

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

PATRONES DE RESTRICCIÓN *IN SILICO* PARA EL ESTUDIO DEL GEN *pds* EN UNA MICROALGA CHLOROPHYTA.

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO MARINO

AUTOR: BRYAN JOSÉ PILLACELA ZHUNIO

TUTOR: Blga. JANETH GALARZA TIPÁN Ph.D.

La Libertad – Ecuador 2018

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA

PATRONES DE RESTRICCIÓN *IN SILICO* PARA EL ESTUDIO DEL GEN *pds* EN UNA MICROALGA CHLOROPHYTA (015)

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención de título de

BIÓLOGO MARINO

AUTOR: BRYAN JOSÉ PILLACELA ZHUNIO

TUTOR: Blga. GANETH GALARZA TIPÁN Ph.D.

La Libertad – Ecuador 2018

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por las ideas, hechos, investigaciones y resultados expuestos en este trabajo de titulación, pertenecen exclusivamente al autor, el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

6 all

Bryan José Pillacela Zhunio C.I.: 1400855530

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su constante e incondicional apoyo durante toda mi trayectoria académica.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

tall there

Blga. Mayra Cuenca Zambrano, Mgt. Decana (e) Facultad de Ciencias del Mar

Blga. Erika Salavarría Palma, Ph.D. Docente de área

Blga. Tanya González Banchón, Mgt. Directora (e) Carrera de Biología Marina

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D. Docente Tutora

Abg. Víctor Coronel Ortiz, Mgt.

Secretario General (e)

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, a los directivos de la carrera y a los docentes que me guiaron.

A la Ing. Carolina Tifiño M. Sc. por su apoyo y asesoramiento en el laboratorio de Biotecnología.

A todos los integrantes del proyecto a través del cual fue posible el desarrollo de este trabajo de investigación.

Patrones de restricción *in silico* para el estudio del gen *pds* en una microalga chlorophyta

Bryan José Pillacela^{1*}, Janeth Galarza¹ ¹Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Estatal Península de Santa Elena. La Libertad – Ecuador. ^{1*}bryanjjose@hotmail.com – ¹jgalarza@upse.edu.ec

Resumen

El uso de herramientas bioinformáticas abarca estudios moleculares que involucra genes de interés tanto biotecnológico como económico. En este trabajo se utilizó el programa bioinformático NEBcutter 2.0 para obtener el mapa de restricción modelado in silico del gen Fitoeno Desaturasa (pds) a partir de una secuencia previamente descrita y accesible en el GenBank (X86783.1), para predecir el tamaño de los fragmentos revelados por las enzimas que escinden la secuencia, a través de la selección de enzimas de restricción que produzcan fragmentos de aproximadamente 1500 pb. Para escindir el ADN genómico de la microalga chlorophyta 015, se usó la mezcla de las enzimas RsaI + EcoRI, PstI + EcoRI y PstI + XhoI, indicando que los patrones generados *in silico* para el gen *pds*, pueden ser reproducidos y comprobados adecuadamente de forma experimental en el laboratorio. Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa para asegurar la presencia del gen pds, revelando un fragmento de aproximadamente 1000 pb. Se obtuvo el mapa de restricción in silico del gen a través del programa NEBcutter 2.0 y el producto amplificado fue digerido con las enzimas RsaI y DraI corroborando los patrones de restricción generando un patrón claramente distinguible a partir de los amplicones. Los programas bioinformáticos son herramientas muy versátiles y didácticas que efectivamente, permitieron predecir los mapas de restricción para el gen *pds*, previo a su obtención en el laboratorio.

Palabras claves: Chlorophyta, patrón de restricción, Fitoeno Desaturasa, enzimas de restricción.

Abstract

Bioinformatics tools includes molecular studies involving genes of both biotechnology and economic interest. In this work the bioinformatics NEBcutter 2.0 program was used to obtain the restriction map modeled in silico of Fitoeno Desaturasa (pds) gene from a previously described and accessible sequence in GenBank (X86783.1) to predict the size of fragments revealed by enzymes that cut the sequence through the selection of restriction enzymes that produce 1500 bp fragments approximately. The mix of enzymes RsaI + EcoRI, PstI + EcoRI y PstI +*XhoI* was used to cut the genomic DNA of the chlorophyta microalgae 015. Patterns generated in silico for the pds gene, can be reproduced and adequately tested experimentally in the laboratory. The polymerase chain reaction was performed to ensure the presence of the *pds* gene revealing a fragment of 1000 bp. approximately. In silico restriction map of the pds gene was obtained through the NEBcutter 2.0 program and the amplified product was digested with the enzymes RsaI and DraI corroborating the restriction patterns generating a clearly distinguishable pattern from the amplicons. The bioinformatic programs are very versatile and didactic tools that allowed to predict the restriction maps for the *pds* gene, previous to their obtaining in the laboratory.

Keywords: Chlorophyta, restriction pattern, Phytoene Desaturase, restriction enzymes.

Introducción

El gen que codifica a la enzima Fitoeno Desaturasa (*pds*) se encuentra localizado en el genoma nuclear de los vegetales y algas. Es considerado el gen clave, del paso de biosíntesis carotenoides incoloros a carotenoides coloreados (Guedes et al. 2011; Henríquez et al. 2016), con amplios estudios en microalgas productoras de carotenoides (Chacón-Lee y González-Mariño 2010; Gong y Bassi 2016), que tienen un potencial farmacéutico (Di Sanzo et al. 2018), industrial (Chacón-Lee y González-Mariño 2010), energético (Minhas et al. 2016) y alimenticio (Molino et al. 2018). La enzima Fitoeno Desaturasa (gen *pds*) junto con la enzima Fitoeno Sintasa (gen *psy*) son capaces de regular la biosíntesis de carotenoides en respuesta a diferentes estímulos ambientales, cuya expresión ha sido estudiada en diferentes microalgas verdes como *Dunaliella salina* (Srinivasan y Gothandam 2017), *Chlorella zofingiensis* (Huang et al. 2008; Liu et al. 2010), *Chlamydomonas reinhardtii* (Liu et al. 2013) y *Haematococcus pluvialis* (Henríquez et al. 2016; Butler et al. 2017; Galarza et al. 2018).

Con el auge de la biotecnología, el gen *pds* ha sido fuertemente estudiado a nivel molecular, empleando métodos y técnicas modernas basadas en estudios bioinformáticos de secuencias de interés (Srinivasan y Gothandam 2017; Kathiresan et al. 2015; Galarza et al. 2018). Por lo tanto, los programas bioinformáticos permiten desarrollar diseños in silico y están altamente caracterizados y estadísticamente evaluados para modelar un proceso o producto biológico (Huang et al. 2008). En ese sentido, NEBcutter 2.0 es un programa bioinformático en línea (http://nc2.neb.com/NEBcutter2/) que emplea enzimas disponibles en el NEB (New England Biolabs Inc.), que acepta secuencias de ADN y emite un informe completo de las enzimas de restricción que escindirán las secuencias en estudio. Además, ofrece una tabla completa de sitios de reconocimiento (www.neb.com/rebase) que se actualiza diariamente y marca todos los sitios que pueden verse afectados por la metilación del ADN (Vincze et al. 2003; Roberts et al. 2010). Otro de los programas ampliamente utilizado es BioEdit Sequence Alignment Editor, desarrollado con varias características, funciones y herramientas moleculares útiles para los biólogos moleculares, como varios modos de alineación manual, dibujo y anotación de plásmidos, mapeo de restricción, integración automática con otros programas como ClustalW y BLAST, entre otras (Hall, 1999; 2011).

Además, los mapas de restricción permiten obtener una proyección de las dianas que presenta una secuencia problema de ADN para distintas enzimas de restricción. De este modo, el investigador es capaz de determinar el número de cortes sobre la secuencia de nucleótidos, el tamaño y sus posiciones relativas sobre la secuencia de ADN en estudio (Chaney et al. 2016; Steinbrenner y Sandmann 2006; Olmos et al. 2000). Está descrito que las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas de ADN, llamadas sitios de restricción, y al encontrar su secuencia blanco, corta las dos cadenas de una molécula de ADN. Por lo general, el corte es sobre o cerca del sitio de restricción y ocurre en un patrón ordenado y predecible (Pingoud y Jeltsch, 2001). Entonces, los modelamientos o patrones de restricción predichos *in silico* son posteriormente corroborados en el laboratorio comparando los tamaños de los fragmentos separados en un gel de agarosa o poliacrilamida (Okada et al. 2000; Srinivasan y Gothandam 2017).

Teniendo en cuenta que los diseños *in sílico* de genes semisintéticos son modelos desarrollados en ordenadores que a la hora de realizar estudios a nivel molecular resultan ser herramientas bioinformáticas muy versátiles que permiten al investigador manipular numerosas variables en la secuencia de ADN y tomar decisiones concretas sobre el organismo en estudio (Cienfuegos et al. 2008; Li et al. 2013; Jiménez y Chaparro-Giraldo, 2016). Considerando la importancia de la aplicación bioinformática en estudios moleculares, este estudio se propone evaluar la efectividad de los diseños *in silico* a través del modelamiento de patrones de restricción para el gen *pds* de una microalga chlorophyta (código de colección 015).

Materiales y métodos

Selección de la secuencia en el GenBank

Con el número de acceso en el GenBank X86783.1, a través de la plataforma virtual PubMed (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (www.ncbi.nlm.nih.gov) se seleccionó la secuencia del gen *pds* reportado para una microalga chlorophyta con un tamaño superior a los 1000 pb.

Obtención del modelo in silico

La secuencia seleccionada fue descargada e ingresada en formato FASTA en el programa BioEdit para identificar todos los sitios de corte y seleccionar las enzimas que reconozcan dianas que revelen fragmentos >200 pb y <2000 pb, considerando la metodología de Liu et al. 2013. El modelamiento *in silico* de los patrones de restricción se obtuvo con 4 enzimas corriendo el programa Nebcutter 2.0. Este programa se encuentra línea y resulta ser más didáctico a la hora de manipular sus herramientas.

Condiciones de cultivo de la microalga

Dos cepas de microalgas chlorophytas (código de colección 009 y 015) fueron obtenidas del proyecto INCYT-PNF-2017M3112 y se cultivaron en condiciones de laboratorio para obtener biomasa.

El medio de cultivo utilizado para las dos cepas fue 250 mL de el Medio Basal Bold 3N (MBB 3N), recomendado por la UTEX (utex.org), que contiene 8,82 mM, NaNO₃; 0,17 mM CaCl $2 \cdot 2H_2O$; 0,3 mM, MgSO₄ · 7H₂O; 0,43 mM, K₂HPO₄; 1,29 mM, KH₂PO₄; 0.43 mM, NaCl. Se adicionó metales traza y vitaminas.

Las condiciones de cultivo se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 1 °C y con fotoperiodo 12/12 horas (luz/oscuridad), pH 7, aireación manual 2 veces al día durante 6 días, adaptando la metodología de Nagaraj et al. 2012. La biomasa fue obtenida por centrifugación del cultivo a 10000 rpm durante 8 minutos. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

Extracción de ADN

Se aplicó el método salino (NaCl), empleando la metodología de Aljanabi y Martinez 1997; Maddocks y Jenkins, 2017, con algunas modificaciones, considerando que a 50 mg de biomasa se adicionó 800 µL de buffer lisis (TRIS, 0,05M; Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) al 10%; EDTA, 0,1M) y 60 mL de NaCl, 5M. Se incubó en baño maría a 60°C y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Al sobrenadante se adicionó etanol al 95% frío y se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm. El lavado se realizó con etanol al 70% frío, se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad (12000 rpm). Las muestras de ADN fueron resuspendidas en agua ultrapura (INVOTROGEN) y conservadas a -20°C hasta su posterior análisis. La cuantificación y pureza del ADN fue medida en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) (Broquet, 2007) y la integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Digestión con enzimas de restricción

A partir de las enzimas seleccionadas del modelamiento *in silico* del programa NEBcutter 2.0, se preparó la mezcla de las enzimas con un volumen final de 50 μ L, siguiendo las especificaciones de cada enzima dadas por el fabricante Thermo Fisher Scientific Inc,

USA, y considerando que 1U de enzima corta 1 µg de ADN en 1 hora. La mezcla de enzimas para la digestión fue la siguiente: A: *RsaI* (10U/µL) + *EcoRI* (15U/µL), B: *PstI* (10U/µL) + *EcoRI* (15U/µL) y C: *PstI* (10U/µL) + *XhoI* (10U/µL). Cada digestión se preparó en base a la concentración del ADN genómico y fueron incubados a 37°C por 4 horas, finalmente los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 1%.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para asegurar la presencia del gen Fitoeno Desaturasa en la secuencia del ADN genómico de la cepa 015, se amplificó el gen *pds* a través de la reacción en cadena de la polimerasa PCR, utilizando el juego de partidores TH219/TH266 (5'-GTTGTCGACATGCGTGTTGTTATTGCTGGT-3'/5'-

GTTTTTACAACCACCAGCAATAGCACCTAC-3') y el portocolo descrito por Galarza et al. 2018.

La amplificación se realizó a partir de 1 µL de ADN genómico de la microalga 015 en un volumen total de 30 µL conteniendo 1,6 X PCR Rxn Buffer (10X PCR Rxn Buffer, INVITROGENTM), 0,2 mM dNTP's (100mM dNTP's Set, INVITROGENTM), 1,5 mM MgCl₂ (25 mM MgCl₂, INVITROGENTM), 0,2 µM partidores (10 µM), 0,72 U Platinum[®] Taq DNA Polymerase (5 U/µL, INVITROGENTM). El programa de PCR utilizado fue: (i) 1 Ciclo de 3 minutos a 95°C; (ii) 35 ciclos con los siguientes pasos: Denaturación, 30 segundos a 95°C; hibridación, 30 segundos a 60°C y extensión 1Kb/minuto a 72°C (iii) una elongación final de 5 minutos a 72°C y finalmente, (iv) conservación a 4°C. La PCR se realizó en un Termociclador T100TM Thermal Cycler (BIORAD). El producto amplificado fue separado en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 3 µL de SYBRTM Safe (INVITROGENTM), empleando el marcador de peso molecular de 1 kb (INVITROGENTM).

Resultados

Patrones de restricción modelados in silico

A partir de la secuencia del GenBank con acceso número X86783.1, se obtuvo el mapa de restricción *in silico* a través del software BIOEdit, el mapa reveló que el gen *pds* contiene 290 sitios de restricción para 90 enzimas que hacen cortes tanto cohesivos como de tipo romo (Figura 1). Los sitios de restricción fueron corroborados con el programa NEBcutter 2.0 en el que se modeló *in silico* los patrones de digestión al combinar las

siguientes enzimas: **A:** *RsaI* + *EcoRI*, **B**: *PstI* + *EcoRI*, **C**: *PstI* + *XhoI* (Figura 2), que reconocen dianas dentro de la secuencia problema (más no flanquean al gen *pds*) y que están previamente descritas por Liu et al. 2014 y Galarza et al. 2018. La mezcla de enzimas fue seleccionada de manera que revelen fragmentos de aproximandamente 1500 pb (Figura 3) que corresponderían al gen *pds* y que posteriormente fue corroborado en el labortorio mediante electroforesis.

| 1921 | ATCGTGAATTATACGCTCGTAACCCTCCAAA | AACTTTAC | TCGAGAAATTAAATT | GTCGTGTAG | GTCAAGCTATGG | CAAAT | 2000 |
|------|---------------------------------|-----------|-----------------|-------------|---------------|-------|------|
| 1921 | TAGCACTTAATATGCGAGCATTGGGAGGTTT | TTGAAATG | AGCTCTTTAATTTA | ACAGCACATC | CAGTTCGATACC | GTTTA | 2000 |
| | Hpy188III | MnlI | XhoI | | | | |
| 481 | CCATGTAGAGTTAATGAAGAAGTTTTTATTG | CTATGGCT. | AAGGCTTTAAATTT | TATTAATCCA | GATGATTTAAGT/ | ATGAC | 560 |
| 481 | GGTACATCTCAATTACTTCTTCAAAAATAAC | GATACCGA | TTCCGAAATTTAAAA | ATAATTAGGT(| CTACTAAATTCA | FACTG | 560 |
| | RsaI | MboII | Bpu10I | 1 | AseI | | |
| 2001 | GGTTTAGGAAAAGTAGATGAATTATTAGAAA | AAATTGGT | TTATTACCAGAATT | CAAACCTTTA | CCTAGTTGGAGT | CCAGA | 2080 |
| 2001 | CCAAATCCTTTTCATCTACTTAATAATCTTT | TTTAACCA | AATAATGGTCTTAAG | GTTTGGAAAT | GGATCAACCTCA | GGTCT | 2080 |
| | | TspDTI | ECORI | | SfaNI | Hpy18 | 8111 |
| 401 | CAGCTATTATTTTTGGTCAACGTTACTGTG | AGAACAAG | ATGAATTAACAGTT | ACTGAATGGA | CTGCAGTACAAG | GTGTA | 480 |
| 401 | GTCGATAATAAAAACCAGTTGCAATGACACT | TCTTGTTC | TACTTAATTGTCAA | TGACTTACCT | GACGTCTTGTTC | CACAT | 480 |
| | HincII | | MboII | SfaNI | PstI | Hpy8I | |
| | | | | | | | |

Figura 1: Mapa de restricción modelado *in silico* a través del programa bioinformático BioEdit Sequence Alignment Editor. El detalle del mapa de restricción del gen *pds*, observar anexo 2.



Figura 2: Mapa de restricción lineal *in silico* de la secuencia de la microalga 015 representando las enzimas seleccionadas obtenidas en el programa NEBcutter 2.0.

A: La mezcla de las enzimas *RsaI* (cortó en el nucleótido 485) y EcoRI (cortó en el nucleótido 2052) indicó un fragmento de 1567 pb. Que se ilustra en el gel de agarosa *in silico* de la Figura 2 A.

En el caso particular de *RsaI*, reconoció 3 dianas en total, pero los extremos resultantes son de tamaños muy pequeños, por lo que inferimos que no se trata del gen esperado.

B: PstI (466) y EcoRI (2052) cada una de estas enzimas reconoció una diana, como resultado indica un fragmento de 1586 pb (Figura 2 B). Los extremos resultantes de la secuencia digerida también fueron de tamaños pequeños, inferiores a los 900 pb.

C: PstI (466) y XhoI (1959) indicó un fragmento de 1493 pb. corroborado en el gel de la Fig. 2 C.



Figura 3: Representación de patrones de restricción de los geles de agarosa *in silico*. Se escogió el gel al 1% y marcador de peso molecular (M) de 1kb.

Los geles marcan únicamente los fragmentos mayores a los 1000 pb. con cada mezcla de enzimas, omitiendo los fragmentos menores a los 900 pb o extremos dejados por los sitios de corte reconocidos.

A: *RsaI* + *EcoRI*, 1567 pb. B: *PstI* + *EcoRI*, 1586 pb. C: *PstI* + *XhoI*, 1493 pb.

ADN genómico de la microalga chlorophyta 015

La cepa 015 se adaptó mejor a las condiciones de cultivo por lo tanto fue seleccionada para este trabajo.

El ADN genómico tuvo una concentración de 154,2 ng/ μ L y una pureza (Abs260/Abs280) de 1,92. Mientras que la integridad fue evidenciada en un gel de agarosa al 1% (Figura 4).



Figura 4: ADN genómico de 015. en todos los carriles.

A partir del ADN genómico se procedió a hacer la digestión con las enzimas de restricción escogidas en el programa bioinformático NEBcutter 2.0 para confirmar y comparar los patrones de restricción del gen *pds*.

Confirmación de los patrones de restricción en el laboratorio



Figura 5: Confirmación de los patrones bioinformáticos producidos por las enzimas escogidas en el software NEBcutter 2.0. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBRTM Safe (INVITROGENTM) y marcador de peso molecular (M) de 1kb.

A: carril 1; RsaI + EcoRI, en este caso, esta mezcla de enzimas produjo un fragmento de 1567 pb. aproximadamente. 2; ADN no digerido con enzimas de restricción.

B: 1; *PstI* + *EcoRI* produjo un fragmento de 1586 pb. aproximadamente. 2; ADN no digerido con enzimas de restricción.

C: 1; PstI + XhoI reveló un fragmento de 1493 pb. aproximadamente. 2; ADN no digerido con enzimas de restricción.

Amplificación del gen Fitoeno Desaturasa (pds)

Al utilizar el ADN genómico de la microalga, no se podía asegurar que los patrones de restricción obtenidos correspondían al gen *pds*. Por tanto, se llevó a cabo la amplificación por PCR, resultando un fragmento de 1500 pb aproximadamente, que corresponde al gen *pds* (Figura 6).



Figura 6: Amplificación del gen *pds* con el juego de partidores TH219/TH266 a partir de 1 μ L de ADN genómico de la microalga 015. Marcador de peso (M) 1 kb (INVITROGENTM).

Carriles, del 1 al 5 muestran los amplicones del gen *pds* con un tamaño superior a los 1000 pb.

Patrones de restricción del producto amplificado

El modelamiento *in silico* del patrón de restricción del gen *pds* previamente descrita por Galarza et al. 2018 se realizó a través del programa NEBcutter 2.0. En este caso se seleccionaron las enzimas *RsaI* y *DraI* que reconocen dianas específicas dentro de la secuencia de este gen, para predecir los tamaños de los fragmentos de la secuencia digerida (Figura 7).



Figura 7: Patrones de restricción *in silico* producidos por las enzimas *RsaI* y *DraI*. Gel de agarosa al 1% y marcador de peso (M) 1 kb (INVITROGENTM).

Los fragmentos producidos por la enzima *RsaI* fueron: uno de 483 pb. seguido por uno de 312 pb, los mismos que fueron comprobados y claramente visibles en el gel de agarosa (Figura 8 carril 1). La digestión con la enzima *DraI* reveló dos fragmentos visibles, uno de 691 pb. seguido por uno de 413 pb. (Figura 8 carril 2). En ninguno de los casos fue posible evidenciar los fragmentos de los extremos de la secuencia debido al bajo peso molecular (inferiores a 200 pb.).



Figura 8: Confirmación de los patrones de restricción en gel de agarosa al 1%. Marcador de peso (M) de 1 kb (INVITROGENTM).

Los amplicones fueron digeridos con las enzimas de restricción *RsaI* y *DraI*, confirmando el tamaño de los fragmentos visibles predichos *in silico* por el software NEBcutter 2.0. 1: fragmentos producidos por el corte de la enzima *RsaI*, de 483 pb. y 312 pb. respectivamente. 2: en el caso de los cortes realizados por la enzima *DraI*, se observaron fragmentos de 691 pb. y 413 pb respectivamente. 3: amplicón no digerido, empleado como control.

En esta electroforesis se comprobaron los tamaños de los fragmentos producidos por las enzimas *RsaI* y *DraI* sobre los amplicones de la PCR del gen Fitoeno desaturasa, confirmando los patrones de restricción predichos *in silico* en el programa bioinformático NEBcutter 2.0, como se observa en la figura 7.

Discusión

El programa NEBcutter 2.0, descrito por Vincze et al. 2003, es capaz de revelar las dianas de restricción y los tamaños de los fragmentos producidos por las enzimas escogidas para digerir una secuencia de interés. En nuestro caso las enzimas escogidas fueron *EcoRI*, *RsaI*, *PstI*, *XhoI*, *DraI* y *RsaI*, indistintamente del tipo de diana de restricción y la metilación del ADN que pudiera afectar al corte de las enzimas, tal como lo sugiere Vincze et al. 2003 y Roberts et al. 2010.

En este estudio se confirma la importancia del uso de un programa bioinformático para la obtención de mapas de restricción in silico de una secuencia problema previamente descrita o identificada con un número de acceso en el GenBank, con el fin de anticipar los resultados previo a su síntesis en el laboratorio y evitar la pérdida de material que con las técnicas moleculares convencionales o clásicas los procesos resultarían más costosos (Jiménez y Chaparro-Giraldo, 2016). Los tipos de mapas revelados por el programa NEBcutter 2.0 presentan los tamaños observables en el gel de agarosa además de los fragmentos denominados terminaciones o extremos que resultan en su gran mayoría de poco interés dentro de los estudios, ya que son los extremos sobrantes dejados por el corte de las enzimas, esto ha sido previamente descrito por Cienfuegos et al, 2008, en donde todos los mapas de restricción modelados *in silico* son superpuestos omitiendo dichos extremos para poder producir un patrón fácilmente distinguible para cada enzima utilizada que detalla el tamaño aproximado del fragmento de la secuencia conocida y previamente descrita en la literatura (Cagney et al, 2003; Olmos et al, 2000). Entonces, en este trabajo únicamente se consideraron los fragmentos con un tamaño de 1500 pb aproximadamente, según la descripción de las secuencias del gen pds realizadas por Liu et al. 2014 y Galarza et al. 2018, en donde identifican a este gen con un tamaño aproximado de 1500 pb.

Para el trabajo experimental se utilizó el ADN genómico de la microalga 015, tal como describe Herrera, 2011 que para el aislamiento, clonación y estudio *in silico* es importante trabajar con un gen específico, en nuestro caso el gen *pds*, y posterior la digestión con enzimas en donde fue posible observar los patrones de restricción obtenidos con la mezcla de las enzimas *RsaI* + *EcoRI*, *PstI* + *EcoRI* y *PstI* + *XhoI*, en un volumen final de 50 μ L, que es el volumen final adecuado para la mezcla de reacción tal como reporta Brown, 2016, en donde también se considera la compatibilidad de las enzimas para digerir ADN

genómico, dada por los buffers que garantizan la actividad máxima de la enzima (Pingoud y Jeltsch, 2001). En el presente estudio se emplearon los buffers que garantizan una actividad enzimática superior de 50% hasta el 100%, tal como sugiere Gibson et al, 2009 y como resultado, fue posible reproducir y comprobar adecuadamente de forma experimental los patrones generados *in silico* para el gen *pds*, generando fragmentos claramente distinguibles en el gel de agarosa, similar a lo reportado por Jiménez y Chaparro-Giraldo, 2016 y por Cienfuegos et al, 2008.

De igual forma, los patrones *in silico* obtenidos con las enzimas *DraI* y *RsaI* en secuencias del *gen pds* fueron confirmados experimentalmente en el laboratorio a partir de los productos amplificados por PCR usando primers específicos previamente descritos por Galarza et al. 2018, en donde dichas enzimas reconocen varias dianas de restrición que no flanquean a *pds*, en su lugar cortan a lo largo de la secuencia evidenciando extremos de muy bajo peso molecular. Sin embargo, generan un patrón claramente distinguible en los amplicones que fueron digeridos con *DraI* y *RsaI*. Este patrón de digestión comprobado en el laboratorio asegura que el producto amplificado por PCR se trata efectivamente del gen *pds*.

Los programas bioinformáticos de la biología sintética ayudan a diseñar, probar o identificar un constructo *in silico*, permitiendo localizar, insertar o eliminar dianas de restricción para predecir los resultados en el laboratorio y luego comprobar su síntesis (Li et al. 2013; Jiménez y Chaparro-Giraldo, 2016; Liu et al. 2013). Y gracias a las herramientas que nos ofrece la biología molecular sintética, fue posible modelar los mapas de restricción *in silico* del gen Fitoeno Desaturasa, demostrando ser de gran valor no solo como complemento de los experimentos convencionales, si no como herramientas eficases a la hora de desarrollar estudios de genética molecular en genes de interés biotecnológico y económico.

Conclusiones

El ADN genómico de la microalga 015 tuvo una concentración óptima para los análisis moleculares (154,2 ng/ μ L), indicando que el método salino (NaCl) es un procedimiento eficaz para la extracción de ADN genómico. Ademas, es un método rápido, simple y reproducible, que no requiere equipos o reactivos caros y peligrosos para el ambiente.

Los amplicones del gen *pds* digeridos con las enzimas *DraI* revelaron fragmentos de 483 pb y 312 pb y con la enzima *RsaI* fragmentos de 691 pb y 413 pb, confirmando el modelo *in silico* obtenido con el programa bioinformático.

El programa bioinformático NEBcutter 2.0 resulta ser una herramienta muy versátil y didáctica para el usuario al momento de emplear secuencias de ADN que requieran la identificación de las dianas de restricción para predecir resultados confiables previo a su obtención en el laboratorio.

Referencias

- Aljanabi, S. y Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*. 25(22), 4692– 4693.
- Broquet, T., Ménard, N. y Petit, E. (2007). Noninvasive population genetics: A review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conserv Genet.* 8, 249–260.
- Brown, T. (2016). Gene cloning and DNA analysis. An introduction. (7^{ma} ed.). John Wiley & Sons, Ltd. Reino Unido.
- Butler, T., McDougall, G., Campbell, R., Stanley, M., Day, J. (2017). Media Screening for Obtaining *Haematococcus pluvialis* Red Motile Macrozooids Rich in Astaxanthin and Fatty Acids. Biology. 7(1), 2.
- Cagney, G., Amiri, S., Premawaradena, T., Lindo, M. y Emili, A. (2003). In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. *Proteome Science*. 1(1), 5.
- Chacón-Lee, T. y González-Mariño (2010). Microalgae for "Healthy" Foods— Possibilities and Challenges. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 9(6), 655–675.
- Chaney, L., Sharp, A., Evans, C. y Udall, J. (2016). Genome Mapping in Plant Comparative Genomics. *Trends in Plant Science*. 21(9), 770–780.
- Cienfuegos, A., Conn, J., Gomez, G. y Correa, M. (2008). Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de

mosquitos *Anopheles spp*. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Rev Biomed*. 19, 35–44.

- Di Sanzo, G., Mehariya, S., Martino, M., Larocca, V., Casella, P., Chianese, S., Musmarra, D., Balducchi, R. y Molino, A. (2018). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin, lutein, and fatty acids from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *Mar. Drugs. 16*(9), 334.
- Galarza, J., Gimpel, J., Rojas, V., Arredondo-Vegad, B. y Henríquez, V. (2018) Overaccumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* through chloroplast genetic engineering. *Algal Research*. 31, 291–297.
- Gibson, D., Young, L., Chuang R., Venter, J., Hutchison, C. y Smith, H. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. 6(5), 343–347.
- Gong, M. y Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*. 34(8), 1396–1412.
- Guedes, A., Amaro, H. y Malcata, F. (2011). Microalgae as Sources of Carotenoids. Mar. Drugs. 9(4), 625–644.
- Guillard, R. (2005). Purification Methods for Microalgae. En: R. Andersen, ed., Algal Culturing Techniques, Journal of Phycology 41. 1ra Ed. Elsevier Academic Press. China. pp.117–132.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95–98.
- Hall, T. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. Software review. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2(1), 60–61.
- Henríquez, V., Escobar, C., Galarza, J. y Gimpel, J. (2016). Carotenoids in microalgae.
 En: C. Satange, ed., *Carotenoids in Nature*, Subcellular Biochemestry 79.
 Springer International Publishing. Suiza. pp.219–237.
- Herrera, V. (2011). Aislamiento, clonación y estudio *in silico* de los genes accoxidasa, accsintasa, α expansina y endoglucanasa en guayaba (*PsidiumguajavaL*.).
 Memoria para la obtención de Maestría en Ciencias. Universidad Auntónoma de Aguascalientes. Aguascalientes–México.
- Huang, D., Sherman, B. y Lempicki, R. (2008). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*. 37(1), 1–13.

- Jiménez, J. y Chaparro-Giraldo, A. (2016). In silico design and functional assessment of semisynthetic genes that confer tolerance to phosphinothricin. Rev. Colomb. Biotecnol. XVIII (2).
- Kathiresan, S., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. y Sarada R. (2015). Regulation of astaxanthin and its intermediates through cloning and genetic transformation of βcarotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*. *Journal of biotechnology*, 196, 33-41.
- Li, X., Li, S., Lang, Z., Zhang., J., Zhu, L. y Huang, D. (2013). Chloroplast- targeted expression of the codon-optimized truncated cry1Ah gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant Cell Reports*, 32(8), 1299-1308.
- Liu, J., Gerken, H., Huang, J. y Chen, F. (2013) Engineering of an endogenous phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation and enhanced biosynthesis of carotenoids. *Process Biochemestry*. 48, 788–795.
- Liu, J., Sun, Z., Gerken, H., Huang, J., Jiang, Y. y Chen, F. (2014). Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: A modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 5069–5079.
- Liu, J., Zhong, Y., Sun, Z. y Huang, J. (2010). One amino acid substitution in phytoene desaturase makes *Chlorella* zofingiensis resistant to norflurazon and enhances the biosynthesis of astaxanthin. *Planta.* 232(1), 61–67.
- Maddocks, S. y Jenkins, R. (2017). Understanding PCR: A Practical Bench-Top Guide. Elsevier Academic Press. Reino Unido.
- Minhas, A., Hodgson, P., Barrow, C., Sashidhar, B. y Adholeya, A. (2016). The isolation and identification of new microalgal strains producing oil and carotenoid simultaneously with biofuel potential. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd. 211, 556-565.
- Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., Rimauro, J. y Musmarra, D. (2018). Microalgae Characterization for Consolidated and New Application in Human Food, Animal Feed and Nutraceuticals. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 15(11), 2436.
- Montes P., Memelli H., Ward C., Kim J., Mitchell J.S.B., Skiena S. (2010). Optimizing Restriction Site Placement for Synthetic Genomes. In: Amir A., Parida L. (eds)

Combinatorial Pattern Matching. CPM 2010. *Lecture Notes in Computer Science*, vol 6129. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Nagaraj, S., Arulmurugan, P., Rajaram, M., Sundararaj, R. y Rengasamy, R. (2012). Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. Phykos. 42(1), 59–71
- Okada, S., Devarenne, T. y Chappell, J. (2000) Molecular Characterization of Squalene Synthase from Green Microalga *Botrycoccus braunii*, Race B. *Archives of Biochemestry and Biophysics*. 373(2), 307–317.
- Olmos, J., Paniagua, J. y Contreras, R. (2000) Molecular identification of *Dunaliella sp.* utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiolology*. 30: 80–84.
- Pingoud, A. y Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*. 29(18), 3705–3727.
- Pulz, O. y Gross W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. Appl Microbiol Biotechnol. 65, 635–648.
- Roberts, R., Vincze, T., Posfai, J. y Macelis, D. (2010). REBASE-a database for DNA restriction and modification: Enzymes, genes and genomes. Nucleic Acids Research. 38: D298–D299.
- Rodríguez, E. (2016) Cultivo mixotrófico de la microalga *Coenochloris sp.* con fracción soluble de papa (*Solanum phureja* L) para la obtención de pigmentos (carotenoides). Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- Srinivasan, R., Babu, S. Gothandam, K. (2017). Accumulation of Phytoene, a colorless carotenoid by inhibition of phytoene desaturase (PDS) gene in *Dunaliella salina* V-101. *Bioresource Technology*. 242, 311–318.
- Steinbrenner, J. y Sandmann, G. (2006) Transformation of the Green Alga Haematococcus pluvialis with a Phytoene Desaturase for Accelerated Astaxanthin Biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology. 72(12), 7477–7484.
- Tocquin, P., Fratamico, A. y Franck, F., (2012). Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth. J Appl Phycol . Springer. 24, 365–373.
- Vincze, T., Posfai, J. y Roberts, R. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. *31*(13), 3688–3691.

ANEXOS

1. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la efectividad de los diseños *in silico* para estudios moleculares del gen *pds* en una microalga Chlorophyta.

Objetivos Específicos

Análisis bioinformático de las secuencias del gen pds para diseñar el mapa de restricción

Diseñar *in silico* el mapa de restricción del gen *pds* modelado a través del software Neb cutter 2.0.

Obtener ADN de alta calidad de una microalga Chlorophyta que asegure las pruebas en el laboratorio.

Obtener el mapa de restricción en el laboratorio y corroborarlo con el mapa de restricción *in silico*.

Hipótesis

Ho: Los modelamientos *in silico* no predicen resultados confiables de los análisis moleculares en el laboratorio.

H1: Los modelamientos *in silico* predicen resultados confiables de los análisis moleculares en el laboratorio.

2. MAPA DE RESTRICCIÓN OBTENIDA EN EL PROGRAMA BioEdit. SECUENCIA FITOENO DESATURASA (*pds*):

| 2954 } | oase pairs | | | | | | | |
|--------|--------------------|---------------------|--------------|-------------|--------------------|---|-----------|------|
| Trans | lations: none | | | | | | | |
| Restr | iction Enzyme | Map: | | | | | | |
| 1 | ATGCGTGTTGTTATTGC | TGGTGCAGGTT | FAGCTGGTTTAT | CAGCTGCTA | AATATTTAGCA | GATGCAGGTCATC | ATCCTGT | 80 |
| 1 | TACGCACAACAATAACO | ACCACGTCCAA | ATCGACCAAATA | GTCGACGAT | TTATAAATCGT | CTACGTCCAGTAG | TAGGACA | 80 |
| | BspM | 1I | MwoI | BsgI | SfaNI | FokI | BstF5 | 5 I |
| | | | HpyF10VI | MspA | 1I SspI | | | |
| | | | BbvI | PvuI | I Bs | pMI | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 81 | TGTTTTAGAAGGTCGTC | GATGTATTAGGT | GGTAAAGTAGCA | GCTTGGAAA | GATGAAGATGG | TGATTGGTATGAA | ACAGGTT | 160 |
| 81 | ACAAAATCTTCCAGCAC | TACATAATCCA | CCATTTCATCGI | CGAACCTTT | CTACTTCTACC | ACTAACCATACT1 | 'TGTCCAA | 160 |
| | Hpj | 7188III | | | BbvI | MboII | | |
| | | | | | | TspDTI | | |
| | | | | | | E | phI | |
| | | | | | | | | |
| 161 | | | | | | 3 3 C 3 0 C 0 0 0 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 | | 240 |
| 161 | | CCTNTCCCAAA | | | | TTCTACCAAATCG | | 240 |
| 101 | UDW ⁹ T | CGIAIGGGIIII | Sept | Dra | TATCCATAAG | upu199111 | IACCIII | 240 |
| | Teppur | | 22bī | DIA | Ţ | upyroorrr | | |
| | 135011 | | | | | 115 | YOI | |
| | | | | | | | | |
| 241 | GAACATAGTATGATTT | CGCTATGCCAG | ATGCTCCTGGTG | AATTTAGTC | GTTTTGATTTT | CCAGAGTTACCAG | CACCATG | 320 |
| 241 | CTTGTATCATACTAAAA | GCGATACGGTC | TACGAGGACCAC | TTAAATCAG | СААААСТАААА | GGTCTCAATGGTC | GTGGTAC | 320 |
| | | SfaNI | | ApoI | HphI | Hpy188III | B | saJI |
| | | | | 1 | * | * * | BtqI | |
| | | | | | | | Ncol | |
| | | | | | | | StyI | |
| | | | | | | | Bst | ΚI |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 321 | GAACGGTATTATTGCT | TTTTACGTAAT | ATCAAATGTTA | AGTTGGCCT | GAGAAAATTCG | TTTTCGTATTGGI | TTATTAC | 400 |
| 321 | CTTGCCATAATAACGAT | AAAATGCATTA | TTAGTTTACAAI | TCAACCGGA | CTCTTTTAAGC | AAAAGCATAACCA | AATAATG | 400 |
| | BslI | BsaAl | [| BseMII | Аро | I | | |
| | | SnaB | [| BspCNI | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 401 | CAGCTATTATTTTGGT | CAACGTTACTG | IGAAGAACAAGA | TGAATTAAC | AGTTACTGAAT | GGACTGCAGTACA | AGGTGTA | 480 |
| 401 | GTCGATAATAAAAACCA | GTTGCAATGAC | ACTTCTTGTTCI | ACTTAATTG | TCAATGACTTA | CCTGACGTCTTGI | TCCACAT | 480 |
| | | HincII | | MboII | SfaNI | PstI | Hpy8I | |
| | | Hpy8I | | | AlwN | I H | py8I | |
| | | AclI | | | Tsp | DTI | FokI | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 481 | CCATGTAGAGTTAATG | AGAAGTTTTTA | TTGCTATGGCTA | AGGCTTTAA | ATTTTATTAAT | CCAGATGATTTAA | GTATGAC | 560 |
| 481 | GGTACATCTCAATTACT | "I'C'I'I'CAAAAA'I'A | ACGATACCGAT | "ICCGAAATT" | I'AAAA'I'AA'I''I'A | GGTCTACTAAATI | CATACTG | 560 |
| | KSal | | MDOIL | Bbnini | D T | Asel | | |
| | | | TSDUTI | | ADOT | нБАтяятII | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 561 | ͲႺͲͲႺͲͲͲͲϪϪϹϪϹϹϪϤ | Ͳልልልሞልሮልሞሞሞ | יייסממממרשי | CATCCTACT | ΔΔΔΨĊĊĊͲͲͲ | ዋዋዋልርኔ ዋርርዋርርዋ | 0.0000000 | 640 |
| 561 | ACAACAAAATTGTCCT | ΑΤΤΤΑΤΩΤΑΔΑ | ATGTTCTTCTT | GTACCATCA | ттттассаза | AAATCTACCACCA | GGAGGAC | 640 |
| | | | | | | BseRI | BsiHKAI | - 10 |

Bsp1286I Hpy188III

| TIGCAAATACAGTTGGTTACCATCTAATAAAATTTGAGGCACCACCACTAAATTACAAATTGAGTGCACAATTGGTTAA Acli Hincii Drai Hphi Afliii Mnli Hpy8i BssSi BsaAi Fmli GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | 641 AACGTTTATGTCAACCAATGGTAGATTATTTTAAAGCTCGTGGTGGTGGTGATTTAATGTTTAACTCACGTGTTAAACAAATT 720 | 641 | AACGTTTATGT | CAACCAATGGTAGA | TTATTTTAAAGCTCGTGGT | GGTGATTTAATGTTTAACTCA | CGTGTTAAACAAATT | 720 |
|---|--|--------------|------------------------------------|--|--|---|--|----------------------|
| AclI HincII DraI HphI AfIII MnII Hpy8I BssSI BsaAI PmlI PmlI PmlI 21 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAACAGTGAGATGATTATATATA | 641 TTGCAAATACAGTTGGTTACCATCTAATAAAATTTCGAGCACCACCACCACTAAATTACAAATTGAGTGCACAATTTGTTTAA 720 | 641 | TTGCAAATACA | GTTGGTTACCATCI | AATAAAATTTCGAGCACCA | CCACTAAATTACAAATTGAGI | GCACAATTTGTTTAA | 720 |
| MII Hy8I BSSI BSAI Fml GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACGTGATTTATATATA | | | AclI | HincII | DraI | HphI | AflIII | |
| Pml I 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 22 GTTCTTAATGATGATAATATTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTACAATAAAAGTCG 800 Hph I 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCTTATTTCAAACAATTAAAATGGTCTTG 880 ATACGGACAACTATAATAATTTTTAATGCCAGGATCCATGGGCATCAATGGTAAATGTTTGTT | AclI HincII DraI HphI AflIII | | MnlI | Hpy8I | BssS | I | BsaAI | |
| 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI | | | | | | PmlI | |
| 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTAAATTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | | |
| 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | | |
| 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCGGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | | |
| 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | 721 | GTTCTTAATGA | TGATAAAAGTGTTA | AACATTTAGCTCTTACAAA | TGGTCAAACAGTTGAAGGTGA | TTTATATATTTCAGC | 800 |
| HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | Acli HincII Drai Hphi AflIII Mnli Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | 721 | CAAGAATTACT. | ACTATTTTCACAAI | TTGTAAATCGAGAATGTTT. | ACCAGTTTGTCAACTTCCACT | AAATATATAAAGTCG | 800 |
| 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | HphI | |
| 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | Acli HincII Drai HphI AflIII Mnli Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | | |
| 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | Acli HincII Drai Hphi AflIII Mnli Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | | |
| 01 TATGCCTGTTGATATTTAGGAAAATTTTAATGCCAGGTCCATGGGGATGGGGATGAAGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTTAAAATTACGGTCTAGGGTACCCGTAGTGGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | Acli HincII Drai Hphi Aflili Mnli Hpy8I BssSI BsaAI PmlI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTGGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACATATATAT | 0.01 | | | | | | 000 |
| ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGGAGAATGTTTACCAGTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI HphI HphI HphI | 801 | TATGCCTGTTG. | ATATTATGAAAATT | "TTAATGCCAGATCCATGGG | CATCAATGCCTTATTTCAAAC | CATTAAATGGTCTTG | 880 |
| TspDTI BstYI | Acli HincII Drai Hphi AfliIi Mnli Hpy8I BssSI BsaAI PmlI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGGAGAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | 801 | ATACGGACAAC | TATAATACTTTTAA | AATTACGGTCTAGGTACCC | GTAGTTACGGAATAAAGTTTG | JIIAAIIIIACCAGAAC | 880 |
| BstYI | Acli HincII Drai Hphi Afliii Mnli Hpy8I BssSI BsaAI Pmli Pmli Pmli 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGAAACATTTACGATGTTTACCAGTTGCAACTTCCACTTCCACTAAAAAGTCG 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGAAAATGGTCTAGGAATGGTTTGCAACTTCCACTTCCACTAAAAAGTCG 800 801 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCCAAACAATTAAAATGGTCTTG 880 801 ATACGGACAACTATAATATTTTTTTAAAGTTAGGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAAATTACCAGAAC 880 | | | ADOI | . AIWI BSau | I SIANI | | нрутеетт |
| | AclI HincII Drai HphI AflIII Mnli Hpy8I BssSI BsaAI Fmli Fmli Fmli 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACCAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | | | | rshnii | | | |
| Btal | Acli Hincii Drai Hphi Afliii Mnli Hpy8I BssSi BsaAi Fmli Fmli | | | | Btal | | | |
| Ncol | Acli HincII Drai HphI AflIII Mnli Hpy8I BssSI BsaAI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | | | | Ncol | | | |
| | AclI HincII Drai HphI AflIII Mnli Hpy8I BssSI BsaAI Fmli Fmli Fmli 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTATGATAATCGAAATTGTAAATGGTCAGAGGTGATTTATATATA | | | | StvI | | | |
| StvI | AclI HincII DraI HphI AfIIII MnII Hpy8I BssSI BsaAI 721 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCAGGTGAATTACCAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGGAGTTGACGTTGGCAACTTCCACTAAAGTGG 800 801 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTTAATGCCAGGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 801 ATACGGACAACTATAAAATTATGGGGCTTAGGGCATCCAATGCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAAATTTACCAGAAC 880 801 ATACGGACAACTATAAAATTACGGGTCTAGGGCATCCAATGCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188111 TspDTI BstYI BtgI NcoI StVI | | | | BstX | I | | |
| StyI BstXI | AclI HincII DraI HphI AfIIII MnII Hpy8I BssSI BsaAI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | | | | | | | |
| StyI BstXI | Acli Hincii Drai Hphi Afliii Mnli Hpy8I BssSi BsaAi 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAAGGTGATTTATATATA | | | | | | | |
| StyI BstXI | AclI HincII DraI HphI AfIIII MnII Hpy8I BssSI BsaAI FmII FmII FmII FmII 721 GTICTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTGGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTATCACAATTGTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCTGCAACTCCACTTCCACATATATAT | 881 | AAGGTGTTCCT | GTTATTAATATTCA | TATTTGGTTTGATCGTAAA | TTAACTACTGTTGATCATTTA | ATTATTTTCACGTTCA | 960 |
| StyI BstXI 31 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 | AclI HincII DraI HphI AfIIII MnII Hpy8I BsSSI BsAI FmII FmII 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTGGTAAATCGAGAAGGTGATCAATGCTCTGCACATGCAATATATAAAGTGG 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTGGCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAAAGGTCG 800 801 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 801 ATACGGACAACTATAAATATCTTTTAAATTACGGTCTAGGTACCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 801 ATACGGACAACTATAATATATCATTTTGGTTTGATCGTAGGTAATGCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 801 ATACGGACAACTATAATATATTTAATGCCGTAGGTCAGGTCACGTAGGTCAATGCCTTATTTCAAAATGGTCTTG 880 801 ATACGGACAACTATAATATATTTTAATGCCGTAGGTCAGGTCAGGTCACGTAGGTAAATGCGTAGGTTTATTTTTTTT | 881 | TTCCACAAGGA | CAATAATTATAAGT | ATAAACCAAACTAGCATTT. | ААТТGАТGАСААСТАGТАААТ | AATAAAAGTGCAAGT | 960 |
| StyI BstXI 31 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 31 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAATTAATT | AclI HincII DraI HphI AfIIII MnII Hpy8I BssSI BsaAI 721 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAAAGGTGAAACAGTTGAAGGTGAATTAATATATAT | | XmnI | TspDTI Ssp | I | BclI | HphI | Hpy8I |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTCACGTTCA 960 31 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCATTTAATTGATGACAACTAGTAAATAAA | Aclı Hıncılı Drai Hphi Aflılı Mnli Hpy8I BssSI BsaAı 721 GTTCTTAATGATGATAANAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTATGAAAAGTGTTAAACGTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAACTTCCAACTAATATATAT | | | AseI | | | | |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAATTAATT | Acli Hincii Drai Hphi Afilii Mnli Hpy8i BssSi BssAi Fmli Fmli 721 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGGATTTATATATA | | | | | | | |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCATTTAATTGATGACAACTAGTAAATAAA | Acli Hindli Drai Hphi Aflili Mnli Hpy8I BssSI BssAi 721 GTICTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTICTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGGCTCATACGAGATGTTACCAGTTGAACGTGCAACAGTTGAAATATATAAAGGTCG 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTGACACTTCCACTAAATATATAT | | | | | | | |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCATTTAATTGATGACAACTAGTAAATAAA | Acli Hincli Drai Hphi Aflili Mnli Hpy8i BsSI BsAi 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTGAAAATTTTGAAAATGGTCAAAGGGTCAATGGCTAAATGAGTGCAACAGTTGAAAGTGGTCTG 800 801 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGGTCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTG 880 801 ATACGGACAACTATAATATTTTAATGCCAGGTCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTG 880 801 ATACGGACAACTATAATATTTAAATGCGTCTAGGTACCCGTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTATACAGAAC 880 801 ATACGGACAACTATTATAATATTTTAATGGTTTGGTTGGT | 961 | CCACTTCTTTC | AGTTTATGCAGATA | TGTCAACAACATCAAAAGA | ATATCGTGATGATAAAAAGTC | CAATGTTAGAATTAGT | 1040 |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGGCATTTGATGAGAACTAGTAAATAAA | AclI HinCII Drai HpHI AfIIII MnII Hpy8I BaSSI BaAI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCCCAGGCCAAAGGTGAACGTTGGAAGGTGATTTATATATTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATATATGAAAATTTTAATGCCAGGATCCATGGGCATCAATGCCTTAGTTACAAATATATAAAGTGC 800 801 TATGCGCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGGTCCGATGGGCATCAATGCCTTATTCCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 801 TATGCGACAACTATATATGAAAATTTTAATGCCCAGGCCTAGGGCATCAATGCCTTATTTCCAAACAATATAAATGGTCTTG 880 801 AAcGGACAACTATATATGCTTTTAAAATTCGTTGGTTAGGCCCGTAGGTACCCGTAAGTAA | 961 | GGTGAAGAAAG | TCAAATACGTCTAI | ACAGTTGTTGTAGTTTTCT | TATAGCACTACTATTTTTCAG | JTTACAATCTTAATCA | 1040 |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAATTAGTGACAACTAGTAAATAATAAAAGTGCAAGT 960 XmnI TspDTI SspI BclI HphI Hpy8I AseI 61 CCACTTCTTTCAGTTTATGCAGATATGTCAACAACAACAACAAAGAATATCGTGATGATAAAAAGTCAATGTTAGAATTAGT 1040 61 GGTGAAGAAAGTCAAATACGTCTATACAGTTGTTGTAGTTTTCTTATAGCACTACTATTTTTCCAGTTACAATCTTAATCA | AclI HinCII DraI HphI AfIIII MnII Hpy8I BaSSI BaAI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAAGGTGATTTATATATTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCATGGGGATCAAAGGTGAAACAGTTGAAAGAATAAAAGTGC 800 801 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGGATCCATGGGGCATCAATGCCTTATTACAAAAAGTGTCTTG 880 801 TATGCGCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGGTCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAAACAATTAAATGGTCTTG 880 801 TATGCGCTGTGATATTATGAAAATTTTAATGCCGGATCCATGGGGATCAATGCCTTATTTCAAAAAGTGTCTTG 880 801 TATGCGTGTTGCTGTTATAAATTCTAATTGCGGGATCCAATGGGCAATGAAAGTATAAATGGTCTTG 880 801 AAGGTGTTCCTGTTATTAAATTCCATATTTGGTTGGTAAATTAACTACTGTGGTAAATTAATT | | | | HincII | Hin4I | BpmI | Hin4I |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAATTAATGAGAAGTAGATAAATAA | Acli Hinfl Drai Hphi Aflili Mnli Hpy8I BesSI BeaAl 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACCAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | | | | Hpy8I | Hin4I | Eco57M | I |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTAT | Acli Hincli Drai Hphi Aflili Mnli Hpy8I BasSI BasAI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTATATATTTCACC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAACAGTTGAACACTTCAACTAAAAAGTGG 800 721 GTTCTTAATGATGATAATATTTAAAGTGCAGATCGATGGGCAACAGTTTACAACTGTCAACTAAAAAGTGG 800 801 TATGGCTGTTGATATTATGAAAATTTTAAGGCCAGATCGATGGGCATCAATGGCATTATTATCAAAAGTGGTCTTG 880 801 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAATTAGGGCCAGAGTCCATGGGCATCAATGCGATATAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 801 ATACGGACAACTATAATATATGGTTTGAAATTGGGTTTGGTAGTACCGATATAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 801 ATACGGACAACTATAATATATATTCATATTTGGTTTGATGGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTT | | | | | Hpy188III | | Hin4I |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTATTATCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAATTAGTGAGAAACTAGTAAATAAA | Acli HinCII Drai Hphi AflIII Mali Hpy81 BesSI BesAI Fall Fall Fall 721 GTTCTTAATGATGATGATGATGATGAGACATTIGGTGATGATGATGAGGTGCAACAGGTGAACGAGGTGATTIATATATTACGAGG 800 721 CAAGAATTACTACTATTATGAAACGTGTTAAACATTIGGTGATGATGAGGTGCAACGAGGTGATTIATATATTATGAGGG 800 801 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTTAATGCCAGGATCCATGGGGCATCAATGCCTAATTCCAACAATTAAATGGTCTTG 880 801 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAATTCAGGTCTAGGTACCCGTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGGAAC 880 801 AADOI ALWI BesJI SfaNI Hpy1881II 1 TatGCGTGTCCTGTTATTAATTTTGATGTTGATGGTTGAGATGACTGGTGATGATTATTTTTCACGGTCAA 880 881 AAGGTGTTCCTGTTATTAATTTTGATGTTGATGGTTGAACTAACT | | | | | | | |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGGCAATTAGTGACAACTAGGTAAATAATAAAAGTGCAAGT 82 BclI HphI Hpy81 83 BclI HphI Hpy81 84 AseI 81 CCACTTCTTTCAGTTTATGCAGATATGTCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAGTGATAAAAAGTCAATGTTAGAATTAGT 1040 63 GGTGAAGAAAGTCAAATACGTCTATAGCAACATCAAAAGAATATCGTGGATGATAAAAAGTCAATGTTAAGAATTAGT 1040 85 HinclI Hin4I BpmI Hin41 85 HinclI Hin4I BpmI Hin41 85 Hin4I Eco57MI 15 Hpy188III Hin4I Hin41 | Acli Hincii Drai Pph Afliii Mnli Hpy81 BasSI BeaAi 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAAGGTGAATTTATTATATATTTACGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCCTTACAAATGGTCAAGGTGAATTATATATA | | | | | | | |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAATTGGTGATGACAACTAGTAAATAAA | Acli Hinci Dri Ppi Aflii Mnli Hp91 Bas31 Bas31 Pmli 721 GTGCTTAATGAGGATAAAAGTGTAAAAGTTTAGGCGGTAAGGGGAAAGGGGGATTAATATATAATGGGGG 800 721 GTGCTGAAGAGATAGTAGAAAGTGTTAAGGGGGAGATGTTGGGAAGGGGGAATGATTAGTAAGAGTGGGGGG | 1041 | mmmcomooso | ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ | 100m00m003 03 m03 3 03 3 3 | | | 1120 |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTGGTCGTAAATTAACTACTGTGGTCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCATTTAATTGATGAACTAGTAAAAAAGTGCAAGT 960 81 TSpDTI SspI BclI HphI Hpy8I AseI 81 CCACTTCTTTCAGTTTATGCAGATATGTCAACAACAACAACAACAAGAATATCGTGGATGAAAAAAGTCAATGTTAGAATTAGT 1040 61 GGTGAAGAAAGTCAAATACGTCTATACAGTTGTTGTAGAATTAGT 1040 61 GGTGAAGAAAGTCAAATACGTCTATACAGTTGTTGTAGTTTTCTATAGCACTACTATTTTCAGTTAGAATTAGT 1040 61 HincII Hin4I BpmI Hin41 Hpy8I Hin4I Eco57MI Hpy188III Hin4I | Ac11 Hincii Drai Ephi Affilii Mnli Hpy81 BesSI Beal 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTAGCTCTTACGAAATGGTCAAACAGTGGAAGGTGATTTATATATTTCAGG 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTAGCTCGAGAACGATGGGGCATCAATGGAGGTGAATTATATATTTCAGG 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACAATTAGCGCGAGATCCAATGGGTCAATGCAATGGAGGTGAATATATAT | 1041 | AAACCACCTCCAG | CAAAAGAATGGATT | CCACCACCECECEACE | A TATTGUTGUTACAATGACAG | JAATTAGAACGTTTAT | 1120 |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTGATCATTTATTT | AclI HINCII Drai Bphi AflIII NnII HpySI BasSI BasAI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACCAATGGTCAAACGGTGAATAGGTGATTATATATA | 1041 | AAAACGAGGTC | GITTTCTTACCTAA | Upul 9 9 TT | AATAACGACGATGTTACTGTC | Alot Acl | 1120 |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTGATCGTAAATTAACTACTGTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCATAGTAAATAAGTGCAAGTGCAAGT 960 82 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAAGTATAATGAAATAAGTGCAAGT 960 83 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAAGTATAATGAAATAAGTGCAAGT 960 84 Amul TspDTI SspI BolI HphI Hpy81 85 T 86 CCACTTCTTTCAGTTTATGCAGATATGTCAACAACAACAACAACAAAGGAATATCGTGGATGATAAAAAGTCAATGTTAGAATTAGT 1040 85 GTGGAAGAAAGTCAAATACGTCTATACGTGTGTGAGATTACGTGGATGATAAAAAGTCAATGTTAGAATTAGT 1040 86 GTGGAAGAAAGTCAAATACGTCTATACGTGTGTGTGTGTG | AclI HineII Drai Hphi AfIIII Mnli Hpy8I BssSI BssAI 721 GTTCTTANTGATGATAAAAGTGTTAAGCATTAGCCTCTTACCAATGGTCAAACAGTGTGAAGGTGATTATAFATTTCCAGC 600 721 GTTCTTANTGATGATAAAAGTGTTAAGCATTAGCCAGATGGTACAATGGCAAATGGCATGAACTGCCACTAATGCACTCCACTAAATGACAATTAATAATTACGAGATTACCAGGTGTGCAACTCCACTAATGCACTTCCACTAAATGACTATTAAATTACGAGAAC 600 721 CAMGAATTACTACTATTATGAAAATTAGCCAGAGTCCATGGGCATCAATGCCTTATTCCAACAATTAATT | | | Hin41 | npyiooiii | nin41 | AIOI ACI | T |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAACCAAACTAGCATTAATTGATGACACTAGTAAAAAGTGCAATGGCAAGT 960 82 Bcll HphI HphI Hpy81 AseI 61 CCACTTCTTTCAGTTTATCGGAGATATGTCAACAACAACAACAACAACGGAGAATATGGGAGGAAGTCAATGTTAGGAATTAGT 1040 63 GGTGAAGAAAGTCAAATAGGTCTATACAGTGTGTGTGGAGTTATCGTGGAGTGATAAAAAGTCAATGTTAGGAATTAGT 1040 64 HincII Hin4I BpmI Hin41 19y8I Hin4I Eco57MI 19y188III Hin4I Eco57MI 19y188III Hin4I | Ac11 Hincli Drai Hphi Afilii Nn11 Hpy81 Bas31 Bas31 Bas31 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAGCATTIAGCTCTTACGAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTATATATTTCACC 500 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAGCATTIAGCTCTTACGAAATGGTCAAACAGTTGAACTGCCAACTTCCACTAAGTGTCCACTAAATGGTCGT 600 721 CAAGGATTACTACTACTATTATGAAATTTTAATGCCAGGATCCATGGGCATCAATGGCCTAATTCCAACTACTAACTA | | | N CmT | IVUE | MboTT | | |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTATATATATATATATGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAACATCGACAATTAATT | AclI HacII Drai Bphi AFIIII Mull Bpy8I BrsSI Bphi AFIII 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGAATTTATATATTCAAC 800 721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGAATTTATATATTCACAC 800 721 CAAGAATTACTATTTTCACAATTTGAAATGCGAGAATGGTTAACGATTAGGACATGCATTTGTAAATTAAATGC 800 801 TATGCCTGTGATATTATAGCATTTAGCACAGGGCAACCATGGGCATCAATGCCTTATTGCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 801 ATACGGGGTCCCTGTTATTATATTCATTTGATTTAGCGGCGAAGGGCAATGAAGTTAAGTTAGGATTAAGTTAGCAACGAAGTAAGGTTAGGGAATTAAGTTAGCAACGAAGTAAGGTTAGGGAATTAAGTACGAACTAGGATTAAGTACGAACTAGGATTAATTA | | | ACIIII | | TepDTI | | |
| StyI BStXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTATATTCATATTCGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTT | Acli Handli Drai Hphi Affilia Mail Hpy81 Drai Hphi Affilia 721 GTTOTTAATGATGATAAAAGTOTTAAGCATTTAGCTOTTACAAATGGTGAAGGTGAAGGTGAATTATATATTTCAGC 600 721 GTTOTTAATGATGATAAAAGTOTTAAGCATTTAGCTOTTACAAATGGTGAACGTTGGAAGGTGAATTATATATTTCAGC 600 721 GTTOTTAATGATGATAAAAGTOTTAAGCATTTAGCTCATGGAAATGGTTACAGTTGGAAGGTGCAATTAATT | | | | | 197011 | | |
| StyI BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATCATATTGGTTGGATCGTAAATTAACTACGTGTGATCATTTATTATTTACTGATCGTGATCGATAATAAAAGGGCAAGGATAATTAAT | Acli Hinefi Drai Bph Affili Mill Bpy81 BesS1 Bph Affili 121 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACCAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTCAAC 800 121 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGGCCCAATGGCCACAAGGTGAACGTTGAAGGTGATTTATATATA | | | | | | | |
| Styl BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAATTAATT | Acli Hincii Drai Iphi Afliti Mil Bp91 BasSi Iphi Afliti 721 GTOTTMATCATCATAMAAGTGTTAACATTTACCTCTACAAATGGTCAAACAGTTGAACGGTATTTATATATTTCCACC 800 721 GTOTTMATCATCATATATACGTATAAACATTTACCTCCTACCAAATGGTCAAACAGTTGAACGTATTATATATTATAAATGCAC 800 721 GTOTTMATCATCATATTACGAAATTGCACAATGGTCAATGGGCATCAATGGCATTATTGCAACAATTAAAATGAGTCC 800 801 ATACGGGACAACTATATATATGCACAAATTGCGGGATCCAATGGCATTATTGCAACAATTAAAATGGGTCTTGC 800 801 ATACGGGACCAATGAATTATATGCGCAGAATGGCTATATGGGATGGGATGCAATGGATATTATTGCAGAACA 800 801 ATACGGGACCAATGAATTATATGCGGACACCGAAGGGATCCAATGGGATGCAATGGATATTATTGCAGAACACGAAGAAGAAGAAGTAAGT | | | | | | | |
| Styl BStXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTATATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTGGTCATTATATTATTTTCACGTTCA 960 81 TTCCACAAGGACAATAATTATTAAGTATAAAGCAAACTAAGCATTAATTGATGACAACTATTAATTA | Aciz Hincili Deal Hpi Afilii Nnii Hpyi Basii Basii 721 CHUUTAARGARGATAAAAGUUTAAACATTAAUUUTAACAAUUTACAAUUUTAAAGUUU 800 800 721 CHUUTAARGARGATAAAAGUUTAAAUUUTAAAUUGAAAUUUTAAAAUUU 800 721 CAAGAAUUUUUU 800 721 CAAGAAUUUUUU 800 721 CAAGAAUUUUUU 800 721 CAAGAAUUUUUUUU 800 721 CAAGAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU | | | | | | | |
| Styl BstXI AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTTGATCGTAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTCACGTTCA 960 TTCCAAAGGACAATAATTATAAGTATAAACAAAACAACAACAACTAGCAATTAATGAAATAATAAAAGTGCAAG 960 Xmni TspDTi Sspi Bcli Hphi Hpy81 Asei CCACTTCTTTCAGTTTATGCAGATATGTCAACAACAACAACAACAACAACAACAAGAATATGGTAGAATAAGTAAAGTGAATGAA | Aciz BinCII DEal Bph AffIII MnI BygI BosBI BosBI Baal 721 GTUTTAATGATGATAAAAGTGUTAAACATTAGGTUTACCAATGGUGAAACAGTUGAAGGUGATTATATATUTCAGC 800 721 GTUTTAATGATGATAAAAGTGUTAAACATTAGGUCUTACCAATGGUGAACCAATGCUTAATGATAAAGTUCCAAATGAAGUAAGU | 1121 | TCCCAACAGAA | GTTCGTGCAGATCA | ATCAATGGCAAAAATTCTT | ΑΑΑΤΑCΑΑΑGTAGTAAAAAA | CCACTTTCTGTTTAT | 1200 |
| Styl BstXI 81 AAGGTGTTCCTGTTATTAAATTCATATTGGTTTGATCGTAAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTCACGTTCA 960 11 TTCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCAATTAATT | Acli Bincli Drai Ppi Afilii Baal MIL Bygi Basi Basi Basi Bali 721 GTTOTTAATGATGATAAAAGTGTTAAGCATTAGOTGTAAGGGTGAAGGGTGAAGGGTGAAGTTAATATTAGAGGGGGATGAAGGGGGG | 1121 1121 | TCCCAACAGAA | GTTCGTGCAGATCA | ATCAATGGCAAAAATTCTT. | AAATACAAAGTAGTAAAAACT TTTATGTTTCATCATTTTTCA | CCACTTTCTGTTTAT | 1200 1200 |
| Styl BstXI BstXI AAGGTGTTCCTGTTATTAATATTCATATTGGTTTGATCGTAATTAACTACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960 TTCCACAAGGACAATAATTATAAGTATAAACCAAACTAGCGAATTAATGAGGACAACTAGTAAAAAGTGCAAGT 960 Xmni TspDTi Sspi Boli Hphi Hpy8i Asel CCACTTCTTTCAGTTTATGCAGATATGTCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACATGTGAAAAAAGTCAATGTTAGAATTAGT 1040 GGTGAAGAAAGTCAAATAACGTCTATACAGTTCTTGTAGTTTTCTTATAGCAACTACTATTTTTCAGGTACAATCTTAATCA 1040 Hincli Hin4i Bpmi Hin4i Hpy8i Hin4i Bco57MI Hpy18BIII Hin4i Bco57MI Hpy18BIII Hin4i Bco57MI Hpy18BIII Hin4i Bco57MI Hpy18BIII AIAA MAAACGAGGTCGTTTTCTTATACCACTGCTACCAGGAATTATTGCTGCTACAATGACAGGAATTAGT 1120 Hin4i Bbvi Hin4i Xemi Molii TspDTi 120 AGGTTGCTCCAGCAGAAGTCGATCAATCAATGGGAAAAATTCTTAAAAAGGAAGG | Acl3 Hind13 Drd1 Pph L Af1111 MD1 HyyS1 BaS1 Pull 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACCAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGAATTATATTTCACC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACCAATGGTCAAACAGTTGAAGTGCAAATGATATATTATATTTCACC 800 801 TATGGCTGTTGATATTATGAAATTGTGAAATGGCAGATCCATGGCGATCAATGCTTTGCTAGTTCAAATTGAAGTGTGTTO 880 801 TATGGCTGTTGGTATTATGGAAATTGTAAGGCGCAAGTCCCTGGGGCATCAATGCCTTAGTTAG | 1121 1121 | TCCCAACAGAA AGGGTTGTCTT | GTTCGTGCAGATCA CAAGCACGTCTAGI Aloi | АТСААТGGCAAAAATTCTT. ТАGTTACCGTTTTTAAGAA Вsα⊺ | АААТАСАААGТАGТАААААСТ ТТТАТGTTTCATCATTTTTGA | CCACTTTCTGTTTAT AGGTGAAAGACAAATA | 1200 1200 PsiI |
| NCOI | Acli HincII Drai HphI AflIII MnI Hpy8I BssSI BsaAI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 CAAGAATTACTACTATTATGATAAACATTTGAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | 881 881 | AAGGTGTTCCT TTCCACAAGGA XmnI | GTTATTAATATTCA CAATAATTATAAGT TspDTI Ssp AseI | Ncol Styl BstX MTATTTGGTTTGATCGTAAA MTAAACCAAACTAGCATTT. | I TTAACTACTGTTGATCATTTA AATTGATGACAACTAGTAAAT BclI | ATTATTTTCACGTTCA 'AATAAAAGTGCAAGT HphI | 960 960 Hpy8I |
| | AclI HincII Drai HphI AflIII Mnli Hpy8I BssSI BsaAI Fmli Fmli Fmli 721 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGGAAATCGAGAATGTTTACCAGTTGCAACTTCCACTAAATATATAAAAGTGC 800 721 GTTCTTGATATTATGAAAATTTGGAAAATTTGGAGAATGTTTACCAGTTGCAACTTCCACTAAATAATATAAAAGTGC 800 801 TATGCCTGTTGATATTATGGAAAATTTTTAATGCCAGGTCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 801 ATACGGACAACTATAATACTTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGAATAAAGTTTGTTAATTATCACGAAC 880 801 ATACGGACAACTATAATACTTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGAATAAAGTTTGTTAATTATCACGAACA 880 801 ATACGGACAACTATAAATACTTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGAATTAAAAGTTTGTTAATTACCAGAAC 880 802 Apol Alwi BsaJI SfaNI Hpy188III | | | | BstYI | | | |
| BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | | | | TspDTI | | | |
| BstYI | Acli HincII Drai Hphi Afliii Mnli Hpy8I BssSI BsaAI Pmli Pmli Pmli 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGAAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | | | Apol | AIWI BSAJ | 1 SIAN1 | | πρλτορτττ |
| TspDTI BstYI | Acli HincII Drai Hphi Aflili Mnli Hpy8I BssSI BsaAI Pmli 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGGAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | 00 T | ACCORCARC | AnoT | AlwI Bea.T | T SfaNI | | Hpv188TTT |
| Apol AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | Acli HincII Drai Hphi Aflili Mnli Hpy8I BssSI BsaAI PmlI 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTGGAAATGGTCAAACAGTTGCAAGGTGATTTATATATA | 801 | ATACGGACAAC | ΤΑΤΑΑΤΑСΤΤΤΤΑΑ | AATTACGGTCTAGGTACCC | GTAGTTACGGAATAAAGTTTG | TTAATTTACCAGAAC | 880 |
| 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | 801 | TATGCCTGTTG | ATATTATGAAAATT | TTAATGCCAGATCCATGGG | CATCAATGCCTTATTTCAAAC | AATTAAATGGTCTTG | 880 |
| 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | | |
| 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | HphI | |
| HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | Acli HincII Drai Hphi AflIII Mnli Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | 721 | CAAGAATTACT. | ACTATTTTCACAAI | TTGTAAATCGAGAATGTTT. | ACCAGTTTGTCAACTTCCACT | AAATATATAAAGTCG | 800 |
| 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | 721 | GTTCTTAATGA | TGATAAAAGTGTTA | AACATTTAGCTCTTACAAA | TGGTCAAACAGTTGAAGGTGA | TTTATATATTTCAGC | 800 |
| 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAATGCCAGGTCTAGGTACCGGTGATGTAGGTATGTTAAATTGCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188111 TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI PmlI | | | | | | | |
| 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188111 TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII MnlI Hpy8I BssSI BsaAI | | | | | | 1 111 1 | |
| 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAAATCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCGGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | AclI HincII DraI HphI AflIII | | MNII | нруві | BSSS | 1 | BSAA1 DmlT | |
| MII HDYSI BSSI BSAI PmlI 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTGTAAATCGAGAAGTGTTTACCAGGTGCAACTTCCAACTAAATATATAAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAAATTTTAATGCCAGGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTGCGTCTAGGTCCAGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAAATGGTCTTG 880 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTCCAGGGCATCCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAAATGGTCTTG 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188111 TspDTI BstYI | | | Acli | HincII | DraI | HphI | AIIII | |
| AclI HincII DraI HphI AfIIII MnII Hpy8I BssSI BsaAI PmlI 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTGTAAACGATGTTAACAGTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGGACCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAAAATGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTAACAGTCT 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188111 TspDTI BstYI | 641 TTGCAAATACAGTTGGTTACCATCTAATAAAATTTCGAGCACCACCACTAAATTACAAATTGAGTGCACAATTTGTTTAA 720 | 641 | TTGCAAATACA | GTTGGTTACCATCI | AATAAAATTTCGAGCACCA | CCACTAAATTACAAATTGAGI | GCACAATTTGTTTAA | 720 |
| AclI HincII DraI HphI AflIII MnII Hpy8I BssSI BsaAI PmlI PmlI PmlI 21 GTTCTTAATGATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATA | 641 TIGCAAATACAGTIGGTTACCATCTAATAAAATTTCGAGCACCACCACTAAATTACAAATTGAGTGCACAATTTGTTTAA 720 | 641 | TTGCAAATACA | GTTGGTTACCATCI | AATAAAATTTCGAGCACCA | CCACTAAATTACAAATTGAGI | GCACAATTTGTTTAA | 720 |
| 41 TTGCAAATACAGTTGGTTACCATCTAATAAAATTTCGAGCACCACCACTAAATTGAGTGCACAATTTGTTTAA 720 AclI HincII DraI HphI AflIII MnII Hpy8I BssSI BsaAI PmlI 21 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTCAGC 800 21 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTGTAAACAGTTGAAATGGTCAAACAGTTGCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800 HphI 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAAATGGTCTTG 880 01 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTTAATGCCAGGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAAATAGGTCTTG 880 01 ATACGGACAACTATAATACTTTTAAAATTACGGTCTAGGTACCGTAGTTACGGAATAAAGTTTGTTAATTTACCAGAAC 880 ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III TspDTI BstYI | | 041 | AACGIIIAIGI | CAACCAAIGGIAGA | IIIAIIIIAAAGCICGIGGI | GGIGATITAATGITTAACICA | CGIGIIAAACAAAII | 120 |

| 1201 | AAATCAACAGCTGGTCGTG | AAAAATTCCGTCCA | ACACAACGTTCA | CCAATTTCAAAI | ITTTTATCTTG | CAGGTGATTATAC | 1280 |
|------|----------------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|---------------|--------|
| 1201 | TTTAGTTGTCGACCAGCAC | TTTTTAAGGCAGGT | IGTGTTGCAAGI | GGTTAAAGTTTA | AAAAATAGAAC | GTCCACTAATATG | 1280 |
| | MspAlI | ApoI | HphI | Нру8І | ApoI | | |
| | PvuII | | AclI | | MmeI | | |
| | Нр | y188III | | | AarI | | |
| | Tsj | pGWI | | | BspMI | | |
| 1281 | AAAACAAAAATACCTTGCA | ICTATGGAAGGTGC | AGTATTTTCAGG | TAAACTTGTAAC | CTGAAGCTATT | GTTGAAGATTGGT | 1360 |
| 1281 | TTTTGTTTTTATGGAACGT. | AGATACCTTCCACG | ICATAAAAGTCC | ATTTGAACATTO | GACTTCGATAA | CAACTTCTAACCA | 1360 |
| | HphI | SfaNI | | Hpy8I | | | Eco57I |
| | | | | BsgI | | E | co57MI |
| 1361 | CTGCTCGTGGTGTTACTTC. | ATCAGCAGCATCACC | GTCAACCTGCTI | TAGCTGCTGCTC | GGTGTAGTAGG | TAGAGTAGGTTCT | 1440 |
| 1361 | GACGAGCACCACAATGAAG | TAGTCGTCGTAGTG | CAGTTGGACGAA | ATCGACGACGAC | CCACATCATCC | ATCTCATCCAAGA | 1440 |
| | MboII | | BmgBI | BspMI | PsrI | MboII | |
| | BssSI | | BbvI | - MwoI | | | |
| | TspDTI | | BbvI | HpvFl | 10VI | | |
| | - 1 | | SfaNT | 1 2 | | | |
| | | | HincII | | | | |
| | | | Hover | | | | |
| | | | BbyT | | | | |
| 1441 | TCTGATTGGGCACGTTGGC | TTCAACCTGTAGGT | GCTATTGCTGGT | GGTTGTAAAGAT | TTATAAAGATC | ATGATGGTGATTA | 1520 |
| 1441 | AGACTAACCCGTGCAACCG | AAGTTGGACATCCA | CGATAACGACCA | CCAACATTTCT | AATATTTCTAG | TACTACCACTAAT | 1520 |
| | PsrI | SfcI | | | PsiI | BspHI | |
| | Bme158 | ΟI | | | | Hpy188III | |
| | Bsp128 | 61 | | | | MslI | |
| 1521 | TAAAGATCATGATATTGAT | TATAAAGATGATGA' | IGATAAATAATG | TTAGCTAGTCC1 | ITTCGCATTAG | ACAGTAAAGCATC | 1600 |
| 1521 | ATTTCTAGTACTATAACTA | ATATTTCTACTACT | ACTATTTATTAC | AATCGATCAGGA | AAAGCGTAATC | TGTCATTTCGTAG | 1600 |
| | PsiI BspHI | PsiI | | | | | |
| | HphI | | | | | | |
| | Hpy188III | | | | | | |
| 1601 | ATTAGGTCGTGGTGCTGCT | CGTCGTTGTTCTCG | IGCACCTCGTGG | TTTATTAACAGI | FAGCAGCAATT | GTTACTCCTGCTG | 1680 |
| 1601 | TAATCCAGCACCACGACGA | GCAGCAACAAGAGC | ACGTGGAGCACC | AAATAATTGTC | ATCGTCGTTAA | CAATGAGGACGAC | 1680 |
| | BbvI | Bs | sSI Bme158 | OI MnlI | 1 | Mfel Bbvl | SfcI |
| | SfaNI | | ApaLI I | raIII | | BpuEI | |
| | | | Hpy8I | | | | |
| | | | BsiHKAI | | | | |
| | | | Bsp1286 | I | | | |
| | | | BssSI | | | | |
| | | | | | | | |
| 1681 | TAGATTCTCAAGATGTTCC | ATCTCCAAGTCCAT | ГАССТААААААС | GTAATCGTATTI | ITTACAGACAA | AGATGGTGTTCGT | 1760 |
| 1681 | ATCTAAGAGTTCTACAAGG | TAGAGGTTCAGGTA | ATGGATTTTTG | CATTAGCATAA | AAATGTCTGTT | TCTACCACAAGCA | 1760 |
| | Hin4I | | Hin4I | | | | |

| | Hin4I | Hin4I | | | |
|-------|--------------------------|--|-------------------------|-----------------|-------|
| | SmlI | | | | |
| | Hpv188III | | | | |
| | 1 2 | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 17.01 | | | | | 1040 |
| 1/61 | ATTCAAGCTATGCCAGTAGACTAT | GGTTTTTCGTGCAGGTGCA | GACGTTTATATCAAGATCATTA | TGGTGAAATTCCAAA | 1840 |
| 1761 | TAAGTTCGATACGGTCATCTGAT | CCAAAAGCACGTCCACGT | CCTGCAAATATAGTTCTAGTAAT | ACCACTTTAAGGTTT | 1840 |
| | BsrI | AarI | BsgI Bsg | I MslI Apol | HphI |
| | Acci | BspMI | Hpy188I | II | |
| | Hpy81 | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 1841 | ATCTGTTTGGGAATTAGCTTCTT | AAATTTTAAACACGAATT | AGATCAAATGCGTCATTCATTCC | GTCATAACCCATATT | 1920 |
| 1841 | ТАБАСАААСССТТААТСБААБАА | ντηταααατητική στο στη τη τ | PCTAGTTTACGCAGTAAGTAAGG | CAGTATTGGGTATAA | 1920 |
| | X cm I | DraT DraT | Hast TenDTT | | |
| | ACIII | Diai Diai | ngai ispbii | | |
| | | Apol | TSPGWI | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 1921 | ATCGTGAATTATACGCTCGTAACC | CTCCAAAAACTTTACTCG | AGAAATTAAATTGTCGTGTAGGI | CAAGCTATGGCAAAT | 2000 |
| 1921 | TAGCACTTAATATGCGAGCATTGC | GAGGTTTTTGAAATGAGC | ICTTTAATTTAACAGCACATCCA | GTTCGATACCGTTTA | 2000 |
| | Hpy188III | MnlI Xho | I | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 2001 | GGTTTAGGAAAAGTAGATGAATTA | ͲͲΑGAAAAAͲͲGGͲͲͲΑ | PTACCAGAATTCAAACCTTTACC | TAGTTGGAGTCCAGA | 2080 |
| 2001 | | | | | 2080 |
| 2001 | CCAARICETTTICATETACTIAA | AAICIIIIIAACCAAAIA | AIGGICIIAAGIIIGGAAAIGG | AICAACCICAGGICI | 2000 |
| | | TSPDTI | ECORI | SIANI HPYI | 50111 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 2081 | TGCATTAGCAGAATTCGATGAAAT | TAAAGATAAACTTTCAAA | ATTAACAATTTGTAACGAAGCAG | TAGCACGTCGTGAAG | 2160 |
| 2081 | ACGTAATCGTCTTAAGCTACTTT | ATTTCTATTTGAAAGTTT | FAATTGTTAAACATTGCTTCGTC | ATCGTGCAGCACTTC | 2160 |
| | PleI ApoI Fall | TspDTI | FalI | BmgBI | |
| | MlyI EcoRI | | | DraI | II |
| | BfrBI | | | Hpv188 | BIII |
| | NsiT | | | * * | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 2161 | CAGCACGTATTGCTGCTGATGGTC | GATATGGAAGCTACACCAA | TTGCAGTTAAACTTCCTTTTTA | GCTTTATGTTGGGTT | 2240 |
| 2161 | GTCGTGCATAACGACGACTACCAC | TATACCTTCGATGTGGTT | AACGTCAATTTGAAGGAAAAAAT | CGAAATACAACCCAA | 2240 |
| | BsaAI | HphI 1 | 4feI | | |
| | BstAPI | | | | |
| | MwoI | | | | |
| | HpyF10VI | | | | |
| | BbvI | | | | |
| | - | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

 2241
 TTAGATGTAGTATATGATAAACGTCCAATTCAAAAATTTTGGGTACTTGAAACTGTTGCTCGTATTCCATATTTCGCATA
 2320

 2241
 AATCTACATCATATACTATTTGCAGGTTAAGTTTTTAAAACCCATGAACTTTGACAACGAGCATAAGGTATAAAGCGTAT
 2320

ApoI

| 2321 | TATCTCAATTCTTCATCTTTACGAA | TCATTAGGTTTTTGGC | GTGCTGGTGC | IGAATTACGTAAAATTCATTTTGCTGAA | G 2400 |
|----------------------|--|--|---|---|---------------------------|
| 2321 | ATAGAGTTAAGAAGTAGAAATGCTT | AGTAATCCAAAAACCG | CACGACCACG. | ACTTAATGCATTTTAAGTAAAACGACTT | C 2400 |
| | TspDTI | | Cac8I | TspDTI | |
| | MboII | | | BsaAI | |
| | | | | SnaBI | |
| | | | | Apol | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 2401 | AATGGAATGAACTTCATCACTTACA | AATTATGGAATCATTA | GGTGGTGATC | AGGCTTGGTTTGATCGTTTTTTAGCAGA | A 2480 |
| 2401 | TTACCTTACTTGAAGTAGTGAATGT | TTAATACCTTAGTAAT | CCACCACTAG | ICCGAACCAAACTAGCAAAAAATCGTCT | T 2480 |
| | TspDTI Eco57I | | Bc. | LI HphI | |
| | Mboli Eco5/Mi | | | | |
| | Ts | pDTI | | | |
| | | | | | |
| 2481 | CATGCAGCTGTATTATATTACTGGT | ͲϪͲͲϪϪͲͲႺϹͲͲͲͲϷ | ͲͲͲϪႺͲͲͲϹϪ | CCAAAAGTTGCTTATAATTTTATGCAAC | G 2560 |
| 2481 | GTACGTCGACATAATATAATGACCA | ATAATTAACGAAAAAT | AAATCAAAGT | GGTTTTCAACGAATATTAAAATACGTTG | C 2560 |
| | BstAPI BbvI | BsrI | HphI | PsiI | AflIII |
| | MwoI MspAlI | AseI | - | | |
| | HpyF10VI | | | | |
| | NspI | | | | |
| | PvuII | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 2561 | TGTTGAACATCATGCTGCTGATACA | TACTGTGAATTTTTAG | AATCAAATAG | AGAATTATTAGCTTCTATTCCACCACCA | G 2640 |
| 2561 | ACAACTTGTAGTACGACGACTATGT | АТGACACTTAAAAATC | TTAGTTTATC | ICTTAATAATCGAAGATAAGGTGGTGGT | C 2640 |
| | BbvI | ApoI | | | BsrI |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 2641 | TTGTTGCACTTAATTATTATAGAAA | TCAAGATTTATACTTA | TTTGATTCTT | ITCAAACTTCATCAAAGGCTTCAGGTGT | т 2720 |
| 2641 | AACAACGTGAATTAATAATATCTTT | AGTTCTAAATATGAAT | AAACTAAGAA | AAGTTTGAAGTAGTTTCCGAAGTCCACA | A 2720 |
| | | Hpy188III | Т | SPDTI | |
| | | | | Eco57I | |
| | | | | ECO5/MI | |
| | | | | | |
| 2721 | СААССТССТСАСАТТСТААТАСАС | ͲͲϹͲͲϹͽϹϹͲͲͲͲͲͽͲ | יידא אייכידא רכידי | | T 2800 |
| 2721 | CTTCCACCACCTCTAACATTATCTC | AAGAACTGCAAAAATA | | | 1 2800 2 2800 |
| 2,21 | Hov188111 | Hov188TTT | AseT | Baalt Aflitt | 2000 |
| | mpyroorrr | npyroorrr | 11001 | Poil | |
| | | | | NapT | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 2801 | GTTTGCTATGCAAAATGAGGAAATT | GCTAAACAACTTGCTA | TTGGTAGAGG | ITCACCAGGTCCAGAAGACCACCTTACA | A 2880 |
| 29.01 | | CGATTTGTTGAACGAT | AACCATCTCC. | AAGTGGTCCAGGTCTTCTGGTGGAATGT | T 2880 |
| 2001 | CAAACGATACGITITACICCITITAA | | | | |
| 2001 | MnlI | | MnlI | Hpy8I Hpy188III | MboII |
| 2001 | MnlI | | MnlI HphI | Hpy8I Hpy188III SexAI BbsI | MboII BslI |
| 2001 | Mnll | | MnlI HphI | Hpy8I Hpy188III SexAI BbsI FalI | MboII BslI |
| 2001 | MnlI | | MnlI HphI | Hpy8I Hpy188III SexAI BbsI FalI | MboII BslI |
| 2001 | MnlI | | MnlI HphI | Hpy8I Hpy188III SexAI BbsI FalI | MboII BslI |
| 2881 | MnlI | TGATTATAAAGATCAT | MnlI HphI GATATTGATT. | Hpy8I Hpy188III SexAI BbsI Fall ATAAAGATGATGATGATAAATAA 29 | MboII BslI 54 |
| 2881 2881 | MnlI TGGAAGATTATAAAGATCATGATGG ACCTTCTAATATTCTAGTACTACC | TGATTATAAAGATCAT ACTAATATTTCTAGTA | MnlI HphI GATATTGATT. | Hpy8I Hpy188III SexAI BbsI Fall ATAAAGATGATGATGATAAATAA 29 FATTTCTACTACTACTATTTATT 29 | MboII BslI 54 54 |
| 2881 2881 2881 | Mnli TGGAAGATTATAAAGATCATGATGG ACCTTCTAATATTTCTAGTACTACC Fali BspHi | TGATTATAAAGATCAT ACTAATATTTCTAGTA PsiI Bsp | MnlI HphI GATATTGATT. CTATAACTAA HI | Hpy8I Hpy188III SexAI BbsI Fall ATAAAGATGATGATGATAAATAA 29 IATTTCTACTACTACTATTTATT 29 Psil | MboII BslI 54 54 |
| 2881 2881 2881 | Mnli TGGAAGATTATAAAGATCATGATGG ACCTTCTAATATTCTAGTACTACC Fali BspHi Psii Hpy188 | TGATTATAAAGATCAT ACTAATATTTCTAGTA PsiI Bsp III HphI | MnlI HphI GATATTGATT. CTATAACTAA HI | Hpy8I Hpy188III SexAI BbsI FalI ATAAAGATGATGATGATAAATAA 29 FATTTCTACTACTACTATTTATT 29 PsiI | MboII BslI 54 54 |