



**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**

**UPSE**

## 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.



---

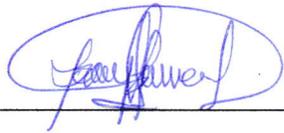
Bryan José Pillacela Zhunio

C.I.: 1400855530

## **DEDICATORIA**

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

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Blga. Mayra Cuenca Zambrano, Mgt.

Decana (e)

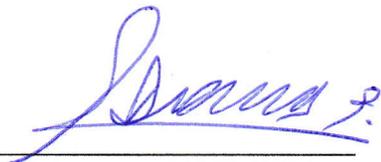
Facultad de Ciencias del Mar



Blga. Tanya González Banchón, Mgt.

Directora (e)

Carrera de Biología Marina



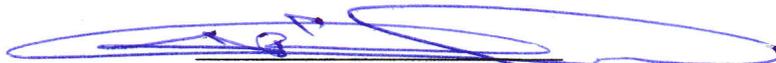
Blga. Erika Salavarría Palma, Ph.D.

Docente de área



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<sup>1\*</sup>, Janeth Galarza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Estatal Península de Santa Elena.

La Libertad – Ecuador.

<sup>1\*</sup>bryanjjose@hotmail.com – <sup>1</sup>jgalarza@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](http://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 silico* 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](http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://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 Ncbutter 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, NaNO<sub>3</sub>; 0,17 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,3 mM, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,43 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,29 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 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 µL, 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'-GTTGTCGACATGCGTGTGTTATTGCTGGT-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, INVITROGEN™), 0,2 mM dNTP's (100mM dNTP's Set, INVITROGEN™), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (25 mM MgCl<sub>2</sub>, INVITROGEN™), 0,2 µM partidores (10 µM), 0,72 U Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/µL, INVITROGEN™). 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 T100™ Thermal Cycler (BIORAD). El producto amplificado fue separado en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 3 µL de SYBR™ Safe (INVITROGEN™), empleando el marcador de peso molecular de 1 kb (INVITROGEN™).

### **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



**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.

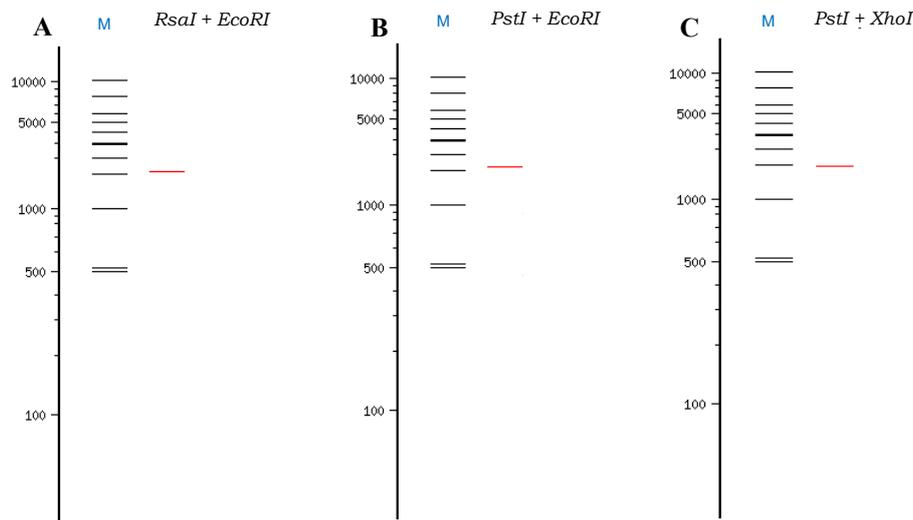


Figura 3: Representación de patrones de restricción de los geles de agarosa *in silico*. Se escogió el gel al 1% y marcador de peso molecular (M) de 1kb.

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/ $\mu$ L y una pureza (Abs260/Abs280) de 1,92. Mientras que la integridad fue evidenciada en un gel de agarosa al 1% (Figura 4).

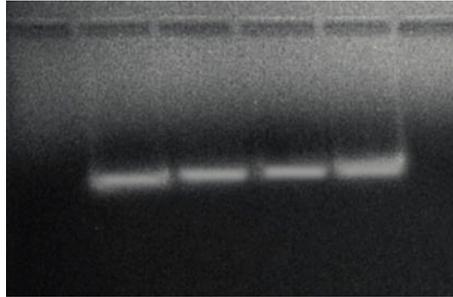


Figura 4: ADN genómico de *015*. en todos los carriles.

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

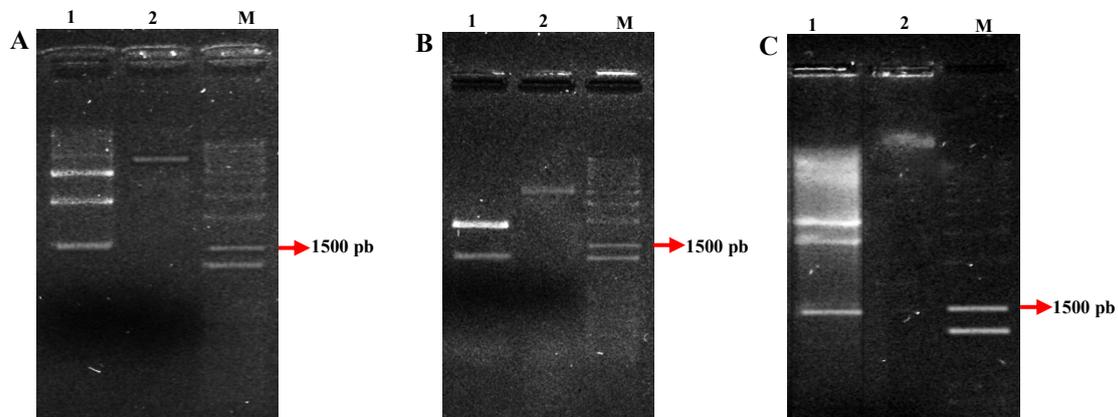


Figura 5: Confirmación de los patrones bioinformáticos producidos por las enzimas escogidas en el software NEBcutter 2.0. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR<sup>TM</sup> Safe (INVITROGEN<sup>TM</sup>) y marcador de peso molecular (M) de 1kb.

**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).

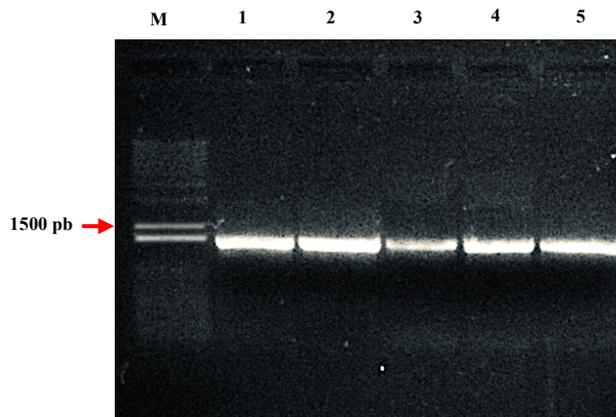


Figura 6: Amplificación del gen *pds* con el juego de partidores TH219/TH266 a partir de 1  $\mu$ L de ADN genómico de la microalga 015. Marcador de peso (M) 1 kb (INVITROGEN™).

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).

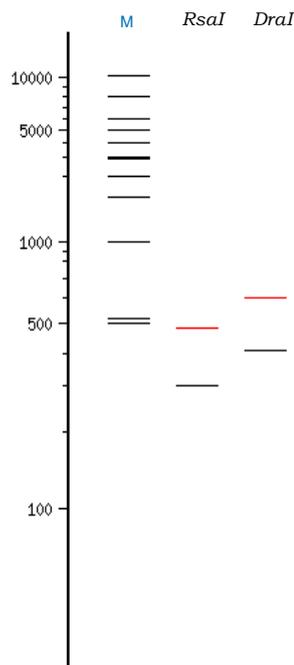


Figura 7: Patrones de restricción *in silico* producidos por las enzimas *RsaI* y *DraI*. Gel de agarosa al 1% y marcador de peso (M) 1 kb (INVITROGEN™).

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.).

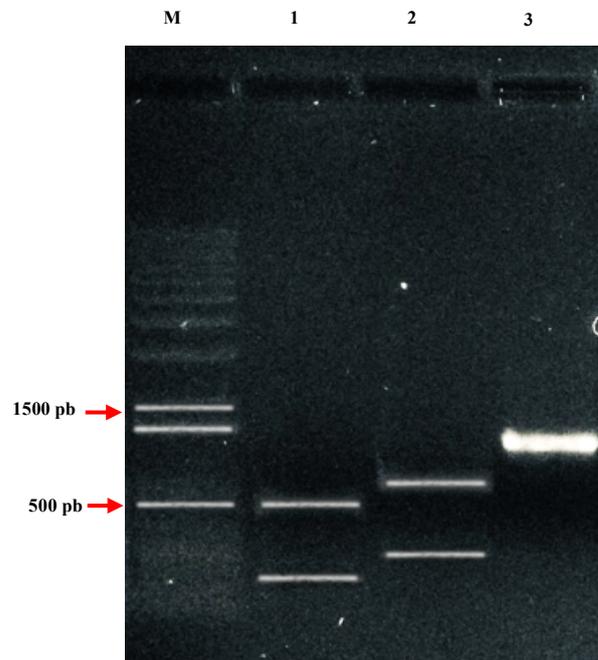


Figura 8: Confirmación de los patrones de restricción en gel de agarosa al 1%. Marcador de peso (M) de 1 kb (INVITROGEN™).

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  $\mu$ 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 restricción 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 eficaces 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/ $\mu$ L), indicando que el método salino (NaCl) es un procedimiento eficaz para la extracción de ADN genómico. Además, 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<sup>ma</sup> 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) Over-accumulation 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 Biochemistry 79. Springer International Publishing. Suiza. pp.219–237.
- Herrera, V. (2011). Aislamiento, clonación y estudio *in silico* de los genes accoxidasa, accsintasa,  $\alpha$  expansina y endoglucanasa en guayaba (*PsidiumguajavaL.*). Memoria para la obtención de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma 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  $\beta$ -carotene 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 Biochemistry*. 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 *Botryococcus braunii*, Race B. *Archives of Biochemistry 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 Microbiology*. 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.



Bsp1286I  
Hpy188III

641 AACGTTTATGTCAACCAATGGTAGATTATTTTAAAGCTCGTGGTGGTGATTTAATGTTTAACTCACGTGTAAACAAATT 720  
641 TTGCAAATACAGTTGGTTACCATCTAATAAAAATTTTCGAGCACCACCCTAAATTACAAAATTGAGTGCACAATTTGTTTAA 720  
AclI HincII DraI HphI AflIII  
MnlI Hpy8I BssSI BsaAI  
PmlI

721 GTTCTTAATGATGATAAAAGTGTAAACATTTAGCTCTTACAAATGGTCAAACAGTTGAAGGTGATTTATATATTTTCAGC 800  
721 CAAGAATTACTACTATTTTCACAATTTGTAATTCGAGAATGTTTACCAGTTTGTCAACTTCCACTAAATATATAAAGTCG 800  
HphI

801 TATGCCTGTTGATATTATGAAAATTTAATGCCAGATCCATGGGCATCAATGCCTTATTTCAAACAATTAATGGTCTTG 880  
801 ATACGGACAACATAAATACTTTTAAAATACGGTCTAGGTACCCGTAGTTACGGAATAAAGTTGTTAATTTACCAGAAC 880  
ApoI AlwI BsaJI SfaNI Hpy188III  
TspDTI  
BstYI  
BtgI  
NcoI  
StyI  
BstXI

881 AAGGTGTTCCGTGTTATTAATATTCATATTTGGTTTGATCGTAAATTAACACTGTTGATCATTTATTATTTTCACGTTCA 960  
881 TTCCACAAGGACAATAATATAAGTATAAACCAAACCTAGCATTTAATTGATGACAACTAGTAAATAATAAAGTGCAGT 960  
XmnI TspDTI SspI BclI HphI Hpy8I  
AseI

961 CCACCTCTTTTCAGTTTATGCAGATATGTCAACAACATCAAAGAATATCGTGATGATAAAAAGTCAATGTTAGAATTAGT 1040  
961 GGTGAAGAAAGTCAAATACGCTCTATACAGTTGTTGTTAGTTTCTTATAGCACTACTATTTTTCAGTTACAATCTTAATCA 1040  
HincII Hin4I BpmI Hin4I  
Hpy8I Hin4I Eco57MI  
Hpy188III Hin4I

1041 TTTTGCTCCAGCAAAGAATGGATTGGTCGTCAGATGAAGAATTTATGCTGCTACAATGACAGAATTAGAACGTTTAT 1120  
1041 AAAACGAGGTCGTTTCTTACCTAACAGCAGGTCTACTTCTTAAACGACGATGTTACTGTCTTAATCTTGCAAATA 1120  
Hin4I Hpy188III Hin4I AclI  
Hin4I BbvI Hin4I  
XcmI MboII  
TspDTI

1121 TCCCAACAGAAGTTCGTGCAGATCAATCAATGGCAAAAATTCCTAAATACAAAGTAGTAAAACTCCACTTCTGTTTAT 1200  
1121 AGGTTGTCTTCAAGCAGTCTAGTTAGTTACCGTTTTAAGAATTTATGTTTCATCATTTTTGAGGTGAAAGACAATA 1200  
AloI BsgI PsiI  
ApoI

1201	AAATCAACAGCTGGTCGTGAAAAATCCGTCCAACACAACGTTACCAATTTCAAATTTTATCTTGCAGGTGATTATAC	1280
1201	TTTAGTTGTCGACCAGCACTTTTAAAGGCAGGTTGTGTGGCAAGTGGTTAAAGTTTAAAAATAGAACGTCCACTAATATG	1280
	MspA1I ApoI HphI Hpy8I ApoI	
	PvuII AclI MmeI	
	Hpy188III AarI	
	TspGWI BspMI	
1281	AAAACAAAAATACCTTGCATCTATGGAAGGTGCAGTATTTTCAGGTAAACTTGTAAGTGAAGCTATTGTTGAAGATTGGT	1360
1281	TTTTGTTTTTATGGAACGTAGATACCTTCCACGTCATAAAAGTCCATTTGAACATTGACTTCGATAAACAACCTCTAACCA	1360
	HphI SfaNI Hpy8I Eco57I	
	BsgI Eco57MI	
1361	CTGCTCGTGGTGTACTTTCATCAGCAGCATCACGTCAACCTGCTTTAGCTGCTGCTGGTGTAGTAGGTAGAGTAGGTTCT	1440
1361	GACGAGCACCACAATGAAGTAGTCGTCGTAGTGCAGTTGGACGAAATCGACGACGACCACATCATCCATCTCATCCAAGA	1440
	MboII BmgBI BspMI PsrI MboII	
	BssSI BbvI MwoI	
	TspDTI BbvI HpyF10VI	
	SfaNI	
	HincII	
	Hpy8I	
	BbvI	
1441	TCTGATTGGGCACGTTGGCTTCAACCTGTAGGTGCTATTGCTGGTGGTTGTAAAGATTATAAAGATCATGATGGTGATTA	1520
1441	AGACTAACCCGTGCAACCGAAGTTGGACATCCACGATAACGACCACCAACATTTCTAATATTTCTAGTACTACCACTAAT	1520
	PsrI SfcI PsiI BspHI	
	Bme1580I Hpy188III	
	Bsp1286I MslI	
1521	TAAAGATCATGATATTGATTATAAAGATGATGATGATAAATAATGTTAGCTAGTCCTTTCGCATTAGACAGTAAAGCATC	1600
1521	ATTTCTAGTACTATAACTAATATTTCTACTACTACTATTTATTACAATCGATCAGGAAAGCGTAATCTGTCAATTCGTAG	1600
	PsiI BspHI PsiI	
	HphI	
	Hpy188III	
1601	ATTAGGTCGTGGTGTGCTGCTCGTCTGTTCTCGTGCACCTCGTGGTTTATTAACAGTAGCAGCAATTGTTACTCCTGCTG	1680
1601	TAATCCAGCACCACGACGAGCAGCAACAAGAGCAGTGGAGCACCATAATGTCATCGTCGTTAACAATGAGGACGAC	1680
	BbvI BssSI Bme1580I MnlI MfeI BbvI SfcI	
	SfaNI ApaLI DraIII BpuEI	
	Hpy8I	
	BsiHKAI	
	Bsp1286I	
	BssSI	
1681	TAGATTCTCAAGATGTTCCATCTCCAAGTCCATTACCTAAAAACGTAATCGTATTTTACAGACAAAGATGGTGTTCGT	1760
1681	ATCTAAGAGTTCTACAAGGTAGAGGTTCCAGGTAATGGATTTTTGCATTAGCATAAAAATGCTGTTTCTACCACAAGCA	1760
	Hin4I Hin4I	

	Hin4I		Hin4I	
	SmlI			
	Hpy188III			
1761	ATTCAAGCTATGCCAGTAGACTATGGTTTTTCGTGCAGGTGCAGGACGTTTATATCAAGATCATTATGGTGAAATCCAAA			1840
1761	TAAGTTCGATACGGTCATCTGATACCAAAAGCAGTCCACGCTCTGCAAAATATAGTTCTAGTAATACCACCTTTAAGGTTT			1840
	BsrI	AarI	BsgI BsgI MslI ApoI	HphI
	AccI	BspMI	Hpy188III	
	Hpy8I			
1841	ATCTGTTTGGGAATTAGCTTCTTTAAATTTTAAACCGAATTAGATCAAATGCGTCATTCATTCCGTCATAACCCATATT			1920
1841	TAGACAAACCCTTAATCGAAGAAATTTAAATTTGTGCTTAATCTAGTTTACGCAGTAAGTAAGGCAGTATTGGGTATAA			1920
	XcmI	DraI DraI	HgaI TspDTI	
		ApoI	TspGWI	
1921	ATCGTGAATTATACGCTCGTAACCCGCCAAAACTTTACTCGAGAAATTAATTTGTCGTAGGTCAAGCTATGGCAAAT			2000
1921	TAGCACTTAATATGCGAGCATTTGGGAGGTTTTTGAATGAGCTCTTTAATTTAACAGCACATCCAGTTCGATACCGTTTA			2000
	Hpy188III	MnlI XhoI		
2001	GGTTTAGGAAAAGTAGATGAATTATTAGAAAAATTTGGTTTATTACCAGAATTCAAACCTTTACCTAGTTGGAGTCCAGA			2080
2001	CCAAATCCTTTTCATCTACTTAATAATCTTTTTTAACCAATAATGGTCTTAAGTTTGGAAATGGATCAACCTCAGTCT			2080
		TspDTI	EcoRI SfaNI	Hpy188III
2081	TGCATTAGCAGAATTCGATGAAATTAAGATAAACTTTCAAATTAACAATTTGTAACGAAGCAGTAGCACGTCGTGAAG			2160
2081	ACGTAATCGTCTTAAGCTACTTTAATTTCTATTTGAAAGTTTTAATTGTTAAACATTCGCTTCGTCATCGTGCAGCACTTC			2160
	PleI	ApoI FallI	TspDTI FallI	BmgBI
	MlyI	EcoRI		DraIII
	BfrBI			Hpy188III
	NsiI			
2161	CAGCACGTATTGCTGCTGATGGTGATATGGAAGCTACACCAATTCAGTTAACTTCCTTTTTTAGCTTTATGTGGGTT			2240
2161	GTCGTGCATAACGACGACTACCACTATACCTTCGATGTGGTTAACGTCATTTGAAGGAAAAATCGAAATACAACCCAA			2240
	BsaAI	HphI MfeI		
	BstAPI			
	MwoI			
	HpyF10VI			
	BbvI			
2241	TTAGATGTAGTATATGATAAACGTCCAATTCAAAAATTTGGGACTTGAACTGTTGCTCGTATTCCATATTTTCGCATA			2320
2241	AATCTACATCATATACTATTGTCAGGTTAAGTTTTTAAAACCATGAACTTTGACAACGAGCATAAGGTATAAAGCGTAT			2320
		ApoI		

2321	TATCTCAATTCCTCATCTTTACGAATCATTAGGTTTTGGCGTGCTGGTGCTGAATTACGTAAAAATCATTGCTGAAG	2400
2321	ATAGAGTTAAGAAGTAGAAATGCTTAGTAATCCAAAAACCGCACGACCAGACTTAATGCATTTTAAAGTAAAACGACTTC	2400
	TspDTI Cac8I TspDTI	
	MboII BsaAI	
	SnaBI	
	ApoI	
2401	AATGGAATGAACCTTCATCACTTACAAATTATGGAATCATTAGGTGGTGATCAGGCTTGGTTGATCGTTTTTTAGCAGAA	2480
2401	TTACCTTACTTGAAGTAGTGAATGTTAATACCTTAGTAATCCACCAGTCCGAACCAAATAGCAAAAAATCGCTTT	2480
	TspDTI Eco57I BclI HphI	
	MboII Eco57MI	
	TspDTI	
2481	CATGCAGCTGTATTATATTACTGGTTATTAATTGCTTTTTATTAGTTTCACCAAAGTTGCTTATAATTTTATGCAACG	2560
2481	GTACGTCGACATAATATAATGACCAATAATTAACGAAAAATAAATCAAAGTGGTTTTCAACGAATATTAATAATACGTTGC	2560
	BstAPI BbvI BsrI HphI PsiI AflIII	
	MwoI MspAII AseI	
	HpyF10VI	
	NspI	
	PvuII	
2561	TGTTGAACATCATGCTGCTGATACATACTGTGAATTTTAGAATCAAATAGAGAATTATTAGCTTCTATCCACCACCAG	2640
2561	ACAACCTGTAGTACGACGACTATGTATGACACTTAAAAATCTTAGTTTATCTCTTAATAATCGAAGATAAGGTGGTGGTC	2640
	BbvI ApoI BsrI	
2641	TTGTTGCACTTAATTATTATAGAAATCAAGATTTATACTTATTGATTCCTTTTCAAACCTCATCAAAGGCTCAGGTGTT	2720
2641	AACAACGTGAATTAATAATATCTTTAGTTCTAAATATGAATAAACTAAGAAAAGTTGAAGTAGTTTCCGAAGTCCACAA	2720
	Hpy188III TspDTI	
	Eco57I	
	Eco57MI	
2721	CAACGTCGTCAGATTGTAATACACTTCTTGACGTTTTTATTAATGTACGTGATGACGAACTTGAACATGTAGCAACAAT	2800
2721	GTTGCAAGCAGGCTAACATTATGTGAAGAACTGCAAAAAATAATACATGCACTACTGCTTGAACCTTGTACATCGTTGTTA	2800
	Hpy188III Hpy188III AseI BsaAI AflIII	
	PciI	
	NspI	
2801	GTTTGCTATGCAAAATGAGGAAATGCTAAACAACCTGCATTTGGTAGAGGTTACCAGGTCAGAAAGACCACCTTACAA	2880
2801	CAAACGATACGTTTTACTCCTTTAACGATTTGTTGAACGATAACCATCTCCAAGTGGTCCAGGCTTCTGGTGGAAATGTT	2880
	MnlI MnlI Hpy8I Hpy188III MboII	
	HphI SexAI BbsI BslI	
	FalI	
2881	TGGAAGATTATAAGATCATGATGGTGATTATAAAGATCATGATATTGATTATAAAGATGATGATGATAAATAA	2954
2881	ACCTTCTAATATTTCTAGTACTACCACTAATATTTCTAGTACTATAACTAATATTTCTACTACTACTATTTATT	2954
	FalI BspHI PsiI BspHI PsiI	
	PsiI Hpy188III HphI	
	MboII Hpy188III	
	MslI	