi. Por lo anterior mencionado, hoy en día se le considera como una estrategia prometedora en el campo de control vectorial (Whyard *et al.*, 2015).

## 1. Principio y mecanismo

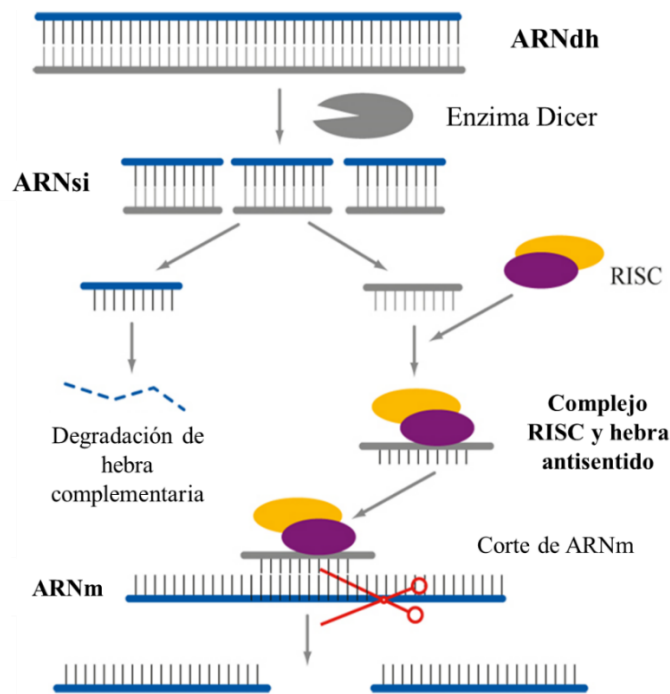
La interferencia mediante ARNdH es un proceso natural y altamente conservado que la célula emplea para la regulación de genes. El silenciamiento de genes se da mediante una interacción de varias enzimas en el citoplasma con moléculas de ARN de doble hebra (ARNdh). Estas actúan sobre el ARNm endógeno, realizando cortes basados en homología, a manera de impedir que sea traducido a proteína (Noriega *et al.*, 2016).

### a. ARN de doble hebra (ARNdh)

El mecanismo inicia con la transcripción de una molécula de ARN de doble hebra y su procesamiento mediante la ribonucleasa III, conocida como Dicer. Esto convierte a la gran molécula inicial en pequeños fragmentos de ella, nombrada como siARN. Esta luego interactúa y activa al complejo RISC, que cuenta con una endonucleasa llamada argonata. La enzima rompe la doble hebra en hebras monocatenarias (sentido y antisentido). Esta última queda asociada al complejo para la degradación de hebras de ARN mensajero mediante complementariedad de bases (Carthew & Sontheimer, 2009).

Para poder ejercer el silenciamiento de genes, es necesario que el complejo se una al mRNA. Como se mencionó previamente, se requiere que haya complementariedad completa para activar argonata y realizar el corte en el enlace fosfodiéster en las bases 10 a 11 relativas al final 5' (Wittrup & Lieberman, 2015). En la Figura 10 se detalla el mecanismo de ARNi para una molécula de ARN de doble hebra.

Figura 10. Mecanismo de acción de ARNi



Fuente: Modificado de Shirinsky, (2011)

## b. Micro ARN (miARN)

Silenciar un gen mediante miARN requiere también de una inhibición post-transcripcional. Estos son transcritos en el núcleo, con una estructura de doble hebra. Luego son cortados por un complejo Drosha a manera de formar el precursor de miARN (Kim *et al.*, 2016). Este se caracteriza por contar hasta con 100 nucleótidos con espacios para formar una estructura de horquilla. Las exportinas garantizan su viaje hacia el citoplasma, donde luego son procesadas por Dicer a moléculas de miARN. Esta molécula logra asociarse con el complejo RISC, donde se desdobra el dúplex y se elimina la hebra sentido (Ha & Kim, 2014).

La hebra remanente guía a la proteína hacia los ARN mensajeros que debe degradar. Es importante tener en cuenta que cuando se trata de miARN, la complementariedad de bases hacia el mARN es parcial. Este fenómeno ocasiona que el silenciamiento del gen diana pueda darse mediante represión, degradación o cortes (Carthew & Sontheimer, 2009) Usualmente, el reconocimiento de este se da en la región no traducida (UTR) 3' del mARN y de 2 a 7 nucleótidos del miARN. Por ello, el reconocimiento de los micro ARNs es mucho mayor hacia diversos genes, disminuyendo así su especificidad. En el caso de este silenciamiento, la argonauta no se encuentra activada. Este proceso se da entonces por represión o degradación con deadenilación o actividad exonucleasa (Kim *et al.*, 2016).

## 2. Aplicación

El ARNi se caracteriza por su elevada especificidad, lo cual le otorga un gran potencial biotecnológico para tratar plagas y vectores de enfermedades. En el caso de reducción de población de mosquitos, existe un interés especial en generar individuos estériles y métodos sencillos para la disminución de hembras en una población. Así se han conducido varios estudios para el silenciamiento de genes relacionados con la cascada de diferenciación sexual. En ellos, se genera ARNd<sub>h</sub> que luego es introducido a las larvas de los mosquitos para inducir un silenciamiento de genes de determinación de sexo. Como resultado, se obtiene una población estéril que puede ser liberada al ambiente (Noriega *et al.*, 2016).

La técnica de silenciamiento de genes con ARNi ofrece una ventaja sobre las tradicionales SIT. Esto se debe a que cuenta con la especificidad inherente de las moléculas de ARNd<sub>h</sub>. Como consecuencia se evita los efectos debilitadores de la radiación y elimina la necesidad de separar los individuos por sexo previo a la liberación (Sanchez-vargas *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que no requiere de transportadores como nanopartículas o liposomas para poder funcionar de manera efectiva. Por ello, se considera el silenciamiento de genes como una estrategia efectiva para la reducción en la población de mosquitos (Whyard *et al.*, 2015).

### 3. Sistema de expresión en *E. coli* HT115 (DE3)

Para la producción de ARNdh en bacterias, se emplea la cepa *E. coli* HT115 (DE3). Esta cuenta con el sistema de expresión DE3, ampliamente utilizado para un rendimiento elevado de proteínas recombinantes y otras moléculas (Wurm *et al.*, 2016). El sistema debe su eficiencia a la presencia de una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa T7 de los bacteriófagos. Este se encuentra bajo el control de un promotor *lac*, en una región conocida como DE3. Al agregar isopropil  $\beta$ -D-1tiogalactopiranosido (IPTG), el inhibidor LacI libera el operador, permitiendo la expresión de la polimerasa T7. El vector de expresión cuenta con promotores T7 en ambas direcciones del gen, permitiendo así que las polimerasas transcritas se unan y aumentar la transcripción del gen de interés (Jia & Jeon, 2016). Adicional a esto, las cepas HT115 de *E. coli* tienen una mutación en el gen de la ARNasa III. Como consecuencia, la producción de ARNdh es propiciada (Papić, Rivas, Toledo, & Romero, 2018).

### 4. Verificación de clonación por Blue-White Screening

Previo a la inducción para producir ARNdh, es necesario elegir a la colonia bacteriana que haya incorporado una ligación exitosa durante la transformación. Para esto se emplea la técnica del Blue-White Screening. Este se basa en el uso del *lacZ*, un gen que codifica para  $\beta$ -galactosidasa, que cataliza la hidrólisis de la glucosa y galactosa. Además, es capaz de hidrolizar X-Gal en galactosa y 5 -bromo 4 -cloro – 3-hidroxiindol, un compuesto con color azul (Banerjee, Kumar, Apte-Deshpande, & Padmanabhan, 2010). Los vectores de expresión que se utilizan para ligar emplean *lacZ* como reportero, a modo de que el fragmento a ligar interrumpa la secuencia del gen y este no pueda complementarse con la secuencia codificada en el genoma bacteriano. Como consecuencia, si la bacteria ha incorporado un plásmido con ligación y es estimulado con X-gal, no podrá producir el color azul característico. En la placa de transformación se obtienen colonias azules y blancas, siendo las primeras las que no cuentan con el fragmento de interés, puesto que el gen está completo y puede catalizar X-gal. Este método es práctico y sencillo ya que el color permite separar las colonias que son útiles y cuentan con el fragmento deseado (Hollister, Brooks, & Gentry, 2014).

## E. Evaluación de la expresión génica

### 1. Extracción de ARN

La extracción de ARN es el primer paso para la evaluación de la expresión génica. Por ello, se desea obtener un aislado homogéneo con elevado rendimiento que permita el posterior análisis con técnicas con PCR cuantitativa o secuenciación (Ridgeway & Timm, 2014). Consiste en tres principales etapas: lisado de las células, purificación y aislamiento. Existen diferentes maneras para llevar cada uno a cabo. El primero puede darse empleando métodos físicos, químicos o con enzimas. Los últimos dos, en cambio, suelen realizarse con solventes orgánicos o por métodos más sofisticados (cromatografías, perlas magnéticas, etc.) (Hong, Kang, Han, Gobert, & Jones, 2011).



## 2. Síntesis de ADN complementario

Como siguiente punto para evaluar expresión de un gen está la síntesis de ADN complementario (ADNc) partiendo del ARNm extraído. Para ello se emplean cebadores que generen ADN con ayuda de una enzima transcriptasa reversa (Farrell, 2010). Esta es una enzima polimerasa de ADN que sintetiza este ácido nucleico partiendo de una plantilla de ARN. Esta técnica requiere la amplificación de un gen control que siempre se exprese y de tamaño conocido, como la actina estructural, para verificar la síntesis correcta de ADN desde la plantilla de ARN (Passarge, 2009).

Pueden utilizarse dos tipos de cebadores: oligo(dT) y cebadores aleatorios. El primero se caracteriza por contener dioxitimidina, que ayudan a unirse a las colas poli A del ARNm. Como consecuencia, los cebadores se unen con especificidad únicamente a las secuencias que contienen dicha cola, es decir, solo al ARNm. Sin embargo, si el fragmento de interés se encuentra cerca del final 5', su uso no es recomendable, ya que la enzima puede separarse antes de llegar a la posición en la que se encuentra (Thermofisher, 2019). Los cebadores aleatorios, cuentan con una secuencia menor a la de los oligo(dT), no suelen sobrepasar los seis pares de bases. De esta forma los cebadores pueden unirse a casi cualquier secuencia de ARN, sin importar si es o no mensajero. Dado que se unen a casi todo el ARN, se aumenta la posibilidad de transcribir casi todo el material presente. Es recomendable utilizar ambos tipos en una mezcla con proporciones iguales de cada uno, así es posible beneficiarse de las ventajas de cada uno (Roche, 2016).

## 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa

Una forma de cuantificar la expresión de un gen es mediante una PCR cuantitativa, también conocida como PCR a tiempo real. Esta se basa en los mismos pasos de una reacción de cadena polimerasa convencional, con la modificación de que una sonda fluorescente se incorpora en la doble hebra generada para medir la cantidad que se está amplificando de la misma. Empleando la detección de la sonda es posible realizar una cuantificación de la cantidad original de templado agregado (Vandesompele, 2012). La unidad básica de medida es el ciclo umbral (Ct), que indica el punto en que se cruza un nivel umbral determinado. Este se determina mediante la irradiación de la fluorescencia generada por la acumulación del producto amplificado. Es posible realizar una cuantificación de dos formas: relativa o absoluta (Farrell, 2010). A continuación, se describen ambas técnicas:

### a. Cuantificación relativa:

Esta variante de la técnica permite el análisis de cambios de expresión de un gen en respuesta a algún tratamiento mediante su comparación con un gen de referencia previamente normalizado. Es importante tener en cuenta que este no debe variar en respuesta al tratamiento que se está analizando. La principal diferencia respecto a la cuantificación absoluta es que no requiere de una curva de calibración (Vandesompele, 2012).

**b. Cuantificación con curva estándar relativa:**

Este método permite la determinación del cambio de expresión de un gen específico en relación con un gen de referencia de la misma muestra. A diferencia de una cuantificación relativa, se emplea una curva estándar con diluciones seriadas de la muestra con concentración conocida. De acá, es posible comparar niveles de expresión de genes en tejidos, contrastar expresión génica en muestras con tratamientos determinadas, entre otros tratamientos (Vandesompele, 2012). En especial, esta técnica se emplea en casos en el que la eficiencia del gen de interés y genes de referencia no son equivalentes. Este es el escenario que se presenta cuando se trabajan con la cascada de determinación sexual en mosquitos (Meléndez, 2018).

## V. ANTECEDENTES

Esta investigación se basa en distintos estudios que se han realizado previamente:

### A. Expresión de isoformas específicas de macho en pupas y adultos hembra

En un estudio realizado por Paiz (2018) se buscaba amplificar la sección conteniendo isoformas específicas de sexo mediante cebadores que hibridan en regiones comunes de *dsx* para hembras y machos y que flanquean la región específica de hembras. Se esperaban largos fragmentos para las dos isoformas de hembra y unos cortos (134 pb y 762 pb) para machos. No obstante, solamente se observaron las bandas correspondientes a las isoformas de macho, tanto en pupas como adultos hembra y macho. Esto evidencia que la isoforma masculina se encuentra expresada también en hembras. No obstante, es importante mencionar que la intensidad de la banda era considerablemente menor en hembras.

### B. Cebadores de amplificación de 154 y 782 pb del gen *dsx*:

Se utilizarán los cebadores diseñados por Paiz (2018), para la amplificación de los fragmentos de interés. Luego de su amplificación se tomarán los fragmentos y se clonarán para su secuenciación. La secuencia de estos se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencias de cebadores elaborados por Paiz (2018) para la amplificación de los fragmentos de interés

<b>Fragmento (pb)</b>	<b>Cebador forward</b>	<b>Cebador reverse</b>
<b>154</b>	5'-TGA GTT ACC CCT GGG AAA TG-3'	5'-TGA AGT CTA CAA TCG TTT TGG TGC C-3'
<b>728</b>	5'-TGA GTT ACC CCT GGG AAA TG-3'	5'-CCT CGT GAA CTG GTG ACT TG-3'

### C. Evidencia de expresión de isoformas específicas de hembra en *A. albimanus*

En sus estudios, Papa *et al.* (2017) publicaron datos de expresión del gen *doublesex* de *A. albimanus* en los que se reflejaba la posible localización de ambas isoformas femeninas. Las lecturas de la expresión en tejido reproductor como de todo el mosquito mostraron la presencia de las isoformas específicas femeninas principalmente en hembras, con algunas lecturas también registradas en machos. En este estudio se busca verificar la presencia de estas isoformas específicas tanto empleando pupas y adultos de ambos sexos.

#### D. Cebadores diseñados para formas específicas de hembra en *A. albimanus*

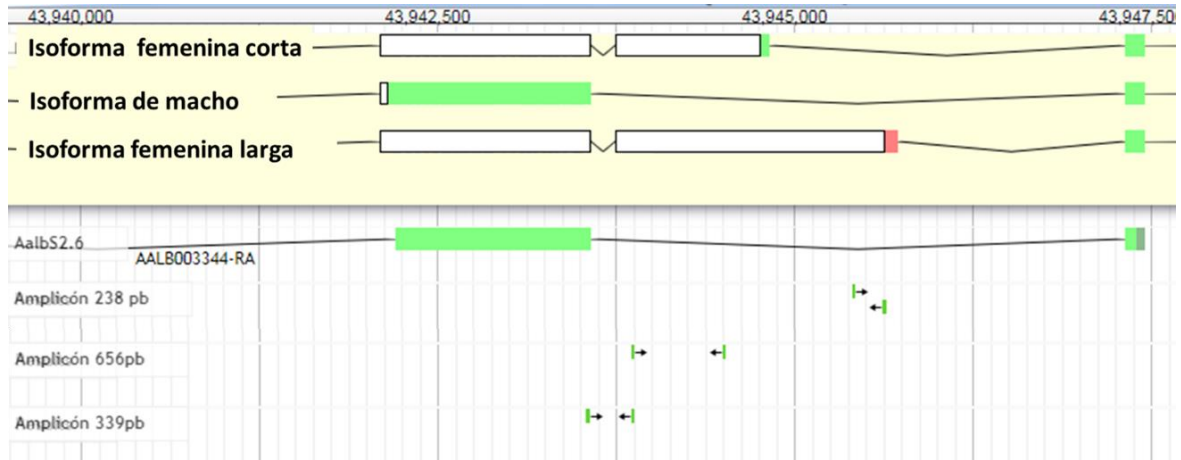
Partiendo de los datos de expresión de ARN de Papa *et al.* (2017), Argueta y Lara (2019) diseñaron cebadores para PCR convencional que pudieran amplificar las isoformas específicas femeninas del gen *dsx*. Se elaboraron sets que amplificarán la parte específica de la isoforma más grande y segmentos que hibridarán con una sección común de ambas isoformas específicas. Estos se utilizarán en este estudio para la verificación de las isoformas en pupas y adultos de ambos sexos. Las secuencias de los cebadores diseñados se presentan en el Cuadro 3 y su ubicación en la isoforma se muestra en la Figura 11.

Cuadro 3. Secuencias de cebadores elaborados por Argueta y Lara (2019) para la amplificación de los isoformas femeninas

<b>Amplicón (pb)</b>	<b>Cebador forward</b>	<b>Cebador reverse</b>	<b>Diana de amplificación</b>
<b>238</b>	5'-GAT AAA CTT CCG ACC TGC CG-3'	5'-TGC TAC TAA CAG ATC GCA CA-3'	Isoforma femenina larga
<b>656</b>	5'-AAG AGG GAG AGT GCG TGA GA-3'	5'-GCG GTT TCG GTT TGA TTG AT-3'	Sección común de isoformas femeninas
<b>339</b>	5'-ATC AAT CAA ACC GAA ACC GC-3'	5'-CTT CAG GAG CTT CTT GTT-3' *	Exón común de macho y hembra con exón de isoformas femeninas

\*Este cebador fue diseñado por Paiz (2018) pero se complementará con uno diseñado por Lara y Argueta (2019).

Figura 11. Localización de los cebadores de *dsx* diseñados por Argueta y Lara (2019) en las isoformas específicas de hembra



\*Cada rectángulo indica un exón y una línea denota a los intrones. El color verde y rojo en los exones indican regiones codificantes. Las blancas, en cambio, son regiones no codificantes.

Elaborada con la herramienta Apollo de VectorBase

### E. Silenciamiento efectivo de isoforma femenina de *dsx* para eliminación de hembras en *Anopheles gambiae*

En un estudio realizado por Taracena *et al.* (2019) se demostró un silenciamiento efectivo del gen *dsx* para la eliminación de las hembras en *Anopheles gambiae*. Aquí se evidenció una disminución en la cantidad de hembras viables así como una reducción significativa del 66% en la expresión del gen únicamente en este sexo. Se observó que el silenciamiento no fue total, probablemente por el hecho de que únicamente se utilizó como diana una de las isoformas. Por ello, en este estudio se busca encontrar una región en ambas isoformas específicas de hembra que pueda ser silenciada, y eliminarlas así por completo.

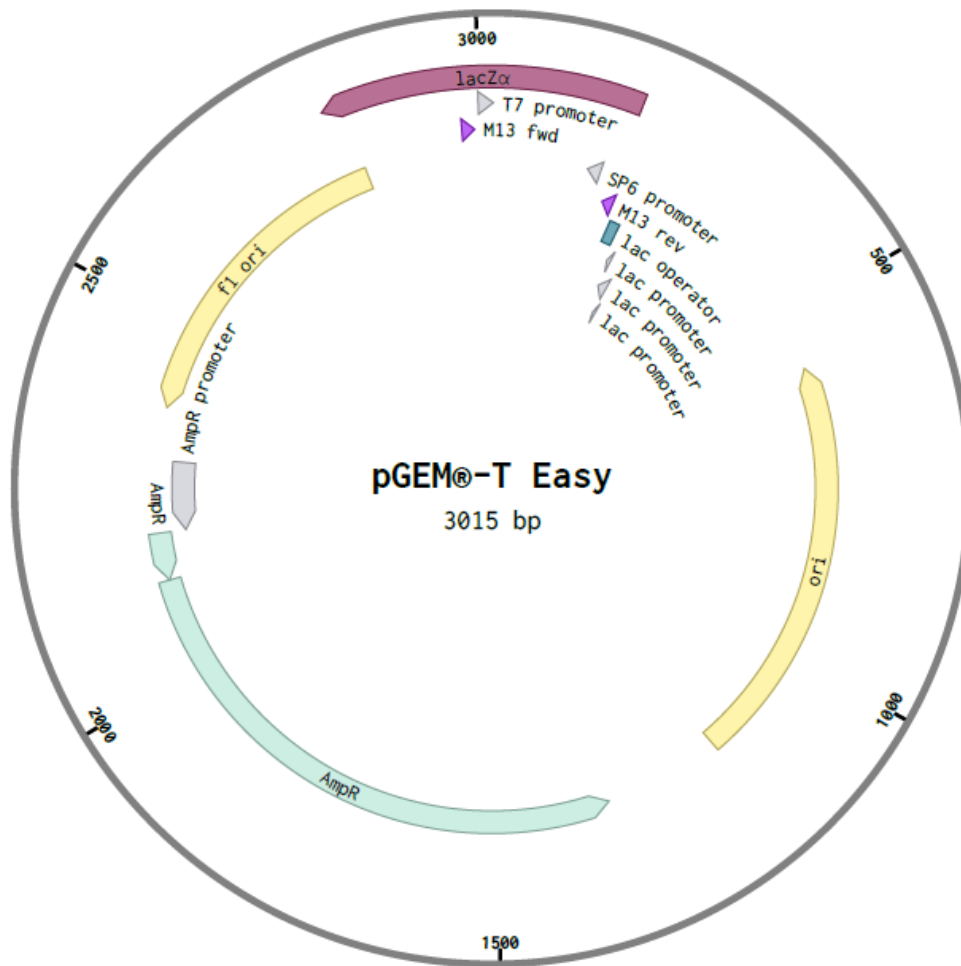
### F. Eliminación de hembras de la población de *Aedes aegypti* mediante el silenciamiento de *dsx*

La investigación realizada por Whyard *et al.* (2015) demostró la eliminación completa la población femenina de mosquitos de *Aedes aegypti*. Esto fue alcanzado mediante la alimentación de larvas con ARNdH específico para la región común de las isoformas femeninas del gen *doublesex*. Fue posible notar que la cantidad de hembras que se desarrollaron era menos de un 1% de la obtenida para machos. Esta diferencia respecto a lo reportado por Taracena, *et al.* (2019) puede deberse a que en este estudio únicamente silenciaron una de las isoformas femeninas de *dsx*. Además, se observó que el silenciamiento evitaba que las hembras emergidas se alimentaran con sangre y, por ende, generaran progenie.

## G. Vector de clonación pGEM-T Easy

Se utilizará como vector de clonación pGEM-T Easy vector de Promega. Este cuenta con los componentes mostrados en la Figura 12. Dentro de estos, son de especial importancia para esta investigación el promotor T7; la presencia de *lacZ* con las secuencias del operador *lac*; y sitios de hibridación para los cebadores universales M13. El sitio de clonación múltiple se encuentra diez pares de bases río abajo al promotor T7.

Figura 12. Mapa del vector pGEM-T Easy (Promega)



Fuente: Promega utilizando Benchiling (2019)

## VI. METODOLOGÍA

### A. Sitio de estudio

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Estudios en Salud (CES) y Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle de Guatemala.

### B. Sujetos de estudio

Se utilizó la cepa Sanarate de zancudos *Anopheles albimanus* del insectario de la Universidad del Valle de Guatemala. Esta fue recolectada en Sanarate, ubicado en El Progreso, Guatemala. La cepa se estableció en los años de 1970. Las hembras se alimentan empleando sangre de carnero.

### C. Diseño, enfoque y tipo de investigación

Se trata de una investigación experimental verdadera con un enfoque de investigación cuantitativo.

### D. Tipo y tamaño de muestra

Se llevó a cabo un muestro probabilístico aleatorio simple para tomar a los sujetos de los cuales se extraerá el ARN total.

### E. Criterios de inclusión y exclusión

Para la extracción de ARN se emplearon pupas macho o hembras, adultos de un día de emergidos y de cinco días de emergidos. No se tomaron en cuenta mosquitos de los que no pueda identificarse el sexo claramente.

### F. Variables

Las variables que están involucradas en este trabajo de investigación se describen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Variables involucradas en el experimento

Nombre	Definición	Naturaleza	Interrelación	Unidades de medición
Competencia de las células de <i>E. coli</i>	Estado óptimo de la bacteria para la recepción de plásmidos de interés.	Cuantitativa	Independiente	Colonias
Tamaño del inserto del gen <i>dsx</i>	Cantidad de pares de bases del gen <i>dsx</i> amplificadas para su posterior secuenciación	Cuantitativa	Independiente	Pares de bases (pb)
Presencia de inserto del gen	Ligación del inserto de interés del gen <i>dsx</i> al plásmido pGEM-T clonado en cepa de <i>E. coli</i> XL1 Blue	Cualitativa	Independiente	Presente/Ausente
Temperatura	Temperatura en el lugar de desarrollo de los estadios de larva de <i>A. albimanus</i> .	Cuantitativa	Independiente	°C
Humedad	Porcentaje de humedad en el lugar de desarrollo de los estadios de larva <i>A. albimanus</i> .	Cuantitativa	Independiente	%
Estadio de <i>A. albimanus</i>	Crecimiento y maduración de las larvas de <i>A. albimanus</i> a pupas y adultos.	Cualitativa	Independiente	Pupa/Adulto



Nombre	Definición	Naturaleza	Interrelación	Unidades de medición
Tiempo de emergencia de <i>A. albimanus</i>	Los días que lleva el mosquito adulto de haber emergido	Cualitativa	Independiente	Número de días
Sexo de pupas y adultos de <i>A. albimanus</i>	Sexo resultante de los organismos de <i>A. albimanus</i> desarrollados.	Cualitativa	Independiente	Hembra/Macho
Presencia de las isoformas específicas de sexo de <i>dsx</i>	Presencia de cada una de las isoformas específicas de sexo en adultos y pupas.	Cualitativa	Independiente	Presente/Ausente
Expresión de las isoformas del gen <i>dsx</i>	Cambio en la expresión del gen <i>doublesex</i> en relación a un gen de referencia de mantenimiento.	Cuantitativa	Dependiente	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ; la expresión relativa del gen.
Concentración de ARNdh producido	Cantidad de nanogramos por microlitro de ARN de doble hebra generado a partir de bacterias transgénicas.	Cualitativa	Independiente	ng/ $\mu$ L

## G. Hipótesis

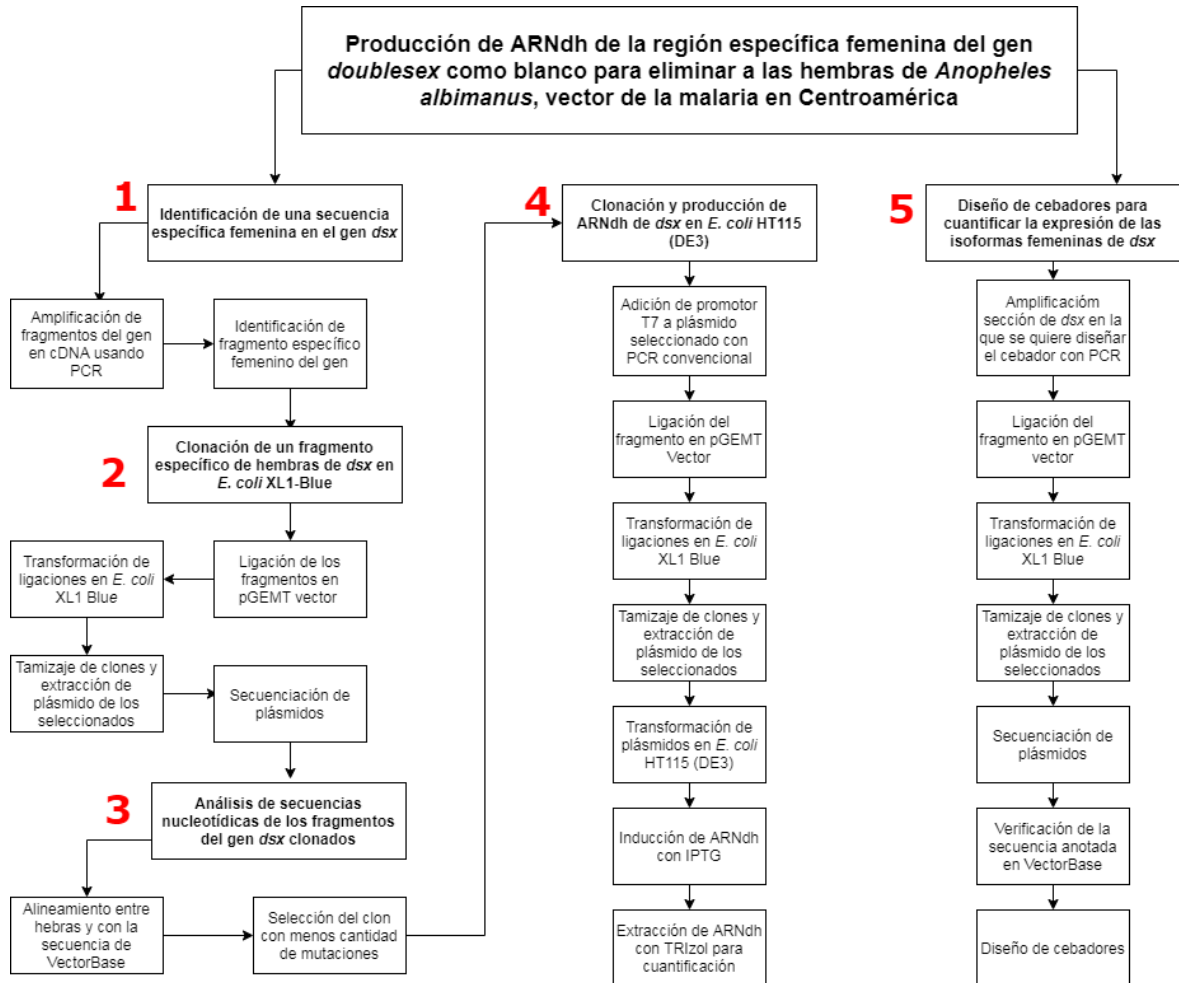
Hipótesis nula: Existe un fragmento específico para hembras del gen *dsx* de *Anopheles albimanus* para el cual es posible generar ARNdh.

Hipótesis alternativa: Un fragmento específico para hembras del gen *dsx* de *Anopheles albimanus* es inexistente por lo que no posible emplearlo para generar ARNdh.

## H. Metodología

A continuación, se presenta un diagrama de procesos sobre la metodología que se llevó a cabo.

Figura 13. Diagrama de la metodología



1. Identificación de un fragmento específico de hembra en las isoformas femeninas del gen *doublesex*.

### a. Extracción de ARN total de *Anopheles albimanus*

La extracción de ARN total de pupas y adultos hembras y machos de *A. albimanus* para usarlo como templado en la generación de ADNc se llevó a cabo empleando el kit. SV Total RNA Isolation System Z3100 de Promega. Para ello se colocaron 15 adultos macho, 10 adultos hembra o 5 pupas en un tubo de 1.6mL con buffer de lisis y se maceró con un pistilo hasta homogenizar la mezcla. Luego se añadieron 350  $\mu$ L del buffer de dilución, se mezcló, centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y se transfirió 475  $\mu$ L del lisado a un tubo nuevo. Se agregaron 200  $\mu$ L etanol y se transfirió a la columna. Se centrifugó 1 minutos a 13000 rpm, agregó 600  $\mu$ L de solución de lavado y luego se repitió la centrifugación. A continuación, se preparó una mezcla de

incubación de ADNAsas para eliminar cualquier remanente de ADN (400  $\mu\text{L}$  de Yellow Core Buffer, 5 $\mu\text{L}$  tanto de  $\text{MnCl}_2$  como de ADNasa 1). Después de incubar 15 minutos se volvió a centrifugar y se realizaron lavados con la solución respectiva (primero 600 $\mu\text{L}$  de la solución de lavado y luego 250 $\mu\text{L}$ ). Previo a la segunda centrifugación se transfirió la columna a un tubo nuevo y se cuantificaron los valores de ARN con NanoDrop. El procedimiento se describe a detalle en el POE VI.

#### b. Generación de ADN complementario

El ARN obtenido en el paso a, se trató con ADNAsas y luego se sintetizó el ADN complementario (el procedimiento se describe en el POE VII). Brevemente, se calculó la cantidad de ARN necesaria para alcanzar 1  $\mu\text{g}$  de este en cada tubo. 1  $\mu\text{g}$  de ARN se trató ADNAsas en un volumen final de 10 $\mu\text{L}$ . Se incubaron las muestras a 37°C por una hora y luego se agregó 1  $\mu\text{L}$  de una solución para detener la acción de las enzimas. Se incubó a 65°C durante 10 minutos. Se procedió a verificar la acción de las ADNAsas mediante la amplificación de actina, mediante una PCR convencional. Dado que no apareció ninguna banda, se procedió a generar ADNc empleando el kit GoScript Reverse Transcription System A5000-A5001 de Promega. Para este se agregó 1  $\mu\text{L}$  de cebadores Oligo (dT) y 1  $\mu\text{L}$  de cebadores aleatorios, a manera de tener un volumen total de 11  $\mu\text{L}$ . Luego se incubó a 70°C por cinco minutos y se preparó un máster mix para que pudiera darse la reacción de transcriptasa reversa (agua libre de nucleasas, buffer, cebadores, inhibidor de ribonucleasas y la transcriptasa reversa). Cuando terminó, se realizó una PCR que amplificó un gen de mantenimiento (actina) y verificar así la eficiencia de la reacción. Se alicuotó el ADNc y se congeló en -80°C.

#### c. Amplificación de fragmentos de isoformas específicos de hembra con PCR convencional

Se utilizó el 1  $\mu\text{L}$  de ADNc sintetizado en el paso anterior como templado para una PCR convencional. Se emplearon los cebadores diseñados por Argueta y Lara (2019) (Cuadro 3) para amplificar las isoformas específicas de hembra en *A. albimanus*. La amplificación se realizó usando ADNc tanto de hembras como machos para confirmar la especificidad de las isoformas femeninas. Se empleó la enzima Taq Platinum HS II de Invitrogen, con concentraciones finales de cebadores de 0.2 $\mu\text{M}$  en un volumen total de la reacción de 20  $\mu\text{L}$ . Se verificaron los resultados corriendo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se seleccionaron los fragmentos que resultaron ser específico para las hembras para proceder con el resto del procedimiento.

## 2. Clonación de la región compartida de las isoformas femeninas del gen *doublesex* en bacterias *E. coli* XL1 Blue y HT115 (DE3)

#### a. Ligación de distintos fragmentos de las isoformas del gen *doublesex* en plásmidos pGEM-T Easy vector

Se utilizó el kit de ligación pGEM-T Easy vector de Promega. Aquí se insertaron 3 fragmentos localizados entre el exón 4 y 6 del gen *dsx* de ADNc que eran específicos para hembras o de interés especial. En este se inició cuantificando el producto de PCR y diluyendo a manera de tener 4ng/ $\mu\text{L}$ . A continuación,

se centrifugó y se agregó 5  $\mu\text{L}$  del buffer de ligación, 50 ng del vector, 2  $\mu\text{L}$  del producto, 1  $\mu\text{L}$  de la ligasa y agua para ajustar un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ . Se mezclaron los reactivos y se incubaron toda la noche a 4°C. Luego se almacenó a -20°C. La ligación se describe en el procedimiento operacional estándar I (POE I) presente en la sección de Anexos.

b. Generación de *E. coli* XL1 Blue y HT 115 (DE3) competentes.

Se elaboraron células competentes de *E. coli* cepas XL1-Blue y HT115(DE3) para poder realizar las transformaciones con las ligaciones previamente realizadas. Para clonar el fragmento de interés era útil únicamente la cepa XL1 Blue. Sin embargo, para cumplir objetivos posteriores se requería también de la otra cepa. Por esto, se generaron alícuotas de células competentes de ambas cepas en el mismo paso. Para ello se siguió el método de INOUE siguiendo el protocolo de INOUE con algunas modificaciones (descritas a detalle en el POE II). Brevemente, se inició con un pre-cultivo de 25 mL de LB con una colonia bacteriana crecida por 6 horas a 37°C. De este se partió para dejar tres cultivos toda la noche a 18°C y del cual se monitorearon las densidad óptica al día siguiente. Todos los cultivos tenían 64 mL de SOB, 125  $\mu\text{L}$  de tetraciclina 500X y precultivo (2 mL, 1 mL y 500  $\mu\text{L}$ ). El que llegó a 0.55 primero, se transfirió a un baño de hielo por 10 minutos y se centrifugó por a 4°C a 2500g por diez minutos. Después de volver a resuspender con INOUE dos veces (una en 10 mL y luego en 3mL), con una centrifugación entre ellas con las mismas condiciones. Por último, se agregó 150 $\mu\text{L}$  DMSO, se dejó reposar 10 minutos y se alícuotó en 100 $\mu\text{L}$  para su uso posterior. Se congelaron con etanol absoluto y se almacenaron a -80°C.

c. Transformación de *E. coli* XLI Blue con las ligaciones de *dsx*

Se llevó a cabo la transformación mediante choque térmico con las bacterias competentes y las ligaciones previamente preparadas. Para ello se agregó 1  $\mu\text{L}$  de la ligación a cada alícuota de células competentes. Se dejaron en baño de hielo por 15 minutos, luego se transfirieron a un baño de agua a 42°C y se volvieron a trasladar al hielo por 2 minutos. Al terminar, se agregó SOC y se dejaron crecer por una hora. De ello se tomaron 250 -300  $\mu\text{L}$  y se sembraron en placas de LB con tetraciclina, carbenicilina, X-Gal e IPTG. El procedimiento se describe en el POE III en la sección de anexos. Al día siguiente se realizó la selección de clones que resultaron positivos mediante el Blue-White Screening presente en las placas luego de la incubación.

d. Tamizaje de clones que contienen el plásmido de interés

Se evaluó la estabilidad y presencia de los clones que contenían los insertos de *dsx* de interés, utilizando la técnica de PCR de colonia como se describe en al POE IV en la sección de anexos. Para este se realizó un máster mix con un volumen final de reacción de 15  $\mu\text{L}$  y se utilizó como muestra una colonia blanca directa de la placa. Se empleó la enzima Go Taq Hot Start Master Mix a una concentración final de 1X y los cebadores a una de 0.5  $\mu\text{M}$ . Luego se corrió el programa en el termociclador. Se empleó el cebador universal M13F y un cebador interno específico para cada inserto a evaluar. Esto permitió verificar que contuvieran el inserto de interés en el sentido adecuado. Se utilizó como control positivo ambos cebadores

universales- M13F y M13R - que amplifican el vector pGEM-T Easy, partiendo de un plásmido con inserto conocido. EL procedimiento se verificó con una corrida electroforética en un gel de agarosa al 2%. Se tomaron como positivos aquellos clones que tuvieran una única banda del tamaño esperado.

e. Extracción de plásmido de inserto en *E. coli* XL1 BLUE

Se realizó una extracción de los plásmidos para su posterior secuenciación y adición del promotor T7. Para ello se utilizó el kit PureYield Plasmid Miniprep System de Promega (el procedimiento se encuentra descrito en el POE V). En resumen, se inició con un cultivo de toda la noche, que fue centrifugado y resuspendido en buffer TE. Luego se añadió el buffer lisis y se dejó actuar. Para interrumpir su acción, después de dos minutos se añadió una solución de neutralización fría y se centrifugó. Se transfirió a un columna, se agregó una solución de remoción de endotoxinas y se centrifugó nuevamente. Por último, se añadió solución de lavado, se centrifugó y se eluyó con otro buffer. Se procedió a cuantificar con un NanoDrop One y a almacenar a -20°C.

f. Secuenciación de los plásmidos ligados

Se secuenció los productos obtenidos de la extracción de plásmidos en el CDC, Estados Unidos. Aquí ellos emplean la técnica de *Sequencing Cycle* para preparar los productos para el secuenciador. Se inicia preparando dos reacciones por cada muestra purificada; una para la hebra sentido y otra para la antisentido. Usualmente es suficiente emplear entre 1 y 2 µL para una reacción con un volumen total de 10 µL. Luego se corre un programa estandarizado con 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C durante 4 minutos con un total de 25 ciclos. A continuación, se inicia el BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Para este se toman los productos obtenidos previamente y mezclan con solución SAM y solución BigDyeXTerminator, cuyos volúmenes se agregan a una pozo determinado. Luego se sella la placa con film adhesivo y se centrifuga. A continuación, se corre el módulo BigDye XTerminator en la placa usando un 3730/3730x DNA Sequencer (Applied Biosystems).

g. Análisis de las secuencias de los fragmentos de las isoformas específicas de hembra

Este análisis se realizó mediante herramientas bioinformáticas como VectorBase, ClustalMuscle, Blast y FinchTV. En pocas palabras, se extrajo el fragmento de interés del plásmido abriendo los cromatogramas en FinchTV. Aquí se determinó la calidad y resolución de los electroferogramas para asegurar si podían ser analizados. Luego, se comprobó que las secuencias sentido y antisentido de los clones concordaran empleando un alineamiento ClustalMuscle. Luego se realizó un alineamiento con la secuencia reportada en la base de datos y se identificaron tanto errores en la anotación, como la posición a la que corresponde el fragmento en cuestión. La secuencia original del gen reportado para *A. albimanus* se tomó de VectorBase (AALB003344-WATERHOUSE\_00003 y AALB003344-WATERHOUSE\_00004, ambas actualizadas el 15 de junio de 2019). Se seleccionaron los clones que tuvieron más similitud entre ellos y a la secuencia reportada en la base de datos.

### 3. Producción de ARNdh de una región femenina específica del gen *doublesex* en bacterias *E. coli* HT 115 (DE3)

#### a. Adición de promotor T7 al plásmido seleccionado para la secuencia específica femenina

Se utilizó el plásmido de los clones seleccionados en el paso anterior como templado para una PCR convencional. Para adicionar el promotor se utilizó el cebador sentido específico del fragmento de *dsx*, y el cebador antisentido del inserto con la secuencia codificante del promotor. Se verificaron los resultados corriendo una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se seleccionaron los fragmentos que presentaron una banda intensa del tamaño esperado.

#### b. Ligación y transformación de fragmentos de *dsx* con promotor T7 en bacterias *E. coli* XL1 Blue

Se utilizó el kit de ligación pGEM-T Easy vector de Promega, de la misma forma como se describe en el inciso d. Luego se transformó en la cepa *E. coli* XL1 Blue, ya que se necesitaba su capacidad de clonación para la producción de plásmido que pudiera ser secuenciado. Este procedimiento se realizó como describe en el inciso 2c. Luego se tamizaron los clones de la forma especificada en el inciso 2d.

#### c. Extracción de plásmido y secuenciación para confirmar la presencia del promotor T7

Se realizó una extracción de los plásmidos para su posterior secuenciación y verificación de la presencia del promotor T7. Para ello se utilizó el kit PureYield Plasmid Miniprep System de Promega, descrito en el inciso h. El producto se secuenció como se detalla en el inciso i. Se emplearon los softwares de FinchTV y ClustalMuscle para verificar la presencia del promotor. Por último, se seleccionaron los clones que tuvieran una menor cantidad de errores en la secuencia reportada en la base de datos VectorBase (mismo procedimiento descrito en el inciso 2g).

#### d. Transformación de *E. coli* HT115 (DE3) con los fragmentos de *dsx* y el promotor T7

La transformación se realizó mediante choque térmico, como se describe en el inciso 2c, utilizando las células competentes generadas en el inciso 2b y los plásmidos seleccionados del inciso 3c. Se realizó luego una verificación de la presencia del inserto utilizando un cebador universal sentido y un antisentido específico del gen.

#### e. Inducción de ARNdh de fragmentos específicos de hembras en bacterias *E. coli* HT 115 (DE3)

Para iniciar la inducción de ARNdh de fragmentos específicos de hembra se siguió el procedimiento descrito en el POE VIII de la sección de anexos. Brevemente, este consistió en la siembra en placas de la bacteria transgénica y su incubación de 18 horas a 37°C. A continuación, se picó una colonia aislada en medio LB con tetraciclina y carbenicilina. El cultivo creció toda la noche con agitación moderada y luego se diluyó en 2XYT y antibióticos. Se monitoreó su crecimiento hasta que llegó a una densidad óptica de 0.4, momento en el que se indujo con IPTG y se siguió incubando. Luego de dos horas se alicuotaron dos alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf estériles antes y después de inactivar con calor. Estas se utilizaron para la extracción y cuantificación de ARNdh producido.

#### f. Extracción de ARNdh con TRIZol

Se tomó una alícuota de cultivo inducido y se centrifugó 10 minutos a 4°C. Luego se resuspendió el pellet con PBS y se lisó el cultivo hirviéndolo dos minutos. A continuación, se agregó buffer lisis con proteinasa K, se incubó a 65°C y se inactivó la enzima con TRIZol. Se agregó ARNasa y se incubó a 37°C por cinco minutos. Seguido a esto se añadieron 500 µL de TRIZol, se incubó a temperatura ambiente y mezcló con cloroformo. Luego se centrifugó la muestra y se removió la fase superior. Se trasladó a otro envase y se trató con isopropanol y etanol. Por último, se resuspendió en 20µL de agua libre de nucleasas, se incubó y cuantificó con NanoDrop. Se verificó la integridad del ARN con un gel al 1% de agarosa. El procedimiento detallado se describe en el POE IX.

### 4. Diseño de oligonucleótidos para la cuantificación de las isoformas femeninas del gen *doublesex* en *A. albimanus*

#### a. Verificación de la anotación de la secuencia en VectorBase

Se amplificó la región en la que se quieren diseñar los nuevos cebadores empleando cebadores diseñados por Argueta y Lara (2019) y por Paiz (2018). Estos fragmentos se ligaron, se transformaron en *E. coli* XL1 Blue, se extrajo el plásmido y se secuenció (inciso d y del f-i de esta sección). A continuación, la secuencia se analizará contra la reportada en VectorBase para determinar cualquier error en la anotación y diseñar cebadores que hibridicen por completo con el área de interés. El análisis bioinformático se llevó a cabo como se describe en el inciso j de la metodología.

#### b. Diseño de cebadores específicos para cada isoforma

Se diseñaron cebadores que puedan tener alta eficiencia en la técnica de qPCR. Para ello se utilizarán los softwares *Primer3Plus* (Bioinformatics) y *PrimerQuest* (IDT Technologies) insertando la secuencia de las isoformas específicas de sexo del gen *dsx*. Se procedió a analizar los parámetros y seleccionar sets que amplifiquen la isoforma larga y la sección común entre isoformas femeninas. Esto se realizó para poder cuantificar de forma específica la expresión de cada isoforma, sin que interfiera con la otra presente.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

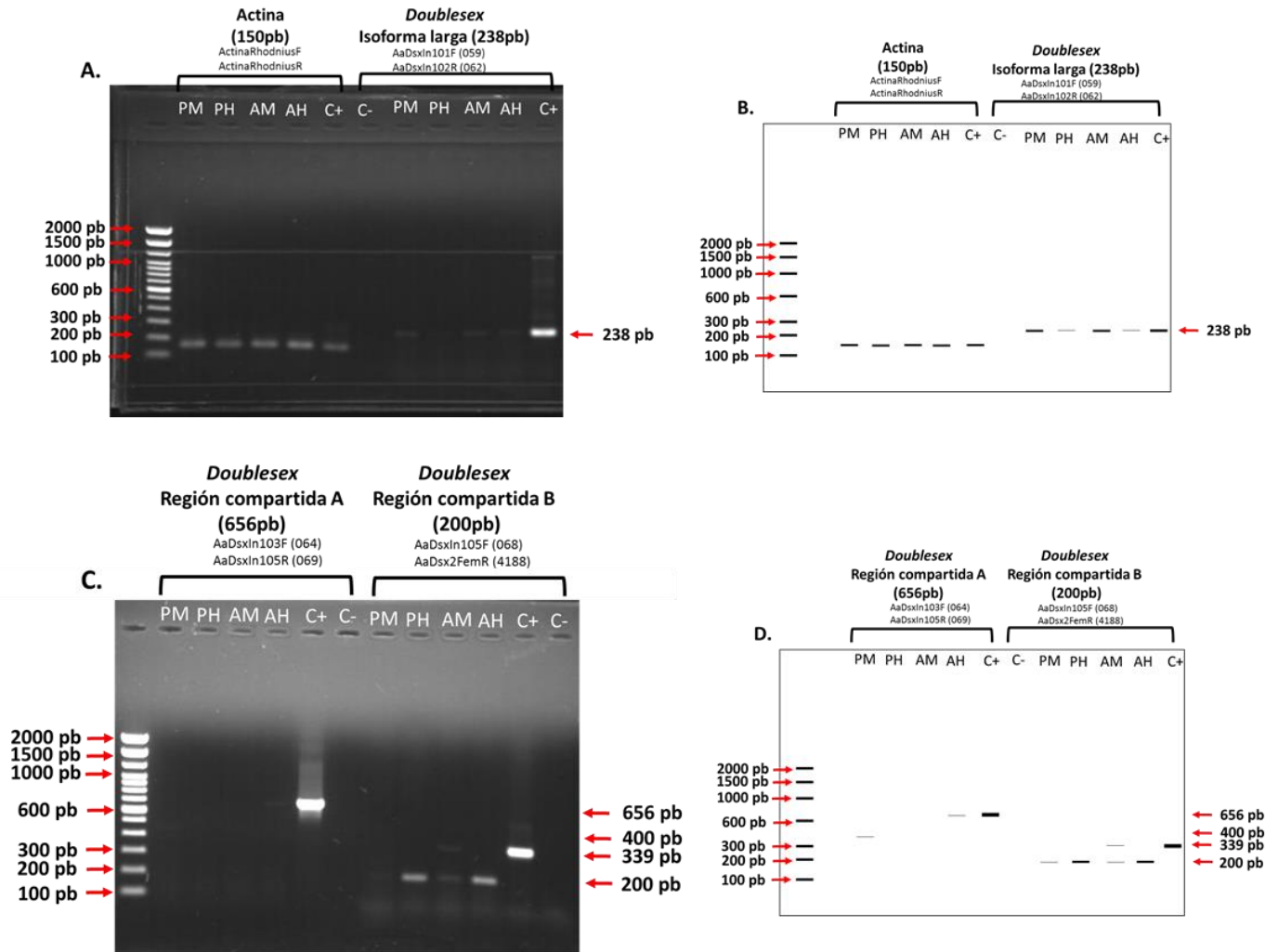
### A. Amplificación de la región compartida de las isoformas femeninas del gen *doublesex*

El objetivo de la amplificación de una región compartida para las isoformas femeninas era confirmar su presencia exclusiva en hembras de *Anopheles albimanus*. Esto se debe a que las lecturas de los análisis del transcriptoma que se utilizaron para diseñar los cebadores (Argueta y Lara, 2019) pertenece a la cepa Stecla de *Anopheles*, por lo que pueden diferir respecto a la local Sanarate. Se amplificaron con éxito los fragmentos de la región de las isoformas femeninas empleando los diferentes conjuntos de cebadores diseñados por Argueta y Lara (2019). Esto se evidenció mediante la observación de la banda esperada en el gel de agarosa al 1%. En la Figura 14 se presentan los resultados para cada uno de los sets de cebadores.

Para todos los conjuntos de cebadores utilizados (Cuadro 3, en antecedentes) se esperaba la presencia de una banda únicamente en las muestras que contenían ADNc de hembras (pupas y adultos de un día). Sin embargo, se obtuvieron resultados distintos a este. Al observar la Figura 14A, cuyo objetivo era la amplificación de la isoforma femenina larga, se esperaban bandas de 238 pb en las muestras de hembras. En el gel se observan las bandas de tamaño esperado en todas las muestras utilizadas (machos y hembras). Las bandas femeninas fueron levemente más fuertes que las masculinas. Sin embargo, todas fueron tenues. Si bien esto podría deberse a degradación en el ADNc utilizado, se descarta la posibilidad ya que el control positivo de actina se amplificó simultáneamente y demostró una amplificación adecuada. Es posible observar que la actina tiene una amplificación intensa en los estadios utilizados. Se utiliza este gen ya que al ser uno de mantenimiento, es expresado en todo momento por la célula. Por ello, siempre debería poder ser amplificado. La banda obtenida de este control positivo debe ser definida e intensa por la importancia del gen en la vida celular. Debido a esto la intensidad de la banda refleja la calidad del ADNc. Si la amplificación del gen demuestra estar degradada, es altamente probable que el ADNc lo esté también. En este caso, todas las bandas demuestran buena calidad del ADNc utilizado para amplificar. Para cada conjunto de cebadores se utilizó como control positivo ADNg, lo cual permite asegurar la correcta amplificación de los cebadores, ya que el ADNg cuenta con todas las secuencias del gen *dsx* de interés. Estos resultados obtenidos evidencian que la isoforma femenina larga está siendo expresada en los machos, y no es específica para las hembras. Lo indicado anteriormente concuerda con lo reportado en VectorBase por Papa *et al.* (2017), donde se presentan algunas lecturas de ARNm para esta sección del gen en machos.



Figura 14. Expresión de fragmentos de las isoformas femeninas de *dsx* en ambos sexos



**Leyenda de la Figura 14. Expresión de fragmentos de las isoformas femeninas de *dsx* en ambos sexos.** Electroforesis en gel de agarosa 1%, con 6  $\mu$ L cargados para cada muestra y 5  $\mu$ L escalera Perfect Ladder 100pb. En donde: PM, PH, AM y AH, corresponden a pupa macho, pupa hembra, adulto macho y adulto hembra, respectivamente. C+ y C- corresponden al control positivo y negativo. En la parte superior de los pozos se indica el código de los cebadores utilizados para la amplificación. El conjunto de actina representa el control positivo para el ADNc. Los controles positivos para cada set se realizaron con ADNg. **A.** Amplificación del control positivo de actina y del conjunto de cebadores que amplifican la isoforma larga específica femenina de *dsx* (ver Figura 11, amplicón 238 pb). **B.** Boceto de las bandas obtenidas en A. **C.** Amplificación de dos fragmentos de la región compartida entre isoformas femeninas de *dsx* (ver Figura 11, amplicón 656 pb y 339 pb). **D.** Boceto de las bandas obtenidas en C.

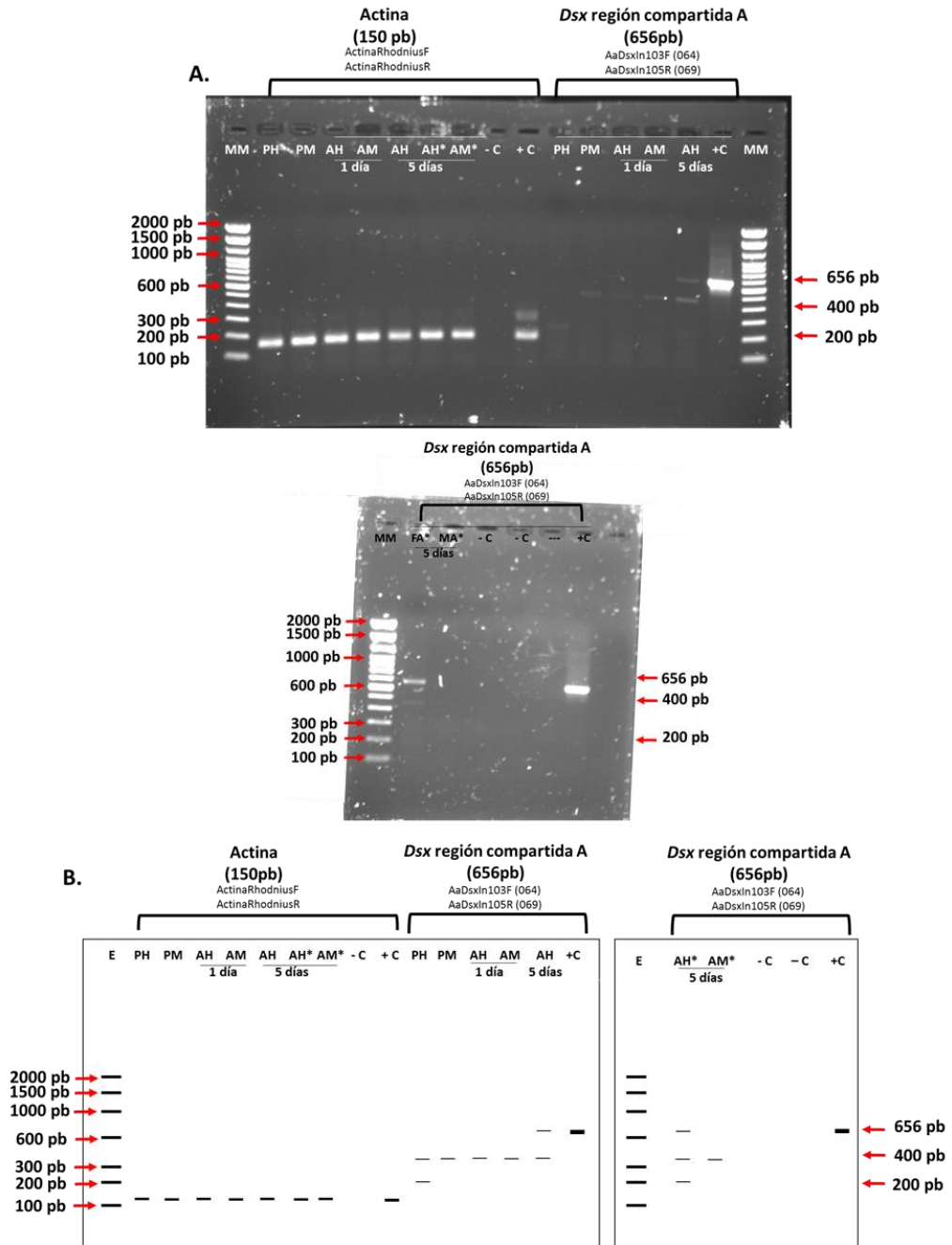
Fuente: Elaboración propia

En el caso de la Figura 14C, se observan dos distintos juegos de cebadores que tenían como objetivo amplificar la región específica compartida entre las isoformas femeninas del gen (ver diagrama de amplificación de los cebadores, Figura 11). El primero (conjunto A) buscaba amplificar un segmento encontrado dentro de las isoformas con un tamaño esperado de 656 pb. Aquí se evidencia una única banda con el tamaño esperado (656pb) en la muestra de adulto hembra de un día. Sin embargo, se obtuvo también una banda no esperada de 400 pb en la muestra de pupa macho. Para el caso del segundo conjunto de cebadores (conjunto B, Figura 14C), se amplificó una sección entre un exón común de machos y hembras (exón 6) y el área compartida de las isoformas femeninas. Según los datos bioinformáticos, debe obtenerse un fragmento de 200 pb para las hembras. Nuevamente, se evidenció una banda de 200 pb en todas las muestras. Sin embargo, se observó mayor intensidad en las muestras femeninas (adulto y pupa). Este tamaño obtenido (200 pb) es distinto al mostrado en el control positivo (339pb) puesto que hay un pequeño intrón que se elimina durante el empalme. De hecho, en la muestra de adulto macho, puede notarse una banda adicional a la de 200 pb, que denota la presencia de este intrón en el ADNc. El resultado obtenido de esta amplificación corrobora lo visto con la Figura 14A: las isoformas femeninas no están siendo específicas para las hembras, sino que se expresan en ambos sexos. Esto vuelve a tener lógica, corroborando así las lecturas reportadas en VectorBase por Papa. *et al* (2017). Es por ello y por la expresión vista que, a partir de este punto del estudio, se hipotetiza que las isoformas no son específicas femeninas sino isoformas con sesgo hacia hembras. Se requiere de más estudios que permitan conocer cómo y cuánto se expresa cada isoforma en ambos sexos y en todos los estadios del ciclo de vida del mosquito.

De todos los conjuntos de cebadores utilizados, únicamente uno presentó una banda de 656pb específica para la hembra. Este fue el set A de la región compartida entre las isoformas (Figura 14C).

Para corroborar la expresión, se repitió la amplificación de este set adicionando ADNc de adultos de cinco días. Se tomó esta decisión, ya que los datos bioinformáticos del transcriptoma que se utilizaron para la elaboración de cebadores, corresponde a adultos de esta edad (Papa *et al.*, 2017). Este se presenta en la Figura 15, donde se obtuvo con éxito la banda esperada de 656pb únicamente en adultos hembra. No obstante, fue posible notar dos tamaños de bandas amplificadas que no se esperaban: una de 200 pb únicamente en hembras; y una de 400 pb en todas las muestras. Dado que el control negativo no presentó ninguna banda, estos se tomaron como productos de amplificación de los cebadores. Tanto la banda de 200 pb como la de 656 pb podían ser candidatos para silenciar *dsx* por su exclusividad a las hembras. En el caso de 400 pb, se quería identificar si el fragmento correspondía a una sección del gen y determinar cómo se generaba esta banda. Por eso, se decidió clonar los tres tamaños obtenidos para el análisis de su secuencia.

Figura 15. Amplificación de fragmentos específicos de *dsx* con ADNc de adultos de cinco días



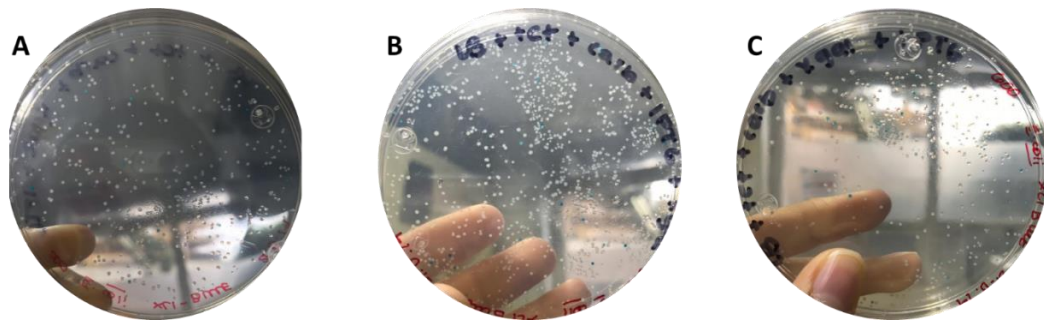
**Legenda de la Figura 15.** Amplificación de fragmentos de isoformas femeninas del gen *dsx* en adultos de cinco días. Electroforesis en gel de agarosa 1%, con 6  $\mu$ L cargados para cada muestra y 5  $\mu$ L escalera Perfect Ladder 100 pb. En donde: PM, PH, AM y AH, corresponden a pupa macho, pupa hembra, adulto macho y adulto hembra, respectivamente. C+ y C- corresponden al control positivo y negativo. En la parte superior de los pozos se indica el código de los cebadores utilizados para la amplificación. El conjunto de actina representa el control positivo para el ADNc. Los controles positivos para cada set se realizaron con ADNg. 1 día o 5 días denota la edad de los mosquitos de los que se extrajo el ARN para sintetizar el ADNc. Las muestras que cuentan con un (\*) indican que se realizó el ADNc partiendo de 275 ng de ARN extraído. **A.** Amplificación de una región compartida entre las isoformas femeninas de *dsx*. **B.** Boceto de las bandas obtenidas en A.

## B. Clonar un fragmento de la región compartida de las isoformas femeninas del gen *dsx* en bacterias *E. coli* XL1-Blue.

Con el objetivo de corroborar la secuencia de las bandas obtenidas en el gel mostrado anteriormente, se decidió ligar el producto de PCR en el vector pGEM-T Easy vector. Dicho vector cuenta con dos nucleótidos timinas en sus extremos. Esto facilita la ligación de productos de PCR que fueron amplificados con Taq polimerasa que dejan adeninas en algún extremo de la secuencia. La ligación se realizó del producto de PCR completo, sin previa purificación de cada banda, ya que en todos los casos las bandas eran muy tenues.

Los fragmentos de 200, 400 y 656 pb se ligaron y transformaron con éxito en bacterias *E. coli* XL1 Blue. Esto se confirmó por la obtención de colonias en placas con agar LB con tetraciclina (12.5µg/mL) y carbenicilina (100µg/mL). Dado que la cepa tiene resistencia a tetraciclina y el plásmido le confiere a carbenicilina, las colonias que crecieron debían tener el vector de ligación. Sin embargo, esto no es suficiente para confirmar la presencia del inserto de interés dentro del plásmido. Por ello se empleó el blue-white screening con el que cuenta esta cepa. Al ser inducida con IPTG y X-Gal, si el inserto se encontraba en el plásmido impediría la complementación necesaria para generar un color azul. De esto es posible deducir que las colonias azules no contaban con ningún fragmento y las blancas eran de interés. El crecimiento obtenido en las placas se muestra en la figura 16, donde hay colonias de ambos colores.

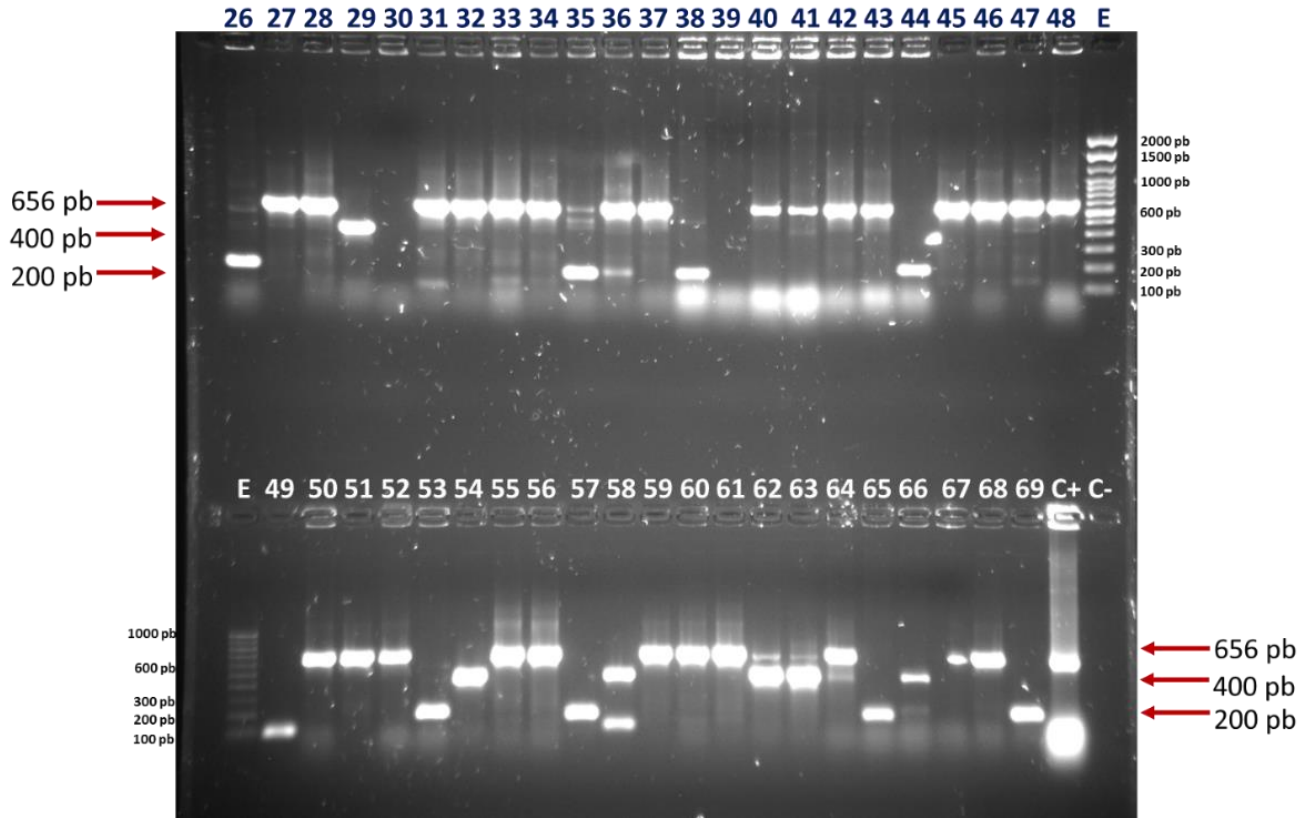
Figura 16. Transformación exitosa de *E. coli* XL1 Blue en placas de LB con tetraciclina 12.5µg/mL, carbenicilina 100µg/mL, IPTG 0.4 mM y X-gal luego de la ligación del producto de amplificación del gen *dsx* que contenía fragmentos de 200pb, 400pb y 656 pb



Fuente: Elaboración propia

Aún si el color de las colonias es un indicador de la presencia del inserto, se comprobó que el fragmento se encontrara dentro de la bacteria. Para ello se realizó un tamizaje de clones utilizando la técnica de PCR de colonias, con los cebadores originales de *dsx* que se emplearon para amplificar el fragmento ligado (Figura 17). Con esto fue posible afirmar que se habían obtenido clones con las regiones previamente amplificadas del gen *dsx*.

Figura 17. Tamizaje de clones con fragmentos de *dsx* de 200, 400 y 656 pb



**Leyenda de la Figura 17. Tamizaje de clones con fragmentos de *dsx*.** Electroforesis en del de agarosa 1 % con 6  $\mu$ L de cada muestra cargada y 5  $\mu$ L de escalera Perfect Ladder 100 pb. El número que se presenta sobre cada pozo es el asignado para cada clon obtenido. El control positivo y negativo se denotan con una C+ y una C-. Como control positivo se utilizó ADNg.

De todos los clones obtenidos se identificaron aquellos que tenían una única banda definida e intensa para los tres tamaños esperados. Se seleccionaron los clones 46, 37, 59 y 71 para el análisis de la banda de 656 pb. Para el fragmento de 400pb se eligieron el 1, 2, 13 y 15. Los clones 3 y 36 se utilizaron para analizar la banda de 200 pb. Dichos clones seleccionados se reestriaron y posteriormente se crecieron en medio LB con antibióticas para extraer plásmido que pudiera enviarse a secuenciar.

Fue posible obtener concentraciones adecuadas para secuenciación en la extracción de plásmido. Además, la mayoría contó con razones de absorbancia que denotaban pureza. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Concentraciones óptimas de ADN plasmidial obtenidas de los clones con fragmentos de *dsx*

Fragmento de <i>dsx</i>	Clon	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
656 pb	46	249.7	1.73	1.30
	37	197.1	1.88	2.58
	59	105.9	1.83	1.63
	71	133.4	1.78	1.44
400 pb	1	333.4	1.74	1.22
	2	182.0	1.90	2.15
	13	367.6	1.75	1.28
	15	218.7	1.87	2.37
200 pb	3	178.2	1.84	2.15
	36	349.7	1.70	1.16

**Leyenda del Cuadro 5.** Concentraciones obtenidas para cada clon en ng/μL. En donde A260/280, indica la razón de absorbancia a 260 nm con 280nm; y A260/230, muestra la razón de absorbancia a 260 nm con 230 nm. Ambas indican razones de pureza.

Fuente: Elaboración propia

### C. Analizar las secuencias nucleotídicas de los fragmentos del gen *dsx* clonados en los plásmidos pGEMT.

Los plásmidos se mandaron a secuencias en ambos sentidos con los cebadores M13. El utilizar dichos plásmidos permite que las regiones de interés queden dentro del área alejada del cebador. De esta forma, el producto ligado queda al centro de la secuencia, donde espera un electroferograma de buena calidad.

Se logró identificar correctamente la secuencia de 656pb dentro del gen *dsx* en la región esperada de las isoformas para todos los clones que se analizaron. Adicional a esto, era de interés encontrar el que tuviese la secuencia de mayor similitud a la reportada en VectorBase para su posterior clonación con promotor T7 para generar ARNdh. Después de realizar un alineamiento entre los clones y la secuencia original se determinó que el clon 59 era el más adecuado para este fin (Figura 17). Esto se debe a que únicamente contó con 13 mutaciones, compartidas también por los otros clones, respecto a las 14 y 15 que tenían los otros (Anexo 10). Debido a que estos cambios en los nucleótidos se encuentran en todos los clones secuenciados, se asumió que eran parte de la cepa local Sanarate. Además, la secuencia de ambas hebras era clara y con alta resolución.

El fragmento de 200 pb se ubicó con éxito dentro de la secuencia de *dsx*. Se realizó el mismo ejercicio detallado en el párrafo anterior, donde fue posible determinar que el clon 36 era el más apto para producir ARNdh. Presentó solo una mutación y alta resolución en la secuencia de sus hebras. Por último, fue

posible identificar que el fragmento tiene un largo específico de 202pb. Un ejemplo del análisis realizado puede observarse en la Figura 16. La evaluación completa de las secuencias para los clones se reporta en el Anexo 10.

Figura 17. Confirmación de la identidad de la secuencia de 656 pb de *dsx* con la secuencia de las isoformas femeninas reportadas en VectorBase

```

Clon59      -----AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
Dsx5       CAAACGCAAGGAGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCT--GAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
          *****
Clon59      AATCATAAGTTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTCTTCAAAGAGGGAGTCT
Dsx5       AATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTCTTCAAAGAGGGAGTCT
          *****
Clon59      TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCC
Dsx5       TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCC
          *****
Clon59      CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTAAAGTGTGCCACAG
Dsx5       CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTAAAGTGTGCCACAG
          *****
Clon59      AAATTTAAAGCGGGCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGGCTGGTGGA
Dsx5       AAATTTAAAGCGGGCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAAATGGGGGGGGGGCTGGTGAA
          *****
Clon59      TCCACCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
Dsx5       TCCACCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
          *****
Clon59      TCCCCTGGTGCACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTATC
Dsx5       TCCCCTGGTGCACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTATC
          *****
Clon59      GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGGAGCGAAGAGAGAT
Dsx5       GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGGAGCGAAGAGAGAT
          *****
Clon59      AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTT
Dsx5       AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATGATAGTTGTTATCACGTTGGTT
          *****
Clon59      CAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTCCTCCCCTGGGGCGGCCAGAA
Dsx5       CAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTCCTCCCCTGGGGCGGCCAGAA
          *****
Clon59      GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAACGCATC
Dsx5       GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAACGCATC
          *****
Clon59      AATCAAACCGAAACCGC-----
Dsx5       AATCAAACCGAAACCGCTGCTGTGCTGTCGCCATTTTGTACGCTGCCATTCATCATT
          *****

```

**Leyenda de la Figura 17. Confirmación de la identidad del gen clonado con la secuencia anotada en VectorBase.** Se presenta la parte del alineamiento realizado para el análisis que se llevó a cabo con la secuencia del clon 59. En celeste se resaltan los pares de bases que no concuerdan con la secuencia reportada en la base de datos. Se realizó el mismo procedimiento para los otros clones secuenciados. Se utilizaron las herramientas de FinchTV, VectorBase y ClustalMuscle. El análisis completo se presenta en el Anexo 10.

Debido a que ambos fragmentos, de 656 pb y de 202 pb, resultaron ser parte del mismo fragmento amplificado del gen *dsx*, es posible que exista algún sitio de corte y empalme alternativo que no se encuentra reportado. Sería importante analizar con más detalle la secuencia para confirmar esta sospecha, así como realizar estudios de la expresión de cada fragmento en el ciclo de vida del mosquito.

Se determinó que el fragmento de 400 pb no pertenece al gen de interés. Al realizar el alineamiento con la secuencia reportada en la base de datos, no se observó similitud alguna. Se hizo uso de la herramienta BLAST de VectorBase para determinar a qué gen correspondía. Fue posible identificar que este fragmento pertenece al cromosoma 3R del genoma de *Anopheles albimanus*. Esto indica que este conjunto de cebadores no es específico para *dsx*.

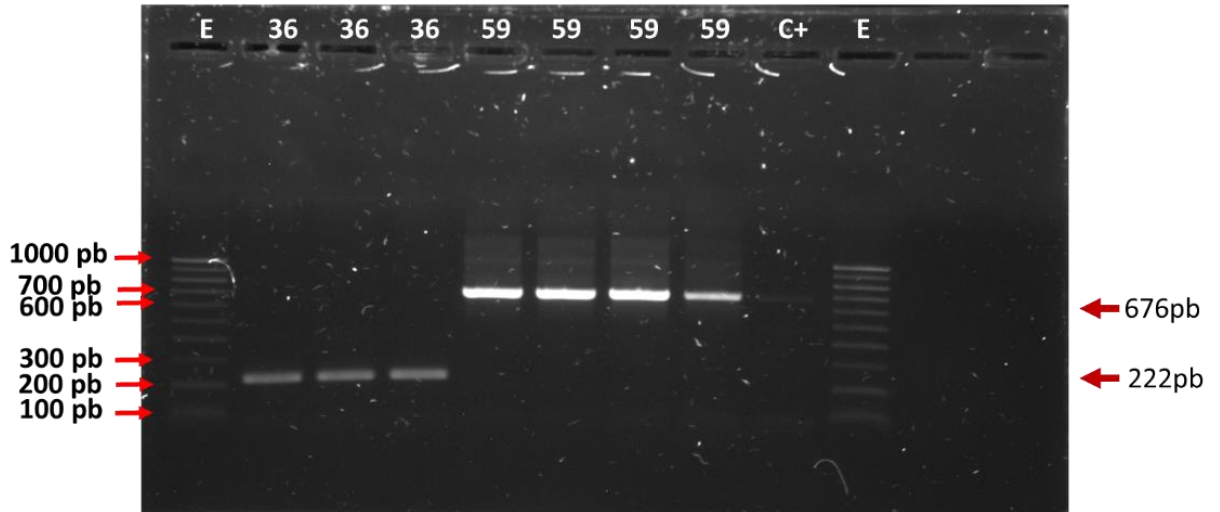
#### D. Clonación del fragmento específico femenino del gen *doublesex* en *E. coli* HT115 (DE3)

El primer paso fue la adición del promotor T7 amplificando la sección del gen *dsx* encontrada en los clones 59 (656 pb) y 36 (202 pb), previamente seleccionados. Es importante mencionar que se agregó la secuencia codificante para el promotor T7 únicamente en el cebador antisentido. Esto se debió a que el vector pGEM-T Easy ya cuenta con un promotor T7 en la región río arriba al sitio de clonación. Fue posible lograrlo con éxito y se evidenció mediante la presencia de las bandas del tamaño esperado en un gel de agarosa 1% (Figura 18). Aquí se observan los tamaños de 676 y 222 pb en vez del original puesto que el promotor T7 cuenta con un largo de 20 pb. En ambos casos la banda es intensa y única, por lo que pudieron ser empleadas para su posterior ligación.

Este paso es de suma importancia para la producción de ARNdh en una cepa DE3. El promotor permite la expresión potenciada del gen seleccionado, ya que la bacteria cuenta con una polimerasa T7 codificada en su genoma, que es inducible, y se unirá a los promotores del plásmido que rodean al fragmento de *dsx* (Papić *et al.*, 2018). No obstante, antes debe agregarse la secuencia del promotor al segmento del gen, ligarlo en un vector y transformarlo en una cepa de clonación (*E. coli* XL1 Blue).



Figura 18. Adición exitosa del promotor T7 a fragmentos amplificados con PCR del gen *dsx*



**Leyenda de la Figura 18. Comprobación exitosa de la adición del promotor T7 a fragmentos amplificados con PCR de *dsx*.** Electroforesis en gel de agarosa 1% con 6µL cargados para cada muestra y 5 µL para la escalera Perfect Ladder 100 pb. En donde: 36 y 59, corresponden a la muestra obtenida del clon 36 y 59, respectivamente. El control positivo (C+) se realizó con ADN genómico.

Fuente: Elaboración propia

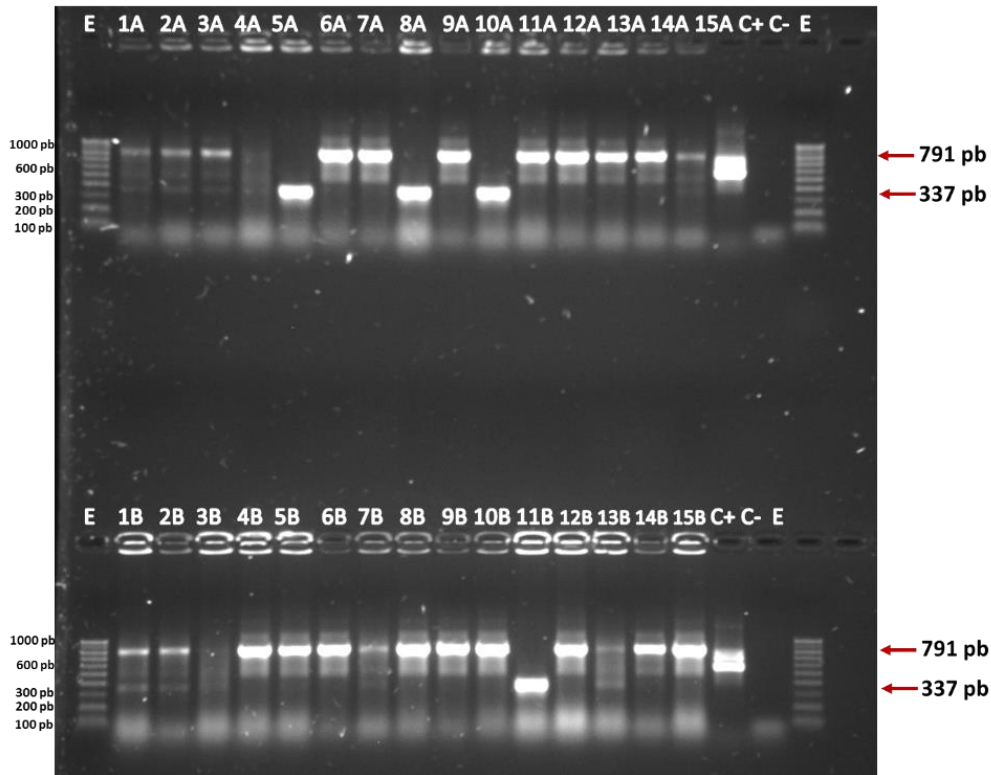
La ligación y transformación de estos fragmentos con T7 en bacterias de *E. coli* XL1 Blue también se logró con éxito. Esta se evidenció mediante el crecimiento de colonias azules y blancas en placas con agar LB con tetracilina (12.5µg/mL), carbenicilina (100µg/mL), X-Gal e IPTG. Nuevamente, la cepa ya contenía resistencia al primer antibiótico y, al incorporar el vector de ligación, adquiría resistencia al segundo. No obstante, esto tampoco fue suficiente para discriminar si la ligación contenía o no el fragmento del gen. Ayudado del sistema blue-white screening, explicado anteriormente, fue posible seleccionar colonias para tamizar.

Fue posible tamizar clones con ambos insertos del gen y el promotor T7 empleando PCR de colonias. En este caso, era de interés que el fragmento se hubiese incorporado al vector en la dirección adecuada. Para verificar esto, se utilizó un conjunto de cebadores distinto: universal M13 sentido y el antisentido específico de *dsx*. El cebador universal permite esta verificación puesto que hibridiza en una sección del vector de ligación hacia arriba de la posición de inserción del gen. Al combinarse con el cebador de específico de *dsx* es posible determinar si se encuentra en el sentido deseado.

En la Figura 19 se presenta el tamizaje de clones realizado. Se observan pozos con las bandas intensas de los tamaños esperados. La longitud es mayor puesto que se amplificó con el cebador universal que hibridiza aproximadamente 115 pb más. Las bandas que cuentan con el inserto del gen en el sentido adecuado son intensas y discretas. En los pozos que no se presenta ninguna banda, se concluye que no contaban con el segmento, o bien, que lo tenían en la dirección opuesta. El hecho que la mayoría de colonias

tamizadas cuentan con alguno de los segmentos en el sentido esperado, es un indicador de su estabilidad dentro de la bacteria. Se seleccionaron aquellos clones que contaban con la banda más intensa y discreta. Para el fragmento de 656 pb, se tomaron el 6A, 7A, 9A, 11A y 12A. Para el fragmento de 202 pb, se seleccionaron los clones 5A, 8A, 10A y 11B.

Figura 19. Tamizaje de clones con fragmentos de *dsx* y promotor T7



**Leyenda de la Figura 19. Tamizaje de clones que incorporaron el fragmento de *dsx* con el promotor T7.** Electroforesis en gel de agarosa 1 %, con 6  $\mu$ L de muestra en cada pozo y 5  $\mu$ L de escalera Perfect Ladder 100 pb. En esta figura, A y B representan la placa de la que se tamizaron esos clones. C+ y C- indican los controles positivos y negativos.

Fuente: Elaboración propia

Se extrajo plásmido de los clones seleccionados para verificar la presencia del promotor T7. En el Cuadro 6 se muestran las concentraciones obtenidas. En la mayoría de casos se presentaron cantidades menores a las esperadas (100 ng/ $\mu$ L). Esto puede deberse a una pobre producción plasmidial de la colonia durante su crecimiento previo a la extracción. Es posible que el tamaño del fragmento del gen haya incidido sobre su producción. En el caso de la razón A260/230, se denota una posible contaminación con fenol o carbohidratos en aquellas muestras que presentaron un valor menor a 2. Sin embargo, la razón A260/280 indica una calidad adecuada, ya que se encuentra cercana a 2.

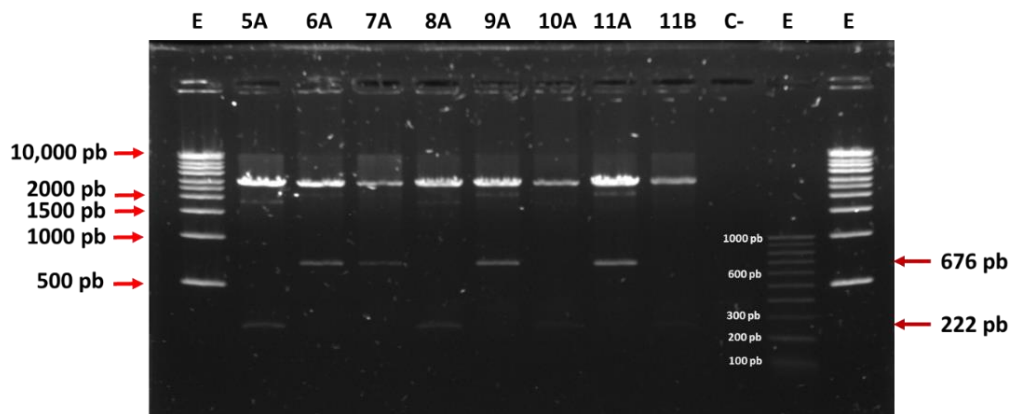
Cuadro 6. Concentraciones óptimas de ADN plasmidial con inserto de *dsx* y promotor T7

Fragmento de <i>dsx</i>	Clon	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
656 pb	6A	152.5	1.79	1.79
	7A	63.9	1.81	1.80
	9A	191.7	1.76	1.37
	11A	200.9	1.83	2.11
	12A	40.4	1.84	2.08
202 pb	5A	151.0	1.84	2.22
	8A	86.9	1.84	2.19
	10A	77.8	1.77	1.54
	11B	54.7	1.79	1.70

**Leyenda del Cuadro 6.** Concentraciones obtenidas para cada clon en ng/μL. En donde A260/280, indica la razón de absorbancia a 260 nm con 280nm; y A260/230, muestra la razón de absorbancia a 260 nm con 230 nm. Ambas indican razones de pureza.

Previo a la secuenciación, se verificó la presencia de un único inserto en el plásmido extraído. Para ello se empleó una digestión con las enzimas de restricción EcoRI y PstI. Se determinó que en todas las muestras únicamente se contaba con uno de los fragmentos de *dsx*. En la Figura 20 se muestran estos resultados. Aquí se evidencian dos bandas: una del tamaño del inserto de *dsx* y otra más grande, que corresponde al resto del vector de ligación. Algunas bandas son más tenues que otras, lo cual corresponde a las distintas concentraciones que se cargaron en el gel.

Figura 20. Presencia de un único inserto en los plásmidos con fragmento de *dsx* y promotor T7



**Leyenda de la Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa 1%, con 6 μL de muestra en cada pozo y 5 μL de escalera Perfect Ladder 100 pb y 1 kb. Se muestra la corrida del plásmido digerido con el inserto correspondiente. Los números en la parte superior del gel indica el clon del cual el plásmido digerido fue extraído. C- indica el control negativo. Ver Figura 12 en antecedentes para el mapa del vector.

Para secuenciar no fue viable enviar todas las muestras puesto que algunas tuvieron una concentración demasiado baja (menor a 80 ng/μL). Se decidió no enviar a los clones 7A, 12A y 11B y trabajar únicamente con aquellos que sí brindarían una buena resolución en su secuenciación.

Para los plásmidos con el inserto de 202 pb, se determinó que tanto el clon 8A como el 10A, presentan el promotor T7 incorporado. Ambos obtuvieron un alineamiento perfecto con la secuencia original amplificada. Por ello, es posible utilizar cualquiera para transformarlo en la cepa *E. coli* HT115 (DE3) para producir ARNdh específico para el gen (Figura 21). Aquí se evidencia la igualdad en la secuencia y la cola agregada del promotor T7 en los plásmidos (en rojo). Sin embargo, en el caso del clon 5A, no fue posible verificar la presencia del promotor T7. Esto se debió a que el electroferograma no fue claro y la secuencia contó con muy baja resolución.

Figura 21. Alineamiento entre clones 8A y 10A con la secuencia original de *dsx*

```

Clon36      AAGAGGGAGAGTGC GTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGCTGTGTTCCTACTAGA
Clon10A     AAGAGGGAGAGTGC GTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGCTGTGTTCCTACTAGA
Clon8a      AAGAGGGAGAGTGC GTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGCTGTGTTCCTACTAGA
*****

Clon36      AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC
Clon10A     AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC
Clon8a      AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC
*****

Clon36      GTCCGACCGATCGGT CAGCAACTACAACGCAACGCCCAAACAACAACGACAAAAAC
Clon10A     GTCCGACCGATCGGT CAGCAACTACAACGCAACGCCCAAACAACAACGACAAAAAC
Clon8a      GTCCGACCGATCGGT CAGCAACTACAACGCAACGCCCAAACAACAACGACAAAAAC
*****

Clon36      GCATCAATCAAACCGAAACCGC-----
Clon10A     GCATCAATCAAACCGAAACCGCCCCTATAGTGAGTCGTATTA
Clon8a      GCATCAATCAAACCGAAACCGCCCCTATAGTGAGTCGTATTA
*****

```

**Legenda de la Figura 21. Correspondencia en las secuencias alineadas de *dsx* y comprobación de la presencia del promotor T7.** Se muestra el alineamiento realizado con la secuencia de *dsx* original clonada. El clon 36 indica la secuencia original amplificada de *dsx*. En rojo se muestran la secuencia del promotor T7 agregado con éxito.

En cuanto a los plásmidos con el fragmento de 656pb, se localizó el promotor T7 en los clones 9A y 6A. Ambos se alinearon con la secuencia original amplificada de *dsx* (Figura 22). De este análisis se evidenció una mutación en la secuencia del clon 9A, que se resalta en celeste en la figura. Caso contrario, el clon 6A no presentó ningún cambio en la secuencia original, siendo una copia idéntica de la misma. En ambos casos se muestra la cola del promotor en rojo que no se encuentra en la secuencia de *dsx*. Por ello, se seleccionó este último como plásmido para transformar en la cepa de *E. coli* HT115 (DE3). Es importante mencionar que el clon 11A no pudo ser analizado porque el electroferograma de la secuencia sentido tenía muy baja resolución. Esto impidió corroborar correspondencia entre ambas hebras. Por ello, se prefirió únicamente analizar

los clones cuyas secuencias habían sido confirmadas. El análisis completo para todos los clones de ambos fragmentos se muestra en el anexo 11.

Figura 22. Alineamiento entre clones 9A y 6A con la secuencia original de *dsx*

```

Clon9A      ACAACTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCC
Clon59      ACAACTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCC
Clon6A      ACAACTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCC
*****

Clon9A      CGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTTAAAAGCGGGCCCC
Clon59      CGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTTAAAAGCGGGCCCC
Clon6A      CGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTTAAAAGCGGGCCCC
*****

Clon9A      GCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCC
Clon59      GCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCC
Clon6A      GCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCC
*****

Clon9A      CCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGC ACTCCAC
Clon59      CCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGC ACTCCAC
Clon6A      CCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGC ACTCCAC
*****

Clon9A      GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG
Clon59      GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG
Clon6A      GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG
*****

Clon9A      TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGAC
Clon59      TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGAC
Clon6A      TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGAC
*****

Clon9A      AAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATA
Clon59      AAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATA
Clon6A      AAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATA
*****

Clon9A      ATTCTGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA
Clon59      ATTCTGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA
Clon6A      ATTCTGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA
*****

Clon9A      AATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCC
Clon59      AATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGC--
Clon6A      AATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCC
*****

Clon9A      CTATAGTGAGTCGTATTA
Clon59      -----
Clon6A      CTATAGTGAGTCGTATTA

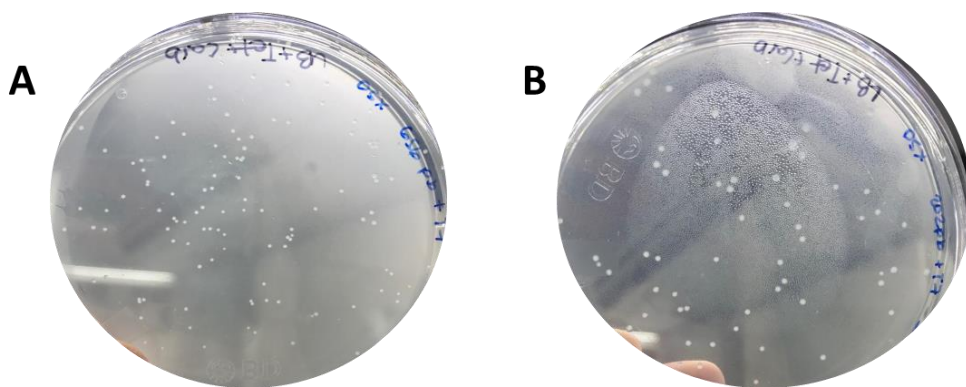
```

**Leyenda de la Figura 22. Correspondencia en las secuencias alineadas de *dsx* y comprobación de la presencia del promotor T7.** Se muestra el alineamiento realizado con la secuencia de *dsx* original clonada. El clon 59 indica la secuencia original amplificada de *dsx*. En rojo se muestran la secuencia del promotor T7. En celeste se resalta la mutación encontrada en el clon 9A.

Se realizó la transformación a células *E. coli* HT115(DE3) con éxito. Fue posible determinarlo mediante el crecimiento de colonias en agar LB con tetraciclina (12.5µg/mL) y carbenicilina (100µg/mL). Como se explicó previamente, la cepa cuenta con resistencia a tetraciclina y adquiere la de carbenicilina al incorporar el plásmido durante la transformación. Se obtuvieron colonias para ambos fragmentos transformados: 202 pb y 656 pb (Figura 23). Esta cepa bacteriana carece de la complementación para el sistema Blue-White Screening, empleado en la identificación de un inserto en una ligación (Wurm *et al.*, 2016). Dado que se transformaron las bacterias con un plásmido cuyo fragmento se había confirmado, no fue necesaria esta herramienta.

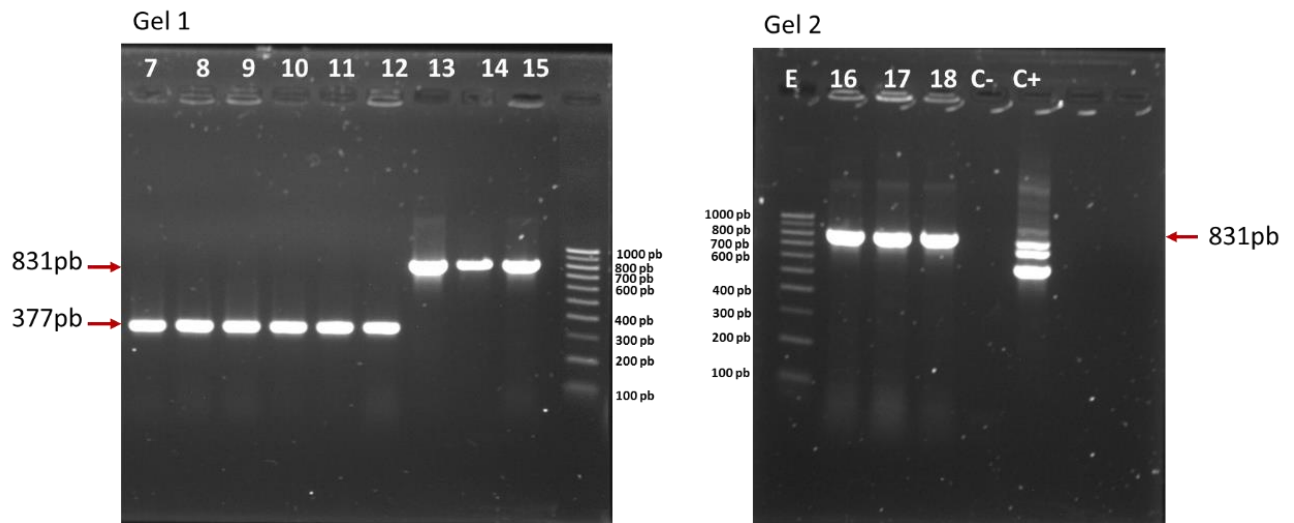
Las colonias que se obtuvieron para la transformación con 202 pb fueron de mayor tamaño que las de 656pb. Esto se relaciona directamente con el tamaño del inserto: entre más grande sea, se requiere de mayor energía para replicarlo. Por lo tanto, el crecimiento es menor para las colonias que cuentan con el fragmento más grande (656pb). A pesar de esto, se obtuvieron colonias de buen tamaño para ambas transformaciones realizadas.

Figura 23. Crecimiento de *E. coli* HT115(DE3) en placas de LB con tetraciclina 12.5µg/ml y carbenicilina 100µg/mL para (A) fragmento de 656 pb; (B) fragmento de 202 pb



Se realizó una PCR de colonias para verificar si las colonias obtenidas no habían perdido el inserto de *dsx* durante su crecimiento. Se comprobó con éxito que todos los clones seleccionados contaban con el fragmento de interés. En la Figura 24 se presentan los tamaños obtenidos para cada uno de los clones seleccionados. Dado que se usó un cebador universal sentido con uno específico para el gen, el tamaño obtenido para cada banda fue mayor al del inserto. Los clones 7 al 12 corresponden al fragmento de 202 pb, que con el promotor T7 y la parte agregada por el cebador universal, dan una banda de 377 pb. Los clones 13 al 18, corresponden al fragmento de 656 pb, para el cual se esperaba una banda de 831 pb. En todos los casos las bandas son discretas, intensas y concuerdan con el tamaño esperado.

Figura 24. Presencia de insertos del gen *dsx* en clones de *E. coli* HT115 (DE3) mediante su amplificación con PCR



**Leyenda de la Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa 1%, con 6  $\mu$ L de muestra cargados en cada pozo y 5  $\mu$ L de escalera Perfect Ladder 100 pb. El número en la parte superior indica el número del clon. C+ y C- denotan al control positivo y negativo. Se utilizaron cebadores con el código M13F y AaDsxIn105R\_T7.

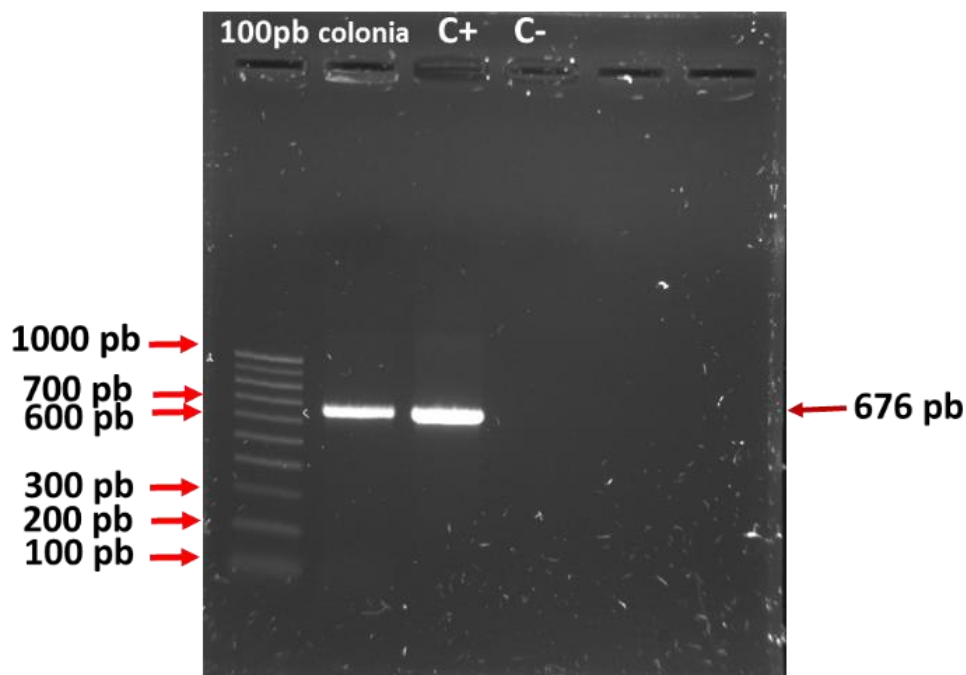
Fuente: Elaboración propia

Se seleccionó el clon 13 para el fragmento de 656 pb y el clon 8 para el de 202pb. Para elegirlos se buscó aquel que tuvo un crecimiento uniforme y que solo presentó una banda discreta en la verificación. De ellos se partió para la inducción de ARNdh para el gen *dsx*.

#### E. Inducción y extracción de ARNdh de un fragmento específico de hembras del gen *doublesex*

Para asegurar el uso de una colonia con el fragmento de interés, se realizó una PCR de colonias a la seleccionada para el precultivo. Se verificó con éxito la presencia del inserto de 656 pb con el promotor T7 (Figura 25), dado que se presentó la banda del tamaño esperado.

Figura 25. Producto de PCR demostrando la presencia del inserto en la colonia utilizada en el precultivo



**Leyenda de la Figura 25. Presencia del inserto de *dsx* en la colonia utilizada en el precultivo.** Electroforesis en gel de agarosa 1%, con 6  $\mu$ L de muestra en cada pozo y 5  $\mu$ L de escalera Perfect Ladder 100 pb. C+ y C- indica el control positivo y negativo, respectivamente. Se utilizaron cebadores específicos de *dsx* con los códigos AaDsxIn103F y AaDsxIn105R\_T7. Como control positivo se empleó plásmido utilizado para transformar a la cepa bacteriana.

Fuente: Elaboración propia

La inducción del cultivo con IPTG 0.4M permitió la producción de ARNdh. Esto se debe a que en su presencia, se modifica el represor, permitiendo que no se una al promotor *lac* modificado de la cepa y se transcriba la polimerasa T7. Como resultado, la polimerasa T7 se une al promotor T7 contenido en el plásmido y genera el ARNdh (Wurm *et al.*, 2016). Después de tres horas de inducción, el cultivo debe ser inactivado puesto que el alimentar a larvas con bacterias vivas puede generar contaminaciones en el insectario y efectos secundarios que no son propios del tratamiento. En este proceso se hierva la bacteria para lizarla. Es posible que por este método se degrade cierta cantidad del ARNdh producido. Por esto es de suma importancia conocer las concentraciones obtenidas antes y después de inactivar. Sin embargo, en ambos casos la lisis células puede llegar a ser un factor limitante al momento de cuantificar. Para solucionar esto, se decidió comprobar la utilidad de la proteinasa K para mejorar la eficiencia de la extracción de ARNdh. Se emplearon tratamientos antes y después de inactivar el cultivo bacteriano, con y sin proteinasa K para determinar si existía alguna diferencia al utilizarla. En el Cuadro 7 se presentan estos valores.



Cuadro 7. Concentraciones promedio de ARNdh obtenidas en la primera réplica

Tratamiento	Muestra	Concentración media $\pm$ desviación estándar (ng/ $\mu$ L)	A260/280	A260/230
Previo a inactivar	Dsx sin proteinasa K Dsx con proteinasa K	202.5 $\pm$ 71.1 190.2 $\pm$ 4.8	1.73 1.81	0.74 0.78
Luego de inactivar	Dsx sin proteinasa K Dsx con proteinasa K	105.3 $\pm$ 23.0 204.7 $\pm$ 0.9	1.49 1.78	0.32 0.65

**Leyenda del Cuadro 7.** Se realizaron mediciones de concentraciones de ARNdh en duplicado utilizando NanoDrop One, en el modo de ARN. Las muestras inactivadas se concentraron a la mitad del volumen original. A260/280, indica la razón de absorbancia a 260 nm con 280nm; y A260/230, muestra la razón de absorbancia a 260 nm con 230 nm. Ambas indican razones de pureza.

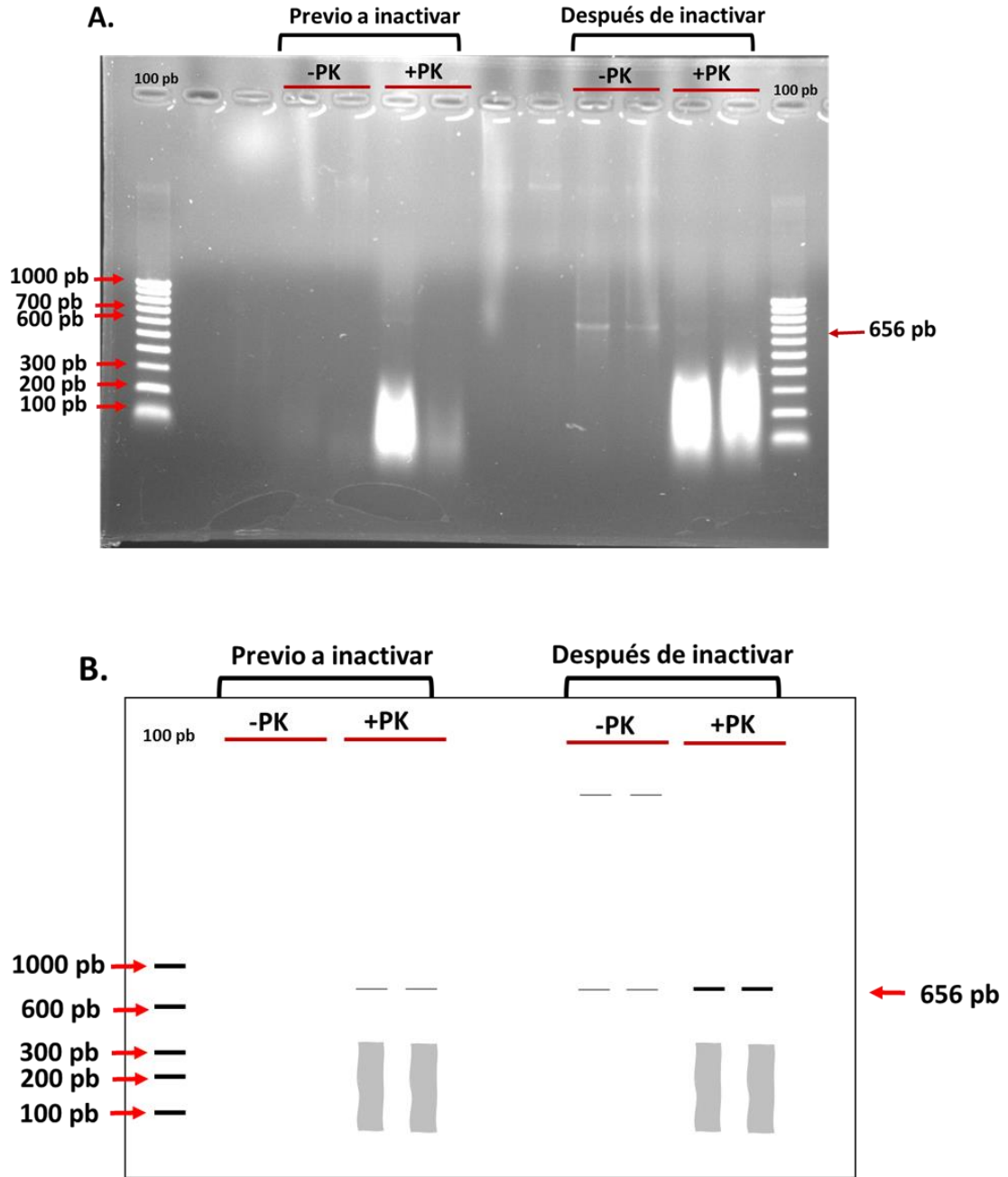
La cuantificación del ácido nucleico obtenido aparentó concentraciones adecuadas de ARNdh, puesto que todos los valores promedio se encontraron arriba de los 105.3 ng/ $\mu$ L. Sin embargo, las razones de pureza obtenida se estuvieron por debajo de los valores ideales. Para la absorbancia 260/280 se esperaba un valor cercano a 2, por ser ARN. Si bien ninguno de los valores alcanzó el rango, es posible notar que casi todos se encuentran por arriba de 1.7. Únicamente el valor de 1.49, correspondiente a la muestra luego de inactivar y sin proteinasa K, destacó entre las mediciones realizadas. Para el caso de la razón A230/260, todos los valores se encontraron por debajo del rango esperado (1.8-2.2). Para ambos casos, es posible que fuera ocasionado por la presencia de residuos del Trizol utilizado en la extracción. Esto concuerda, puesto que cuenta con una elevada absorbancia entre 220 y 230 nm, así como también en 260, afectando ambas medidas de pureza, pero influyendo significativamente más en la de 230/260 (Koetsier, Cantor, & Biolabs, 2019). Desjardins & Conklin (2010), sugieren que un valor bajo para la absorbancia de 260/230 es un indicador de la falta de optimización del método de extracción.

Las concentraciones de ARNdh obtenidas fueron muy similares entre ellas, tanto antes como después de la inactivación hirviendo quince minutos. Es posible notar una leve diferencia para el uso de proteinasa K: previo a inactivar hay una diferencia de menos de 10 ng/ $\mu$ L al utilizarla, mientras que luego de hervir utilizar la proteinasa K supone un aumento de casi 100 ng/ $\mu$ L respecto a la muestra en la cual no fue empleada. Para ambos casos del uso de la enzima, se demostró tener una desviación estándar baja. En el caso de las muestras que no se trataron con la proteinasa K obtuvieron una desviación casi equivalente a un quinto del valor medio obtenido, representando así una falta de homogeneidad del ARNdh en las muestras empleadas para extraer. Las mediciones individuales realizadas para las réplicas se presentan en anexos.

Dado que las muestras fueron medidas empleando un NanoDrop One, se obtuvo una cuantificación del ARNdh total presente, aún si está degradado. Además, este instrumento incluyó la concentración incluyendo aquellos ARNdh de un tamaño distinto al que se espera. Por ello, es importante evaluar la

integridad del ARN extraído y verificar la presencia del producto de interés. Para ello se realizó un gel de agarosa al 1%, mostrado en la Figura 26.

Figura 26. Presencia de bandas de ARNdh de *dsx* extraído de la primera réplica



**Leyenda de la Figura 26. Presencia de bandas de ARNdh extraído de la primera réplica.** Electroforesis en gel de agarosa 1%, con 6  $\mu$ L de muestra para cada pozo y 5  $\mu$ L de muestra para la escalera Perfect Ladder 100 pb. Se muestran los tratamientos de con (+PK) y sin proteinasa K (-PK), tanto antes como después de inactivar las bacterias. **A.** Gel de integridad obtenido para el ARNdh extraído en cada tratamiento. **B.** Boceto de las bandas obtenidas en el gel A.

Fue posible observar bandas del tamaño esperado (656 pb) en algunas muestras, evidenciando así la producción exitosa de ARNdh para un fragmento específico femenino de *dsx* con las bacterias transgénicas. Previo a la inactivación solamente se presentó el producto en las muestras que fueron tratadas con proteínasa K, aún si la banda presente fue en extremo leve. Al revisar el protocolo utilizado fue posible determinar que a las otras muestras previo a inactivarlas no se les lisó de ninguna manera. Esto ocasionó la ausencia de bandas en el gel, ya que al no ser lisadas las células, el ARNdh se queda atrapado dentro de la bacteria y en el debris celular y es eliminado junto con él en el proceso de extracción. Por otro lado, se obtuvieron bandas para ambos tratamientos después de inactivar. Las obtenidas para el tratamiento sin proteínasa K fueron más intensas y definidas. En el caso de las tratadas con la enzima, la banda fue considerablemente más leve, siendo visibles al emplear la máxima intensidad del transiluminador.

Al comparar las concentraciones obtenidas en el Cuadro 7 con la intensidad de las bandas del gel, es posible notar que no concordaron los valores entre ellos. Las concentraciones parecían ser altas pero la banda era muy débil. Esto puede deberse a que una cantidad elevada del producto extraído se encontraba degradado. De hecho, fue posible evidenciarlo con la presencia de un barrido muy intenso al final del gel. Estaba presente en las muestras tratadas con proteínasa K. Dado que el tratamiento con la enzima involucra una incubación de una hora al 65°C, es posible que el ARNdh no haya resistido estas condiciones y se hubiera degradado una elevada cantidad del mismo. Sin embargo, el barrido que se observa únicamente debajo de la proteínasa K demuestra que esta sí es más efectiva al momento de extraer, ya que permite la visualización del ARNdh degradado con mucha intensidad y este está ausente en las muestras que no se trataron con ella. Es importante optimizar su uso para que la elevada intensidad que se demuestra en el barrido, corresponda a las bandas de ARNdh del tamaño deseado y no a degradación.

A manera de corroborar la producción y verificar el patrón de extracción demostrado por la proteínasa K, se realizó una segunda réplica de inducción y extracción de ARNdh. Las condiciones fueron las mismas, agregando únicamente la lisis de las bacterias previo a inactivar mediante ebullición por 2 minutos con buffer de lisis. La cuantificación obtenida para esta ocasión se presenta en el Cuadro 8.

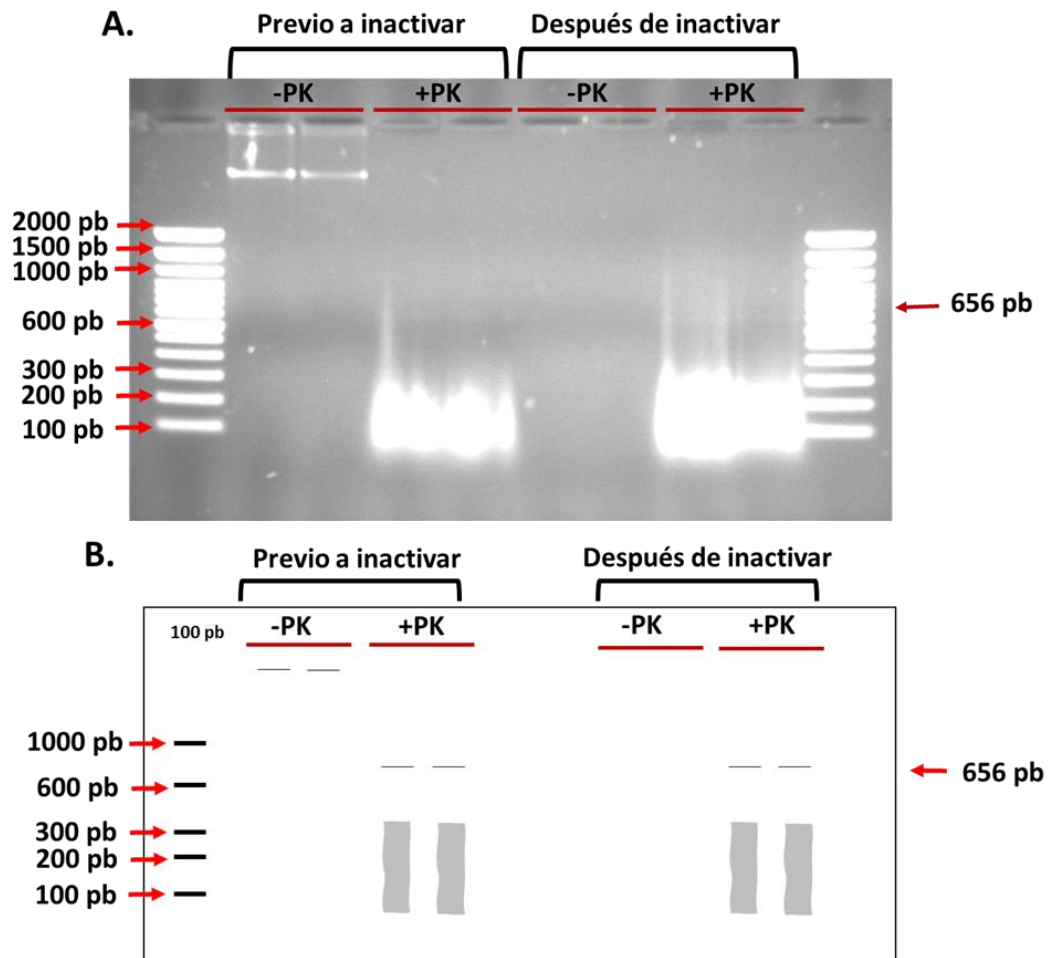
Cuadro 8. Concentraciones promedio de ARNdh obtenidas en la segunda réplica

Tratamiento	Muestra	Concentración media $\pm$ desviación estándar (ng/ $\mu$ L)	A260/280	A260/230
Previo a inactivar	Dsx sin proteínasa K	19.0 $\pm$ 9.3	1.71	0.05
	Dsx con proteínasa K	38.8 $\pm$ 8.5	1.92	0.08
Luego de inactivar	Dsx sin proteínasa K	111.8 $\pm$ 15.5	1.96	0.16
	Dsx con proteínasa K	16.3 $\pm$ 6.4	1.72	0.03

**Leyenda del Cuadro 8.** Se realizaron mediciones de concentraciones de ARNdh en duplicado utilizando NanoDrop One, en el modo de ARN. Las muestras inactivadas se concentraron a la mitad del volumen original. A260/280, indica la razón de absorbancia a 260 nm con 280nm; y A260/230, muestra la razón de absorbancia a 260 nm con 230 nm. Ambas indican razones de pureza.

Para la segunda réplica fue posible obtener concentraciones mucho más bajas de ARNdh. De la misma forma, la desviación estándar fue elevada, llegando a representar hasta casi la mitad del valor medio de concentración. Esto demostró una falta de homogenización en la resuspensión de ARNdh en las alícuotas que se tomaron para realizar la extracción. No existió ningún patrón entre las muestras tratadas con proteinasa K y aquellas que no fueron expuestas a la enzima. En cuanto a la pureza de la muestra, se observó una absorbancia 260/280 cercana ligeramente menor a 2. Para la razón 260/230, los valores están muy por debajo del rango 1.8-2.2 esperado. De nuevo, esto se debió a contaminantes residuales del Trizol empleado para la extracción. Como se explicó antes, este absorbe a una longitud de onda entre 220 y 230 nm, además de una cercana a 260 nm. Como consecuencia, se afecta ligeramente la razón 260/280 y se disminuye en extremo la 260/230.

Figura 27. Presencia de bandas de ARNdh de *dsx* extraído de la segunda réplica



**Leyenda de la Figura 27. Presencia de bandas de ARNdh de *dsx* extraído en la segunda réplica.** Electroforesis en gel de agarosa 1%, con 6  $\mu$ L de muestra para cada pozo y 5  $\mu$ L de muestra para la escalera Track It 100 pb Se muestran los tratamientos de con (+PK) y sin proteinasa K (-PK), tanto antes como después de inactivar las bacterias. **A.** Gel de integridad obtenido para el ARNdh extraído en cada tratamiento. **B.** Boceto de las bandas obtenidas en el gel A.

En algunas de las muestras, se visualizaron las bandas de ARNdh con éxito en el gel de agarosa para verificar su integridad (Figura 27). Esto permitió comprobar nuevamente que fue posible generar ARNdh específico para un fragmento femenino del gen *dsx* partiendo de bacterias transgénicas. Sin embargo, las bandas observadas fueron en extremo tenues. Solo fue posible observarlas para las muestras que habían sido tratadas con proteinasa K. En las muestras sin enzima previo a inactivar se obtuvieron bandas inespecíficas mayores a los 1000 pb, mientras que no se presentó nada en el tratamiento sin proteinasa K después de los quince minutos en ebullición.

Para esta ocasión se utilizó la escalera TrackIt de Invitrogen, la cual permite una cuantificación aproximada de la concentración de la banda según la intensidad que presente. Sus bandas presentan una cantidad aproximada de 30 ng de ácido nucleico. Dado que el fragmento de *dsx* se observó en extremo más tenue a la escalera, es posible concluir que existe una cantidad menor a 30 ng en los 10  $\mu$ L cargados el pozo. Es decir, la concentración real del ARNdh específico de *dsx* es menor a los 3 ng/ $\mu$ L. Para el caso del tratamiento con proteinasa K, esta considerable diferencia respecto al valor marcado por el NanoDrop se debió a la medición del ARNdh degradado. Fue posible evidenciarlo de nuevo con el barrido intenso que se presenta al final del gel. Para el tratamiento previo a inactivar y sin enzima, se atribuyó a las bandas inesperadas de tamaño mayor a los 1000 pb. Debido a que la secuencia que se insertó en el plásmido no cuenta con una secuencia de terminación, es posible que se haya presentado ARNdh de todo el vector y no solo del gen. Se recomienda correr geles de integridad con escaleras que permitan una comparación visual de la concentración. De esta forma será posible tener una mayor certeza de este dato respecto al reportado por el NanoDrop.

Fue posible evidenciar la degradación del ARNdh para las muestras tratadas con proteinasa K. Esto reforzó la idea de que una temperatura de 65°C durante una hora para la acción de esta enzima es suficiente para degradar el ARN. Se sugiere realizar una optimización de uso a distintas temperaturas y tiempos de incubación para reducir al máximo la degradación. Sin embargo, sí se logró comprobar que su uso sí permite la extracción de más ARNdh aún si se presenta degradado. Es importante agregar que el barrido se atribuyó primordialmente a la degradación, pero esto no excluye el hecho de que pudieron haber ARNdh con un tamaño menor encontrados en esta área. Dichos productos pudieron deberse a una transcripción incompleta del fragmento del gen por parte de la ARN polimerasa T7.

Concentrar la cantidad de ARNdh es una buena alternativa para obtener concentraciones más claras y fiables al momento de cuantificar y verificar su producción. Como parte del protocolo utilizado se realizó una concentración de 2X. Sin embargo, se sugiere realizar una a 100X a manera de visualizar la banda esperada con claridad. Esto permitirá una comparación más sencilla y exacta con la concentración reportada en la escalera luego de correr el gel. Asimismo, se propiciará una mezcla mucho más homogénea para su cuantificación, disminuyendo así la desviación estándar entre muestras. En experimentos realizados para *A. gambiae*, una concentración de 100x ha resultado efectiva (Taracena *et al.*, 2019).

En resumen, fue posible evidenciar la producción de ARNdh para un fragmento específico femenino de *dsx* en bacterias transgénicas. No obstante, el rendimiento obtenido fue inferior al deseado para la realización de experimentos con mosquitos. Las concentraciones obtenidas para el producto de interés fueron bajas. Por esto, se sugiere una optimización de la producción y extracción de ARNdh, que excluya el uso de la proteinasa K a 65°C e incluya una concentración 100X.

#### F. Diseño de cebadores específicos para cada una de las isoformas femeninas del gen *doublesex*

Para poder monitorear la eficiencia en el silenciamiento del gen *dsx*, es importante cuantificar la expresión del gen en los mosquitos. Dado que el principal objetivo es silenciar las isoformas femeninas del gen *dsx*, se necesitan cebadores que puedan amplificar de forma específica e independiente a cada una de ellas.

La isoforma corta se encuentra contenida dentro de larga, razón por la que se complicó el diseño de un cebador específico para ella. Sin embargo, al realizar un análisis de las secuencias en VectorBase fue posible determinar que la región codificante era distinta entre las isoformas (secuencias AALB003344-WATERHOUSE\_00003 y AALB003344-WATERHOUSE\_00004, ambas actualizadas el 15 de junio de 2019). Este fragmento es muy corto para diseñar un cebador dentro de él, pero colinda directamente con el siguiente exón (número 4). Por ello, se decidió diseñar un cebador que incluyera la mitad de sus pares de bases dentro del exón 4 y la otra mitad en el exón 5 (isoformas). Este sería específico para cada isoforma, ya que contaría con la secuencia única codificante de cada una y tomaría en cuenta el empalme respectivo de ellas al unirse en una región entre exones. En ambos casos, se empleará el cebador sentido ya existente, diseñado por Paiz (2018), para complementarlos.

Los cebadores se diseñaron empleando la secuencia de VectorBase y utilizando las herramientas de *OligoAnalyzer*, *Primer3Plus* y *PrimerQuest*. En el Cuadro 9 se presentan las secuencias de los cebadores diseñados y sus características. En la Figura 28 se muestra su localización en la secuencia de esta región de *dsx*. Los cebadores diseñados se resaltan en amarillo.

Cuadro 9. Cebadores diseñados para las isoformas femeninas del gen *dsx*

Isoforma	Secuencia (5'-3')	Tamaño del primer	%GC	Tm (°C)	Horquillas	Homo dímeros $\Delta G$ (kcal/mol)	Tamaño de amplicón (pb)	Hetero dímeros $\Delta G$ (kcal/mol)
<b>Larga</b>	GGC CTG ACC TTC GTC GAT T	19	57.9	60	3	7 (-9.28)	101	15 (-3.5)
<b>Corta</b>	GCA TTG ACA CTT CGT CGA TTC	21	47.6	60	-0.91 y -0.85	10(-6.76 )	102	10 (-5.7)

Figura 28. Posición de los cebadores diseñados para las isoformas en la secuencia de *dsx*

### Cebador en la isoforma larga

5´ ACGATGAGCTGGTCAAGCGGGCCAGTGGCTGCTGGAGAAAC**TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCTGATGTACGTACAT**  
**AaDsx2F (Paiz, 2018)**  
**ACTTAAGAGCGCGGATGGCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAAGGCC**GTGGTCAACGAATACTCACGA  
**qAaDsx\_ISL1R**  
 TTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCGGATGATAAACTCCGACCTGC  
 CGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGGCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCAGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTGCCTCAGG  
 CGTGTATGTGTGTGTGGTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTA  
 GGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCAGCAGCAGCAGCGGCGAGC  
 AGCAGCCCGTAATTGCAACTAAATACCGATGAGTTCAAACTAGTGTTTAAGGCCCTCCGCGGTGGAGGAGAAAACGGTGG  
 GGCAGATTGTGGGTGTACATTGTAGTAGAATGTTGTTGCTGCATACGCCCAAGCAGCGCATCACAGCGGAACGGTGTG  
 AGTAGTCAATGGAACGGTCAGGAAACGGGACGGAAACAAACACACGCCGCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCG  
 TGTATGTGTGACGCAGGACTCTCGAGGCTCTACCACCACCTGCTATCGATTGACCGGACAGCTTGGCTCCGGGCGCCA  
 TTAATCTCTGAAATACCAAAATCAGAAAACCAACCGAAATCATGATGATGATGATGATGATGATGAAGATGATGATGATC  
 ACCAACACCCTTGTCTTTGCTTGGTCTTTTTCTATGTTTCGATGCGCCGTGGGAACGACGGAACCGTATCGCGAAC  
 TTTCCGGTGGATGGTCGTATCGGTCGTTCGCCGTTCCCGGTTCCCGTGTCCCTTCCCACAACACCCGCTCCCTGCCA  
 TTACAGTGTCAATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTGTAGCTGTACTTGTGAGA  
 TCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGTCCGACGACCCCGTGCCTGAACTGGGGCCCTAGCAGCTCCGTTTCTCTCT  
 CCGAGGCTCTGGGGCCACGGTTTCTAGACCCACAGTAATATGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTGAAAAGTTC  
 TTTGCTGGGCTGTAGTAGTGTACCTAGTTCCGCGCTCGGTGTCGGTGGGAAGAAAACCAACCGAAGGAGG  
 AGAGAAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGCAAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAGGCAAAACCCA  
 AGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGC  
 AACGCCCCAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGG  
 GCCCCGACTCAGTGGGAACGGTGAATGGGGGGGGGCTGGTGAATCCACCCAACCCATCCCCGGGCCATTTCGT  
 CATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCTGCTGCACCTCCAGGTCGTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAG  
 TGTGTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAG  
 TAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAGATGTAGTGTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGC  
 CATAGTTTCTCCCTGGGGCGGCCGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAAATCTCCACCCCAAAAACAACAACGAC  
 AAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCTGTCTTGTGTGTCCGCCATTTGTACGCTGCCATTCATTCATTCAAAACCC  
 ACTGCGCCAGATTAATGCAAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAAAGCGCCA 3´

### Cebador en la isoforma corta

5´ ACGATGAGCTGGTCAAGCGGGCCAGTGGCTGCTGGAGAAAC**TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCTGATGTAC**  
**AaDsx2F (Paiz, 2018)**  
**GTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTGTCAAATGC**TGTTTCGACGGCA  
**qAaDsx\_ISC1R**  
 ACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGTGTAGCTGTACTTGTGAGATCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGGTCC  
 GACGACCCCGTGCCTGAACTGGGGCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTCTCCGAGGCTCTGGGCCACGGTTCTAG  
 ACCCCACAGTAATATGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTTAAAAGTTCCTTTCGCTGGGCTGCTAGTAGTGTACCT  
 AGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGTGAAGAAAAGAAAACCAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGGAGAGTGCCTGAGAGAG  
 AGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAGGCAAAACCAAGAGTGTTCAAAAGAGGGAGTCTTT  
 CATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCCCAAAACCCCGTAATACCCCGA  
 ATACCTGAGTCAGCATCGCTTTCGTTAAAGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCCGACTCAGTGGGGAACGGTGAA  
 TGGGGGGGGGCTGGTGAATCCACCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGA  
 TTCCCTGCTGACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG  
 TGAATCCGTTCCAAATTCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAAG  
 ATGTAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTCTCCCTGGGGCGGCCAG  
 AAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAAATCTCCACCCCAAAAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCCG  
 TGTCTTGTGTGTCCGCCATTTGTACGCTGCCATTCATTCATTCAAAACCCACTGCGCCAGATTAATGCAAAAGATTT  
 CCCGACTCTTCAATCAATCCAAAAGCGCCAG 3´

**Legenda de la Figura 28. Localización de los cebadores diseñados en las isoformas femeninas.** Ambos cebadores diseñados se muestran resaltados en amarillo. El cebador en color rojo hace referencia al ya existente, diseñado por Paiz (2018). En negra se indica el exón 4 y fuente normal se muestra el exón 5.

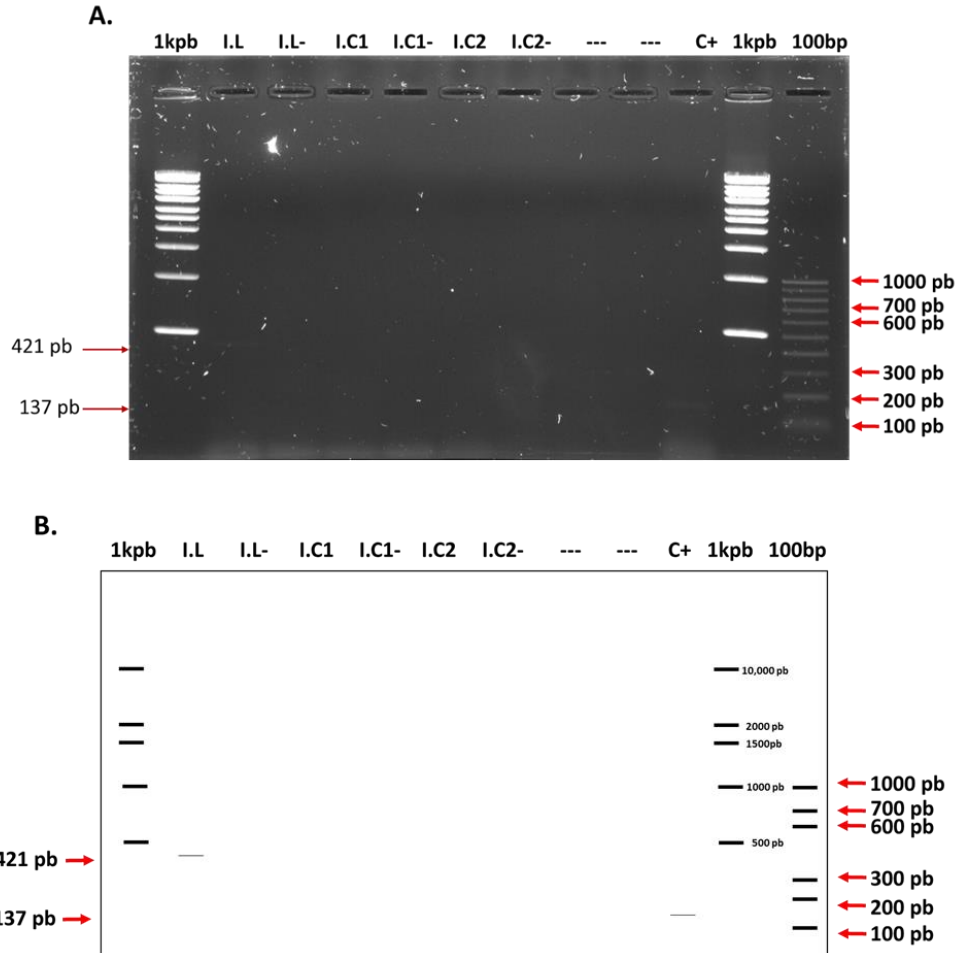
Fue posible diseñar cebadores con características óptimas. La longitud se encuentra dentro del rango adecuado y cuentan con la misma temperatura de anillamiento ( $T_m$ ) (Dieffenbach, Lowe, & Dveksler, 1993). Esto permite que se den reacciones específicas y asegura la eficiencia de la reacción. Además, se logró asegurar una pinza GC, para asegurar que los cebadores se unan correctamente y se prevenga la formación de bandas secundarias (Abd-elsalam, 2003). Sin embargo, cuentan con una elevada posibilidad de formación de estructuras secundarias. Dado que la secuencia específica es muy corta, no pudo buscarse otra región que disminuyera este problema. Será necesario evaluar la eficiencia de los cebadores en una PCR cuantitativa y verificar que los tamaños esperados sean acorde a lo esperado. Si ambas características previamente descritas se cumplen, podrán ser utilizados para medir la expresión de las isoformas antes y después de su silenciamiento.

No obstante, estas regiones son pequeñas y específicas, por lo que se decidió verificar la secuencia anotada en la base de datos previo al diseño del cebador. Para ello fue posible amplificar con éxito la región entre el exón 4 y la isoforma larga. Para ello se utilizó un cebador sentido que hibrida en el exón 4 y un cebador antisentido encontrado en una región exclusiva de la isoforma larga. Se partió de ADNc de hembras de cinco días, por lo que el tamaño esperado era de 421 pb. Se obtuvo una banda en extremo tenue, que se evidencia en la Figura 29. Esta fue picada del gel y se volvió a amplificar previo a la ligación.

Se buscó amplificar una región que abarcara la parte específica de la isoforma corta. Para ello se emplearon dos conjuntos de cebadores: un mismo cebador antisentido en la región común de isoformas, con dos sentido en la región de la isoforma larga. Se esperaba un tamaño de 1312 pb y 1566pb. Justo como se muestra en la Figura 29, no fue posible observar ninguna banda para este caso. Es posible que esto se deba a que el ADNc se encontraba ya algo degradado. De hecho, este argumento es aún más probable debido a que el control positivo de actina también presentó una intensidad leve. Por esto, no fue posible amplificar ninguno de los casos para la isoforma corta y no se realizó ligación que permitieran verificar su secuencia. Se planteó que si el resultado de secuenciación obtenido para la isoforma larga, tiene alta similitud con la secuencia de VectorBase, es muy probable que la otra región de interés se encuentre anotada correctamente.



Figura 29. Amplificación de secuencias entre exón 4 y exón 5 de *dsx*

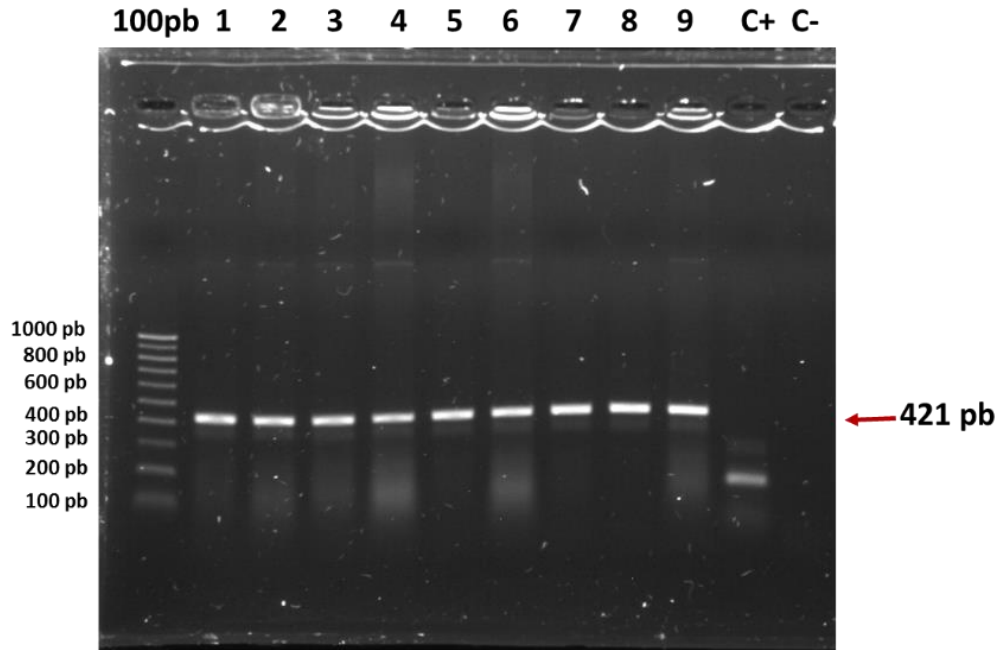


**Leyenda de la Figura 29. Amplificación de la secuencia entre el exón 4 y 5.** Electroforesis en gel de agarosa 1%, con 6  $\mu$ L de muestra en cada pozo y 5  $\mu$ L de escalera 100 pb o 1kb. I.L, indica la isoforma larga. IC1, indica la isoforma corta con el primer conjunto de cebadores. IC2 indica la isoforma corta con el segundo conjunto de cebadores. El signo “-” al lado de cada nombre, denota el control negativo. Se utilizaron los cebadores: AaDSX2-F y AaDsxIn102R para la isoforma larga; AaDsxIn102F con AaDsxIn104R, para el primer set de la isoforma corta; y AaDsxIn102F con AaDsxIn105R, para el segundo set de la isoforma corta que se buscaba obtener. **A.** Amplificación resultante para los conjuntos de cebadores utilizados. **B.** Boceto de las bandas que se obtuvieron en al electroforesis en gel.

La ligación se transformó con éxito en células de *E. coli* XL1-Blue. Fue posible evidenciarlo mediante el crecimiento de colonias blancas y azules en agar LB con tetraciclina (12.5 $\mu$ g/mL), carbenicilina (100 $\mu$ g/mL), IPTG (0.8M) y X-Gal. Se seleccionaron algunas colonias blancas y se tamizaron clones para este tamaño empleando PCR de colonias empleando cebadores específicos del gen. El sentido en el que el fragmento se hubiese incorporado al plásmido no es relevante para verificar su secuencia. Esto permite realizar el tamizaje sin utilizar algún cebador universal M13.

Se logró obtener clones con el fragmento de interés incorporado (Figura 30). En todos los casos se observan bandas discretas e intensas del tamaño esperado (421 pb). Se seleccionaron todos clones puesto que presentaron una única banda con elevada intensidad.

Figura 30. Tamizaje de clones con insertos de los exones 4 y 5 de *dsx*



**Leyenda de la Figura 30. Tamizaje de clones con insertos de *dsx* entre los exones 4 y 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con 6  $\mu$ L de muestra en cada pozo y 5  $\mu$ L de escalera 100 pb. El número que se presenta arriba es corresponde al clon analizado. C+ y C- indican al control positivo y negativo. Se utilizaron los cebadores AaDSX2-F y AaDsxIn102R. Como control positivo se emplearon cebadores universales M13 y un plásmido con un inserto conocido.

Se extrajo plásmido de once diferentes clones, cuyo resultado se observa en el cuadro 10. En todos los casos se obtuvieron concentraciones elevadas (más de los 150 ng/ $\mu$ L). De la misma forma, se obtuvieron absorbancias que denotaron pureza en la muestra extraída. Dado que el ADN plasmidial producido por los diferentes clones fue elevado, se enviaron todos a secuenciar.

Cuadro 10. Concentración de ADN plasmidial óptimas de clones con inserto del gen *dsx* entre el exón 4 y 5

Clon	Concentración [ng/μL]	A260/280	A260/230
1	511.3	1.83	2.17
2	399.5	1.86	2.02
3	356.3	1.86	2.30
4	427.7	1.85	2.01
5	196.8	1.82	1.90
6	136.5	1.82	2.18
7	310.0	1.85	2.14
8	335.1	1.83	1.96
9	408.9	1.78	1.48
10	302.8	1.86	2.25
11	185.2	1.83	2.24

**Leyenda del Cuadro 10.** Concentraciones obtenidas para cada clon en ng/μL. En donde A260/280, indica la razón de absorbancia a 260 nm con 280nm; y A260/230, muestra la razón de absorbancia a 260 nm con 230 nm. Ambas indican razones de pureza.

Con los cromatogramas obtenidos fue posible identificar cambios en la secuencia reportada en VectorBase. Primero se analizó la congruencia en la secuencia de hebras de los resultados obtenidos. En este paso se descartó el clon 4, 6, 7, 8 y 11 porque había demasiado ruido en las secuencias generadas. Luego, se seleccionaron los clones 1, 2, 3, 5, 9 y 10 para alinearlos con la secuencia anotada en la base de datos. De la misma manera, se alinearon con el cebador diseñado para la isoforma larga. Así fue posible identificar si hay alguna mutación encontrada en la región que este abarca. Un fragmento del análisis se presenta en la Figura 30; el análisis completo se detalla en el anexo 12.

Figura 31. Alineamiento de fragmento entre exón 4 y 5 de *dsx* con los clones tamizados

```

SecAmplificada      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
PrimerExones       -----
Clon9              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon5              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon2              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon3              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCTGATGGCG
Clon10             TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon1              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
*****

SecAmplificada      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
PrimerExones       -----AATCGACGAAGGTCAGGCC-----
Clon9              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon5              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon2              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon3              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon10             ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon1              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
*****

SecAmplificada      GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
PrimerExones       -----
Clon9              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon5              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATTGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGGCGAGAGCG
Clon2              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon3              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon10             GATTGCACAATCTGAACATATTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon1              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
*****

SecAmplificada      GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGGGCGCATCTGCCTG
PrimerExones       -----
Clon9              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon5              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon2              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon3              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon10             GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon1              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
*****

```

**Leyenda de la Figura 31.** Fragmento del análisis de la secuencia entre el exón 4 y 5. El exón 4 se muestra en negrita. “SecAmplificada” indica la secuencia reportada en VectorBase para *dsx*. “PrimerExones” hace referencia al cebador diseñado para cuantificar la expresión (la secuencia se resalta en amarillo). En celeste se resaltan las mutaciones en la secuencia.

Fuente: Elaboración propia

Se determinó que no existe una mutación dentro de la secuencia en la que se diseñó el cebador. Por esto, es posible utilizar este cebador antisentido con uno de los sentidos ya existentes encontrados en el exón 4. Hubo solamente tres mutaciones compartidas por todos los clones, distinta únicamente en la secuencia anotada. Para la cantidad de pares de bases amplificadas, es un porcentaje bajo de mutaciones. Estas pueden deberse a cambios específicos de la cepa de *Anopheles albimanus* Sanarate, o a mutaciones incorporadas por las bacterias durante la replicación. Dado que se encontró en todos los clones, existe mayor posibilidad de

que sean cambios atribuidos a la cepa. Se concluyó que la secuencia se apega a la original, por lo que el cebador diseñado podría hibridarse bien y cuantificar la expresión.

Dado que esta secuencia demuestra alta fidelidad a lo anotado, se asumirá que el cebador para la otra isoforma también hibridará sin ningún problema. No obstante, se recomienda la amplificación de la secuencia de las isoformas femeninas de *dsx*. De esta forma será posible diseñar cebadores con alta fidelidad a la secuencia que estará presente dentro del ADNc con el que se trabaja.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se evidenció que existe expresión de las isoformas de *dsx* en pupas y adultos macho de *Anopheles albimanus*, por lo que se plantea que son isoformas con sesgo hacia hembras y no específicas femeninas.
2. Se identificaron dos fragmentos específicos femeninos en la región común de las isoformas con sesgo hacia hembras de *dsx* en ADN complementario.
3. Fue posible clonar dos fragmentos (656 pb y 202 pb) específicos femeninos en las isoformas con sesgo hacia hembras de *dsx* en bacterias *E. coli* XL1-Blue.
4. Se logró evidenciar la secuencia de ambos fragmentos específicos femeninos clonados en el vector pGEMT, se encuentran dentro del gen *dsx* en la región común de las isoformas con sesgo hacia hembras.
5. Se agregó y comprobó la adición de un promotor T7 a ambos fragmentos de *dsx* femeninos para su futura producción de ARNdh.
6. Se realizó una transformación exitosa de bacterias *E. coli* HT115 (DE3) con plásmidos que contenían los fragmentos específicos de hembra del gen *dsx* y el promotor T7.
7. Fue posible clonar y producir ARNdh de un fragmento específico femenino de *dsx* utilizando la cepa *E. coli* HT115 (DE3).
8. Se diseñaron cebadores para la evaluación de la expresión génica de las isoformas con sesgo hacia hembras de *dsx*, para su cuantificación antes y después de silenciar la región común del gen.
9. Se comprobó la secuencia de una región entre el exón 4 y el exón 5 de *dsx* utilizando secuenciación.

## IX. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el potencial de los cebadores diseñados para la cuantificación de las isoformas de *dsx* empleando la técnica de qPCR.
2. Cuantificar la expresión de las isoformas femeninas de *dsx* en ambos sexos y en todos los estadios del ciclo de vida de *Anopheles albimanus*.
3. Determinar el momento del ciclo de vida de *A. albimanus* en el que cada isoforma se expresa más y sea adecuado silenciarlas.
4. Optimizar la producción de ARNdH de 656 pb específico para una región femenina del gen *dsx*, incluyendo una concentración 100X y excluyendo el uso de proteinasa K.
5. Realizar ensayos de silenciamiento alimentando larvas con el ARNdH producido con el fragmento de 656pb de *dsx*.
6. Producir ARNdH con el fragmento de 202 pb específico de hembra de la región común de las isoformas femeninas de *dsx*.
7. Alimentar larvas con ARNdH con ambos fragmentos específicos de *dsx* y evaluar el fenotipo obtenido

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-elsalam, K. A. (2003). *Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design*, 2(May), 91–95.
- Adelman, Z. N., & Tu, Z. (2016). *Control of mosquito-borne infectious diseases: Sex and gene drive*, 32(3), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.003>.Control
- Amexo, M., Tolhurst, R., Barnish, G., & Bates, I. (2004). *Malaria misdiagnosis : effects on the poor and vulnerable*, 364, 1896–1898.
- Baker, B. S., & Wolfner, M. F. (1988). *A molecular analysis of doublesex , a blfunctional gene that controls both male and female sexual differentiation in Drosophila melanogaster*, 477–489.
- Banerjee, S., Kumar, J., Apte-Deshpande, A., & Padmanabhan, S. (2010). *A novel prokaryotic vector for identification and selection of recombinants: Direct use of the vector for expression studies in E. coli. Microbial Cell Factories*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-30>
- Bassat, Q., & Alonso, P. L. (2011). *Between Bedside and Bench Defying malaria Arming T cells to halt malaria. Nature Publishing Group*, 17(1), 48–49. <https://doi.org/10.1038/nm0111-48>
- Bejarano, E. E. (2003). *Occurrence of the Malaria Vector Anopheles albimanus Wiedemman (Diptera : Culicidae) in Isla Fuerte, Colombia. Neotropical Entomology*, 32(3), 517–518. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2003000300025>
- Bledsoe, G. H. (2005). *Malaria Primer for Clinicians in the United States*, 98(12), 1197–1204.
- Burtis, K. C., & Baker, B. S. (1989). *Drosophila doublesex Gene Controls Somatic Sexual Differentiation by Producing Alternatively Spliced mRNAs Encoding Related Sex-Specific Polypeptides*, 56, 997–1010.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell*, 136(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2015). *Malaria Disease*. <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> [Consultado el 26/12/18].
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). *Malaria* . <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html> [Consultado el 26/12/18].
- CDC. (2013). *Treatment of Malaria ( Guidelines For Clinicians )*. *Centers for Disease Control and Prevention*, 1(July), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66420-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66420-3)



- Chávez, E. (2019). *Departamento de Vigilancia Epidemiológica Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social*, 2018–2019.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). *NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. Journal of Visualized Experiments*, (45), 1–4. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). *General concepts for PCR primer design. Genome Research*, 23(4), 566–573. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>
- Dyck, V., Hendrichs, J., & Robinson, A. (2005). *Sterile Insect Technique Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Holanda: Springer.
- Faran, M. (1980). *Contributions of the American Entomological Institute*, 15(7).
- Farrell, R. (2010). *RNA methodologies*. (E. Inc., Ed.) (4th ed.). London.
- Feachem, R. G. A., Phillips, A. A., Hwang, J., Cotter, C., Wielgosz, B., Greenwood, B. M., ... Snow, R. W. (2010). *Shrinking the malaria map: Progress and prospects. The Lancet*, 376(9752), 1566–1578. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61270-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61270-6)
- González, L., & de la Cruz, F. (2017). *Malaria : vectores. Ciencia*, 68(1), 50–53.
- Graveley, B. R., & Maniatis, T. (1998). *Arginine / Serine-Rich Domains of SR Proteins Can Function as Activators of Pre-mRNA Splicing*, 1, 765–771.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). *Regulation of microRNA biogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hertel, K., Lynch, K., Hsiao, L., Liu, E., & Maniatis, T. (1996). *Structural and functional conservation of the Drosophila doublesex splicing enhancer repeat elements. RNA*, 2, 969–981.
- Hollister, E. B., Brooks, J. P., & Gentry, T. J. (2014). *Nucleic Acid-Based Methods of Analysis. Environmental Microbiology: Third Edition*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00013-2>
- Hong, Y. S., Kang, S., Han, M., Gobert, G. N., & Jones, M. K. (2011). *High quality RNA isolation from Aedes aegypti midguts using laser microdissection microscopy. Parasites & Vectors*, 4(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-83>
- Hoshijima, K., Inoue, K., Higuchi, I., Sakamoto, H., & Shimura, Y. (1991). *Control of doublesex Alternative Splicing by transformer and transformer-2 in Drosophila*, 109(March), 833–835.

- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). *High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: Current status and future perspectives*. *Open Biology*, 6(8). <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Jursnich, V., & Burtis, K. (1993). *A positive role in differentiation for the mate doublesex protein of Drosophila*. *Developmental Biology*, (155), 235–249.
- Kim, D., Sung, Y. M., Park, J., Kim, S., Kim, J., Park, J., ... Baek, D. (2016). *General rules for functional microRNA targeting*. *Nature Genetics*, 48(12), 1517–1526. <https://doi.org/10.1038/ng.3694>
- Koetsier, G., Cantor, E., & Biolabs, E. (2019). *A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers, 1–8*. Retrieved from [https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs\\_analysis\\_of\\_na\\_concentration\\_and\\_purity.pdf?rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc](https://www.neb.com/-/media/catalog/application-notes/mvs_analysis_of_na_concentration_and_purity.pdf?rev=be7c8e19f4d34e558527496ea51623dc)
- Laloo, D. G., Shingadia, D., Pasvol, G., Chiodini, P. L., Whitty, C. J., Beeching, N. J., ... Bannister, B. A. (2007). *UK malaria treatment guidelines*. *Journal of Infection*, 54(2), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.12.003>
- Lees, R. S., Gilles, J. R. L., Hendrichs, J., Vreysen, M. J. B., & Bourtzis, K. (2015). *Back to the future : the sterile insect technique against mosquito disease vectors*. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.011>
- Mehta, K. (2007). *STERILE INSECT TECHNIQUE : A MODEL FOR DOSE OPTIMIZATION FOR IMPROVED STERILE INSECT QUALITY* Author ( s ): Andrew Parker and Kishor Mehta. *Florida Entomologist*, 90(1), 88–95.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). *The pathogenic basis of malaria*, 415(February), 673–679.
- Moree, M., & Ewart, S. (2004). *Policy challenges in malaria vaccine introduction*, 71(Suppl 2), 248–252.
- Nadjm, B., & Chb, M. B. (2012). *Malaria : An Update for Physicians*, 26, 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.010>
- Noriega, D., Valencia, A., & Villegas, B. (2016). *ARN de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos de plaga*. *Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1), 25–35.
- Olano, V., Brochero, H., Sáenz, R., Quiñonez, M., & Molina, J. (2000). *Muestro básico para ejecución e interpretación de encuestas*. *Biomédica*, 21, 402–408.

- Oliva, C. F., Jacquet, M., Gilles, J., Lemperiere, G., Maquart, P., Vreysen, M. J. B., ... Quilici, S. (2012). *The Sterile Insect Technique for Controlling Populations of Aedes albopictus (Diptera : Culicidae) on Reunion Island : Mating Vigour of Sterilized Males*, 7(11), 1–8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049414>
- OMS. (2014). *Fact Sheet: Malaria. Regional Office for the Eastern Mediterranean*.
- OMS. (2017). *World Malaria Report 2017* (Vol. 25 Suppl 3). [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(07\)01183-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(07)01183-8)
- OMS. (2018). *World malaria report 2018*.
- OPS. (1996). *Biología y ecología de Anopheles albimanus Wiedemann en Centroamerica. Bol Oficina Sanit Panam*, 121(3), 189–220.
- Papa, F., Windbichler, N., Waterhouse, R. M., Cagnetti, A., Amato, R. D., Persampieri, T., ... Papathanos, P. A. (2017). *Rapid evolution of female-biased genes among four species of Anopheles malaria mosquitoes*, 1536–1548. <https://doi.org/10.1101/gr.217216.116>.Freely
- Papić, L., Rivas, J., Toledo, S., & Romero, J. (2018). *Double-stranded RNA production and the kinetics of recombinant Escherichia coli HT115 in fed-batch culture. Biotechnology Reports*, 20, 10–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00292>
- Pinault, L., & Hunter, F. (2012). *Characterization of larval habitats of Anopheles albimanus, Anopheles pseudopunctipennis, Anopheles punctimacula, and Anopheles oswaldoi s.l. populations in lowland and highland Ecuador. Advances in Agricultural Technology, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture*, 37, 124–136.
- Price, D. C., Egizi, A., & Fonseca, D. M. (2015). *The ubiquity and ancestry of insect doublesex. Scientific Reports*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep13068>
- Ramírez, L., Medina, P., Fajardo, P., & González, R. (1986). *CICLO BIOLÓGICO Y ESTABLECIMIENTO DE UNA COLONIA DE BIFOLIATA (DIFTERA : CULICIDAE) EN CALI, COLOMBIA. Biomédica*, 6(3 y 4), 79–84.
- Ridgeway, J. A., & Timm, A. E. (2014). *Comparison of RNA Isolation Methods From Insect Larvae*, 4–8.  
<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu130>
- Rogers, D. J., & Randolph, S. E. (2000). *The Global Spread of Malaria in a Future, Warmer World. Science*, 2, 1763–1766.

- Rozeboom, L. (2016). *Laboratory-bred Anopheles albimanus*. *Medical Entomologist*, 29, 480–489.
- Salvemini, M., Mauro, U., Lombardo, F., Milano, A., Zazzaro, V., Arcà, B., ... Saccone, G. (2011). *Genomic organization and splicing evolution of the doublesex gene, a Drosophila regulator of sexual differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito Aedes aegypti*, 1–19.
- Sanchez-vargas, I., Travanty, E. A., Keene, K. M., Franz, A. W. E., Beaty, B. J., Blair, C. D., & Olson, K. E. (2004). *RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes*, 102, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.017>
- Sánchez, I. M. (2010). *El gen Transformer-2 de Sciara (Díptera, nematocera, sciaridae)*. Universidad Complutense de Madrid.
- Scali, C., Catteruccia, F., Li, Q., & Crisanti, A. (2005). *Identification of sex-specific transcripts of the Anopheles gambiae doublesex gene*, 3701–3709. <https://doi.org/10.1242/jeb.01819>
- Scali, C., Catteruccia, F., Li, Q., & Crisanti, A. (2006). *Europe PMC Funders Group Identification of sex-specific transcripts of the Anopheles gambiae doublesex gene*, 208(Pt 19), 3701–3709. <https://doi.org/10.1242/jeb.01819>. Identification
- SENEPA. (2013). *Manual de Campo para la Vigilancia Entomológica de Anopheles*. OPS, 26.
- Shukla, J., & Nagaraju, J. (2010). *Doublesex: a conserved downstream gene controlled by diverse upstream regulators*. *Journal of Genetics*, 89(3), 341–356.
- Sinka, M. (2013). *Global Distribution of the Dominant Vector Species of Malaria*. *IntechOpen*, 4, 109–142.
- Sinkins, B. S. P. (2016). *Yob makes mosquitoes male*. *Science*, 353(6294), 33–34.
- Spencer, L. M., Gómez, A., & Collovini, E. (2016). *Mechanisms of invasion from sporozoite and merozoite of Plasmodium*. *Bionatura*, 1(2), 89–94. <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.02.9>
- Taracena, M. L., Hunt, C. M., Benedict, M. Q., Pennington, P. M., & Dotson, E. M. (2019). *Downregulation of female doublesex expression by oral - mediated RNA interference reduces number and fitness of Anopheles gambiae adult females*. *Parasites & Vectors*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3437-4>
- Tuteja, R. (2007). *Malaria - The global disease*. *FEBS Journal*, 274(18), 4669. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05996.x>
- Vandesompele, J. (2012). *qPCR guide*. Ghent: Eurogentec.

- Verhulst, E., Van de Zande, L., & Beukeboom, L. (2010). *Insect sex determination : it all evolves around transformer*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(4), 376–383.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.05.001>
- Waterbury, J. A., Jackson, L. L., & Schedl, P. (1999). *Analysis of the Doublesex Female Protein in Drosophila melanogaster : Role in Sexual Differentiation and Behavior and Dependence on Intersex*, 3.
- White, N. J. (2008). *Qinghaosu (artemisinin): The price of success*. *Science*, 320(5874), 330–334.  
<https://doi.org/10.1126/science.1155165>
- Whyard, S., Erdelyan, C. N. G., Partridge, A. L., Singh, A. D., Beebe, N. W., & Capina, R. (2015). *Silencing the buzz : a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0716-6>
- Wilkins, A. S. (1994). *Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway*. *BioEssays*, 17(1), 71–77.
- Williams, J., & Pinto, J. (2014). *Training Manual on Malaria Entomology For Entomology and Vector Control Technicians*, (March 2012), 78.
- Wittrup, A., & Lieberman, J. (2015). *Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics*. *Nature Reviews Genetics*, 16(9), 543–552. <https://doi.org/10.1038/nrg3978>
- Wurm, D. J., Veiter, L., Ulonska, S., Eggenreich, B., Herwig, C., & Spadiut, O. (2016). *The E. coli pET expression system revisited—mechanistic correlation between glucose and lactose uptake*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(20), 8721–8729. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7620-7>
- Yamamoto, D., & Koganezawa, M. (2013). *Genes and circuits of courtship behaviour in Drosophila males*. *Nature Publishing Group*, 14(10), 681–692. <https://doi.org/10.1038/nrn3567>

## XI. ANEXOS

Anexo I:

POE I: Ligación de fragmentos en pGEM -T Easy vector

<b>Código del POE</b>	<b>I</b>
<b>Área</b>	<b>Ingeniería genética</b>
<b>Versión</b>	<b>Primera</b>
<b>Idioma</b>	<b>Español</b>
<b>Título</b>	<b>Ligación de fragmentos específicos de <i>dsx</i> en el vector pGEM- T Easy vector</b>
<b>Escrito por</b>	<b>Claudia Alfaro</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>15 de abril de 2019</b>
<b>Revisado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	
<b>Aprobado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	

### 1. Propósito

1.1. Ligar fragmentos específicos del gen *dsx* previamente amplificados en el vector pGEM- T Easy vector.

### 2. Aplicación

La ligación de productos específicos de un gen de interés es de fundamental importancia para generar un vector que contenga el fragmento que busca expresarse en una cepa

bacteriana específica. Por esto, partiendo de una ligación, es posible transformar bacterias competentes que sean capaces de expresar la molécula que se desea.

### **3. Referencias**

Promega corporation. 2018. pGEM – T Easy and pGEM -T Vector Systems. Technical manual. 29pp. Disponible en:

<https://www.promega.com//media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>

### **4. Terminología y abreviaciones**

**4.1.** *dsx*: gen *doublesex*, identificado en *Drosophila melanogaster* que se encuentra en el final de la cascada de diferenciación sexual.

**4.2** ADN plasmidial (plásmido): ADN circular con un inserto de interés.

**4.3** PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

### **5. Principio**

La ligación de un fragmento de ADN a un plásmido determinado se da mediante su incorporación empleando una enzima. Es decir, el vector se abre en un punto específico, en donde se coloca el ADN de interés y luego se une por la acción de la ligasa. Como resultado, se obtiene un plásmido interrumpido en un operón determinado que permitirá su selección en las bacterias transformadas. Posteriormente, con una inducción apropiada se expresará el fragmento insertado en el vector.

### **6. Documentos asociados**

Promega corporation. 2018. pGEM – T Easy and pGEM -T Vector Systems. Technical manual. 29pp. Disponible en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>

### **7. Seguridad**

Usar guantes y bata de laboratorio mientras se manipulen los productos de PCR y se agreguen los reactivos.

## 8. Equipos materiales y reactivos

### 8.1 Equipo y materiales

- Micropipetas de 10 y 100  $\mu\text{L}$
- Puntas para micropipetas de 10 y 100  $\mu\text{L}$
- Tubos eppendorf de 1.2 mL
- Centrífuga para tubos de 1.2 mL
- NanoDrop One
- Refrigerador  $-4^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$

### 8.2 Reactivos

- Productos de PCR con fragmento a insertar
- pGEM-T Easy vector (Promega)
- 2X Rapid Ligation Buffer (Promega)
- ADN Ligasa T4 (Promega)
- Agua libre de nucleasas

## 9. Procedimiento

**9.1** Cuantificar con NanoDrop One la concentración de los productos de PCR. Realizar una dilución para llevar el producto a  $4\text{ ng}/\mu\text{L}$  de ADN.

**9.2** Centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos los reactivos a utilizar. Preparar las reacciones de ligación como se indica en el cuadro 1 en tubos de 1.2 mL.

**Cuadro 1.** Reacciones de ligación

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
2x Rapid Ligation Buffer	5
pGEM-T Easy vector (50 ng)	1
Producto de PCR (fragmento)	2
ADN Ligasa T4	1
Agua libre de nucleasas	1
Volumen final	10



*Es importante respetar el orden de adición de cada componente para evitar otros productos secundarios.*

**9.3** Mezclar las reacciones con pipeteo.

**9.4** Incubar las ligaciones a 4°C durante toda la noche.

**9.5** Almacenar las ligaciones a -20°C.

## **10. Cálculos**

Para la elaboración de diluciones que lleven al producto de PCR a 4 ng/μl

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

## **11. Control de calidad**

Llevar a cabo una transformación con células competentes y verificar el crecimiento de colonias. Utilizar como control un plásmido con funcionalidad ya probada.

## **12. Reporte de datos y documentos utilizados**

N/A

## **13. Reporte**

N/A

Anexo 2:

POE II: Generación de *E. coli* XL1 Blue y HT 115 (DE3) competentes

<b>Código del POE</b>	<b>II</b>
<b>Área</b>	<b>Ingeniería genética</b>
<b>Versión</b>	<b>Primera</b>
<b>Idioma</b>	<b>Español</b>
<b>Título</b>	<b>Generación de células <i>E. coli</i> XL1 Blue y HT 115(DE3) ultracompetentes por el método de INOUE</b>
<b>Escrito por</b>	<b>Claudia Alfaro</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>15 de abril de 2019</b>
<b>Revisado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	
<b>Aprobado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	

## **1. Propósito**

**1.1.** Obtener bacterias *Escherichia coli* XL1 Blue y HT 115 (DE3) ultracompetentes para su transformación empleando el método de INOUE.

## **2. Aplicación**

Las células competentes son el punto de inicio para cualquier procedimiento de ingeniería genética. Al alcanzar su estado de competencia, las bacterias están listas para la transformación con plásmidos que cuenten con un inserto de interés. Posteriormente, estas

podrán expresarlo y, según la cepa que se esté empleando, obtener las moléculas que se precisan.

### 3. Referencias

3.1 Sambrook, J. y D. Russell. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 3ra ed. Cold Sping Harbor Laboratory Press. Vol. 1. Protocolo 24, páginas 112-115.

### 4. Terminología y abreviaciones

4.1. Célula competente: célula que se encuentra en un estadio adecuado de crecimiento y desarrollo para su transformación con un plásmido determinado.

4.2 *E. coli* XL1 Blue: Cepa de *Escherichia coli* que permite clonar ADN plasmidial en elevadas cantidades.

4.3. *E. coli* HT115(DE3): Cepa de *Escherichia coli*, con una mutación en el gen que codifica para la Rnasa III, para prevenir la hidrólisis enzimática del material genético acumulado, como el ARNdh.

4.4 Tet: Tetraciclina

### 5. Principio

El método de INOUE para la obtención de células competentes es una alternativa eficiente para el tradicional método de Hannahan. Ambos consisten en el monitoreo de un cultivo de la cepa de interés hasta que lleguen a su punto de competencia. Aquí se detienen las células para su tratamiento con buffers respectivos y su congelación, a manera de poder utilizarlas en el punto adecuado cuando sean necesarias.

### 6. Documentos asociados

Sambrook, J. y D. Russell. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 3ra ed. Cold Sping Harbor Laboratory Press. Vol. 1. Protocolo 24, páginas 112-115.**Seguridad**  
Usar guantes y bata de laboratorio.

### 7. Equipos materiales y reactivos

#### 8.1 Equipo y materiales

- Campana de flujo laminar
- Cubeta con hielo
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl
- Puntas para micropipeta de 10, 100 y 1000 µl

- Tubos eppendorf de 1.6 mL
- Shaker
- Erlenmeyers estériles de 250 mL
- NanoDrop One
- Centrífuga

## 8.2 Reactivos

- *E. coli* XL1 Blue y HT 115 (DE3) sembrada 24 horas antes en agar.
- Caldo LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 5 g/L NaCl)
- Caldo SOB (20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 0.5 g/L NaCl)
- Tetraciclina 500X (6.25 mg/ml)
- DMSO estéril
- Etanol absoluto
- Nitrógeno líquido
- PIPES
- Buffer INOUE
  - Cloruro de manganeso tetrahidratado
  - Cloruro de calcio dihidratado
  - Cloruro de potasio
  - PIPES

## 8. Procedimiento

### 9.1 Preparar el buffer INOUE

**9.1.1** Preparar una solución de PIPES 0.5 M pH 6.7. Para ello, disolver 15.1g de PIPES en 80 mL de agua ultra pura. Ajustar el pH con KOH 5M y llevar a un volumen final de 100 mL. Esterilizar empleando un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**9.1.2** Preparar el buffer INOUE mezclando todos los componentes enlistados en la tabla siguiente. Ajustar el volumen a 1L con agua ultrapura.

**Cuadro 1.** Reactivos y concentraciones para la preparación del buffer INOUE

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad por litro</b>	<b>Concentración final</b>
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	10.88g	55 mM
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.20 g	15 mM
KCl	18.65 g	250 mM
PIPES (0.5 M, pH 6.7)	20 mL	10 mM
Agua ultrapura	Llevar a 1 L	--

**9.1.3** Esterilizar con filtro de 0.45 µm y almacenar a -20°C.

**9.2** De una placa con *E. coli* que ha sido incubada por 24 horas a 37°C, tomar una colonia bacteriana (2-3mm de diámetro) y transferir a 25 mL de LB o SOB en un Erlenmeyer de 250 mL. Agregar 50 µL de tetraciclina. Incubar de 6 a 8 horas a 37°C con una agitación vigorosa.

**9.3** Preparar 3 Erlenmeyers de 250 mL, cada uno con 64 mL de SOB y 125 µL de tetraciclina. Al primer matraz, agregar 2 mL del precultivo; al segundo, 1 mL; y al tercero, 500 µL de precultivo. Incubar overnight entre 18-22°C a 150 rpm.

**9.4** Monitorear cada hora (o según sea conveniente acorde a la turbidez de cada cultivo) el OD600 con el NanoDrop One de cada Erlenmeyer hasta que alguno de los tres alcance el 0.55.

**9.5** Transferir el cultivo a baño de hielo por 10 minutos y descartar los otros dos.

**9.6** Centrifugar a 2500g a 4°C durante 10 minutos.

**9.7** Decantar medio y resuspender en 10 mL de buffer INOUE frío.

**9.8** Centrifugar a 2500g a 4°C durante 10 minutos.

**9.9** Decantar sobrenadante y resuspender las células en 3 mL de buffer INOUE frío.

**9.10** Agregar 150 µL de DMSO frío y dejar reposar en hielo por 10 minutos.

**9.11** Alicuotar la mezcla (100 o 50 µL) en tubos eppendorf de 1.6 mL previamente rotulados.

**9.12** Sumergir los tubos en etanol absoluto para congelar y almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se necesiten. Si no se cuenta con etanol absoluto, puede utilizarse una sumersión en nitrógeno líquido para congelar las células.

## **9. Cálculos**

Cálculo para determinar de dilución y antibióticos

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$  concentración/dilución inicial

$V_1$  volumen a determinar

$C_2$  concentración/dilución a la que se quiere llegar

$V_2$  volumen que se quiere utilizar

## **10. Control de calidad**

Para confirmar la competencia de las bacterias, llevar a cabo una transformación con plásmido conocido y una alícuota de células competentes cuya eficacia ya se ha probado con anterioridad.

## **11. Reporte de datos y documentos utilizados**

**11.1** Anotar datos de temperaturas y revoluciones por minuto de incubación.

**11.2** Llevar un control de los OD600 de cada cultivo.

## **12. Reporte**

N/A

Anexo III:

POE III: Transformación de células competentes mediante choque térmico

<b>Código del POE</b>	<b>III</b>
<b>Área</b>	<b>Ingeniería genética</b>
<b>Versión</b>	<b>Segunda</b>
<b>Idioma</b>	<b>Español</b>
<b>Título</b>	<b>Transformación de <i>E. coli</i> XL1 Blue y HT 115 (DE3) competente con ligaciones previamente elaboradas mediante choque térmico</b>
<b>Escrito por</b>	<b>Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>28 de mayo de 2018</b>
<b>Modificado por</b>	<b>Claudia Alfaro</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>7 de abril de 2019</b>
<b>Aprobado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	

## **1. Propósito**

**1.1.** Transformar bacteria *Escherichia coli* competente con ligaciones realizadas previamente que contienen diferentes insertos del gen *doublesex*.

## **2. Aplicación**

La cepa *E. coli* XL1 Blue permite una producción eficiente del plásmido con el que se le ha transformado. Esto la convierte en una maquinaria adecuada para la generación de elevadas cantidades de este y así realizar una posterior extracción y secuenciación. La

transformación de *E. coli* HT 115 (DE3) con ADN plasmidial que cuente con el inserto del gen de interés permite la producción de ARNdh del gen respectivo de manera controlada.

### 3. Referencias

**3.1** Lara, AG. y P. Villatoro (2018). Transformación de *E. coli* HT115(DE3) con ADN plasmidial del clon 2 de *zpg* y clon 3 de *boule* por choque térmico. POE 1.0 *Técnicas innovadoras para el control de vectores*. Trabajo de Graduación. Universidad del Valle de Guatemala.

**3.2** Thermo Fisher Scientific. (2018a). Bacterial Transformation Workflow—4 Main Steps. Encontrado en:

<https://www.thermofisher.com/us/en/home/lifescience/cloning/cloninglearningcenter/invitrogen-school-of-molecularbiology/molecularcloning/transformation/bacterialtransformationworkflow.html>.

**3.3** Promega Corporation. (2015). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual. Encontrado en: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360#protocols>

### 4. Terminología y abreviaciones

**4.1.** ARNdh: Ácido ribonucleico de doble hebra.

**4.2.** *dsx*: gen *doublesex*, identificado en *Drosophila melanogaster* que se encuentra en el final de la cascada de diferenciación sexual.

**4.3** *E. coli* XL1 Blue: Cepa de *Escherichia coli* que permite clonar ADN plasmidial en elevadas cantidades.

**4.4.** *E. coli* HT115(DE3): Cepa de *Escherichia coli*, con una mutación en el gen que codifica para la Rnasa III, para prevenir la hidrólisis enzimática del material genético acumulado, como el ARNdh.

**4.5** Tet: Tetraciclina

**4.6** Carb: Carbenicilina

**4.7** PCR: Reacción en cadena de la polimerasa



## 5. Principio

El método de choque térmico consiste en incubar las células en solución con cationes divalentes y a un cambio drástico de temperatura, esto provoca que la membrana se rompa y entre el plásmido (Thermo Fisher Scientific, 2018a).

## 6. Documentos asociados

Promega Corporation. (2015). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual. Encontrado en: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360#protocols>

## 7. Seguridad

Usar guantes y bata de laboratorio.

## 8. Equipos materiales y reactivos

### 8.1 Equipo y materiales

- Campana de flujo laminar
- Baño de agua
- Cubeta con hielo
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl
- Puntas para micropipeta de 10, 100 y 1000 µl
- Shaker
- Termómetro
- Centrífuga
- Placas petri de agar LB con tetraciclina y carbenicilina

### 8.2 Reactivos

- ADN plasmidial de los genes
- Células *E. coli* HT115 (DE3) competentes
- Medio SOC (20 g/L Triptone, 5 g/L extracto de levadura, 4.8 g/L MgSO<sub>4</sub>, 3.603 g/L dextrosa, 0.5g/L NaCl y 0.186 g/L KCl)
- Agar LB (10 g/L Peptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 12 g/L Agar).
- Tetraciclina 500X (6.25 mg/ml)
- Carbenicilina 1000X (100 mg/ml)

## 9. Procedimiento

9.1 Agregar 1 µl de dilución ADN plasmidial a 100 µl de células *E. coli* competentes.

9.2 Colocar la mezcla de células y plásmido en hielo por 15 minutos

9.3 Colocar en baño de agua a 45°C por 45 segundos.

9.4 Colocar en hielo por 3 minutos

9.5 Añadir 200 µl de SOC

9.6 Incubar por 1 hora y media con agitación a 130 rpm en shaker

9.7 En el caso de transformar la cepa *E. coli* HT 115 (DE3): Centrifugar por 3 minutos a 12,000 rpm. Si es la cepa XL1 Blue, saltar este paso y continuar con el 9.8.

9.8 Sembrar 300uL del cultivo en placas de LB con Tet [12.5 µg/ml] y Carb [100 µg/ml].

9.9 Incubar O/N a 37°C

## 10. Cálculos

Cálculo para determinar de dilución y antibióticos

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C<sub>1</sub> concentración/dilución inicial

V<sub>1</sub> volumen a determinar

C<sub>2</sub> concentración/dilución a la que se quiere llegar

V<sub>2</sub> volumen que se quiere utilizar

## 11. Control de calidad

Para confirmar la estabilidad de los insertos en la cepa de *E. coli* HT115 (DE3) se realizará un PCR de colonias, con los plásmidos como control positivo (ver POE IV).

## 12. Reporte de datos y documentos utilizados

Anotar datos de temperaturas y revoluciones por minuto de incubación. Marcar la cantidad de clones obtenidos como positivos para cada uno de los segmentos.

## 13. Reporte N/A

Anexo 4:

POE IV: PCR de colonias

<b>Código del POE</b>	<b>IV</b>
<b>Área</b>	<b>Ingeniería genética</b>
<b>Versión</b>	<b>Segunda</b>
<b>Idioma</b>	<b>Español</b>
<b>Título</b>	<b>PCR de colonias de cepa transformada con inserto de <i>dsx</i></b>
<b>Escrito por</b>	<b>Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>28 de mayo de 2018</b>
<b>Modificado por</b>	<b>Claudia Alfaro</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>7 de abril de 2019</b>
<b>Aprobado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	

## **1. Propósito**

**1.1.** Confirmar la presencia de los insertos *dsx* en las cepas de *E. coli* HT115 (DE3) y XL1 Blue transformadas.

## **2. Aplicación**

El PCR de colonias permite seleccionar a las colonias de *E. coli* HT115 (DE3) y XL1 Blue que fueron transformadas de manera exitosa. Es decir, verificar que colonias cuentan con el constructo plasmidial con el inserto del gen *dsx*. Esto permite identificar las colonias de

interés para hacer stocks de glicerol de las mismas y para la inducción de la producción del plásmido en elevadas cantidades.

### 3. Referencias

Promega Corporation. (2009). Recombinant Clone Screening Using the GoTaq® Hot Start

Green Master Mix. Encontrado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/promega-notes/101/recombinant-clone-screening-using-the-gotaq-hot-start-green-master-mix.pdf?la=en>

### 4. Terminología y abreviaciones

**4.1. *dsx*:** gen *doublesex*, identificado en *Drosophila melanogaster* que se encuentra en el final de la cascada de diferenciación sexual.

**4.2 *E. coli* XL1 Blue:** Cepa de *Escherichia coli* que permite clonar ADN plasmidial en elevadas cantidades.

**4.3. *E. coli* HT115(DE3):** Cepa transgénica de *Escherichia coli*, que posee una mutación en el gen que codifica para la Rnasa III, lo que evita la hidrólisis enzimática del material genético acumulado.

**4.4 PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

### 5. Principio

El PCR se basa en múltiples ciclos de temperatura que permiten la síntesis y amplificación de un fragmento específico de ADN. El PCR de colonias utiliza cebadores específicos para amplificar la porción del plásmido que cuenta con el inserto del gen. La presencia o ausencia del inserto se verifica por medio de bandas del tamaño esperado para el gen con electroforesis en gel de agarosa.

### 6. Documentos asociados

Promega Corporation. (2009). Recombinant Clone Screening Using the GoTaq® Hot Start

Green Master Mix. Encontrado en:

<https://www.promega.com/-/media/files/resources/promega-notes/101/recombinant-clone-screening-using-the-gotaq-hot-start-green-master-mix.pdf?la=en>

## 7. Seguridad

Usar doble guantes y bata de laboratorio especial para trabajar con bromuro de etidio.

## 8. Equipos materiales y reactivos

### 8.1 Equipo y materiales

- Micropipetas de 10 y 100  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas de 10 y 100  $\mu$ l
- Tubos eppendorf para PCR
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador UV
- 

### 8.2 Reactivos

- ADN plasmidial usado en transformación
- Go Taq Hot Start Master Mix
- Cebadores M13 forward y reverse
- Colonias de bacterias transformadas
- Loading buffer
- Escalera 100pb Novagen
- Buffer TBE
- Agarosa
- Bromuro de etidio

## 9. Procedimiento

### 9.1 Reacción de PCR de colonias

**9.1.1** Preparar el *Master mix* en un tubo eppendorf de 600  $\mu$ l (cuadro 1).

**9.1.2** Traspasar 14 $\mu$ l de *master mix* a 7 tubos eppendorf de 200  $\mu$ l (uno para cada reacción)

**9.1.3** Con ayuda de una micropipeta picar una colonia de *E. coli* HT115 (DE3) transformada con inserto y resuspender la colonia en la mezcla de reacción de tubo.

**9.1.4** A tres tubos diferentes con 14  $\mu\text{l}$  del *master mix* cada uno, agregar 1  $\mu\text{l}$  del ADN plasmidial con inserto del gen *dsx* para cada tubo. Estos serán los controles positivos del PCR.

**9.1.5** Dejar un tubo con 14 $\mu\text{l}$  del *master mix* sin plásmido ni colonia, como control negativo del PCR.

**9.1.6** Correr en termociclador en programa de Colony PCR

**Cuadro 1.** Reacción de PCR de colonias

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	1 reacción	8 reacciones
Go Taq Hot Start Master Mix	2X	1X	7.5 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$
CebadorM13F	10 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	0.75 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$
CebadorM13R	10 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	0.75 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$
Agua			5 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
Colonia/plásmido			1 $\mu\text{l}$	N/A

## 9.2 Electroforesis en gel de agarosa

**9.2.1** Preparar gel de agarosa 0.8% en buffer TBE. Colocar mezcla en erlenmeyer y calentar en microondas hasta que esté cristalino.

*Es importante que esté completamente transparente, de lo contrario el gel no se podrá visualizar bien.*

**9.2.2** Esperar a que la temperatura disminuya y agregar 2  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio y colocar gel sobre la canasta con el peine. Dejar polimerizar el tiempo que sea necesario.

**9.2.3** Pasar el gel a la cámara de electroforesis y llenar la cámara con buffer TBE.

*Asegurarse que esté colocado en dirección de negativo a positivo.*

**9.2.4** Cargar 7µl de escalera de 100pb en el cebadorpozo.

**9.2.5** En los demás pozos cargar 6µl de los productos de PCR y de los controles

**9.2.6** Correr a 100V por 30 minutos.

*Estar atento para que la corrida no se salga del gel, de ser necesario apagar la cámara antes de que transcurran los 30 minutos.*

## **10. Cálculos**

Gel de agarosa 2% en buffer TBE

$$g \text{ de agarosa} = \frac{(2\%)(45\text{mL de buffer TBE})}{100}$$

$$P_1 = 0.9g \text{ de agarosa}$$

## **11. Control de calidad**

Se esperan bandas de 154, 427 y 782 pb que corresponden a cada uno de los fragmentos de *dsx* que se insertaron en las ligaciones.

## **12. Reporte de datos y documentos utilizados**

Anotar el mapa de carga del gel y anotar los tamaños obtenidos de los fragmentos.

## **13. Reporte**

N/A

Anexo 5:

POE V: Extracción de plásmidos por kits

<b>Código del POE</b>	<b>V</b>
<b>Área</b>	<b>Ingeniería genética</b>
<b>Versión</b>	<b>Primera</b>
<b>Idioma</b>	<b>Español</b>
<b>Título</b>	<b>Extracción de plásmidos de interés con <i>GeneJET Plasmid miniprep</i> y <i>PureYield Plasmid Miniprep System</i></b>
<b>Escrito por</b> <b>Fecha y firma</b>	<b>Claudia Alfaro</b> <b>15 de abril de 2019</b>
<b>Revisado por</b> <b>Fecha y firma</b>	
<b>Aprobado por</b> <b>Fecha y firma</b>	

## **1. Propósito**

**1.1.** Extraer plásmidos de bacterias a elevadas concentraciones empleando kits comerciales.

## **2. Aplicación**

La extracción de plásmidos de una bacteria puede utilizarse para purificar ADN plasmidial insertado previamente en ella y proceder a su secuenciación. De la misma forma, este se utiliza para su posterior uso en futuras transformaciones bacterianas a realizar, para un análisis con enzimas de restricción y otros procedimientos como una PCR.



### 3. Referencias

Promega Corporation. 2009. PureYield™ Plasmid Miniprep System. 12 pp. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/pureyield-plasmid-miniprep-system-protocol.pdf?la=en>.

Thermo Fisher Scientific. 2014. GeneJET Plasmid Miniprep Kit. 11 pp. Disponible en : [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012655\\_GeneJET\\_Plasmid\\_Miniprep\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf)

### 4. Terminología y abreviaciones

**4.1** ADN: ácido desoxirribonucleico

**4.2** ADN plasmidial (plásmido): ADN circular con un inserto de interés

### 5. Principio

La extracción de plásmidos se basa en la resuspensión bacteriana en una solución de lisis. Una vez liberado el ADN plasmidial, es posible neutralizar las condiciones para su separación del debris celular con una columna de sílica. Nuevamente, los plásmidos se purifican con soluciones de lavado y luego se eluyen con un buffer determinado que permite su almacenamiento.

### 6. Documentos asociados

**6.1** Promega Corporation. 2009. PureYield™ Plasmid Miniprep System. 12 pp. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/pureyield-plasmid-miniprep-system-protocol.pdf?la=en>.

**6.2** Thermo Fisher Scientific. 2014. GeneJET Plasmid Miniprep Kit. 11 pp. Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012655\\_GeneJET\\_Plasmid\\_Miniprep\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf)

### 7. Seguridad

Utilizar guantes y bata en todo momento mientras se manipulan los cultivos y los plásmidos.

### 8. Equipos materiales y reactivos

#### 8.1 Equipo y materiales

- Micropipetas de 10 y 100  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas de 10 y 100  $\mu$ l
- Tubos eppendorf de 1.6 mL

- Centrifuga para tubos de 1.6 mL

## 8.2 Reactivos

- Cultivo bacteriano con el plásmido a extraer
- Kit PureYield Plasmid Miniprep System de Promega
- Kit GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Fisher Scientific

## 9. Procedimiento

### 9.1 Cultivos con volúmenes grandes

**9.1.1** Centrifugar 10 mL del cultivo a máxima velocidad a 4°C durante 1 minuto.

**9.1.2** Decantar el sobrenadante.

**9.1.3** Resuspender el pellet con 3 mL de buffer TE.

**9.1.4** Traspasar 1.5 mL a un tubo eppendorf de 1.6mL.

**9.1.5** Centrifugar los tubos a máxima velocidad por un minuto.

**9.1.6** Decantar sobrenadante y resuspender con 600 µL de buffer TE.

### 9.2 Extracción con el kit PureYield Plasmid Miniprep System de Promega

**9.2.1** Agregar 100 uL de Cell Lysis Buffer y mezclar por inversión 6 veces (2 min máximo) azul opaco→ Azul claro.

**9.2.2** Agregar 350 uL de Neutralization Solution, la cual debe estar entre 4-8°C, y mezclar fuertemente por inversión→ Cambia a amarillo, luego invertir 3 veces más.

**9.2.3** Centrifugar a velocidad máxima por 3 minutos.

**9.2.4** Transferir el sobrenadante (~900 uL) a la columna del kit.

**9.2.5** Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.

**9.2.6** Descartar el contenido del tubo recolector y volver a re usarlo con la columna.

**9.2.7** Agregar 200 uL de Endotoxin Removal Wash a la columna.

**9.2.8** Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.

**9.2.9** Agregar 400 uL de Wash Solution a la columna. Centrifugar a máxima velocidad, 1 minuto.

**9.2.10** Transferir la columna a un tubo estéril de 1.5mL.

**9.2.11** Agregar 35 uL de Elution Buffer directamente a la matriz de la columna.

**9.2.12** Dejar a temperatura ambiente por 1 minuto.

**9.2.13** Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto para eluir el ADN plasmídico.

**9.2.14** Cuantificar en NanoDrop.

**9.2.15** Almacenar a -20°C.

### **9.3 Extracción con el kit GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Fisher Scientific**

**9.3.1** Centrifugar los tubos con cultivo re suspendidos en TE a máxima velocidad.

**9.3.2** Descartar sobrenadante

**9.3.3** Resuspender el el botón celular en 500 uL de Resuspension Solution

**9.3.4** Agitar en vortex hasta disolver el botón y dar un spin

**9.3.5** Agregar 500 ul de Lysis Solution y mezclar invirtiendo cuidadosamente el tubo de 4-6 veces hasta que la solución se vea viscosa.

**9.3.6** Incubar a temperatura ambiente 4 minutos exactos. Si incuba por más de 5 minutos su plásmido puede desnaturalizarse.

**9.3.7** Adicionar 700 uL de Neutralization Solution y mezcle inmediatamente y cuidadosamente invirtiendo de 4-6 veces el tubo.

**9.3.8** Centrifugar 5 min a 16 rpm para recolectar el debris celular y el DNA cromosomal

**9.3.9** Transferir el sobrenadante a la columna de sílica. No transferir nada del precipitado blanco.

**9.3.10** Centrifugar 1 min. Descartar el líquido y volver a colocar el tubo a la columna.

**9.3.11** Adicionar 1000 ul de wash solution y centrifugar 1 min. Descartar el líquido y volver a colocar el tubo en la columna

**9.3.12** Repetir paso anterior

**9.3.13** Centrifugar por 1 minuto nuevamente para recolectar los residuos de wash solution

**9.3.14** Transferir la columna en un tubo limpio de 1.5 mL. Agregar 100 uL de Elution Buffer en el centro de la columna para eluir el plásmido.

**9.3.15** Incubar 2 min a temperatura ambiente y centrifugar por dos minutos.

**9.3.16** Cuantificar en NanoDrop y almacenar ADN plasmídico -20°C.

## **10. Cálculos**

N/A

## **11. Control de calidad**

En las lecturas realizadas con el NanoDrop One, es importante verificar las razones de absorbancia 260/280 y 230/260.

## **12. Reporte de datos y documentos utilizados**

Anotar el mapa de carga del gel y anotar los tamaños obtenidos de los fragmentos.

## **13. Reporte**

N/A

Anexo 6:

POE VI: Extracción de ARN total de pupas y adultos de *Anopheles albimanus*

<b>Código del POE</b>	VI
<b>Área</b>	Ingeniería genética
<b>Versión</b>	Tercera
<b>Idioma</b>	Español
<b>Título</b>	Extracción de ARN de <i>Anopheles albimanus</i> (larva y pupa) con kit SV total RNA Isolation System Z3100 de Promega
<b>Escrito por</b>	Andrea Ramos Nufio; 12027
<b>Fecha y firma</b>	03 de febrero de 2018
<b>Revisado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	
<b>Arobado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	

**1. Propósito:**

1. Aprender a extraer ARN de *Anopheles albimanus* adulto con el uso del kit SV total RNA Isolation System Z3100 de Promega.
2. Extraer ARN de buena calidad, sin contaminantes y a concentraciones adecuadas para ser utilizado en la síntesis de ADN complementario (cDNA).

**2. Aplicación:** El ARN extraído de este mosquito servirá para hacer síntesis de ADN copia y poder analizar la expresión de los genes ortólogos de *boule* y *zpg* en *An albimanus*. Esto se logrará mediante RT-PCR y análisis de expresión relativa mediante PCR en tiempo real con Sybr Green.

**3. Referencias:**

1. Promega. SV Total RNA Isolation System Technical Manual TM048 Z3100.  
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>

2. Farrell, R. (2010). *RNA Methodologies: a laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 4ta. Ed. Editorial Elsevier. 742Pp.

**4. Terminología y abreviaciones:**

1. BME:  $\beta$ -mercaptoetanol
2. GTG: Tiocianato de guanidina

**5. Principio:**

El procedimiento se basa en la homogenización de tejido de *An. albimanus* (larva y pupa) para la extracción de ARN mediante la combinación de tiocianato de guanidina (GTG) y  $\beta$ -mercaptoetanol para inactivar las ribonucleasas presentes en el tejido. El GTG junto con dodecilsulfato sódico (SDS) actúan como disruptor de complejos nucleoprotéicos, permitiendo que el ARN liberado a la solución sea extraído libre de proteínas.

La dilución de extractos celulares en presencia de altas concentraciones de GTG causa precipitación selectiva de proteínas celulares, mientras que el ARN se mantiene en la solución. Luego de la centrifugación hecha para aclarar el lisado de las proteínas precipitadas y debris celular, el ARN es selectivamente precipitado con etanol y se une a la superficie en la columna utilizada (Spin Basket). La ADnasa del kit es aplicada a la membrana para digerir el ADN genómico. El ARN total luego es purificado de sales contaminantes, proteínas e impurezas celulares. Posteriormente es alicuotado, cuantificado y se analiza mediante PCR para saber si tiene contaminación de ADN genómico

**6. Documentos asociados:**

1. Promega. SV Total RNA Isolation System Technical Manual TM048 Z3100.  
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/sv-total-rna-isolation-system-protocol.pdf>

**7. Seguridad:**

1. El tiocianato de guanidina es un reactivo irritante por lo que si es inhalado, ingerido o absorbido causa quemaduras. Siempre utilizar guantes, bata y zapatos cerrados. Este reactivo rápidamente inhibe la actividad de RNAsas.
2. El  $\beta$ -mercaptoetanol es una solución igual de toxica que causa irritaciones en la piel y en el tracto respiratorio, usar guantes y trabajar bajo campana.
3. El SDS es un reactivo ligeramente irritante y causa dermatitis, por lo cual se recomienda de igual manera utilizar guantes, bata y zapatos cerrados.

**8. Equipos, materiales y reactivos:**

**1. Equipos**

1. Centrífuga
2. Macerador eléctrico

**2. Materiales**

1. Micropipetas: 1000uL, 200uL y 10uL.
2. Puntas: 1000uL, 200uL y 10uL.
3. Beaker de desechos.
4. Beaker para colocar maceradores o pistilos usados con cloro.
5. Tubos eppendorff 1.6mL libre de nucleasas (6 por duplicado).
6. Tubos eppendorff de 0.9 mL (6 por duplicado).
7. Tubos de 0.2 MI (2 por duplicado).
8. Pistilos libres de nucleasas (ver anexo).

**3. Reactivos**

1. Etanol al 95%

**9. Procedimiento:**

<b>9.1</b>	Limpiar campana de ARN y dejarla bajo luz UV 15 minutos.																		
<b>9.2</b>	Preparar el lisado de tejido de <i>Anopheles albimanus</i> a partir de muestras menores o iguales a 30mg.																		
<b>9.3</b>	El número de individuos a utilizar por extracción es el siguiente: <table border="1"><thead><tr><th>Estadios</th><th>Peso por individuo (mg)</th><th>Individuos por pool</th></tr></thead><tbody><tr><td>Larva L1</td><td>0.20</td><td>150</td></tr><tr><td>Larva L2</td><td>0.25</td><td>120</td></tr><tr><td>Larva L3</td><td>0.70</td><td>40</td></tr><tr><td>Larva L4</td><td>4.3</td><td>7</td></tr><tr><td>Pupa</td><td>6.7</td><td>5</td></tr></tbody></table>	Estadios	Peso por individuo (mg)	Individuos por pool	Larva L1	0.20	150	Larva L2	0.25	120	Larva L3	0.70	40	Larva L4	4.3	7	Pupa	6.7	5
Estadios	Peso por individuo (mg)	Individuos por pool																	
Larva L1	0.20	150																	
Larva L2	0.25	120																	
Larva L3	0.70	40																	
Larva L4	4.3	7																	
Pupa	6.7	5																	
<i>Las pupas deben de ser sexadas. Se hace duplicado por macho y duplicado por hembra.</i>																			

9.4	Etiquetar todos los tubos de 1.6mL que se van a usar, identificando el <b>estadio al que pertenecen, si son machos o hembras, fecha, número de duplica e iniciales de la(s) persona(s)</b> que está haciendo la extracción para futuras identificaciones.
9.5	<p>Utilizar filtro de 53 um para trasladar las larvas en los tubos cuando estén en los estadios de L1, L2 y L3. Tratar de hacer este paso tratando de que no quede ninguna larva en el filtro y que todas sean colocadas en los tubos.</p> <p>Colocar las larvas, pupas en tubos de 1.6mL.</p> <p>9.6</p> <p>9.7</p> <p>Extraer toda el agua de los tubos colocándolos en el bloque frío alrededor de 40 segundos- 1 minuto para que las larvas y pupas bajen al fondo del tubo, de esta manera será más fácil extraer el agua del tubo con pipeta de 1000uL o 200uL.</p> <p>9.8</p> <p>No hay necesidad de usar filtro con las larvas L4 ni pupas para introducir las en el tubo de 1.6mL. Para esto se usa una pipeta pasteur y se introducen en el tubo. Se coloca en bloque frío y se extrae el agua.</p> <p><b>IMPORTANTE:</b></p> <p><b>Modificaciones (RNA later): En caso de muestras preservadas en RNA later, remover el RNA later utilizando una micropipeta. OJO: cuando el ARN later se descongela queda un sedimento blanco al final del tubo, entonces previo a removerlo se debe de pipetear para solubilizarlo nuevamente.</b></p>
9.9	Agregar a cada tubo, 175uL de RNA Lysis buffer (+ BME).
9.10	<p>9.10</p> <p>Macerar con el macerador eléctrico y con los pistilos previamente tratados con 2.5% SDS y NaOH 5N. Todas las maceraciones deben de realizarse en frío, es decir utilizando el bloque frío.</p> <p><b>Realizar la lisis durante aprox. 15-20 min</b></p> <p><i>Macerar hasta que no se vea fragmentos de larva o pupa. La maceración permite homogeneizar el tejido.</i></p> <p><i>El <math>\beta</math>-mercaptoetanol y los pistilos tratados con SDS y NaOH inhiben la contaminación por nucleasas. Posterior a la maceración, los pistilos deben de dejarse en romojo con cloro, luego tratarlos nuevamente si es necesario.</i></p>
10.1	Añadir 350uL de RNA Dilution Buffer.
10.11	Mezclar por inversión de 3-4 veces.



<p>9.7</p> <p>9.8</p>	<p>Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm a temperatura ambiente.</p> <p><b>Si usted todavía observa partículas en el lisado a transferir, centrifugar nuevamente por 5 minutos más. Solamente si considera necesario, repetir 5 minutos si todavía se observan partículas en el sobrenadante (pocas veces fue necesario repetir la centrifugación de 5 minutos dos veces).</b></p> <p>Transferir alrededor de 475uL del lisado a un tubo de 1.6uL libre de nucleasas, nuevo y <b>previamente</b> etiquetado según las muestras, fecha, número de dúplica, sexo e iniciales de la persona que está realizando el proceso para evitar confusiones. ¡CUIDADO! NO TRANSFERIR PARTÍCULAS DEL PELLET FORMADO, EVITAR PASAR ESTAS PARTÍCULAS EL SOBRENADANTE AL NUEVO TUBO.</p> <p><i>Este buffer contiene tiocianato de guanidina que actúa como disruptor de complejos de nucleoproteínas, permitiendo que el ARN sea liberado a la solución. Los desechos celulares se descartan mediante centrifugación. *En este paso NO se incuba a 70°C por 3 minutos debido a que al hacerlo el ARN sale en poca concentración y de baja integridad.</i></p>												
<p>9.9</p> <p>9.10</p> <p>9.11</p> <p>9.12</p>	<p>Agregar 200uL de etanol al 95% a cada tubo, mezclar por pipeteo y transferir a la Spin Basket o columna.</p> <p>Centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Descartar el eluido (lo que paso a través de la columna)</p> <p>Agregar 600uL de RNA Wash Solution.</p> <p>Centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm a temperatura ambiente. Ya no es necesario usar el bloque frío.</p> <p><i>El ARN es selectivamente precipitado con etanol. Luego de que se eliminó el débris celular y los desechos proteicos mediante la centrifugación, el ARN se une a la superficie de la columna. La reacción de unión a la columna ocurre rápidamente debido a la ruptura de las moléculas de agua por las sales caotrópicas, lo que permite la adsorción de los ácidos nucleicos en la sílica.</i></p>												
<p>9.13</p>	<p>Preparar la mezcla de incubación de ADnasa mezclando a temperatura ambiente los siguientes reactivos incluido en el kit:</p> <table border="1" data-bbox="386 1587 1003 1780"> <thead> <tr> <th></th> <th>Yelow Core Buffer</th> <th>MnCl2 0.09M</th> <th>DNase I</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>N =1</td> <td>40ul</td> <td>5ul</td> <td>5ul</td> </tr> <tr> <td>N=</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Yelow Core Buffer	MnCl2 0.09M	DNase I	N =1	40ul	5ul	5ul	N=			
	Yelow Core Buffer	MnCl2 0.09M	DNase I										
N =1	40ul	5ul	5ul										
N=													

<p><b>9.14</b></p> <p><b>9.15</b></p> <p><b>9.16</b></p> <p><b>9.17</b></p>	<p>Estos son los volúmenes usados para 1 tubo o una columna de extracción de ARN. Se deben de aumentar las cantidades dos o cuatro veces, ya que se trabaja en duplicado (o en el caso de adultos y pupas, se debe de aumentar cuatro veces dicha cantidad).</p> <p>Añadir 50 uL de la mezcla de ADnasa directamente a la membrana de cada columna.</p> <p>Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.</p> <p><i>La ADnasa es aplicada directamente a la membrana para digerir todo el ADN genómico. El tiempo de incubación se aumentó 15 minutos más de los establecido por el protocolo del kit de extracción, porque al dejar solamente incubando por 15 minutos todavía se encontraba presencia de ADN genómico al hacer PCR convencional. Al dejarla por 30 minutos, se obtuvo una banda de amplificación menos fuerte luego de hacer PCR que en las muestras que se incubaron solamente por 15 minutos.</i></p> <p><b>NO OLVIDAR: Agregar 200uL de DNase STOP SOLUTION a la spin basket.</b></p> <p><b>Centrifugar 1 minuto a 13,000 × g.</b></p>
<p><b>9.18</b></p> <p><b>9.19</b></p> <p><b>9.20</b></p> <p><b>9.21</b></p> <p><b>9.22</b></p> <p><b>9.23</b></p>	<p>Añadir 600 uL de RNA Wash Solution.</p> <p>Centrifugar por 1 minuto y vaciar lo eluido.</p> <p>Añadir 250uL de RNA Wash Solution,</p> <p>Centrifugar por 2 minutos</p> <p>Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.6mL libre de nucleasas.</p> <p>Añadir 100uL de agua libre de nucleasas a la membrana y centrifugar por 1 minuto.</p> <p><i>El ARN extraído total es eluído con el agua libra de nucleasas al tubo de 1.6mL.</i></p>
<p><b>9.24</b></p>	<p>Transferir el volumen obtenido de esta última centrifugación al tubo de 1.6ml el cual debe de estar correctamente etiquetado con:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• fecha de extracción</li> <li>• especie</li> <li>• estadio</li> <li>• género</li> <li>• número de réplica (R1, R2, etc) .</li> <li>• Cantidad de ARN (ej. 1ug)</li> </ul> <p>Colocar nuevamente en bloque frío.</p>

	<i>No se transfiere directamente la columna de extracción de ARN a este tubo de elución, ya que al momento de centrifugar la tapadera del tubo que trae el kit se rompe, pero no se rompe en otros tubos libres de nucleasas comprados aparte.</i>
<b>9.25</b>	Cuantificar rápidamente las muestras en nanodrop (mantener en bloque frío) (En triplicado). Sacar el promedio y usar este valor para estimar la cantidad necesaria para hacer alícuotas de 1ug de ARN.
<b>9.26</b>	Hacer alícuotas de 1ug de ARN.
	Etiquetar de la misma manera los tubos de alícuotas.
<b>9.27</b>	Guardar todas las muestras incluyendo el stock a -70°C, menos la alícuota de 2.5uL ya que se usa para cuantificar el ARN en Nanodrop, saber si la concentración es suficiente y si la extracción fue exitosa. Anotar las razones A260/280 y A260/230.
	<i>Si se necesita verificar integridad se recomienda hacer gel de agarosa 1.5%, se dejan correr las muestras de 5uL de ARN y 1uL de loading buffer a 100V por 35 minutos.</i>
	<i>Si se quiere saber si hay contaminación por ADN genómico, realizar PCR convencional utilizando cebadores o iniciadores de Actina 10uM y 1uL de muestra de ARN extraído. Correr dichas muestras en gel de agarosa al 1.5% utilizando un marcador molecular de 50bp. Se puede observar que sí hay presencia de ADN genómico, por lo tanto se debe de hacer un tratamiento con ADnasa antes de realizar la reacción de transcriptasa reversa.</i>

**10. Cálculos:**

N/A

**11. Control de calidad:**

1. Usar guantes en todo momento.
2. Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente. Es decir, trabajar bajo campana de ARN, utilizando pipetas y puntas únicamente usadas para la extracción de ARN.
3. Limpiar pipetas, caja de puntas y bloque frío con RNase Away. Dejar en campana de flujo laminar de ARN con luz UV por 15 minutos antes de realizar la extracción de ARN.
4. Al mover reactivos, tocar espátulas para realizar mediciones de reactivos y tocar papel para pesar.
5. En cualquier momento posible utilizar material plástico desechable para manipular ARN.
6. Política de resolución de conflictos.

**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

Se debe de anotar si no se llevaron a cabo todos los pasos que manda este protocolo, por si no se obtuvo la concentración adecuada. Si hizo o no un paso de este protocolo que lo llevo a tener una mayor concentración de ARN, añadirlo al mismo.

Las concentraciones de ARN y las absorbancias deben de anotarse en el cuadernito de manera ordenada para evitar confusiones y tener listos los datos para calcular la cantidad de ARN a utilizar en la reacción de transcripción reversa. Se pueden reportar las concentraciones de la siguiente manera:

Estadio	Género	Réplica	Fecha extracción ARN	ng/ul	ng/ul	ng/ul	Promedio ng/ul	260/280	260/230	Cantidad para 1 ug
										=1000ng / promedio

**13. Reporte:**

N/A

**ANEXO**

- Pistilos tratados NaOH 5N y SDS **0.5%**.
  1. Dejar overnight los pistilos usados en un beaker de 600mL con 250mL de NaOH 5N y 250mL de SDS **0.5%**.
  2. Enjuagar los pistilos con agua ultrapura autoclaveada.
  3. Colocarlos en aluminio o bolsas de papel manila.
  4. Autoclavear y secar.

Anexo 7:

POE VII: Tratamiento de ARN de *Anopheles albimanus* con ADNasa y reacción de transcriptasa reversa

<b>Codigo del POE</b>	VII
<b>Área</b>	Ingeniería genética
<b>Version</b>	Segunda
<b>Idioma</b>	Español
<b>Título</b>	Tratamiento de ARN de <i>Anopheles albimanus</i> con ADNasa y reacción de transcripción reversa
<b>Escrito por</b>	Andrea Ramos Nufio; 12027
<b>Fecha y firma</b>	02 de febrero de 2018
<b>Modificado por</b>	Claudia Alfaro
<b>Fecha y firma</b>	21 de junio de 2019
<b>Aprobado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	

**1.Propósito:**

1. Realizar tratamiento con ADNasa con el kit RQ1 RNase-free DNase (Cat#M6101), para eliminar contaminación por ADN genómico de las muestras de ARN extraídas de los distintos estadios de *Anopheles albimanus*.
2. Verificar que el ARN esté libre de ADN genómico mediante PCR convencional con iniciadores de Actina.
3. Hacer ADN copia a partir del ARN mensajero extraído usando el kit Go Script Reverse Transcription System (Promega A5000-A50001).
4. Verificar la presencia ADN copia hecho mediante PCR convencional.

**2.Aplicación:**

Entre las aplicaciones de la reacción de transcripción reversa se encuentran:

- Amplificación del ADN copia hecho a partir de transcritos de ARNm de genes específicos para caracterizar la expresión del gen a lo largo del ciclo de vida de una especie.

- Generación de bibliotecas de ADN copia.

### 3.Referencias:

1. Promega. GoScript Reverse Transcription System Technical Manual. TM316. Consultado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
2. Promega. RQ1 RNase-Free DNase. Part#9PIM610. Consultado en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?la=en>
3. Farrell, R. (2010). *RNA Methodologies: a laboratory Guide for Isolation and Characterization*. 4ta. Ed. Editorial Elsevier. 742Pp.

### 4. Terminología y abreviaciones:

1. cDNA: ADN copia
2. PCR: reacción en cadena de la polimerasa
3. Iniciadores: cebadores
4. CEB: Centro de Estudios en Biotecnología

### 5.Principio:

La reacción de transcripción reversa es utilizada para sintetizar de manera enzimática ADN copia (cDNA) *in vitro* a partir de una hebra plantilla de ARN. Para esta reacción es crítica la integridad del ARN y que no haya otros ácidos nucleicos como ADN genómico en el tubo de reacción. Por lo tanto, es necesario hacer tratamiento con la enzima DNasa I para degradar todas las plantillas de ADN genómico en el ARN extraído. El tratamiento con DNasa se realiza por medio del kit RQ1 RNase-free DNase (Promega, Cat#M6101) y para la reacción de transcripción reversa se utiliza el kit Go Script Reverse Transcription System (Promega, A5000 y A5001).

### 6.Documentos asociados:

1. Promega. GoScript Reverse Transcription System Technical Manual. TM316. Consultado en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/goscript-reverse-transcription-system-protocol.pdf>
2. Promega. RQ1 RNase-Free DNase. Part#9PIM610. Consultado en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?la=en>
3. Ausubel, F., R. Brent., R. Kingston, D., Moore., J.G. Seidman, J. Smith y K. Stuhl. 2003. *Current Protocol in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. Consultado en: [http://www.aun.edu.eg/molecular\\_biology/Proceeding\\_Dec2011/Current%20Protocols%20in%20Mol.%20Biol..pdf](http://www.aun.edu.eg/molecular_biology/Proceeding_Dec2011/Current%20Protocols%20in%20Mol.%20Biol..pdf)

4. Fichas internacionales de seguridad. 2007. Bromuro de etidio. IPCS. Consultado en:  
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1605a1679/1676.pdf>

### 7. Seguridad:

Bromuro de etidio: causa irritación ocular, dolor de garganta, toz. Se descompone al calentarla intensamente produciendo gases tóxicos, incluyendo bromuro de hidrógeno y óxidos fuertes. Utilizar doble guante al trabajar con esta sustancia.

### 8. Equipos, materiales y reactivos:

#### 1. Equipos

1. Termociclador (Marca DEL CEB).
2. Minicentrífuga (para hacer spin down).

#### 2. Materiales

1. Bloque frío
2. Micropipetas: 20, 100 y 10uL.
3. Puntas: 20, 100 y 10uL.
4. Beaker de desechos con cloro
5. Tubos ependorff 0.9mL

**IMPORTANTE: asegurarse de que estos tubos quepan o casen completamente en las entradas del termociclador y no tener que cambiar los tubos a última hora cuando ya tengan el ARN.**

6. Tubos ependorff 0.2mL

#### 3. Reactivos

1. Kit RQ1 RNase-free Cat #M6101
2. Kit Go Script Reverse Transcription System

### 2. Tratamiento con RQ1 RNase-free DNase (Cat #M6101).

<b>9.0</b>	<p>Hacer los cálculos correspondientes, como se muestra a continuación, antes de empezar a trabajar. Cada reacción debe de tener un volumen de ARN previamente extraído que corresponda a <b>1ug</b> de ARN; <b>1uL</b> de RQ1 RNase-free DNase <b>10x Reaction Buffer</b>, <b>1uL</b> de RQ1 RNase-free <b>DNase</b> y agregar H<sub>2</sub>O libre de nucleasa para llevar a un volumen final de 10uL. <b>Hacer los cálculos en Excel e imprimir la hoja con el cuadro que contenga los volúmenes específicos de ARN y agua a agregar según corresponda.</b></p>
------------	--

**PUEDE COPIAR ESTE CUADRO EN EL EXCEL E IMPRIMIR CUANDO ESTE PREPARANDO CADA REACCIÓN:**

**Cuadro 1. Muestras de ARN**

No. (ID)	Nombre de muestra	[ARN] ng/uL	Volumen de ARN tener 1ug de ARN.	Volumen de H2O.	DNasa	Buffer de DNasa	Vol. total
1							10
2							10
3							10
4							10

En esta tabla agregué el “ID” de la muestra para que sea fácil identificar los tubos que contienen ARN extraído de distintos estadios de *An. albimanus*. Esto es opcional, usted los puede identificar como usted quiera, pero **DEBEN** de estar **CORRECTAMENTE** identificados durante todo el proceso hasta llegar a hacer qPCR.

*NOTA:*

- *Es obligatorio que la cantidad de ARN este estandarizada a 1ug para poder usar el kit de ADNasa como el protocolo señala y que la reacción sea eficiente.*
- *El volumen de ARN extraído para tratar con DNasa no debe de ser mayor a 8uL porque se quiere tener un volumen final por reacción de 10uL.*
- *Si el ARN extraído tiene una concentración muy alta y se necesita utilizar un volumen menor al que la pipeta puede medir de ARN para tener 1ug, entonces HAGA CÁLCULOS para utilizar un volumen de ARN de una dilución de 1:10 o 1:5.*
- *Si sucede todo lo contrario y tiene muestras con baja concentración de ARN y debe de utilizar más de 8uL de volumen de ARN para llegar a tener 1ug en la reacción, tiene dos opciones: precipitar con etanol o volver a extraer ARN si considera que la extracción no se hizo correctamente. Se precipita el ARN únicamente cuando es de larva L1 y/o L2.*

*NO SE PREOCUPE* si tiene que volver a extraer, ya que es preferible volver a extraer que tener resultados alterados debido una mala extracción.

**9.1** Después de hacer los cálculos e imprimir la hoja, limpie el área donde va a trabajar y cada uno de los instrumentos con Rnase away y etanol.

**9.2** Etiquetar tubos de 0.9uL con un nombre, número o letra que corresponda a la muestra de ARN a tratar. Agregar de primero el volumen de agua correspondiente a cada tubo. Mantener en frio y



	<p>agregar 1ul de RQ1 RNase-free DNase 10x <b>Reaction Buffer</b> y 1uL de RQ1 RNase-free <b>DNase</b> a cada tubo.</p> <p>Por ejemplo, si usted tratará 15 muestras de ARN, se debe de hacer la solución de 15uL de RQ1 RNase-free DNase 10x Reaction Buffer y 15uL de RQ1 RNase-free DNase. Agregar en cada tubo de 0.9uL 2uL de esta solución y mantener en bloque frío.</p> <p><b>IMPORTANTE:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PONGA ATENCIÓN y TRATE DE NO CONFUNDIRSE al agregar los volúmenes de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y/o ARN, ya que todas las muestras suelen tener concentraciones de ARN distintas, por lo tanto, volúmenes a agregar diferentes. Al hacer esta reacción se pretende estandarizar que todas las muestras tengan 1ug de ARN para que la reacción se eficiente.</b></li> <li>• <i>Se debe de agregar la mezcla de 2uL de RQ1 RNase-free DNase 10x <b>Reaction Buffer</b> y de RQ1 RNase-free DNase antes de preparar y agregar los volúmenes de ARN. El ARN se debe de sacar de -70°C hasta que se vaya a utilizar para que no se degrade. Por esto, es necesario hacer alícuotas de 5-10uL cuando se hace la extracción de ARN, para no sacar el stock sino una alícuota.</i></li> <li>• <i>Nuevamente, <b>SI SE CONFUNDE</b>, puede tomar otra alícuota de ARN y hacer de nuevo la reacción. No es lo recomendable, pero es preferible esto a tener resultados alterados.</i></li> </ul>
<p><b>9.3</b></p>	<p>Agregar el volumen de ARN correspondiente a cada muestra según sus cálculos hechos. Hacer un breve spin down y colocar nuevamente las muestras en frío.</p>
<p><b>9.4</b></p>	<p>Incubar a 37°C por 1 hora en el termociclador. El programa en el termociclador que se encuentra en el CEB (marca) se llama: Tratamiento de DNASA I.</p> <p>Durante este tiempo, usted debe de etiquetar nuevos tubos de 0.9uL (el número de tubos depende del número de muestras a tratar) a los cuales se les agregará 1uL de ARN tratado de cada muestra para hacer PCR y confirmar que ya no hay ADN genómico.</p>
<p><b>9.5</b></p>	<p>Terminado el tiempo de incubación <b>agregar 1uL de RQ1 DNase Stop Solution a cada tubo e incubar a 65°C por 10 minutos.</b> El programa en el termociclador que se encuentra en el CEB (marca) se llama: Tratamiento de DNASA II.</p> <p><i>Se agrega DNase Stop Solution para inactivar DNasa. Se debe de confirmar mediante PCR que no hay ADN genómico en la muestra, porque esto interfiere en la reacción de transcripción reversa.</i></p>

<p><b>9.6</b></p>	<p>Luego de inactivar la DNasa, agregar a tubos de 0.9uL 1uL de las muestras tratadas para hacer PCR. Las muestras del ARN tratado (stock y alícuotas de 1uL) se guardan a 4°C mientras se confirma cuáles son las muestras que están libres de ADN genómico.</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 2. Volúmenes utilizados para hacer PCR:</p> <table border="1" data-bbox="375 407 1271 909"> <thead> <tr> <th data-bbox="375 407 857 531">Reactivo</th> <th data-bbox="857 407 1060 531">Volumen (n=1)</th> <th data-bbox="1060 407 1271 531">Volumen (n= X muestras)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="375 531 857 594">Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x</td> <td data-bbox="857 531 1060 594">7.5uL</td> <td data-bbox="1060 531 1271 594"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 594 857 657">Cebador Forward Actina 10uM</td> <td data-bbox="857 594 1060 657">1uL</td> <td data-bbox="1060 594 1271 657"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 657 857 720">Cebador Reverse Actina 10uM</td> <td data-bbox="857 657 1060 720">1 uL</td> <td data-bbox="1060 657 1271 720"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 720 857 783">Agua libre de nucleasas</td> <td data-bbox="857 720 1060 783">5.5 uL</td> <td data-bbox="1060 720 1271 783"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 783 857 846">Plantilla de <b>ARN</b></td> <td data-bbox="857 783 1060 846">1 uL</td> <td data-bbox="1060 783 1271 846">-----</td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 846 857 909">Volumen total por reacción</td> <td data-bbox="857 846 1060 909">15 uL</td> <td data-bbox="1060 846 1271 909"></td> </tr> </tbody> </table> <p><i>NOTA: Limpiar la campana de área blanca previamente con etanol y cada instrumento a utilizar. Dejar bajo UV durante 15 minutos antes y después de hacer el PCR. NO OLVIDAR agregar al PCR la reacción de control negativo (agua) y control positivo (ADN genómico de <i>An. albimanus</i>).</i></p>	Reactivo	Volumen (n=1)	Volumen (n= X muestras)	Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5uL		Cebador Forward Actina 10uM	1uL		Cebador Reverse Actina 10uM	1 uL		Agua libre de nucleasas	5.5 uL		Plantilla de <b>ARN</b>	1 uL	-----	Volumen total por reacción	15 uL						
Reactivo	Volumen (n=1)	Volumen (n= X muestras)																									
Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5uL																										
Cebador Forward Actina 10uM	1uL																										
Cebador Reverse Actina 10uM	1 uL																										
Agua libre de nucleasas	5.5 uL																										
Plantilla de <b>ARN</b>	1 uL	-----																									
Volumen total por reacción	15 uL																										
<p><b>9.7</b></p>	<p>Colocar el PCR en termociclador con las siguientes condiciones:</p> <table border="1" data-bbox="375 1171 1211 1623"> <thead> <tr> <th data-bbox="375 1171 670 1234">Paso</th> <th data-bbox="670 1171 849 1234">Temperatura</th> <th data-bbox="849 1171 992 1234">Tiempo</th> <th data-bbox="992 1171 1211 1234">Número de ciclos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="375 1234 670 1297">Desnaturalización inicial</td> <td data-bbox="670 1234 849 1297">95°C</td> <td data-bbox="849 1234 992 1297">2 min</td> <td data-bbox="992 1234 1211 1297">1</td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 1297 670 1360">Desnaturalización</td> <td data-bbox="670 1297 849 1360">95°C</td> <td data-bbox="849 1297 992 1360">30seg</td> <td data-bbox="992 1297 1211 1497" rowspan="3">35</td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 1360 670 1423">Anillamiento</td> <td data-bbox="670 1360 849 1423">56°C</td> <td data-bbox="849 1360 992 1423">30seg</td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 1423 670 1497">Extensión</td> <td data-bbox="670 1423 849 1497">72°C</td> <td data-bbox="849 1423 992 1497">30seg</td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 1497 670 1560">Extensión final</td> <td data-bbox="670 1497 849 1560">72°C</td> <td data-bbox="849 1497 992 1560">5min</td> <td data-bbox="992 1497 1211 1560">1</td> </tr> <tr> <td data-bbox="375 1560 670 1623">Hold</td> <td data-bbox="670 1560 849 1623">4°C</td> <td data-bbox="849 1560 992 1623">Indefinido</td> <td data-bbox="992 1560 1211 1623">1</td> </tr> </tbody> </table>	Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos	Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1	Desnaturalización	95°C	30seg	35	Anillamiento	56°C	30seg	Extensión	72°C	30seg	Extensión final	72°C	5min	1	Hold	4°C	Indefinido	1
Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos																								
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1																								
Desnaturalización	95°C	30seg	35																								
Anillamiento	56°C	30seg																									
Extensión	72°C	30seg																									
Extensión final	72°C	5min	1																								
Hold	4°C	Indefinido	1																								
<p><b>9.8</b></p>	<p>Mientras ocurre el PCR. Hacer gel de agarosa al 1.5% y el mapa de las muestras que se colocaran en cada pozo del gel. Al finalizar el PCR, correr 7uL de cada una de las muestras con una escalera de 50pb a 100V. Este pendiente del gel. Revíselo cada cierto tiempo para evitar que se salgan las muestras. Si se salen debe repetirlo. Si hay contaminación se observarán dos bandas: una en 150pb y otra en ~300pb.</p>																										

	<p>NOTA: Si no hubo amplificación de ADN genómico, entonces proseguir con la transcripción reversa. Si hubo amplificación, tratar nuevamente la(s) muestra(s) por media hora más agregando nuevamente Dnasa y Buffer de Dnasa.</p>																
<b>23.</b>	<b>Reacción de Transcriptasa Reversa con Kit GoScript Reverse Transcription System, A5000-A5001</b>																
<b>10.1</b>	<p>A cada muestra de ARN tratado Agregar 1uL de cebadores Oligo (dT) y 1uL de random cebadores del kit GoScript Reverse Transcription System A5000-A5001 para tener un volumen total de 11uL. Calentar en el termociclador a 70°C por cinco minutos.</p> <p><i>La temperatura permite que los cebadores se anillen a la plantilla de ARN. Se usan estos dos tipos de cebadores para tener rendimientos altos de ADN copia.</i></p>																
<b>10.2</b>	<p>Luego de incubar por cinco minutos, colocar todos los tubos en frío (en hielo) hasta que la mezcla de Transcriptasa Reversa esté lista. Asegurarse de que todos los tubos estén cerrados y en buen estado. Preparar la mezcla de transcriptasa reversa en un tubo de 0.2mL identificado y libre de nucleasas. Agregar los componentes en el orden del cuadro 3.</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 3: Preparación de reacción de Transcriptasa Reversa</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>Componente</th> <th>Vol. n=1 (uL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>GoScript™ 5X Reaction Buffer</td> <td style="text-align: center;">4.0</td> </tr> <tr> <td>MgCl<sub>2</sub> (1.5-5.0 mM)</td> <td style="text-align: center;">2.0</td> </tr> <tr> <td>Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)</td> <td style="text-align: center;">1.0</td> </tr> <tr> <td>Recombinant RNasin Ribonuclase Inhibitor</td> <td style="text-align: center;">1.0</td> </tr> <tr> <td>GoScript™ Reverse Transcriptase</td> <td style="text-align: center;">1.0</td> </tr> <tr> <td><b>Volumen final</b></td> <td style="text-align: center;"><b>9</b></td> </tr> </tbody> </table> <p><i>IMPORTANTE: Se recomienda agregar una reacción más, por error de pipeteo.</i></p>	Componente	Vol. n=1 (uL)	Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)	-	GoScript™ 5X Reaction Buffer	4.0	MgCl <sub>2</sub> (1.5-5.0 mM)	2.0	Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)	1.0	Recombinant RNasin Ribonuclase Inhibitor	1.0	GoScript™ Reverse Transcriptase	1.0	<b>Volumen final</b>	<b>9</b>
Componente	Vol. n=1 (uL)																
Nuclease-free water (a un volumen final de 15uL)	-																
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4.0																
MgCl <sub>2</sub> (1.5-5.0 mM)	2.0																
Mix (concentración final de 0.5mM cada dNTP)	1.0																
Recombinant RNasin Ribonuclase Inhibitor	1.0																
GoScript™ Reverse Transcriptase	1.0																
<b>Volumen final</b>	<b>9</b>																
<b>10.3</b>	<p>Combinar 9 uL de la mezcla de Transcriptasa reversa con cada tubo de 11 uL del RNA que se dejó en hielo. Realizar el anillamiento en el termociclador a 25°C por 5 minutos. Extensión en el a 42°C por 1 ½ hora y, por último, inactivar la transcriptasa reversa a 70°C por 15 minutos. El programa utilizado del termociclador del CEB se llama: “”.</p>																

10.4	<p>Mientras esto ocurre, etiquetar nuevamente 3 tubos por cada muestra. Agregar a uno de estos tubos 1uL de cDNA hecho y hacer 2 alícuotas de 2uL. Guardar el stock de cDNA y las dos alícuotas a 2uL a -70°C.</p> <p><i>Es necesario hacer la alícuota de 1uL para verificar la presencia del cDNA. Las alícuotas de 2uL se utilizan posteriormente para hacer PCR tiempo real o hacer PCR nuevamente.</i></p>																																															
10.5	<p>Preparar la campana de área blanca para hacer PCR. Limpiarla con etanol. Dejar en UV por 15 minutos.</p>																																															
10.6	<p>Hacer nuevamente PCR convencional para confirmar presencia de cDNA de la siguiente manera:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 4. Volúmenes utilizados para hacer PCR</p> <table border="1" data-bbox="375 716 1325 1157"> <thead> <tr> <th>Reactivo</th> <th>Volumen (n=1)</th> <th>Volumen (n= _____ )</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x</td> <td>7.5uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cebador Forward Actina 10uM</td> <td>1uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cebador Reverse Actina 10uM</td> <td>1 uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua libre de nucleasas</td> <td>4.5 uL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plantilla de <b>cDNA</b></td> <td>1 uL</td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Volumen total por reacción</td> <td>15 uL</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>NOTA: NO OLVIDAR agregar al PCR la reacción de control negativo y control positivo (ADN genómico de <i>An. albimanus</i>).</p> <p>Utilizar el siguiente programa:</p> <p style="text-align: center;">Cuadro 5: Programa para amplificación de actina</p> <table border="1" data-bbox="375 1388 1211 1839"> <thead> <tr> <th>Paso</th> <th>Temperatura</th> <th>Tiempo</th> <th>Número de ciclos</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Desnaturalización inicial</td> <td>95°C</td> <td>2 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Desnaturalización</td> <td>95°C</td> <td>30seg</td> <td rowspan="3">35</td> </tr> <tr> <td>Anillamiento</td> <td>56°C</td> <td>30seg</td> </tr> <tr> <td>Extensión</td> <td>72°C</td> <td>30seg</td> </tr> <tr> <td>Extensión final</td> <td>72°C</td> <td>5min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Hold</td> <td>4°C</td> <td>Indefinido</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Reactivo	Volumen (n=1)	Volumen (n= _____ )	Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5uL		Cebador Forward Actina 10uM	1uL		Cebador Reverse Actina 10uM	1 uL		Agua libre de nucleasas	4.5 uL		Plantilla de <b>cDNA</b>	1 uL	-----	Volumen total por reacción	15 uL		Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos	Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1	Desnaturalización	95°C	30seg	35	Anillamiento	56°C	30seg	Extensión	72°C	30seg	Extensión final	72°C	5min	1	Hold	4°C	Indefinido	1
Reactivo	Volumen (n=1)	Volumen (n= _____ )																																														
Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x	7.5uL																																															
Cebador Forward Actina 10uM	1uL																																															
Cebador Reverse Actina 10uM	1 uL																																															
Agua libre de nucleasas	4.5 uL																																															
Plantilla de <b>cDNA</b>	1 uL	-----																																														
Volumen total por reacción	15 uL																																															
Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos																																													
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1																																													
Desnaturalización	95°C	30seg	35																																													
Anillamiento	56°C	30seg																																														
Extensión	72°C	30seg																																														
Extensión final	72°C	5min	1																																													
Hold	4°C	Indefinido	1																																													

<b>10.7</b>	Hacer gel de agarosa al 1.5% mientras se hace el PCR. Hacer mapa de las muestras que se correrán en cada pozo del gel. Correr 7uL de muestra con 5uL de escalera de 50pb a 100V. Debe de haber amplificación en 150bp.
-------------	--

**24. Cálculos:**

N/A

**25. Control de calidad:**

1. Usar guantes en todo momento.
2. Tener un área restringida únicamente para trabajo con ARN que contenga todo el material necesario tratado adecuadamente.
3. Limpiar el área de trabajo con RNase away.
4. Realizar PCR en área blanca limpia.

**ANEXO: Copiar esto y pegar en cuadernito.**

**1. PCR para verificar contaminación por ADN genómico y presencia de cDNA.**

- Verificar si hay cDNA en las muestras de ARN tratadas con el kit de Reverse Transcription System haciendo un PCR con cebadores de Actina 10uM.

Reactivo	Volumen n=1 (uL)	Volumen n=
<b>Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2x</b>	7.5	
<b>Cebador forward ACT 10 uM</b>	1	
<b>Cebador reverse ACT 10 uM</b>	1	
<b>RNA template/cDNA template</b>	1	--
<b>Nuclease free water</b>	4.5	
<b>Volumen total</b>	15	

**Programa de PCR usado para verificar presencia de ADN genómico y cDNA: NOMBRE**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
asnaturalización	95°C	30 seg	35
Anillamiento	56°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extension final	72°C	5 min	1
Hold	4°C	indefinido	1

**2. Gel de agarosa 1.5%**

- Agregar 0.46g de agarosa en 30ml de buffer TBE 1x.
- Agregar 2-3uL de bromuro de etidio al gel antes de que se enfríe. Dejar solidificar por 20 minutos con el peine puesto.

Anexo 8:

POE VIII: Inducción de producción de ARNdh en *E. coli* HT 115 (DE3)

<b>Código del POE</b>	<b>VIII</b>
<b>Área</b>	<b>Ingeniería genética</b>
<b>Versión</b>	<b>Segunda</b>
<b>Idioma</b>	<b>Español</b>
<b>Título</b>	<b>Producción de ARNdh en bacterias transgénicas de <i>E. coli</i> HT115(DE3) para alimentar <i>Anopheles albimanus</i></b>
<b>Escrito por</b>	<b>Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>28 de mayo de 2018</b>
<b>Modificado por</b>	<b>Claudia Alfaro</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>13 de octubre de 2019</b>
<b>Aprobado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	

**1. Propósito**

Producir una concentración de ARNdh mayor a 100 ng/uL del gen *dsx* por bacterias de *E. coli* HT115(DE3) transgénicas para su posterior evaluación de silenciamiento en *An. albimanus*.

**2. Aplicación**

El ARNdh producido por las bacterias de *E. coli* HT115(DE3) se usará para la alimentación de larvas de *An. albimanus*. Esto producirá silenciamiento en el gen *doublesex* mediante el mecanismo de ARNi en los mosquitos de *An. albimanus*.

### 3. Referencias

- 3.1. Whyard, S. et al. 2015. Silencing the buzz: a new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasites & Vectors* 8(96): 1-11. DOI: 10.1186/s13071-015-0716-6
- 3.2. Ongvarrasopone, C. et al. 2007. A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates. *Science Asia* 33(2007):35-39.

### 4. Terminología y abreviaciones

- 4.1. ARNdh: Ácido ribonucleico de doble hebra.
- 4.2. *An. albimanus*: *Anopheles albimanus*
- 4.3 *dsx*: *dsx*: gen *doublesex*, identificado en *Drosophila melanogaster* que se encuentra en el final de la cascada de diferenciación sexual.
- 4.4. ARNi: ARN de interferencia
- 4.5. *E. coli* HT115(DE3): Cepa transgénica de *Escherichia coli*, que posee una mutación en el gen que codifica para la Rnasa III, lo que evita la hidrólisis enzimática del material genético acumulado.
- 4.6. IPGT: Isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosido.

### 5. Principio

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo biológico, ampliamente distribuido en eucariotas, por el cual, se consigue silenciar genes, mediante moléculas de ARN de doble hebra (ARNdh). El descubrimiento de este mecanismo, se llevó a cabo hace 15 años y, desde entonces se han realizado diferentes investigaciones enfocadas, principalmente, a comprender mejor cómo funciona, su función en diferentes organismos, su uso para describir funciones de genes específicos y las potenciales aplicaciones que tendría en el desarrollo tecnológico, en otras áreas de la ciencia (Noriega, et al. 2016).

El silenciamiento de genes comienza con la separación del ARNdh en fragmentos pequeños (21 a 15 pares de bases) (Agrawal, et al. 2003), por la interacción de complejos enzimáticos del citoplasma con pequeñas moléculas de ARN (siRNA), las cuales actúan sobre el ARN mensajero (ARNm) endógeno, impidiendo que sea traducido a proteína. Por lo tanto, es un hecho que el ARNi puede ser una tecnología alternativa en el control de plagas, a través del silenciamiento selectivo de genes (Noriega, et al. 2016).



## **6. Documentos asociados**

- 6.1.** Noriega, D. *et al.* 2016. ARN de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos de plaga. *Journal of U.D.C.A. Act&Div. Cient.* 191(4):25-35.
- 6.2.** Agrawal, Neema, et al. 2003. «RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications». *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67 (4): 657–685.

## **7. Seguridad**

- 7.1.** Usar guantes y bata en todo momento.

## **8. Equipos materiales y reactivos**

- 8.1.1.** Shaker (Incubadora a 37°C con agitación)
- 8.1.2.** Freidora
- 8.1.3.** Lonchera con hielo y agua
- 8.1.4.** Campana de Flujo laminar
- 8.1.5.** Espectrofotómetro UV-VIS
- 8.1.6.** Centrífuga con rotor de tubos falcon
- 8.1.7.** Horno

### **8.2. Materiales**

- 8.2.1.** Micropipetas de 1000 uL, 100/200 uL, 10 uL con sus respectivas puntas.
- 8.2.2.** Beaker con bolsa roja de desechos.
- 8.2.3.** Tubos eppendorf libres de nucleasas/estériles de 1.5mL y de 0.5 mL
- 8.2.4.** Gradilla de tubos eppendorf de 0.5 mL y 0.5 mL
- 8.2.5.** Tubos falcon estériles de 50 mL
- 8.2.6.** Erlenmeyers estériles de 125mL
- 8.2.7.** Cubetas de vidrio para espectrofotómetro
- 8.2.8.** Guantes
- 8.2.9.** Parafilm
- 8.2.10.** Frascos de vidrio con rosca

### **8.3. Reactivos**

- 8.3.1.** Tetraciclina 500 x (concentración final de 1X o 6,260ug/mL)
- 8.3.2.** Carbenicilina 1000x (concentración final de 1X o 100ug/mL)
- 8.3.3.** Placas LB+Carbenicilina+tetraciclina
- 8.3.4.** LB Broth (atemperado)

**8.3.5.** 2XYT Broth (atemperado)

**8.3.6.** IPTG 800mM

**8.3.7.** PBS 1X ((137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O) pH 7.4)

**8.3.8.** Estreptomicina 50 ug/uL

## **9. Procedimiento**

**9.1.** Sembrar en placas de LB+Tetraciclina+Carbenicilina las bacterias *E. coli* HT115(DE3) transformada con el plásmido pGEMT-ZPG

*Para ello, rápidamente y en bloque congelado sacar una pequeña porción de hielo del stock de glicerol y plaqurear en toda la placa (con la misma asa). Guardar el stock de glicerol a -70°C inmediatamente.*

**9.2.** Incubar las placas por aproximadamente 18h a 37°C.

**9.3.** Picar una colonia aislada en medio LB+Tetraciclina+Carbenicilina. Crecer el cultivo toda la noche O/N a 37°C con agitación moderada (aproximadamente 200 rpm).

*La cantidad de LB a utilizar puede variar dependiendo de la cantidad de cultivo inducido que se necesitará, normalmente se realiza una dilución 6.66X.*

**9.4.** Al día siguiente, realizar una dilución 1:75 de dicho cultivo en 2XYT + antibióticos, en el cuadro siguiente se presentan las cantidades para un cultivo de 50 mL.

Cuadro 1. Volumen de medios y antibióticos a agregar

<b>Antibiótico (concentración inicial)</b>	<b>LB (cultivo O/N)</b>	<b>2XYT</b>
	5 mL	50 mL
Tetraciclina 1000 X (12.5mg/mL)	5 uL	50 uL
Carbenicilina a 1000 X (100mg/mL)	5 uL	50 uL

**9.5.** Incubar el nuevo cultivo en 2XYT a 37°C con agitación moderada (200 rpm) por aproximadamente 2 horas hasta alcanzar un OD<sub>600</sub> = 0.38-0.50

*Es necesario ser preciso ya que si el cultivo se pasa mucho más allá de 0.4 no es válido realizar diluciones ya que las bacterias se encuentran ya en otra fase de crecimiento.*

**9.6.** Una vez alcanzado el OD<sub>600</sub> = 0.4 se procede a realizar la inducción con IPTG 0.4mM.

*El Stock de IPTG se encuentra a 800mM. Por lo que se agrega la mitad del volumen del medio en total.*

**9.7.** Incubar a 37°C con agitación 200 rpm durante 3h exactas.

*Posteriormente registrar el OD<sub>600</sub> a la cual llegaron los cultivos. Por lo regular se encuentran en 1.20*

**9.8.** Alícuotar 1 mL en tubos eppendorf de 1.5mL estériles. Hacer esto en duplicado y etiquetar correctamente.

**9.8.1.** Centrifugar alícuotas 3700g por 10 minutos a 4°C.

**9.8.2.** Resuspender en 1 mL de PBS IX estéril.

**9.8.3** Almacenar a 4°C para la cuantificación.

**9.9.** Proceder a realizar lavados para eliminar residuos de antibióticos e IPTG, para ello:

- a. Trasladar cultivos a tubos cónicos del tamaño apropiado.
- b. Centrifugar a 4,000g por 10 minutos
- c. Descartar sobrenadante
- d. Lavar el pellet con PBS 1X estéril a la mitad del volumen inicial del cultivo (si se desea concentrar). *Ejemplo: Si tengo 50 mL de cultivo agrego 25 mL de PBS 1X estéril, con el fin de concentrar aún más el ARNdh.*
- e. Centrifugar a 4,000g por 10 minutos
- f. Descartar sobrenadante
- g. Lavar el pellet con PBS 1X estéril (igual que paso d)
- h. Centrifugar a 4,000g por 10 minutos
- i. Descartar sobrenadante
- j. Resuspender el pellet en el mismo volumen de PBS 1X estéril que se agregó en pasos d.

**9.10** Tomar dos alícuotas de 1 mL del resuspendido en tubos 1.6 mL.

**9.11.** Inactivar las bacterias:

**9.11.1. Ebullición** en tubos falcon o eppendorf de 1.6 mL, a 100°C por 15 minutos (en freidora) y meter inmediatamente en agua con hielo por 8 minutos (Heat shock). Para este método de inactivación se resuspendió el pellet (paso 9.9 j) en la mitad de PBS 1X, para concentrar el cultivo a 2X.

**9.12.** Alícuotar el cultivo en tubos de 1.6 mL y colocar las alícuotas a 4°C para su posterior cuantificación.

## 10. Cálculos

### 10.1 Preparación de medio 2XYT

16g/L de triptona

10g/L de extracto de levadura

5g/L de NaCl

Diluir en 1L de agua destilada. Hervir hasta disolver y medir pH. Autoclavear 15-20min a 121°C.

### 10.2 Preparación de medio LB

Pesar 5g de triptona + 5g NaCl + 2.5g de extracto de levadura.

Diluir en 500mL de agua destilada y agitar hasta homogenizar la solución.

Medir pH 6.5 y autoclavar 15-20min a 121°C.

### 10.3 Preparación de antibióticos

#### a. Carbenicilina 100X

$$C1V1=C2V2$$

Disolver 500mg en 5mL de agua destilada. Esterilizar por filtración con filtro de 0.22um y hacer alícuotas de 1.6mL en tubos estériles. Almacenar a 4°C.

#### b. Tetraciclina 500X

$$C1V1=C2V2$$

500X (6.25mg/mL), Vf de 10mL. Pesar 62.5mg y disolver 10mL en etanol absoluto.

Vortexear hasta que se homogenizar la muestra y almacenar a -20°C.

#### c. IPTG

$$C1V1=C2V2$$

Pesar 2g de IPTG y disolver en 10mL de agua destilada. Filtrar en filtro de 0.22um.

Hacer alícuotas de 1.6mL y almacenar a 4°C.

#### **10.4 Dilución 6.66x para el medio LB O/N**

*mL de LB = 50mL 2XYT/6.66X*

#### **10.5 Concentración de estreptomicina 50 ug/uL**

250uL 50ug1uL=12500ug=12.5mg de estreptomicina sulfato marca Gibco

### **11. Control de calidad**

**11.1.** Usar guantes en todo el procedimiento

**11.2.** Verificación del crecimiento de bacterias en los erlenmeyers antes de iniciar el proceso mediante turbidez en el medio.

**11.3.** Verificación de OD600 antes de inducir y después de inducir.

### **12. Reporte de datos y documentos utilizados**

Anotar absorbancias de los OD600 antes de inducir y después de inducir.

Anexo 9:

POE IX: Extracción de ARN con TRIzol LS Reagent (Thermo Fisher Scientific)

<b>Código del POE</b>	<b>IX</b>
<b>Área</b>	<b>Ingeniería genética</b>
<b>Versión</b>	<b>Segunda</b>
<b>Idioma</b>	<b>Español</b>
<b>Título</b>	<b>Extracción de ARNdh mediante TRIzol LS Reagent</b>
<b>Escrito por</b>	<b>Paula Villatoro y Ana Gabriela Lara</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>28 de mayo de 2018</b>
<b>Modificado por</b>	<b>Claudia Alfaro</b>
<b>Fecha y firma</b>	<b>10 de octubre de 2019</b>
<b>Aprobado por</b>	
<b>Fecha y firma</b>	

## **1. Propósito**

**1.1.** Extraer ARNdh de los insertos de *dsx* producido por bacterias de *E. coli* HT115(DE3) mediante TRIzol LS Reagent.

**1.2.** Verificar la integridad de ARNdh por medio de un gel de agarosa 1%.

## **2. Aplicación**

El ARNdh extraído se puede utilizar para determinar si la concentración e integridad del mismo es la adecuada para alimentar a las larvas en sus estadios L2, L3 y L4 de *Anopheles*

*albimanus* para generar un silenciamiento específico del gen *dsx*, aplicando el mecanismo de ARN de interferencia.

### **3. Referencias**

Invitrogen, Thermo Fisher Scientific. TRIzol LS Reagent: Experimental protocol for RNA isolation. En: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol\\_ls\\_reagent.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_ls_reagent.pdf).

### **4. Terminología y abreviaciones**

**4.1.** ARNdh: Ácido ribonucleico de doble hebra.

**4.2.** *dsx*: gen *doublesex*, identificado en *Drosophila melanogaster* que se encuentra en el final de la cascada de diferenciación sexual.

**4.3.** ARNi: ARN de interferencia

#### **ii. Principio**

El procedimiento se basa en usar el reactivo de TRIzol LS para aislar ARN total de buena calidad (así como ADN y proteínas) de la célula y muestras de tejido humano, animal, vegetal, de levadura o bacteriano en el menor tiempo posible. TRIzol LS es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes patentados que facilitan el aislamiento de una variedad de especies de ARN de gran o menor tamaño molecular. Así mismo este reactivo mantiene la integridad del ARN debido a la inhibición altamente efectiva de la actividad de la RNasa.

#### **iii. Documentos asociados**

Invitrogen, Thermo Fisher Scientific. TRIzol LS Reagent: Experimental protocol for RNA isolation. En: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol\\_ls\\_reagent.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_ls_reagent.pdf).

#### **iv. Seguridad**

**7.1** Utilizar siempre guantes, bata y zapatos cerrados.

**7.2** Es importante que al momento de realizar este procedimiento no se esté hablando ya que la inhalación de los reactivos puede causar irritación de las fosas nasales.

## **8. Equipos materiales y reactivos**

### **8.1. Equipos**

- 8.1.1.** Centrífuga en frío
- 8.1.2.** Heat block
- 8.1.3.** Nano-Drop
- 8.1.4.** Cámara de electroforesis
- 8.1.5.** Microondas

### **8.2. Materiales**

- 8.2.1.** Micropipetas de 1000 uL, 100/200 uL, 10 uL con sus respectivas puntas.
- 8.2.2.** Beaker con bolsa roja de desechos.
- 8.2.3.** Tubos eppendorf libres de nucleasas/estériles de 1.5mL
- 8.2.4.** Gradilla de tubos falcon y gradilla de tubos eppendorf de 1.5 mL
- 8.2.5.** Beaker de 500 mL
- 8.2.6.** Estufa
- 8.2.7.** Guantes

### **8.3. Reactivos**

- 8.3.1.** SDS 1%
- 8.3.2.** Buffer RNase A
- 8.3.3.** ARNasa
- 8.3.4.** TRIzol LS
- 8.3.5.** Cloroformo absoluto
- 8.3.6.** IPOEropanol absoluto
- 8.3.7.** Etanol al 75%
- 8.3.8.** Agua libre de RNasas (DEPC)



**8.3.9.** Agarosa

**8.3.10.** Buffer TAE

## **9. Procedimiento**

**9.1.** Tomar las alícuotas de cultivo inducido e inactivado.

**9.2.** Agregar 50 uL de buffer lisis (SDS 1%, 25 mM EDTA, 50mM Tris-HCl, 0.4M NaCl, agua destilada y proteinasa K a 20 mg/mL).

**9.3** Incubar a 65°C durante una hora.

*Este paso puede cambiarse a una incubación de 37°C toda la noche (18 horas) si se desea parar el procedimiento acá.*

**9.4** Agregar 500 uL de TRIZol LS, homogenizar e incubar 5 minutos.

*Esto permite desactivar a la proteinasa K.*

**9.5.** Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

**9.6.** Centrifugar 12,000g 15 minutos a 4°C

**9.7.** Remover fase superior transparente en ángulo de 45° y colocar en nuevo tubo.

**9.8.** Hacer una dilución 1:10 de la ARNasa (Stock ARNasa A=20 ug/uL). Añadir 1uL de RNase A a los tubos (2ug añadidos).

*Realizar este paso cuando ya se vaya a utilizar para mantener la estabilidad de la ARNasa.*

**9.9.** Incubar a 37°C en heat block por 5 minutos.

**9.10.** Agregar 500 uL TRIZol LS y pipetear para homogeneizar bien.

**9.11.** Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

**9.12.** Agregar 133uL cloroformo y mezclar vigorosamente a mano por 15 segundos.

**9.10.** Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

**9.11.** Centrifugar 12,000g 15 minutos a 4°C

**9.12.** Remover fase superior transparente en ángulo de 45° y colocar en nuevo tubo.

*La fase transparente es la acuosa, que es lo que nos interesa. Es importante que no se toque la interfase para no contaminar nuestro ARNdh.*

**9.13.** Agregar 333uL isopropanol, mezclar por inversión vigorosamente.

**9.14.** Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

**9.15.** Centrifugar 12,000g por 10 minutos a 4°C

**9.16.** Remover sobrenadante

**9.17.** Agregar 1 mL de ETOH 75% y mezclar.

**9.18.** Centrifugar a 7,600g por 5 minutos a 4°C y descartar sobrenadante.

**9.19.** Remover etanol y dejar secar

*Se ha dejado secando aproximadamente por 20 minutos, sin embargo este paso puede variar según la presencia de restos de etanol.*

**9.20.** Resuspender en 20 uL de H<sub>2</sub>O libre de RNasas

*Para ello se coloca el tubo en 45°C y se deja caer el agua sobre el pellet invisible.*

**9.21.** Incubar a 56°C por 10 minutos.

**9.22.** Cuantificar en NanoDrop y hacer gel de integridad (1% de agarosa)

**9.23.** Almacenar a -70°C

## **10. Cálculos**

### **10.1 Determinación de la concentración de ARNdh en 200 uL de cultivo**

$$[\text{ARNdh}]_{\text{en } 200\text{uL}} = \text{ARNdhobtenido del Nano-Drop} * 20\text{uL de agua libre de RNasas} / 250\text{uL alícuota de cultivo inducido} * 200\text{uL}$$

## **11. Control de calidad**

**11.1.** Usar guantes en todo momento.

**11.2.** Tener un área restringida únicamente para trabajo de ARNdh que contenga todo el material necesario desinfectado con etanol y RNase away.

**v. Reporte de datos y documentos utilizados**

Para presentar los resultados se utilizará un cuadro donde se indique el nombre de la muestra, fecha de extracción, número de réplicas, valor de concentración obtenido por el Nano-Drop (ng/uL), absorbancia a 260/280 y 260/230 y concentración a dar a las larvas de *A. albimanus* en 200 uL de cultivo.

Anexo 10: Secuencias de las isoformas de *dsx* utilizadas en este estudio

**Isoforma larga:**

**-Código en VectorBase:** AALB003344-WATERHOUSE-00003

**-Secuencia genómica:**

5'GTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGC  
GTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGCCGGG  
GGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGGCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCCTGCGGTGTCCAAAGTG  
TGGTTGCAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGG  
AGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGA  
AGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCAGCAGCAGCAGC  
GGCAGCAGCAGCCGCGTAATTGCAACTAAATACCGATGAGTTCAAAGTGTGTTAA  
GGCCTCCGCGGTGGAGGAGAAAACGGTGGGCAGATTGTGGGTGTACATTGTAGTAG  
AATGTTGTTGCTGCATACGCCGAAGCAGCGCATCACAGCGGAACGGTGTGAGTAGT  
CAATGGAACGGTCAGGAAACGGGACGGAAACAAACACACGCCGCCTCTGTGTGTGT  
GTGTGTGTGTGTGTGCGTGTATGTGTGACGCAGGACTCTCGAGGCTCTACCACCCAC  
CTGCTATCGATTGACCGGACAGCTTGGCTCCGGGCGCCATTAATTCTCTGAAATACC  
AAAATCAGAAAACCAAACCGAAATCATGATGATGATGATGATGATGAAGATGATGA  
TGATCACCAACACCCTTGTCTTTGCTTGCCTTCTTTTCTATGTTTCGATGCGCCGTGG  
GAACGGACGGAACCGTATCGCGAACTTTCCGGTGGATGGTCGTATCGGTCGTTCCCG  
GTTCCCGGGTTCCCGTGTCCCTTCCACAACACCCGCTCCCCTGCCATTACAGTGTCA  
ATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTGTAGCTG  
TACTTGTGAGATCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGGTCCGACGACCCCGTGCCGTGA  
ACCTGGGGCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTTCTCCGAGGCTCTGGGCCCACGGTTTCT  
AGACCCACAGTAATATTGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTTGAAAAGTCTTT  
GCCTGGGCTGCTAGTAGTGTACCTAGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGCTGGAAGAAAG  
AAAACCAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGAGAGAG  
AAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAGGCAAACCAAGAAGTGCTTCAA  
AAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTCAGCAA  
CTACAACGCAACGCCCAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTT  
CGTTAAAGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTG  
AATGGGGGGGGGGCCTGGTGAATCCACCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCAT  
CGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGCCTCCACGGTCTGTGTGGATGT  
GTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCA

AATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAA  
GGATGTAGAAGATGTAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCCG  
AATGCCATAGTTTTCTCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAAT  
CTCCACCCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCT  
GTCTTGCTGTGTCCGCCATTTTGTACGCTGCCATTCATCATTCAAACCCCACTGCGCC  
CAGATTAATGCAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAAAGCGCCAG 3'

**-Secuencia codificante:**

5'GTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGC  
GTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCGGATGA 3'

**Isoforma corta:**

**-Código en VectorBase:** AALB003344-WATERHOUSE-00003

**-Secuencia:**

5'TGTCAATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTG  
TAGCTGTACTTGTGAGATCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGGTCCGACGACCCCGTG  
CCGTGAACCTGGGGCCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTTCTCCGAGGCTCTGGGGCCAC  
GGTTTCTAGACCCACAGTAATATTGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTTGAAAA  
GTTCTTTGCCTGGGCTGCTAGTAGTGTACCTAGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGCTGGA  
AGAAAGAAAACCAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGA  
GAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTG  
CTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGT  
CAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGC  
ATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAGAAATTAAGAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGA  
ACGGTGAATGGGGGGGGGCCTGGTGAATCCACCAACCACCATCCCCGGGCCATT  
CGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGCCTCCACGGTCTGTGT  
GGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATC  
CGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACA  
AAAAAAGGATGTAGAAGATGTAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGC  
ATAATTCGAATGCCATAGTTTTCTCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGG  
AAGCAAATCTCCACCCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCG  
AAACCGCTGTCTTGCTGTGTCCGCCATTTTGTACGCTGCCATTCATCATTCAAACCC  
ACTGCGCCAGATTAATGCAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAAAGCGC  
CAG 3'

**-Secuencia codificante:**

5'TGTCAATGCTGTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTG  
TAG 3'

Anexo 11: Análisis de la secuencia de fragmentos de *dsx* en la región común de las isoformas femeninas

**Análisis de clones con fragmentos específicos femeninos de *doublesex***

Las siguientes secuencias fueron obtenidas amplificando secciones del exón 5 del gen *doublesex*.

Se emplearon los primers AaDsxIn103F con AaDsxIn105R .

**-Secuencia de primers:**

**AaDsxIn103F:** 5' AAGAGGGAGAGTGCGTGAGA 3'

**AaDsxIn105R:** 5' ATCAATCAAACCGAAACCGC 3'

**-Secuencia de *dsx* exón 5:**

GTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCG  
TAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGG  
GAGGGCAGGCAGGGTCTCAGGCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGT  
GGTTGCAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGA  
GTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAA  
GAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCAGCAGCAGCAGCG  
GCAGCAGCAGCCGCGTAATTGCAACTAAATACCGATGAGTTCAAAGTGTGTTAAG  
GCCTCCGCGGTGGAGGAGAAAACGGTGGGCAGATTGTGGGTGTACATTGTAGTAGA  
ATGTTGTTGCTGCATACGCCGAAGCAGCGCATCACAGCGGAACGGTGTCTAGTAGTC  
AATGGAACGGTCAGGAAACGGGACGGAAACAAACACACGCCGCTCTGTGTGTGTG  
TGTGTGTGTGTGTGCGTGTATGTGTGACGCAGGACTCTCGAGGCTCTACCACCCACCT  
GCTATCGATTGACCGGACAGCTTGGCTCCGGGCGCCATTAATTCTCTGAAATACCAA  
AATCAGAAAACCAAACCGAAATCATGATGATGATGATGATGATGAAGATGATGATG  
ATCACCAACACCCTTGTTCTTTGCTTGCCTTCTTTCTATGTTTCGATGCGCCGTGGGA  
ACGGACGGAACCGTATCGCGAACTTTCCGGTGGATGGTCGTATCGGTTCGTTCCCGGT  
TCCCGGGTTCCCGTGTCCCTTCCCACAACACCCGCTCCCCTGCCATTACAGTGTCAAT  
GCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTGTAGCTGTA  
CTTGTGAGATCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGGTCCGACGACCCCCGTGCCGTGAAC  
CTGGGGCCCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTTCTCCGAGGCTCTGGGCCACGGTTTCTAG  
ACCCACAGTAATATTGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTTGAAGTTCTTTGCC  
TGGGCTGCTAGTAGTGTACCTAGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGCTGGAAGAAAGAAA  
ACCAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGAGAGGAAG

AGCAAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAAG  
AGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTA  
CAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGT  
TAAAGTGTGCCACAGAAATTAAGAGCGGGCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAAT  
GGGGGGGGGGCCTGGTGAATCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGT  
CAGTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGCCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTG  
TACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAAT  
TGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAAAGGA  
TGTAGAAGATGTAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAAT  
GCCATAGTTTTCTCCCCTGGGGCGGCCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTC  
CACCCCAAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCTGTC  
TTGCTGTGTCCGCCATTTTGTACGCTGCCATTCATCATTCAAACCCCACTGCGCCCAG  
ATTAATGCAAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAAAGCGCCAG

**-Análisis de clones:**

**CLON 1: Adulto macho 1 día 400pb**

➤ **1F**

**AAGAGGGAGAGTGCCTGAGA**TTATACCACACTTATAGTGATTGTGATAAT  
TATTGCATATTAGTTTTGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAAATGAAA  
CAGCCGTCCGCCGTCGTATGTCGCTACTGTGATGTCACCCTTACAATCCGA  
TTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACACCGACACTCGGTGTCATATCTT  
CAATCGCGATTTTATTACCTTAGACCGCCGTTTCATTGGTCAATTCCAAC  
CGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCTAGC  
TGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTTTCATGTTCTTTTTTGT  
TTTATTTGCCATTCTTGTTTTTAAATTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTG  
TGACGAACAGACGGACAATAA**ATCAATCAAACCGAAACCGC**

➤ **1R**

**CGGGTTTCGGTTTGATTGATTT**ATTATTGTCGGTCTGTTTCGTCACAACATTTAG  
TATCATCTGGTAAAGAATTTAAAAACAAGAATGGCAAATAAAAACAAAA  
AAGAACATGAACATCGTGTCTAACAGTAATCACTTAGGTGTACAGCTAGC  
GGGTCATTATTGCCGTCATTAGCGAGGTAGCTGCACGACCATCGGTTGGA  
ATGTGACCAATGAAACGGCGGTCTAAGGTAATGAAATCGCGATTGAAGA  
TATGACGACCGAGTGTCCGGTGTGTTAAGGCATGGGCACCACATAAATCG



GATTGTAAGGGTGACATCACAGTAGCGACATACGACGGCGGACGGCTGT  
TTCATTTTCGATGTATCTCTAGTAAATTCTTACAAAATAATATGCAATAAT  
TATCACAATCACTATAAGTGTGGTATAA**TCTCACGCACTCTCCCTCTT**

**Congruencia de secuencias F y R (ClustalW):**

F	AAGAGGGAGAGTGCGTGAGATTATACCACACTTATAGTGATTGTGATAATTATTGCATAT	60
R	AAGAGGGAGAGTGCGTGAGATTATACCACACTTATAGTGATTGTGATAATTATTGCATAT *****	60
F	TAGTTTTGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAAATGAAACAGCCGTCGCCGTCGTATG	120
R	TAGTTTTGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAAATGAAACAGCCGTCGCCGTCGTATG *****	120
F	TCGCTACTGTGATGTCACCCCTTACAATCCGATTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACAC	180
R	TCGCTACTGTGATGTCACCCCTTACAATCCGATTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACAC *****	180
F	CGACACTCGGTCGTCATATCTTCAATCGCGATTTTACCTTAGACCGCCGTTTCATTG	240
R	CGACACTCGGTCGTCATATCTTCAATCGCGATTTTACCTTAGACCGCCGTTTCATTG *****	240
F	GTCACATCCAACCGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCT	300
R	GTCACATCCAACCGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCT *****	300
F	AGCTGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTTTCATGTTCTTTTTGTTTTTATT	360
R	AGCTGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTTTCATGTTCTTTTTGTTTTTATT *****	360
F	TGCCATCTTGTTTTTAAATTTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTGTGACGAACAGACGG	420
R	TGCCATCTTGTTTTTAAATTTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTGTGACGAACAGACGG *****	420
F	ACAATAAATCAATCAAACCGAAACCGC	447
R	ACAATAAATCAATCAAACCGAAACCGC *****	447

**Alineamiento con sección común de isoformas:**

Clon1	-----TGAGATTATACCACACTTATAGTGATTG-----	43
Dsx5	ATTAATTCTCTGAAATACCAAATCAGAAAACCAAACCGAAATCATGATGATGATGATGA * * * * *	720
Clon1	-----TGATAATTATT-----GCATATTAGTT---TT--GTAAGAATTT	77
Dsx5	TGATGAAGATGATGATGATCACCAACACCCTTGTTCTTTGCTTGCCTTCTTTCTATGTT * * * * * * * * * * * * * * *	780
Clon1	ACTAGAGATACATCGAAATGAAACAGCCGTCGCCG---TCGTATGTCGCTACTGTGATG	134
Dsx5	TCGATGCGCCGTGGGAACGGACGGAACCGTATCGCGAACTTCCGGTGGATGGTCGTATC * * * * * * * * * * * * * * *	840
Clon1	TCACCCTTACAATCCGATTTATGTGGTGCCCAT-----GCCTTA	173
Dsx5	GGTCGTTCCCGGTTCCCGGTTCCCGTGTCCCTTCCACAACACCCGCTCCCTGCCATT * * * * * * * * * * * * * * *	900
Clon1	AC-----GACACCGACACTCGGTCGTATATCTTCAATC	207
Dsx5	ACAGTGTCAATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTG * * * * * * * * * * * * * * *	960

Clon1	GCGATTTTCATTA-----CCTTAGACCGCCGTTTCATTGGTCCACATTCCAACCGATGGTC	261
Dsx5	TAGCTGTACTTGTGAGATCGGGCCCGACCGTGTGAATGGGTCCGA-CGACCCCGTGCC * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1019
Clon1	GTGCAGCTACCTC-----G-----CTAATGACGGCAATAATGACCCGCTAG	302
Dsx5	GTGAACCTGGGGCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTTCTCCGAGGCTCTGGGCCACGGTTT * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1079
Clon1	CTGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTTTCATGTTCTTTTTGTTTTTATTTG	362
Dsx5	CTAGACCCACAGTAATATTGGTGAGAAAGTGTGTCGACGCTTTTGAAGTTCTTTG * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1139
Clon1	CCATTCTTG-----	371
Dsx5	CCTGGGCTGCTAGTAGTGTACCTAGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGCTGGAAGAAAGAAA * * * *	1199
Clon1	-----	371
Dsx5	CCAAACGCAAGGAGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA	1259

No hace match con la secuencia de la Isoforma de *doublesex* por lo que se analizó en VectorBase y se determinó que este fragmento no es parte del gen en cuestión. Los primers no son específicos para *dsx*.

**CLON 2:** Adulto macho 1 día 400pb

➤ **2F**

**AAGAGGGAGAGTGCCTGAGA**TTGTACCACACTTATAGTGATTGTGATAAT  
TATTGCATATTAGTTTTGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAAATGAAA  
CAGCCGTCCGCCGTCGTATGTGCTACTGTGATGTCACCCTTACAATCCGA  
TTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACACCGACACTCGGTCGTCATATCTT  
CAATCGCGATTTCATTACCTTAGACCGCCGTTTCATTGGTCCACATTCCAAC  
CGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCTAGC  
TGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTTTCATGTTCTTTTTTGT  
TTTATTTGCCATTCTTGTTTTTAAATTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTG  
TGACGAACAGACGGACAATAA**ATCAATCAAACCGAAACCGC**

➤ **2R**

**GCGGTTTCGGTTTGATTGATTT**ATTGTCCGTCTGTTTCGTCACAACATTTAG  
TATCATCTGGTAAAGAATTTAAAAACAAGAATGGCAAATAAAAAACAAA  
AAGAACATGAACATCGTGTCTAACAGTAATCACTTAGGTGTACAGCTAGC  
GGGTCATTATTGCCGTCATTAGCGAGGTAGCTGCACGACCATCGGTTGGA  
ATGTGACCAATGAAACGGCGGTCTAAGGTAATGAAATCGCGATTGAAGA  
TATGACGACCGAGTGTCCGGTGTCTTAAGGCATGGGCACCACATAAATCG  
GATTGTAAGGGTGACATCACAGTAGCGACATACGACGGCGGACGGCTGT



```

Clon2      ACT-----
Dsx5      ATTAATTCTCTGAAATACCAAATCAGAAAACCAAACCGAAATCATGATGATGATGATGA
          * *

Clon2      -----GTGATG-TCACC-----CTTACAATCCGATTTATGT-
Dsx5      TGATGAAGATGATGATGATCACCAACACCCTTGTTCCTTTGCTTGCCTTCTTTCTATGTT
          *****                *** * * * * *

Clon2      -----
Dsx5      TCGATGCGCCGTGGGAACGGACGGAACCGTATCGCGAACTTCCGGTGGATGGTCGTATC

Clon2      -----GGTGCCCATGCC----TTAACGACA-CCGACACTCGGTTCGTC
Dsx5      GGTCGTTCCCGGTTCCCGGGTTCCTGTCCCTTCCCACAACACCCGCTCCCCTGCCATT
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * *

Clon2      ATATCTTCAAT-----
Dsx5      ACAGTGTC AATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTG
          * * * * *

```

No hizo match con ninguna secuencia del gen *dsx*. Es la misma secuencia que la vez anterior, por lo que no pertenece a este gen tampoco.

**CLON 3: Adulto hembra 1 día 200pb**

➤ **3F**

```

TGMG GCGCA GGTGA TGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGT
CGCATGCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATAATCACTAGTGAATT
CGCGGCCGCTGCA GGT GACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATA
GCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTA

```

➤ **3R**

```

ACACCA ACC CCTTTAGGTGA ACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGT
TGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTA
TCGAATTCCCGCGGCCGCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGGGCCCAATTC
GCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCC

```

Se compusieron las letras desconocidas utilizando las hebras complementarias (se marcan en verde). Les hebras se recortaron según los fragmentos en que se intersecaron. No pegaron los cebadores en las secuencias proveías.

**Congruencia de secuencia F y R**

```

R      ----G G C C A G T G A A T T G T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C G A A T T G G G C C C G A C G T C G C A T G      56
F      T G M G G C G C A G G T G A T T G T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G C G A A T T G G G C C C G A C G T C G C A T G      60
          * * * * *

R      C T C C C G G C C G C C A T G G C G G C C G G G A A T T C G A T A A T C A C T A G T G A A T T C G C G G C C G C C T      116
F      C T C C C G G C C G C C A T G G C G G C C G G G A A T T C G A T A A T C A C T A G T G A A T T C G C G G C C G C C T      120
          * * * * *

```

```

R      GCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATA 176
F      GCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATA 180
      *****

R      GTTCACCTAAAAGGGGGTGGTGT-      199
F      GTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTA      204
      **      *      ***      *      ***      **

```

Se usará la secuencia sentido.

### Alineamiento con la secuencia de Isoforma

```

Clon3      -----TGMGGCGCA-----
Dsx5      GGCAGGGTCTCAGGGCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTG
           *      *****

Clon3      -----GGTGATTG-----TAAT
Dsx5      CGTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGC
           ***      **

Clon3      ACGACTCACTATAGG-----GCGAATTGGGCCCG
Dsx5      GCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCG
           ***      *      *      *****      **      ***      *      **

Clon3      AC-----
Dsx5      GCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCAGCAGCAGCAGCGGCAGCAGCAGCCGCGTAATT
           *

Clon3      -----
Dsx5      GCAACTAAATACCGATGAGTTCAAAC TAGTGT TTAAGGCTCCGCGGTGGAGGAGAAAAC

Clon3      -----GTCGCATGCTCCCG-----
Dsx5      GGTGGGCAGATTGTGGGTGTACATTGTAGTAGAATGTTGTTGCTGCATACGCCCGAAGCA
           *      *****      *      *****

Clon3      -----
Dsx5      GCGCATCACAGCGGAACGGTGT CAGTAGTCAATGGAACGGTCAGGAAACGGGACGGAAAC

Clon3      -----GCCGCC-----ATGGCGGCCGCGGG-
Dsx5      AAACACACGCCGCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGTGTATGTGTGACGCAGGA
           *****      ***      *      ***      **

Clon3      -----
Dsx5      CTCTCGAGGCTCTACCACCCACCTGCTATCGATTGACCGGACAGCTTGGCTCCGGGCGCC

```

El cromatograma tiene muy baja resolución, por lo que la secuencia obtenida es poco fiable. Se descarta este clon.

**CLON 13: Adulto hembra 1 día 400 pb**

➤ **13F**

AAGAGGGAGAGTGCCTGAGATTGTACCACACTTATAGTGATTGTGATAAT  
TATTGCATATTAGTTTTGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAAATGAAA  
CAGCCGTCCGCCGTCTGATGTCGCTACTGTGATGTCATCCTTACAATCCGA  
TTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACACCGACTCGGTCGTCATATCTT  
CAATCGCGATTTCATTACCTTAGACCGCGTTTCATTGGTCACATTCCAAC  
CGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCTAGC  
TGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTTTCATGTTCTTTTTTGT  
TTTTTTGCCATTCTTGTTTTTTAAATTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTG  
TGACGAACAGACGGACAATAAATCAATCAAACCGAAACCGC

➤ **13R**

CGGTTTCGGTTTGATTGATTTATTGTCCGTCTGTTTCGTCACAACATTTAG  
TATCATCTGGTAAAGAATTTAAAACAAGAATGGCAAATAAAAACAAAA  
AAGAACATGAACATCGTGTCTAACAGTAATCACTTAGGTGTACAGCTAGC  
GGGTCATTATTGCCGTCATTAGCGAGGTAGCTGCACGACCATCGGTTGGA  
ATGTGACCAATGAAACGGCGGTCTAAGGTAATGAAATCGCGATTGAAGA  
TATGACGACCGAGTGTCCGGTGTCTTAAGGCATGGGCACCACATAAATCG  
GATTGTAAGGATGACATCACAGTAGCGACATACGACGGCGGACGGCTGT  
TTCATTTGATGTATCTCTAGTAAATCCTTACGAACTAATATGCAATAAT  
TATCACAATCACTATAAGTGTGGTACAACTCACGCACTCTCCCTCTT

**Congruencia entre R y F**

R	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGATTGTACCACACTTATAGTGATTGTGATAATTATTGCATAT	60
F	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGATTGTACCACACTTATAGTGATTGTGATAATTATTGCATAT *****	60
R	TAGTTTCGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAAATGAAACAGCCGTCCGCCGTCTGATG	120
F	TAGTTTCGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAAATGAAACAGCCGTCCGCCGTCTGATG *****	120
R	TCGCTACTGTGATGTCATCCTTACAATCCGATTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACAC	180
F	TCGCTACTGTGATGTCATCCTTACAATCCGATTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACAC *****	180
R	CGACACTCGGTCGTCATATCTTCAATCGCGATTTTCATTACCTTAGACCGCCGTTTCATTG	240
F	CGACACTCGGTCGTCATATCTTCAATCGCGATTTTCATTACCTTAGACCGCCGTTTCATTG *****	240
R	GTCACATTCCAACCGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCT	300
F	GTCACATTCCAACCGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCT *****	300

```

R      AGCTGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTCATGTTCTTTTTGTTTTTATT 360
F      AGCTGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTCATGTTCTTTTTGTTTTTATT 360
      *****

R      TGCCATTCTTGTTTTTAAATTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTGTGACGAACAGACGG 420
F      TGCCATTCTTGTTTTTAAATTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTGTGACGAACAGACGG 420
      *****

R      ACAATAAATCAATCAAACCGAAACCGC 447
F      ACAATAAATCAATCAAACCGAAACCGC 447
      *****

```

**Alineamiento con la secuencia de isoforma**

```

Clon13      -----AA-----GAGGGAGAG--
Dsx5        AGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCGGATGATAAACTCCGACCTGCCGGGGGAGGGCA
              **                * ***** *

Clon13      -----TGCGTGAGAT-----TG
Dsx5        GGCAGGGTCTCAGGCGCATCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTG
              ***** * *                **

Clon13      TACCACACTTATA-----GTGATTGTG-----ATAATTATT-----
Dsx5        CGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGC
              ** * * **                *** *****                *** **

Clon13      -----GCATATTAGTTTTG
Dsx5        GCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCG
              *** **                *** *

Clon13      TAAGAATTT-----
Dsx5        GCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCAGCAGCAGCGGCAGCAGCAGCCGCGTAATT
              *   ****

Clon13      -----ACTAGAG-----
Dsx5        GCAACTAAATACCGATGAGTTCAAACCTAGTGTTTAAGGCCTCCGCGGTGGAGGAGAAAAC
              ***** *

Clon13      -----ATACATCGAAAT-----
Dsx5        GGTGGGCAGATTGTGGGTGTACATTGTAGTAGAATGTTGTTGCTGCATACGCCCGAAGCA
              ***** * * *

```

Ninguno hace match con la secuencia de *dsx*. Es otro gen, al igual que las anteriores de 400pb.

**CLON 15: Adulto hembra 1 día 400 pb**

➤ **15F**

**AAGAGGGAGAGTGC**GTGAGATTGTACCACACTTATAGTGATTGTGATAAT  
TATTGCATGTTAGTCTTGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAGATGAAA  
CAGCCGTCCGCCGTCGTATGTCGCTACTGTGATGTCACCCTTACAATCCGA  
TTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACACCGACACTCGGTCGTCACATCTT  
CAATCGCGATTTCAATTACCTTAGACCGCCGTTTCATTGGTCACATTCCAAC  
CGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCTAGC

TGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTCCATGTTCTTTTTTTGTT  
 TTTATTTGCCATTCTTGTTTTTAAATTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTG  
 TGACGAACAGACGGACAATAAATCAATCAAACCGAAACCGC

➤ **15R**

GCGGTTTCGGTTTGATTGATTTATTGTCCGTCTGTTTCGTCACAACATTTAG  
 TATCATCTGGTAAAGAATTTAAAAACAAGAATGGCAAATAAAAAACAAA  
 AAGAACATGGACATCGTGTCTAACAGTAATCACTTAGGTGTACAGCTAGC  
 GGGTCATTATTGCCGTCATTAGCGAGGTAGCTGCACGACCATCGGTTGGA  
 ATGTGACCAATGAAACGGCGGTCTAAGGTAATGAAATCGCGATTGAAGA  
 TGTGACGACCGAGTGTCCGGTGTCTTAAGGCATGGGCACCACATAAATCG  
 GATTGTAAGGGTGACATCACAGTAGCGACATACGACGGCGGACGGCTGT  
 TTCATCTCGATGTATCTCTAGTAAATTCTTACAAGACTAACATGCAATAAT  
 TATCACAATCACTATAAGTGTGGTACAAATCTCACGCACTCTCCCTCTT

**Congruencia entre R y F**

R	AAGAGGGAGAGTGCGTGAGATTGTACCACACTTATAGTGATTGTGATAATTATTGCATGT	60
F	AAGAGGGAGAGTGCGTGAGATTGTACCACACTTATAGTGATTGTGATAATTATTGCATGT *****	60
R	TAGTCTTGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAGATGAAACAGCCGTCGCCGTCGTATG	120
F	TAGTCTTGTAAGAATTTACTAGAGATACATCGAGATGAAACAGCCGTCGCCGTCGTATG *****	120
R	TCGCTACTGTGATGTCACCCTTACAATCCGATTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACAC	180
F	TCGCTACTGTGATGTCACCCTTACAATCCGATTTATGTGGTGCCCATGCCTTAACGACAC *****	180
R	CGACACTCGGTCGTCACATCTTCAATCGCGATTTTCATTACCTTAGACCGCCGTTTCATTG	240
F	CGACACTCGGTCGTCACATCTTCAATCGCGATTTTCATTACCTTAGACCGCCGTTTCATTG *****	240
R	GTCACATCCAACCGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCT	300
F	GTCACATCCAACCGATGGTCGTGCAGCTACCTCGCTAATGACGGCAATAATGACCCGCT *****	300
R	AGCTGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTCCATGTTCTTTTTTTGTTTTTATT	360
F	AGCTGTACACCTAAGTGATTACTGTTAGACACGATGTCCATGTTCTTTTTTTGTTTTTATT *****	360
R	TGCCATTCTTGTTTTTAAATTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTGTGACGAACAGACGG	420
F	TGCCATTCTTGTTTTTAAATTCTTTACCAGATGATACTAAATGTTGTGACGAACAGACGG *****	420
R	ACAATAAATCAATCAAACCGAAACCGC	447
F	ACAATAAATCAATCAAACCGAAACCGC *****	447



**Alineamiento con la secuencia de Isoforma**

```

Clon15      -----AA-----GAGGGAGA---
Dsx5      AGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGGAGGGCA
                **                * *****

Clon15      -----
Dsx5      GGCAGGGTCTCAGGCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGCCAAAGTGTGTTGCAGTG

Clon15      -----GTGCGTGAGATTGTAC-CACACTTATAGTGATTGTGATAATT-----
Dsx5      CGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGC
                *** ** * ***** *      *** ** *      * *      ***

Clon15      ----ATTGCA-----
Dsx5      GCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCG
                ** **

Clon15      -----TGTTAGT-----CTTGTA--
Dsx5      GCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCAGCAGCAGCGGCAGCAGCAGCCGCGTAATT
                *****                      *      ****

Clon15      -----GAATTT--ACTAGAG-----
Dsx5      GCAACTAAATACCGATGAGTTCAAAC TAGTGTTTAAGGCTCCGCGGTGGAGGAGAAAAC
                ** **      ***** *

Clon15      -----ATACATCGAGAT-----
Dsx5      GGTGGGCAGATTGTGGGTGTACATTGTAGTAGAATGTTGTTGCTGCATACGCCGAAGCA
                ***** *      *

Clon15      -----GAAAC
Dsx5      GCGCATCACAGCGGAACGGTGTGAGTAGTCAATGGAACGGTCAGGAAACGGGACGGAAAC
                *****

Clon15      AGCCGTCGCGCGTC-----GTATGT-----
Dsx5      AAACACACGCCGCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGTGTATGTGTGACGCAGGA
                * *      ***** *      *****

```

No hizo match con ninguna parte del gen *dsx* por lo que, al igual que los otros fragmentos de 400pb pertenecen a otro gen.

**CLON 36: Adulto hembra 1 día 200 pb / 656 pb**

➤ **36F**

**AAGAGGGAGAGTGCCTGAGA**GAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCAT  
AAGTTGTGTTCCACTAGAAGGCCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGG  
AGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAA  
CTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCCGAATACCTGAGTCAGC  
ATCGCCTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCCGCACTCA  
GTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCAACCACC  
ATCCCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCC  
TGGTGC ACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTG  
TTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCAAATTGCAGAAAGAG



```

R      GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG      416
F      GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG      420
*****

R      TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAAGTAGGTGAC      476
F      TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAAGTAGGTGAC      480
*****

R      AAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTC AATCGCTAGCATA      536
F      AAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTC AATCGCTAGCATA      540
*****

R      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGACCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA      596
F      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGACCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA      600
*****

R      AATCTCCACCCCAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGC      654
F      AATCTCCACCCCAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGC      658
*****

```

Faltan algunas bases repetidas en varias partes de la secuencia. Estas se marcan en celeste. Usualmente son bases repetidas las que faltan. Del análisis con la secuencia de Isoforma puede concluirse que la hebra sentido es más confiable porque comete menos mismatches.

### Alineamiento con la secuencia de Isoforma

```

Clon36      -----AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
Dsx5        CAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCT--GAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
                *****

Clon36      AATCATAAGTTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCT
Dsx5        AATCATAAGTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCT
                *****
                Este error está en ambas hebras

Clon36      TTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCC
Dsx5        TTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCC
                *****

Clon36      CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAGTGTGCCACAG
Dsx5        CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAGTGTGCCACAG
                *****
                Mismatches reportado en 2 hebras

Clon36      AAATTTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGACTGGGGGGTGGGGCTGGTGGA
Dsx5        AAATTTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAAATGGGGGGGGGGCTGGTGGA
                *****
                Mismatches en ambas hebras

Clon36      TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
Dsx5        TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
                *****

Clon36      TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
Dsx5        TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
                *****

Clon36      GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
Dsx5        GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
                *****

```

```

Clon36      AGAGAGAAAGTAGGTGAC-AAAAAAGGATGTAGAAGATA TAGTTGTTATCACGTTGGTT
Dsx5        AGAGAGAAAGTAGGTGACA AAAAAAAGGATGTAGAAGATC TAGTTGTTATCACGTTGGTT
*****
                Mismatches en ambas hebras
Clon36      CAGTTCAATCGCTAGCATAAATTCGAATGCCATAGTTTTC CCCCTGGGGCGA CCCAGAA
Dsx5        CAGTTCAATCGCTAGCATAAATTCGAATGCCATAGTTTTC CCCCTGGGGCGA CCCAGAA
*****

Clon36      GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAACAACAACAACGACAAAAACGCATC
Dsx5        GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAACAACAACAACGACAAAAACGCATC
*****

Clon36      AATCAAACCGAAACCGC-----
Dsx5        AATCAAACCGAAACCGCTGTCTTGCTGTGTCGCCATTTTGTACGCTGCCATTCATCAT
*****

Clon36      -----
Dsx5        CAAACCCCACTGCGCCAGATTAATGCAAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAA

Clon36      -----
Dsx5        AGCGCCAG

```

En total, hay 14 diferencias en pares de bases respecto a la original.

**CLON 37: Adulto hembra 5 días 656 pb**

➤ **37F**

**AAGAGGGAGAGTGCCTGAGA**GAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCAT  
AAGTTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAAGAGGG  
AGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAA  
CTACAACGCAACGCCCAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGC  
ATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCCGCACTCA  
GTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCAACCACC  
ATCCCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCC  
TGGTGCCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTG  
TTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAG  
CGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAG  
AAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGA  
ATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAA  
GCAAATCTCCACCCCAAACAACAACAACGACAAAAACGC**ATCAATCA**  
**AACCGAAACCGC**

➤ **37R**

**CGGTTTCGGTTTGATTGATGCGTTTTTGTGCTTGTGTTGTTTTGGGGGT**  
GGAGATTTGCTTCCCTAATTTTACCTTCTGGCCGCCCCAGGGGGGAAAA



```

R      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAA      600
F      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAA      600
      *****

R      ATCTCCACCCCAAAAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGC      657
F      ATCTCCACCCCAAAAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGC      657
      *****

```

### Alineamiento con la secuencia de Isoforma

```

Clon37      -----AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
Dsx5        CAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCT--GAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
      *****

Clon37      AATCATAAGTTGTGTTCCACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCT
Dsx5        AATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCT
      *****

Clon37      TTCATCGATCAACAAACCACAACGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCC
Dsx5        TTCATCGATCAACAAACCACAACGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCC
      *****

Clon37      CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACTGTGTGCCACAG
Dsx5        CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACTGTGTGCCACAG
      *****

Clon37      AAATTTAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGTGGGGCTGGTGA
Dsx5        AAATTTAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGTGGGGCTGGTGA
      *****

Clon37      TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
Dsx5        TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
      *****

Clon37      TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
Dsx5        TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
      *****

Clon37      GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
Dsx5        GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
      *****

Clon37      AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTT
Dsx5        AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATCAGTTGTTATCACGTTGGTT
      *****

Clon37      CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAA
Dsx5        CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAA
      *****

Clon37      GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAAACAACAACGACAAAAACGCATC
Dsx5        GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAAACAACAACGACAAAAACGCATC
      *****

Clon37      AATCAAACCGAAACCGC-----
Dsx5        AATCAAACCGAAACCGCTGTCTTGCTGTGTCGCCATTTTGTACGCTGCCATTCATCATT
      *****

```

Total: 12 mismatches.

**CLON 36: Adulto hembra 5 días 200 pb**

➤ **46F**

AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTG  
 TGTTCCTACTAGAAGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTT  
 CATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTGTCAGCAACTACAAC  
 GCAACGCCCAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAA  
 ACCGC

➤ **46R**

CGGTTTCGGTTTGATTGATGCGTTTTTGTTCGTTGTTGTTGTTTTGGGCGTT  
 GCGTTGTAGTTGCTGACCGATCGGTCCGACAGTTGTGGTTTGTGATCGAT  
 GAAAGACTCCCTCTTTGAAGCACTCCTTGGGTTTGCCTTCTAGTGGAAACA  
 CAGCTTATGATTTTGCTCTTCCCTCTCTCTCTCACGCACTCTCCCTCTT

**Congruencia entre R y F**

R	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGA	60
F	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGA *****	60
R	AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC	120
F	AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC *****	120
R	GTCCGACCGATCGGTGTCAGCAACTACAACGCAACGCCCAAACAACAACAACGACAAAAAC	180
F	GTCCGACCGATCGGTGTCAGCAACTACAACGCAACGCCCAAACAACAACAACGACAAAAAC *****	180
R	GCATCAATCAAACCGAAACCGC	202
F	GCATCAATCAAACCGAAACCGC *****	202

Hacen match perfecto.

**Alineamiento con la secuencia de Isoforma**

```

Clon200pb -----
IsoformaLarga GTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAG
IsoformaCorta -----

Clon200pb -----
IsoformaLarga AGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGGAGGGCA
IsoformaCorta -----

Clon200pb -----
IsoformaLarga GGCAGGGTCTCAGGCGCATCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTG
IsoformaCorta -----
    
```

Clon200pb	-----
IsoformaLarga	CGTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGC
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	GCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCG
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	GCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCAGCAGCAGCAGCGGCAGCAGCAGCCGCGTAATT
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	GCAACTAAATACCGATGAGTTCAAACTAGTGTTTAAGGCTCCGCGGTGGAGGAGAAAAC
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	GGTGGGCAGATTGTGGGTGTACATTGTAGTAGAATGTGTTGCTGCATACCCCCAAGCA
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	GCGCATCACAGCGGAACGGTGTGTCAGTAGTCAATGGAACGGTCAGGAAACGGGACGGAAAC
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	AAACACACGCCGCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGTGTATGTGTGACGCAGGA
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	CTCTCGAGGCTCTACCACCCACCTGCTATCGATTGACCGGACAGCTTGGCTCCGGGCGCC
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	ATTAATTCTCTGAAATACCAAAATCAGAAAACCAAACCGAAATCATGATGATGATGATGA
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	TGATGAAGATGATGATGATCACCAACACCCTTGTTCCTTGCTTGCGTCTTTTTCTATGTT
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	TCGATGCGCCGTGGGAACGGACGGAACCGTATCGCGAACTTTCCGGTGGATGGTCGTATC
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	GGTCGTTCCCGGTTCCCGGTTCCCGTGTCCCTTCCCACAACACCCGCTCCCCTGCCATT
IsoformaCorta	-----
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	ACAGTGTCAATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTG
IsoformaCorta	----TGTC AATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTG



Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- TAGCTGTACTTGTGAGATCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGGTCCGACGACCCCCGTGCCG TAGCTGTACTTGTGAGATCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGGTCCGACGACCCCCGTGCCG -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- TGAACCTGGGGCCCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTTCTCCGAGGCTCTGGGCCACGGTTTC TGAACCTGGGGCCCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTTCTCCGAGGCTCTGGGCCACGGTTTC -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- TAGACCCACAGTAATATTGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTTAAAAAGTTCCTTTCG TAGACCCACAGTAATATTGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTTAAAAAGTTCCTTTCG -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- CTGGGCTGCTAGTAGTGTACCTAGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGCTGGAAGAAAGAAAAAC CTGGGCTGCTAGTAGTGTACCTAGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGCTGGAAGAAAGAAAAAC -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- -----AAGAGGGAGAGTGCCT-----GAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAA CAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAA CAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAA ***** -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- TCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCAAGCAGTGTCTTCAAAGAGGGAGTCTTT TCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCAAGAGTGTCTTCAAAGAGGGAGTCTTT TCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCAAGAGTGTCTTCAAAGAGGGAGTCTTT ***** -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- CATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTTCAGCAACTACAACGCAACG---- CATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTTCAGCAACTACAACGCAACGCCCA CATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTTCAGCAACTACAACGCAACGCCCA ***** -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- AAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAGAA AAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAGAA -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- ATTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGGGCCTGGTGAATC ATTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGGGCCTGGTGAATC -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- CACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTC CACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTC -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- CCCTGGTGCCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATCGG CCCTGGTGCCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATCGG -----
Clon200pb IsoformaLarga IsoformaCorta	----- TGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAG TGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAG -----

Clon200pb	-----
IsoformaLarga	AGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATGTAGTTGTTATCACGTTGGTTCA
IsoformaCorta	AGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATGTAGTTGTTATCACGTTGGTTCA
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	GTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTCTCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGT
IsoformaCorta	GTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTCTCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGT
Clon200pb	-----CCCAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAAT
IsoformaLarga	GAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAAT
IsoformaCorta	GAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAAT
	*****
Clon200pb	CAAACCGAAACCGC-----
IsoformaLarga	CAAACCGAAACCGCTGTCTTGCTGTGTCCGCCATTTGTACGCTGCCATTCATCATCAA
IsoformaCorta	CAAACCGAAACCGCTGTCTTGCTGTGTCCGCCATTTGTACGCTGCCATTCATCATCAA
	*****
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	ACCCCACTGCGCCAGATTAATGCAAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAAAGC
IsoformaCorta	ACCCCACTGCGCCAGATTAATGCAAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAAAGC
Clon200pb	-----
IsoformaLarga	GCCAG
IsoformaCorta	GCCAG

Mismatches: 1 corrimiento en el cebador y 1 mismatch adicional. P

**CLON 59: Adulto hembra 5 días 656 pb**

➤ **59F**

AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCAT  
AAGTTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGG  
AGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAA  
CTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGC  
ATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCCGCACTCA  
GTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACC  
ATCCCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCC  
TGGTGCCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTG  
TTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCAAATTGCAGAAAGAG  
CGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAG  
AAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGA  
ATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGA  
AGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATC  
AAACCGAAACCGC

➤ **59R**

**CGGGTTTCGGTTTGATTGATGCGTTTTTGTGCGTTGTTGTTTGGGGGTT**  
 GGAGATTTGCTTCCCTAATTTTCACCTTCTGGGCCGCCCCAGGGGGGAAA  
 AACTATGGCATTCCGAATTATGCTAGCGATTGAACTGAACCAACGTGATAA  
 CAACTATATCTTCTACATCCTTTTTTTTGTACCTACTTTCTCTCTATCTCTC  
 TTCGCTCGCTCTTTCTGCAATTTGGAACGGATTACACGACGCGGATTACACA  
 CCGATAACACACTCACGCACCGGGTACACACATCCACACAGACCGTGGA  
 GTGCACCAGGGGAATCGGTTGGTTGATAGAAGCTGACGATGACGAATGG  
 CCCGGGGGATGGTGGTTGGGTGGATCCACCAGCCGCACCCCCACTCACC  
 GTTCCCCACTGAGTGCGGGGCCGCTTTTAATTTCTGTGGCACACGTTAAC  
 GAAGCGATGCTGACTCAGGTATTCGGGGTATTACGGGGTTTTGGGCGTTG  
 CGTTGTAGTTGCTGACCGATCGGTCCGACAGTTGTGGTTTGTGATCGATG  
 AAAGACTCCCTCTTTTGAAGCACTTCTGGGTTTGCCTTCTAGTGGAACAC  
 AACTTATGATTTTGCTCTCCTCTCTCTCTCTCTCT**TCTCACGCACTCTCCCTCT**

**T**

**Congruencia entre R y F**

R	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGTTGTGTTC	60
F	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGTTGTGTTC *****	60
R	ACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACC	120
F	ACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACC *****	120
R	ACAACGTCCGACCGATCGGTACAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCGTAATACCC	180
F	ACAACGTCCGACCGATCGGTACAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCGTAATACCC *****	180
R	CGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTAAACGTGTGCCACAGAAATAAAAGCGGGCCCC	240
F	CGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTAAACGTGTGCCACAGAAATAAAAGCGGGCCCC *****	240
R	GCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGTGCGGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCC	300
F	GCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGTGCGGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCC *****	300
R	CCCGGGCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGCCTCCAC	360
F	CCCGGGCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGCCTCCAC *****	360
R	GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG	420
F	GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG *****	420
R	TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGAC	480
F	TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGAC *****	480

```

R      AAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTC AATCGCTAGCATA      540
F      AAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTC AATCGCTAGCATA      540
      *****

R      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA      600
F      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGARGGTGAAAATTAGGGAAGCA      600
      *****

R      AATCTCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGC      658
F      AATCTCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGC      658
      *****

```

Hacen match perfecto. Se puede deducir que la R que no se veía en una de las hebras, corresponde a una A.

### Alineamiento con la secuencia de Isoforma

```

Clon59      -----AAGAGGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
Dsx5        CAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGGAGAGTGCCT--GAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
      *****

Clon59      AATCATAAGTTGTGTTCCACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCT
Dsx5        AATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCT
      *****

Clon59      TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCC
Dsx5        TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCC
      *****

Clon59      CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACTGTGTGCCACAG
Dsx5        CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGTGCCACAG
      *****

Clon59      AAATTTAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGTGGGGCTGGTGA
Dsx5        AAATTTAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGGGGGCTGGTGA
      ***** * *

Clon59      TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
Dsx5        TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
      *****

Clon59      TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
Dsx5        TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
      *****

Clon59      GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
Dsx5        GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
      *****

Clon59      AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTT
Dsx5        AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATCTAGTTGTTATCACGTTGGTT
      *****

Clon59      CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAA
Dsx5        CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAA
      *****

Clon59      GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAACGCATC
Dsx5        GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAACGCATC
      *****

Clon59      AATCAAACCGAAACCGC-----
Dsx5        AATCAAACCGAAACCGCTGTCTTGCTGTGTCCGCAATTTTGTACGCTGCCATTCATCATT

```

\*\*\*\*\*

Mismatches: 13. Se presentan los mismos que en las secuencias anteriores.

**CLON 71: Adulto hembra 5 días 656 pb**

➤ **71F**

AAGAGGGAGAGTGCCTGAGA GAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCAT  
AAGTTGTATTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAAGAGGG  
AGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAA  
CTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGC  
ATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCCGCACTCA  
GTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCAACCACC  
ATCCCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCC  
TGGTGC ACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGC GTGAGTGTG  
TTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAG  
CGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAGAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAG  
AAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGA  
ATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGA  
AGCAAATCTCCACCCCCAAAACAACAACGACAAAAACGCATCAAT  
CAAACC GAAACCGC

En esta secuencia la sección amplificada por el primer tiene una C insertada adicional.

➤ **71R**

Esta secuencia no pudo ser analizada debido a excesivo ruido en la secuenciación. De hecho, la secuencia enviada cuenta con 334 pb, lo cual es considerablemente menor a la hebra sentido. Se analizará un alineamiento solo con la secuencia sentido.

**Alineamiento con la secuencia de Isoforma**

```

Clon71      -----AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
Dsx5        CAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCT--GAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
                *****
Clon71      AATCATAAGTTGTATTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAAGAGGGAGTCT
Dsx5        AATCATAAGCTGTCTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAAGAGGGAGTCT
                *****
Clon71      TTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCC
Dsx5        TTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCC
                *****

```

```

Clon71      CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAG
Dsx5       CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAG
*****

Clon71      AAATTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGTGGGGCTGGTGA
Dsx5       AAATTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGTGGGGCTGGTGA
***** * * * * *

Clon71      TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
Dsx5       TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
*****

Clon71      TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
Dsx5       TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
*****

Clon71      GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGGAGCGAAGAGAGAT
Dsx5       GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGGAGCGAAGAGAGAT
*****

Clon71      AGAGAGAGAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTT
Dsx5       AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATCTAGTTGTTATCACGTTGGTT
*****

Clon71      CAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCTGGGGCGGCCAGAA
Dsx5       CAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCTGGGGCGGCCAGAA
*****

Clon71      GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAAACAACAACAACGACAAAAACGCAT
Dsx5       GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAAACAACAACAACGACAAAAACGCAT
*****

Clon71      CAATCAAACCGAAACCGC-----
Dsx5       CAATCAAACCGAAACCGCTGTCTTGCTGTGTCCGCCATTTTGTACGCTGCCATTTCATCA
*****

```

Mismatches totales: 15. No se puede analizar la otra hebra.

### Alineamiento de todos los clones 656 pb

```

IsoformaLarga  GTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAG
IsoformaCorta  -----
Clon46         -----
Clon37         -----
Clon59         -----

IsoformaLarga  AGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGGAGGGCA
IsoformaCorta  -----
Clon46         -----
Clon37         -----
Clon59         -----

IsoformaLarga  GGCAGGGTCTCAGGCGCATCCTGCCTGCCTGCCTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTG
IsoformaCorta  -----
Clon46         -----
Clon37         -----
Clon59         -----

```

IsoformaLarga CGTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGC  
IsoformaCorta -----  
Clon46 -----  
Clon37 -----  
Clon59 -----

IsoformaLarga GCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTCG  
IsoformaCorta -----  
Clon46 -----  
Clon37 -----  
Clon59 -----

IsoformaLarga GCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCAGCAGCAGCAGCGGCAGCAGCAGCCGCGTAATT  
IsoformaCorta -----  
Clon46 -----  
Clon37 -----  
Clon59 -----

IsoformaLarga GCAACTAAATACCGATGAGTTCAAACTAGTGTTTAAGGCTCCGCGGTGGAGGAGAAAAC  
IsoformaCorta -----  
Clon46 -----  
Clon37 -----  
Clon59 -----

IsoformaLarga GGTGGGCAGATTGTGGGTGTACATTGTAGTAGAATGTTGTTGCTGCATACGCCCGAAGCA  
IsoformaCorta -----  
Clon46 -----  
Clon37 -----  
Clon59 -----

IsoformaLarga GCGCATCACAGCGGAACGGTGTGTCAGTAGTCAATGGAACGGTCAGGAAACGGGACGGAAAC  
IsoformaCorta -----  
Clon46 -----  
Clon37 -----  
Clon59 -----

IsoformaLarga AAACACACGCCGCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGTGTATGTGTGACGCAGGA  
IsoformaCorta -----  
Clon46 -----  
Clon37 -----  
Clon59 -----

IsoformaLarga CTCTCGAGGCTCTACCACCCACCTGCTATCGATTGACCGGACAGCTTGGCTCCGGGCGCC  
IsoformaCorta -----  
Clon46 -----  
Clon37 -----  
Clon59 -----

IsoformaLarga	ATTAATCTCTGAAATACCAAAATCAGAAAACCAAACCGAAATCATGATGATGATGATGA
IsoformaCorta	-----
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----
IsoformaLarga	TGATGAAGATGATGATGATCACCAACACCCTTGTTCTTTGCTTGCCTTCTTTTCTATGTT
IsoformaCorta	-----
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----
IsoformaLarga	TCGATGCGCCGTGGGAACGGACGGAACCGTATCGCGAACTTTCCGGTGGATGGTTCGTATC
IsoformaCorta	-----
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----
IsoformaLarga	GGTCGTTCCCGGTTCCCGGTTCCCGTGTCCCTTCCCACAACACCCGCTCCCCTGCCATT
IsoformaCorta	-----
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----
IsoformaLarga	ACAGTGTCAATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTG
IsoformaCorta	----TGTCATGCTGTTTCGACGGCAACGTAGACCTACAGCCATTCTGGGGCTACCGGGTG
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----
IsoformaLarga	TAGCTGTACTTGTGAGATCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGGTCCGACGACCCCCGTGCCG
IsoformaCorta	TAGCTGTACTTGTGAGATCGGGCCCCGACCGTGTGAATGGGTCCGACGACCCCCGTGCCG
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----
IsoformaLarga	TGAACCTGGGGCCCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTTCTCCGAGGCTCTGGGCCACGGTTTC
IsoformaCorta	TGAACCTGGGGCCCCCTAGCGAGCTCCGTTTCTTCTCCGAGGCTCTGGGCCACGGTTTC
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----
IsoformaLarga	TAGACCCACAGTAATATTGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTTGAAAAGTTCTTTGC
IsoformaCorta	TAGACCCACAGTAATATTGGTGAGAAAGTGTGTCCGACGTCTTTTGAAAAGTTCTTTGC
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----
IsoformaLarga	CTGGGCTGCTAGTAGTGTACCTAGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGCTGGAAGAAAGAAAAC
IsoformaCorta	CTGGGCTGCTAGTAGTGTACCTAGTTCGCCGGCTCGGTGTGGCGCTGGAAGAAAGAAAAC
Clon46	-----
Clon37	-----
Clon59	-----



```

IsoformaLarga      CAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCT--GAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
IsoformaCorta     CAAACGCAAGGAGGAGAGAAGAGGGAGAGTGCCT--GAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
Clon46            -----AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
Clon37            -----AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
Clon59            -----AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAA
                    *****
IsoformaLarga      AATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCCTCAAAGAGGGAGTCT
IsoformaCorta     AATCATAAGCTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCCTCAAAGAGGGAGTCT
Clon46            AATCATAAGTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCCTCAAAGAGGGAGTCT
Clon37            AATCATAAGTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCCTCAAAGAGGGAGTCT
Clon59            AATCATAAGTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCCTCAAAGAGGGAGTCT
                    *****
IsoformaLarga      TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCC
IsoformaCorta     TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCC
Clon46            TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCC
Clon37            TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCC
Clon59            TTCATCGATCAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCC
                    *****
IsoformaLarga      CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAG
IsoformaCorta     CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAG
Clon46            CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAG
Clon37            CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAG
Clon59            CAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAAGTGTGCCACAG
                    *****
IsoformaLarga      AAAT'AAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGGGGCGCTGGTGAA
IsoformaCorta     AAAT'AAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGGGGCGCTGGTGAA
Clon46            AAAT'AAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGGGGCGCTGGTGAA
Clon37            AAAT'AAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGGGGCGCTGGTGAA
Clon59            AAAT'AAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAATGGGGGGGGGCGCTGGTGAA
                    *****
IsoformaLarga      TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
IsoformaCorta     TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
Clon46            TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
Clon37            TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
Clon59            TCCACCCAACCACCATCCCCGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGAT
                    *****
IsoformaLarga      TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
IsoformaCorta     TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
Clon46            TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
Clon37            TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
Clon59            TCCCCTGGTGCACCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATC
                    *****
IsoformaLarga      GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
IsoformaCorta     GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
Clon46            GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
Clon37            GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
Clon59            GGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGAT
                    *****
IsoformaLarga      AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAAAGGATGTAGAAGATGTAGTTGTTATCACGTTGGTT
IsoformaCorta     AGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAAAGGATGTAGAAGATGTAGTTGTTATCACGTTGGTT
Clon46            AGAGAGAAAGTAGGTGAC-AAAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTT
Clon37            AGAGAGAAAGTAGGTGAC-AAAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTT
Clon59            AGAGAGAAAGTAGGTGAC-AAAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTT
                    *****

```

```

IsoformaLarga      CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAG-TTTTCTCCCCTGGGGCGGCCAGAA
IsoformaCorta      CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAG-TTTTCTCCCCTGGGGCGGCCAGAA
Clon46              CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAA
Clon37              CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAA
Clon59              CAGTTCAATCGCTAGCATAATTGCAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAR
                    *****
                    *****

IsoformaLarga      GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATC
IsoformaCorta      GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATC
Clon46              GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATC
Clon37              GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATC
Clon59              GGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACAACAACAACGACAAAAACGCATC
                    *****

IsoformaLarga      AATCAAACCGAAACCGCTGTCTTGCTGTGTCCGCCATTTTGTACGCTGCCATTTCATCATT
IsoformaCorta      AATCAAACCGAAACCGCTGTCTTGCTGTGTCCGCCATTTTGTACGCTGCCATTTCATCATT
Clon46              AATCAAACCGAAACCGC-----
Clon37              AATCAAACCGAAACCGC-----
Clon59              AATCAAACCGAAACCGC-----
                    *****

IsoformaLarga      CAAACCCCACTGCGCCAGATTAATGCAAAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAA
IsoformaCorta      CAAACCCCACTGCGCCAGATTAATGCAAAAAGATTTCCCGTACTCTTCAATCAATCCAAA
Clon46              -----
Clon37              -----
Clon59              -----

IsoformaLarga      AGCGCCAG
IsoformaCorta      AGCGCCAG
Clon46              -----
Clon37              -----
Clon59              -----

```

**CUADRO RESUMEN:**

Fragmento	Clon	Mismatches
<b>656 pb</b>	46	14
	37	12
	59	13
	71	15
<b>400 pb</b>	1	No son parte de <i>doublesex</i> .
	2	
	13	
	15	
<b>200 pb</b>	3	---
	36	1

Anexo 12: Análisis de secuencias de los fragmentos de *dsx* femeninos para verificar la presencia del promotor T7

**Análisis de clones con fragmentos específicos femeninos de *dsx* con promotor T7**

Las siguientes secuencias fueron obtenidas amplificando secciones del exón 5 del gen *doublesex* clonadas en plásmidos extraídos de *E. coli* XL1-Blue. Se emplearon los cebadores AaDsxIn103F con AaDsxIn105R\_T7.

**-Secuencia de primers:**

**AaDsxIn103F:**

5' AAGAGGGAGAGTGCGTGAGA 3'

**Cola codificante para promotor T7:**

5' CCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'

**-Secuencia clon 59:**

GCGGTTTCGGTTTGATTGATGCGTTTTTGTTCGTTGTTGTTGTTTTGGGGGT  
GGAGATTTGCTTCCCTAATTTTCACCTTCTGGGCCGCCCCAGGGGGGAAA  
AACTATGGCATTCTGAATTATGCTAGCGATTGAACTGAACCAACGTGATAA  
CAACTATATCTTCTACATCCTTTTTTTGTTCACCTACTTTCTCTCTATCTCTC  
TTCGCTCGCTCTTTCTGCAATTTGGAACGGATTCACACGCACGGATTCACA  
CCGATAACACACTCACGCACCGGGTACACACATCCACACAGACCGTGGA  
GTGCACCAGGGGAATCGGTTGGTTGATAGAAGCTGACGATGACGAATGG  
CCCGGGGGATGGTGGTTGGGTGGATCCACCAGCCGCACCCCCACTCACC  
GTTCCCCACTGAGTGCGGGGCCCGCTTTTAATTTCTGTGGCACACGTTAAC  
GAAGCGATGCTGACTCAGGTATTCGGGGTATTACGGGGTTTTGGGCGTTG  
CGTTGTAGTTGCTGACCGATCGGTCGGACAGTTGTGGTTTGTGATCGATG  
AAAGACTCCCTCTTTTGAAGCACTTCTTGGGTTTGCCTTCTAGTGGAACAC  
AACTTATGATTTTGCTCTTCCTCTCTCTCTCTCTCAGCACTCTCCCTCT  
T

## ANÁLISIS DE CLONES CON 202 pb

### CLON 5A: 202 pb +T7

La secuencia del cromatograma tenía demasiado ruido, por lo que no fue posible siquiera encontrar los cebadores. Se descarta el clon.

### CLON 8A: 202pb +T7

➤ **F**

TCGATTAAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAG  
CTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTT  
TCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTTCAGCAACTACAACG  
CAACGCCCAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACC  
GCCCTATAGTGAGTCGTATTAATCACTAGTGAA

➤ **R**

AATTCGATTAAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCAT  
AAGCTGTGTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGT  
CTTTCATCGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTTCAGCAACTACA  
ACGCAACGCCCAAACAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAA  
ACCGCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATCACTAGT

#### Alineamiento:

```
F      ---TCGATTAAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGT
R      AATTCGATTAAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGT
      *****

F      TCCACTAGAAGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAA
R      TCCACTAGAAGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAA
      *****

F      ACCCAACTGTCCGACCGATCGGTTCAGCAACTACAACGCAACGCCCAAACAACAAC
R      ACCCAACTGTCCGACCGATCGGTTCAGCAACTACAACGCAACGCCCAAACAACAAC
      *****

F      GACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATCACTAG
R      GACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATCACTAG
      *****

F      TGAA
R      T---
      *
```

**CLON 10A: 202pb +T7**

F

**AAGAGGGAGAGTGCCTGAGA**GAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCAC  
TAGAAGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAA  
CCACAACGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACAACAAC  
AACGACAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCG**CCCTATAGTGAGTCGTATTA**

R

**AAGAGGGAGAGTGCCTGAGA**GAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCAC  
TAGAAGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAA  
CCACAACGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACAACAAC  
AACGACAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCG**CCCTATAGTGAGTCGTATTA**

**Alineamiento:**

F AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGA  
R AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGA  
\*\*\*\*\*

F AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC  
R AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC  
\*\*\*\*\*

F GTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACAACAACGACAAAAAC  
R GTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACAACAACGACAAAAAC  
\*\*\*\*\*

F GCATCAATCAAACCGAAACCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA  
R GCATCAATCAAACCGAAACCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA  
\*\*\*\*\*

**Alineamiento entre clones 202 pb y clon original**

Clon36 AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGA  
Clon10A AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGA  
Clon8a AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGCTGTGTTCCACTAGA  
\*\*\*\*\*

Clon36 AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC  
Clon10A AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC  
Clon8a AGGCAAACCCAAGGAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACAAC  
\*\*\*\*\*

Clon36 GTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACAACAACGACAAAAAC  
Clon10A GTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACAACAACGACAAAAAC  
Clon8a GTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACAACAACGACAAAAAC  
\*\*\*\*\*

Clon36 GCATCAATCAAACCGAAACCGC-----  
Clon10A GCATCAATCAAACCGAAACCGC**CCCTATAGTGAGTCGTATTA**  
Clon8a GCATCAATCAAACCGAAACCGC**CCCTATAGTGAGTCGTATTA**  
\*\*\*\*\*

Se puede utilizar cualquier clon porque ambos tienen la secuencia intacta.

## ANÁLISIS DE CLONES CON 656 PB

CLON 6A: 600+T7

F

AAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGTTGT  
GTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCAT  
CGATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAAC  
GCCAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAAC  
GTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAGT  
GGGGGGTGCGGCTGGTGGATCCACCAACCACCATCCCCGGGCCATTCGTC  
ATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGCACTCCACGGTCTGTG  
TGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGT  
GAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAG  
TAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAG  
TTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCC  
AGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCACCCCCAAAACAACAACG  
ACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAA  
T

R

AAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGTTGT  
GTTCCACTAGAAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATC  
AACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAAC  
CCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAA  
TTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGCGGCTGGTGG  
ATCCACCAACCACCATCCCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACC  
GATCCCCTGGTGCACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTG  
TTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGA  
AGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTA  
TCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTG  
GGGCGGCCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCACCCCCAAAACAACAAC  
AACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCCCTATAGTGAGTCGTATTAA

Alineamiento

```
F -----AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGT
R ATTCGATT AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGT
      *****

F TGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATC
R TGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATC
      *****

F AACAAACCACAACGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCG
R AACAAACCACAACGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCG
      *****

F TAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAG
R TAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAG
      *****

F CGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGGGCTGGTGGATCCACCCAAC
R CGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGGGCTGGTGGATCCACCCAAC
      *****

F CACCATCCCCGGGCCATTTCGTATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTG
R CACCATCCCCGGGCCATTTCGTATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTG
      *****

F CACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATC
R CACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCCTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATC
      *****

F CGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAG
R CGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAG
      *****

F TAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCG
R TAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCG
      *****

F CTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAGGTGAAAATTA
R CTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAGGTGAAAATTA
      *****

F GGAAGCAAATCTCCACCCCAAACAACAACAACGACAAAACGCATCAATCAAACCGA
R GGAAGCAAATCTCCACCCCAAACAACAACAACGACAAAACGCATCAATCAAACCGA
      *****

F AACCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAAAT
R AACCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAA--
      *****
```

CLON 9A:

F

GATT AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAG  
TTGTGTTCCACTAGAAAGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATC

GATCAACAAACCACAACACTGTCCGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCA  
AAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTAAACGTGTGCCACA  
GAAATTAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTG  
GTGGATCCACCAACCACCATCCCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACC  
AACCGATTCCCCTGGTGC ACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGA  
GTGTGTTATCGGTGTGAGTCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCG  
AGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAG  
TTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCC  
CCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCCAAAAC  
AACACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCCTATAGTGAGTCGT  
ATTA

**R**

ATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTC ACTAGTGATTAAGAGGGAGAGTGCGT  
GAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGTTGTGTTCCACTAGAAGGCCA  
ACCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACA ACTGTC  
CGACCGATCGGTCAGCAACTACAACGCAACGCCCAAACCCCGTAATACCCCGAAT  
ACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTAAACGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCCGC  
ACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCAACCACCAT  
CCCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCTGGTGC ACT  
CCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAGTCC  
GTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGA  
AAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTT  
CAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAG  
TGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCCAAAACAACAACGACAAAAACGCA  
TCNATCAAACCGAAACCGCCCCCTATAGTGAGTCGTATTA

**Alineamiento**

F -----GATTAGAGGGAGAGTGCGTGAG  
R ATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTC ACTAGTGATTAGAGGGAGAGTGCGTGAG  
\*\*\*\*\*

F AGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGTTGTGTTCCACTAGAAGGCCAAACCCAAG  
R AGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAATCATAAGTTGTGTTCCACTAGAAGGCCAAACCCAAG  
\*\*\*\*\*

F AAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACA ACTGTCCGACCGATCG  
R AAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACCACA ACTGTCCGACCGATCG  
\*\*\*\*\*



```

F      GTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCAT
R      GTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCAT
      *****

F      CGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGT
R      CGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGT
      *****

F      GAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCCCCGGGGCCATTTCGTCATCG
R      GAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCCCCGGGGCCATTTCGTCATCG
      *****

F      TCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCCTGGTGC ACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGT
R      TCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCCTGGTGC ACTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGT
      *****

F      ACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAGTCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGC
R      ACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAGTCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGC
      *****

F      AGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGA
R      AGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGA
      *****

F      TATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAAATTCGAATGCCATAGTTTT
R      TATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAAATTCGAATGCCATAGTTTT
      *****

F      TCCCCCTGGGGCGGCCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACA
R      TCCCCCTGGGGCGGCCCAGAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCAAAACA
      *****

F      ACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTAA
R      ACAACAACGACAAAAACGCATC NATCAAACCGAAACCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTAA
      *****

F      ATC
R      A--
      *

```

**CLON 11A: 600 +T7**

**F**

No pudo leerse el cromatograma por elevada cantidad de ruido.

**R**

```

TAAGAGGGAGAGTGCGTGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGTTG
TGTTCCACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGAT
CAACAAACCACAACCTGTCCGACCGATCGGTTCAGCAACTACAACGCAACGCCAAA
CCCCGTAATACCCCGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAA
ATTTAAAAGCGGGCCCCGCACTCAGTGGGGAACGGTGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGT
GATCCACCCAACCACCATCCCCGGGGCCATTTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAAC

```

CGATTCCCCTGGTGCCTCCACGGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGT  
 GTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTGTGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCG  
 AAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGACAAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTT  
 ATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATAATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCCT  
 GGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCAAATCTCCACCCCCAAAACAACAA  
 CAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCCCTATAGTGAGTTCGTATTAA  
 ATCGAATT

**Análisis entre clon 59 (original) y clones de 656pb**

Clon9A	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGTTGTGTTC
Clon59	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGTTGTGTTC
Clon6A	AAGAGGGAGAGTGCCTGAGAGAGAGAGAGAGAGGAAGAGCAAAATCATAAGTTGTGTTC *****
Clon9A	ACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACC
Clon59	ACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACC
Clon6A	ACTAGAAGGCAAACCCAAGAAGTGCTTCAAAGAGGGAGTCTTTCATCGATCAACAAACC *****
Clon9A	ACAACGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCC
Clon59	ACAACGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCC
Clon6A	ACAACGTCCGACCGATCGGTGAGCAACTACAACGCAACGCCAAAACCCCGTAATACCC *****
Clon9A	CGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCC
Clon59	CGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCC
Clon6A	CGAATACCTGAGTCAGCATCGCTTCGTTAACGTGTGCCACAGAAATTAAGCGGGCCCC *****
Clon9A	GCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCC
Clon59	GCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCC
Clon6A	GCACTCAGTGGGGAACGGTGAGTGGGGGGTGC GGCTGGTGGATCCACCCAACCACCATCC *****
Clon9A	CCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCCTGGTGCCTCCAC
Clon59	CCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCCTGGTGCCTCCAC
Clon6A	CCCGGGCCATTCGTCATCGTCAGCTTCTATCAACCAACCGATTCCCCCTGGTGCCTCCAC *****
Clon9A	GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG
Clon59	GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG
Clon6A	GGTCTGTGTGGATGTGTGTACCCGGTGCGTGAGTGTGTTATCGGTGTGAATCCGTGCGTG *****
Clon9A	TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGAC
Clon59	TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGAC
Clon6A	TGAATCCGTTCCAAATTGCAGAAAGAGCGAGCGAAGAGAGATAGAGAGAAAGTAGGTGAC *****
Clon9A	AAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATA
Clon59	AAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATA
Clon6A	AAAAAAGGATGTAGAAGATATAGTTGTTATCACGTTGGTTCAGTTCAATCGCTAGCATA *****

```

Clon9A      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA
Clon59      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA
Clon6A      ATTCGAATGCCATAGTTTTTCCCCCTGGGGCGGCCAGAAAGGTGAAAATTAGGGAAGCA
*****

```

```

Clon9A      AATCTCCACCCCAAAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCC
Clon59      AATCTCCACCCCAAAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGC--
Clon6A      AATCTCCACCCCAAAACAACAACGACAAAAACGCATCAATCAAACCGAAACCGCCC
*****

```

```

Clon9A      CTATAGTGAGTCGTATTA
Clon59      -----
Clon6A      CTATAGTGAGTCGTATTA

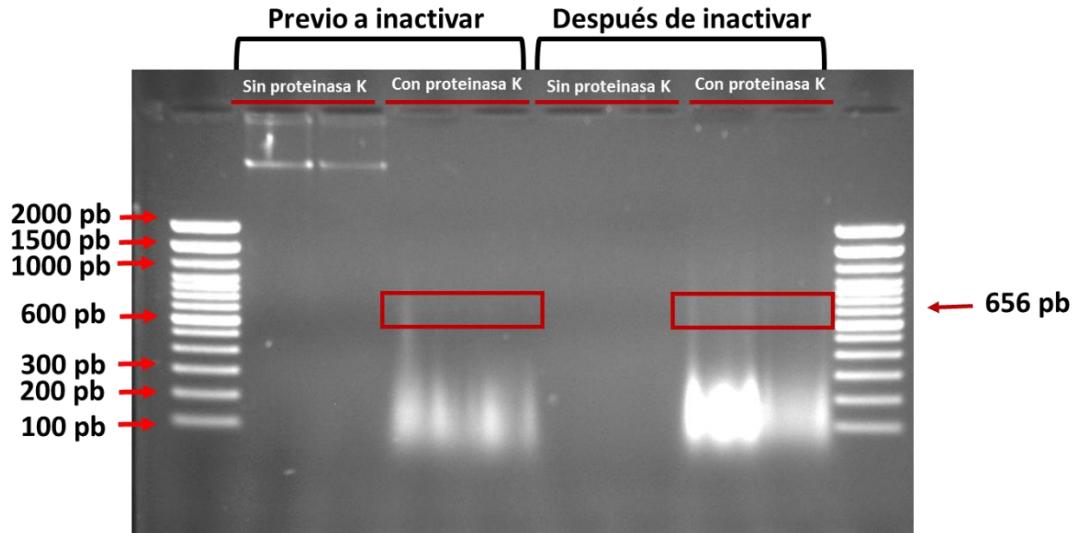
```

Debido a que el 9A cuenta con una mutación respecto a la secuencia original, se empleó el clon 6A para transformar las bacterias *E. coli* HT115 (DE3).

Anexo 13: Geles de integridad de ARNdh de la segunda réplica a diferentes intensidades de UV en el transiluminador

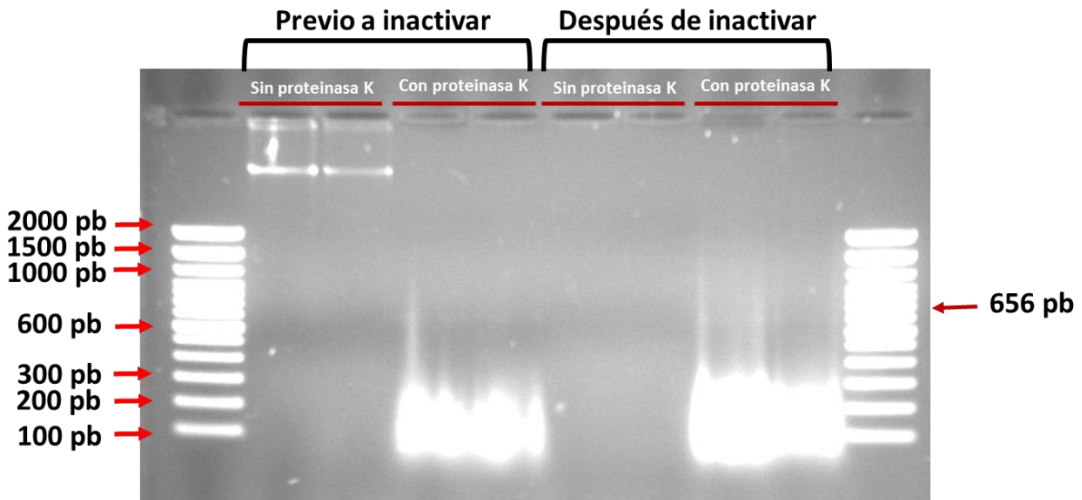
En ambos casos se cargaron 10  $\mu$ L de muestra y 5  $\mu$ L de escalera Track It 100 bp de Novagen.

Figura 32. Gel de integridad de ARNdh con menor intensidad de UV



Esta figura permite observar con claridad la intensidad de las bandas de la escalera. Es útil para poder realizar la comparación con la obtenida de ARNdh.

Figura 33. Gel de integridad de ARNdh con mayor intensidad de UV



Esta figura muestra las bandas de ARNdh de *dsx*. Sin embargo, no es posible observar la escalera porque su intensidad es demasiado elevada.

ANEXO 14: Análisis de la secuencia de *dsx* que se encuentra entre el exón 4 y 5

### Análisis clones con inserto Exón 4-Isoforma larga

#### -Cebadores utilizados

F: 5' TGAGTTACCCCTGGGAAATG 3'

R: 5' TGTGCGATCTGTTAGTAGCA 3'

#### -Cebador diseñado

AATCGACGAAGGTCAGGCC

#### -Secuencia amplificada

**TGAGTTACCCCTGGGAAATG**ATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGG  
ATGGCGATGTACAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCA  
ACGAATACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACG  
CCACCCGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGAGGGCAGGCAGGGT  
CTCAGGCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTGCGTCA  
GGCGTGTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGC  
GAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTT  
CGGCAATATT**TGTGCGATCTGTTAGTAGCA**

En negrita se muestra la secuencia correspondiente al exón 4. Sin negrita representa la secuencia del exón 5.

#### CLON 1

F

**TGAGTTACCCCTGGGAAATG**ATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGT  
GTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATT**TGTGCGATCTGTTAGTAGCA**

R

**TGAGTTACCCCTGGGAAATG**ATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
 GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
 TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
 CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
 GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGT  
 GTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
 GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTCGGCA  
 ATATT**TGTGCGATCTGTTAGTAGCA**

Alineamiento

```

F      TTTGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGG
R      -TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGG
      *****

F      CGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTC
R      CGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTC
      *****

F      ACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAG
R      ACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAG
      *****

F      CGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCC
R      CGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCC
      *****

F      TGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGT
R      TGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGT
      *****

F      TGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTT
R      TGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTT
      *****

F      AGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTA
R      AGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTA
      *****

F      GCA-
R      GCAA
  
```

**CLON 2**

**F**

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGT  
GTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

**R**

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGT  
GTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

**Alineamiento**

F TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG  
R TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG  
\*\*\*\*\*

F ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
R ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
\*\*\*\*\*

F GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
R GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
\*\*\*\*\*

F GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG  
R GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG  
\*\*\*\*\*

F CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTG  
R CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTG  
\*\*\*\*\*

F TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
 R TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
 \*\*\*\*\*

F GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
 R GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
 \*\*\*\*\*

F A  
 R A  
 \*

**Alineamiento con la secuencia amplificada**

SecAmplificada TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG  
 Clon2 TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG  
 Primer -----

SecAmplificada ATGTACAAAAAGCGCACCCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
 Clon2 ATGTACAAAAAGCGCACCCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
 Primer -----AATCGACGAAGGTCAGGCC-----  
 \*\*\*\*\*

SecAmplificada GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
 Clon2 GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
 Primer -----

SecAmplificada GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGAGGAGGCAGGCAGGGTCTCAGCGCATCCTGCCTG  
 Clon2 GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGAGGAGGCAGGCAGGGTCTCAGCGCATCCTGCCTG  
 Primer -----

SecAmplificada CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGGTTG  
 Clon2 CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGGTTG  
 Primer -----

SecAmplificada TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
 Clon2 TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
 Primer -----

SecAmplificada GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
 Clon2 GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
 Primer -----

SecAmplificada A  
 Clon2 A  
 Primer -

**CLON 3**

**F**

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCTGATG  
 GCGATGTACAAAAAGCGCACCCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
 TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
 CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT



GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGT  
GTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCNAATCGTTTTTCGGCN  
ATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

R

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCTGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGT  
GTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

**Alineamiento**

F	TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCTGATGGCG
R	TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCTGATGGCG *****
F	ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
R	ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC *****
F	GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
R	GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG *****
F	GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
R	GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG *****
F	CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
R	CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTG *****
F	TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
R	TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG *****
F	GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCNAATCGTTTTTCGGCNATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
R	GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC *****
F	A
R	A
	*

## Alineamiento con la secuencia amplificada

SecAmplificada	TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon2	TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCTGATGGCG
Primer	-----
SecAmplificada	ATGTACAAAAAGCGCACCCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon2	ATGTACAAAAAGCGCACCCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Primer	-----AATCGACGAAGGTCAGGCC----- *****
SecAmplificada	GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon2	GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Primer	-----
SecAmplificada	GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGGCGCATCCTGCCTG
Clon2	GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGGCGCATCCTGCCTG
Primer	-----
SecAmplificada	CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
Clon2	CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
Primer	-----
SecAmplificada	TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Clon2	TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Primer	-----
SecAmplificada	GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Clon2	GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Primer	-----
SecAmplificada	A
Clon2	A
Primer	-

## CLON 4

### F

**TGAGTTACCCCTGGGAAATG**ATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
 GCGATGTACAAAAAGCGCACCCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
 TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACC  
 CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
 GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCCGT  
 GTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
 GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
 ATATT**TGTGCGATCTGTTAGTAGCA**

## R

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATCGCACAATCTGAACACGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGT  
GTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

### Alineamiento

```
F      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
R      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
*****

F      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
R      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
*****

F      GATGTCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
R      GATGTCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
***  *****

F      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
R      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
*****

F      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
R      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
*****

F      TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
R      TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
*****

F      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
R      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
*****

F      A
R      A
      *
```

### Alineamiento con secuencia amplificada

```
SecAmplificada  TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon4F          TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon4R          TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Primer          -----
```

SecAmplificada ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
 Clon4F ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
 Clon4R ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
 Primer -----AATCGACGAAGGTCAGGCC-----  
 \*\*\*\*\*

SecAmplificada GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
 Clon4F GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
 Clon4R GATCGCACAATCTGAACAAGTTTCGATGGCGTAGAGCTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
 Primer -----

SecAmplificada GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGCGCATCCTGCCTG  
 Clon4F GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGCGCATCCTGCCTG  
 Clon4R GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGCGCATCCTGCCTG  
 Primer -----

SecAmplificada CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG  
 Clon4F CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG  
 Clon4R CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG  
 Primer -----

SecAmplificada TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
 Clon4F TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
 Clon4R TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
 Primer -----

SecAmplificada GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
 Clon4F GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
 Clon4R GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
 Primer -----

SecAmplificada A  
 Clon4F A  
 Clon4R A  
 Primer -

## CLON 5

### F

**TGAGTTACCCCTGGGAAATG**ATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
 GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
 TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCC  
 GGCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATG  
 CGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCCGTG  
 TATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCG  
 CGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAA  
**TATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA**

## R

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCC  
GGCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATG  
CGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTG  
TATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCG  
CGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAA  
TATTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

### Alineamiento

```
F      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
R      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
*****

F      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
R      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
*****

F      GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGGCAGAGCGG
R      GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGGCAGAGCGG
*****

F      ATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTGC
R      ATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTGC
*****

F      CTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCCGTGTATGTGTGTGGTTGT
R      CTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCCGTGTATGTGTGTGGTTGT
*****

F      GCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGG
R      GCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAGG
*****

F      GACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA
R      GACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA
*****
```

### Alineamiento con secuencia amplificada

```
SecAmplificada  TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon5           TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Primer          -----

SecAmplificada  ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon5           ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Primer          -----AATCGACGAAGGTCAGGCC-----
*****
```

SecAmplificada Clon5 Primer	GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGCGGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGCGGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG -----
SecAmplificada Clon5 Primer	GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGGCGCATCCTGCCTG GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG -----
SecAmplificada Clon5 Primer	CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG -----
SecAmplificada Clon5 Primer	TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG -----
SecAmplificada Clon5 Primer	GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC -----
SecAmplificada Clon5 Primer	A A -

Tiene 5 mismatches.

## CLON 6

La secuencia sentido no puede ser analizada por exceso de ruido.

## CLON 7

**F**

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGGTGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGT  
GTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

**R**

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA

TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTCCGGTGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
 CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
 GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGT  
 GTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
 GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCANNATCGTTTTCNCGN  
 ATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

**Alineamiento**

```

F      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
R      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
*****

F      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
R      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
*****

F      GATTGCACAATCTGAACATGTTCCGGTGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
R      GATTGCACAATCTGAACATGTTCCGGTGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
*****

F      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
R      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
*****

F      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
R      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
*****

F      TCGTGACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
R      TCGTGACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
*****

F      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
R      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAAATCGTTTTTCGGC NATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
*****

F      A
R      A
      *
```

Después de analizar los cromatogramas, se corrigieron 3 de los cuatro mismatches.

**Alineamiento con secuencia amplificada**

```

SecAmplificada  TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon5           TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Primer         -----

SecAmplificada  ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon5           ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Primer         -----AATCGACGAAGGTCAGGCC-----
                  *****

SecAmplificada  GATTGCACAATCTGAACATGTTCCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon5           GATTGCACAATCTGAACATGTTCCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Primer         -----
```

SecAmplificada GATGATAAACTTCCGACCTG CCGGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCA GCGCATCCTGCCTG  
Clon5 GATGATAAACTTCCGACCTG GCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCA GCGCATCCTGCCTG  
Primer -----

SecAmplificada CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTG CAGTGCCTCAGGCCTGTATGTGTGTGGTTG  
Clon5 CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTG CAGTGCCTCAGGCCTGTATGTGTGTGGTTG  
Primer -----

SecAmplificada TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
Clon5 TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
Primer -----

SecAmplificada GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
Clon5 GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
Primer -----

SecAmplificada A  
Clon5 A  
Primer -

Hubo cinco mismatches.

## CLON 8

### F

TGAGTTACCCN GGGAAATGATGCCCCNGANGTACGTTCATNCNTAAGAGCGCGGAN  
GGCGANGTACAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGA  
ATACNCACGATNGCACAATCTGAACATGTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCAC  
CCGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCA  
TGCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCG  
TGTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAAT  
CGCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGC  
AATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

### R

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGT  
GTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAATC



GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCGAATCGTTTTCGGCG  
NATATTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

**Alineamiento**

```
F      TGAGTTACCCN GGGAAATGATGCCCCN GAN GTACGTCATNCNTAAGAGCGCGGANGGCG
R      TGAGTTACCCTGGGAAATGATGCCCCGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
      *****  *****  *  *****  *  *****  *****

F      ANGTACAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACNCAC
R      ATGTACAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
      *  *****  *****  *****  *****

F      GATNGCACAACTCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
R      GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
      ***  *****

F      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
R      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
      *****

F      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
R      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
      *****

F      TCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
R      TCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
      *****

F      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA-ATATTGTGCGATCTGTTAGTAG
R      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCGAATCGTTTTTCGGCGNATATTGTGCGATCTGTTAGTAG
      *****

F      CA
R      CA
      **
```

**CLON 9**

**F**

TGAGTTACCCTGGGAAATGATGCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGCCAGGCCGT  
GTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTGAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

## R

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCAGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGCCAGGCGT  
GTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTGAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

### Alineamiento

```
F      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
R      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
*****

F      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
R      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
*****

F      GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
R      GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
*****

F      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
R      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
*****

F      CCTGCGTGCAGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGCCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
R      CCTGCGTGCAGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGCCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
*****

F      TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
R      TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
*****

F      GGACTGAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
R      GGACTGAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
*****

F      A
R      A
      *
```

### Alineamiento con secuencia amplificada

```
SecAmplificada  TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon9           TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Primer          -----
```

SecAmplificada ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
Clon9 ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC  
Primer -----AATCGACGAAGGTCAGGCC-----  
\*\*\*\*\*

SecAmplificada GATTGCACAATCTGAACATGTTCCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
Clon9 GATTGCACAATCTGAACATGTTCCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG  
Primer -----

SecAmplificada GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGCGCATCCTGCCTG  
Clon9 GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAGCGCATCCTGCCTG  
Primer -----

SecAmplificada CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGGTTG  
Clon9 CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGCAGTGCCTCAGGCCGTGTATGTGTGTGGTTG  
Primer -----

SecAmplificada TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
Clon9 TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG  
Primer -----

SecAmplificada GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
Clon9 GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC  
Primer -----

SecAmplificada A  
Clon9 A  
Primer -

Tiene cinco mismatches.

**CLON 10**

**F**

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA  
TACTCACGATTGCACAATCTGAACATATTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCCG  
GTATGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAATC  
GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
ATATTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

**R**

TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATG  
GCGATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAA

TACTCACGATTGCACAATCTGAACATATTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACC  
 CGCCAGAGCGGATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCAT  
 GCGCATCCTGCCTGCCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGT  
 GTATGTGTGTGTGGTTGTGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATC  
 GCGATAGGAAAGGGCGTTAGGGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCA  
 ATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGCA

**Alineamiento**

```

F      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
R      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
      *****

F      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
R      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
      *****

F      GATTGCACAATCTGAACATATTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
R      GATTGCACAATCTGAACATATTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
      *****

F      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
R      GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCCTGCCTG
      *****

F      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
R      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCGTCAGGCGTGTATGTGTGTGTGGTTG
      *****

F      TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
R      TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
      *****

F      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
R      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
      *****

F      A
R      A
  
```

**Alineamiento con secuencia**

```

SecAmplificada   TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon10           TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Primer          -----

SecAmplificada   ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon10           ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Primer          -----AATCGACGAAGTCAGGCC-----
                  *****

SecAmplificada   GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon10           GATTGCACAATCTGAACATATTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Primer          -----
  
```

```

SecAmplificada      GATGATAAACTTCCGACCTG CCGGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCA GCGCATCCTGCCTG
Clon10              GATGATAAACTTCCGACCTG GCGGAAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCA GCGCATCCTGCCTG
Primer              -----

SecAmplificada      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTG CAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
Clon10              CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTG CAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
Primer              -----

SecAmplificada      TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Clon10              TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGCAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Primer              -----

SecAmplificada      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTCCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Clon10              GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTCCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Primer              -----

SecAmplificada      A
Clon10              A
Primer              -

```

Tiene cinco mismatches

## CLON 11

No pudo analizarse la secuencia por exceso de ruido en ambas hebras

## ALINEAMIENTO DE LOS CLONES CON LA SECUENCIA DE VECTOR BASE

Se seleccionaron los clones con ambas hebras con secuencias iguales, el resto no se tomó en cuenta para este análisis. El cebador diseñado se resalta en amarillo:

Clones: 1, 2, 3, 5, 9, 10

```

SecAmplificada      TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
PrimerExones       -----
Clon9              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon5              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon2              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon3              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon10             TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
Clon1              TGAGTTACCCCTGGGAAATGATGCCCTGATGTACGTCATACTTAAGAGCGCGGATGGCG
*****

SecAmplificada      ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
PrimerExones       -----
Clon9              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon5              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon2              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon3              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon10             ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
Clon1              ATGTACAAAAAGCGCACCAGCGAATCGACGAAGGTCAGGCCGTGGTCAACGAATACTCAC
*****

```

```

SecAmplificada      GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
PrimerExones      -----
Clon9              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon5              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon2              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon3              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon10             GATTGCACAATCTGAACATATTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
Clon1              GATTGCACAATCTGAACATGTTTCGATGGCGTAGAGTTGCGCAACGCCACCCGCCAGAGCG
*****

SecAmplificada      GATGATAAACTTCCGACCTGCCGGGAGGAGGCAGGCAGGGTCTCAGCGCATCTGCCTG
PrimerExones      -----
Clon9              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon5              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon2              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon3              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon10             GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
Clon1              GATGATAAACTTCCGACCTGGCGGAGGAGGGCAGGCAGGGTCTCATGCGCATCTGCCTG
*****

SecAmplificada      CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
Clon9              CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
Clon5              CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
Clon2              CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
Clon3              CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
Clon10             CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
Clon1              CCTGCGTGCGGTGTCCAAAGTGTGGTTGTAGTGCCTCAGGCGTGTATGTGTGTGGTTG
*****

SecAmplificada      TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Clon9              TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Clon5              TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Clon2              TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Clon3              TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Clon10             TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
Clon1              TGCGTGTACTAGTAGCGGGAGTAACGATTTAGCGGAATCGCGATAGGAAAGGGCGTTAG
*****

SecAmplificada      GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Clon9              GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Clon5              GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Clon2              GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Clon3              GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Clon10             GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
Clon1              GGACTAAGGCTTAGAAGAAGCAAATCGTTTTTCGGCAATATTTGTGCGATCTGTTAGTAGC
*****

SecAmplificada      A
Clon9              A
Clon5              A
Clon2              A
Clon3              A
Clon10             A
Clon1              A
*
```

Existieron varios errores entre los diferentes clones. Sin embargo, la secuencia del cebador diseñado alinea perfectamente con la secuencia reportada y las amplificadas.