

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

“UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS DE PCR PARA EL SUB-
CLONAMIENTO DE FRAGMENTOS DE
LEPTOSPIRA DE UNA BIBLIOTECA EN LAMBDA”

PABLO DAVID ROJAS MENCIAS

Para la obtención del título *Baccalaureus Scientiae* en Biotecnología,
subespecialización en Microbiología
Quito, Mayo, 2007

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Utilización de técnicas de PCR para el subclonamiento de fragmentos de
Leptospira de una biblioteca en Lambda**

Pablo David Rojas Mencias

Gabriel Trueba Piedrahita, DMV, M.Sc., Ph.D.
**Director de Tesis y Miembro del Comité de
Tesis**

.....

Maria de Lourdes Torres Proaño, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

.....

Venancio Arahana Bonilla, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

.....

Hugo Valdebenito Millings B.S., Ph.D.
**Decano del Colegio de Ciencias Biológicas
y Ambientales**

.....

Quito, mayo de 2007

(C) Derechos de Autor

Pablo David Rojas Mencias

2007

Abstract

The interest of pathogenic microbial genomics has focused in the identification of genes present in virulent bacteria strains and absent in the avirulent counterparts. Genomic libraries from bacteriophage Lambda and a differential hybridization process have been used in order to achieve this goal, however the main challenge with this approach remains on the possibility of obtaining to obtain high quality DNA, suitable for sequencing.

This study aimed to resolve this problem by using a two steps PCR procedure, based on the combination of specific primers, such as T7 and T3, and a non specific one called BC740. The genomic products obtained were cloned through bacterial transformation via Invitrogen vectors and finally sequenced.

After DNA sequencing and analysis, data revealed rich similarities to *E.coli*'s genome, suggesting that PCR took place on the *E.coli*'s chromosome present on the Lambda extracts.

Resumen

El interés por entender la genómica de los microorganismos patógenos se ha enfocado en la identificación y el estudio de los genes presentes en estos y de cierta forma ausente en los microorganismos que no causan enfermedad. Para este propósito se emplearon bibliotecas genómicas con ADN de *Leptospira* procedentes del bacteriófago Lambda y técnicas de hibridación diferencial. Una de las complicaciones que presentan las bibliotecas genómicas es la dificultad en la obtención de fragmentos de ADN secuenciable.

El presente trabajo describe una técnica basada en PCR que resolvería este problema. Se realizó un proceso de amplificación con dos etapas de PCR con primers específicos T7 y T3, además de un primer corto e inespecífico llamado BC740. Posteriormente se colocaron estos productos de la amplificación en vectores comerciales pCR de Invitrogen que fueron introducidos en *E.coli* competentes. Finalmente se secuenciaron los insertos y se obtuvieron las secuencias de los fragmentos amplificados previamente con PCR.

Al analizar los resultados, se pudo observar que los primers no amplificaron ninguna secuencia esperada, sino que por el contrario, se obtuvieron secuencias muy similares a genes de *E.coli*. Los resultados de este estudio sugieren que las amplificaciones correspondieron a ADN presente en el cromosoma bacteriano de *Escherichia coli*.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El Fago Lambda como vector para la construcción de bibliotecas genéticas	1
1.2. Métodos de Amplificación de ADN	2
1.3 Métodos de Clonación	3
1.4 <i>Leptospira</i> Patógena y <i>Leptospira biflexa</i>	4
1.5. La <i>Leptospirosis</i>	5
1.6. Genómica de la <i>Leptospira</i>	6
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo General	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. ÁREA DE ESTUDIO	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5.1. Materiales	9
5.1.1. Bacterias	9
5.1.2. Medios	9
5.1.3. Kit de Extracción y Purificación de ADN para Secuenciamiento	10
5.1.4. Kit de PCR	10
5.1.5. Plásmidos	10
5.1.6. Primers	11
5.1.7. Reactivos	11
5.1.8. Vectores	11
5.2. Métodos	12

5.2.1. Walking PCR	12
5.2.2. Selección de segmentos amplificados por Walking PCR	13
5.2.3. Ligación del producto del Walking PCR al vector	14
5.2.4. Transformación bacteriana	14
5.2.5. Siembra de colonias seleccionadas en Agar Nutriente	16
5.2.6. Extracción de plásmido	16
5.2.7. Corte del plásmido	17
5.2.8. Identificación de Insertos	18
5.2.9. Purificación de ADN Plasmídico para Secuenciamiento	18
5.2.10. Liofilización y Secuenciamiento	20
5.2.11. Análisis de las Secuencias	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Amplificación de Clones con Walking PCR	22
6.2. Transformación de Bacterias	22
6.3. Identificación del Inserto en el Vector después del Corte	22
6.4. Visualización de los Insertos de las Colonias Seleccionadas.	23
6.5. Análisis de las Secuencias para pLLB1	24
6.6. Análisis de las Secuencias para pLLB2	27
6.7. Análisis de las Secuencias para pLLB4	28
6.8. Análisis de las Secuencias para pLLB5	30
7. DISCUSIÓN	31
7.1. Utilización de Walking PCR para la Amplificación de Clones de una Biblioteca en Lambda	31
7.2. Ligación de los Productos de PCR al Vector	33
7.3. Transformación Bacteriana	34

7.4. Purificación de los Plásmidos Recombinantes procedentes de las Colonias Seleccionadas	34
7.5. Análisis de las Secuencias Obtenidas	35
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
9. BIBLIOGRAFÍA	39
10. FIGURAS	41
11. TABLAS	50
12. ANEXOS	51

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Mapa del bacteriófago Lambda Dash II	41
Figura 2. Mapa del vector comercial pCRII, Invitrogen, USA, utilizado para clonar los productos de la amplificación del clon 1	42
Figura 3. Mapa del vector comercial pCR2.1, Invitrogen, USA, utilizado para clonar los productos de la amplificación de los clones 2, 4 y 5	43
Figura 4. Ladder de 1kb, Invitrogen, USA, utilizado para calcular el tamaño de las secuencias amplificadas y los insertos	44
Figura 5. Electroforesis de las amplificaciones realizadas con T7, T3 y BC740 mediante Walking PCR del clon 1 de una biblioteca de <i>L. biflexa</i> en Lambda Dash II	44
Figura 6. Electroforesis de Walking PCR realizado en los clones 1, 2, 3, 4 y 5	45
Figura 7. Gráfica de la posición correcta para el ensamblaje de las columnas de precipitación/tubos de recolección en el kit S.N.A.P.	45
Figura 8. Electroforesis de la digestión del plásmido pCRII extraído de las colonias transformadas con apariencia blanca, lactosa negativas.	46
Figura 9. Electroforesis de los plásmidos recombinantes pCRII seleccionados con los insertos deseados después de la purificación con S.N.A.P.	47
Figura 10. Electroforesis de los plásmidos recombinantes pCR 2.1 y digeridos con EcoR1 procedentes de las colonias transformadas seleccionadas.	48
Figura 11. Electroforesis de la purificación con S.N.A.P. de los vectores recombinantes pCR2.1 con los insertos seleccionados.	49
Tabla1: Resumen de resultados generales del experimento.	50

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados del Blast realizado para pLLB1 secuenciado con el primer SP6.	51
ANEXO 2. Resultados del Blast realizado para pLLB1 secuenciado con el primer SP6, con las especies en las que se encontró similitudes.	53
ANEXO 3: Resultados del Blast realizado para pLLB1 secuenciado con el primer M13F.	58
ANEXO 4: Resultados del Blast realizado para pLLB1 secuenciado con el primer M13F, con las especies en las que se encontró similitudes.	60
ANEXO 5: Secuencias de pLLB1 con el primer SP6.	65
ANEXO 6: Secuencias de pLLB1 con el primer M13F.	67
ANEXO 7: Resultados del Blast realizado para pLLB2 secuenciado con el primer M13F.	69
ANEXO 8: Resultados del Blast realizado para pLLB2 secuenciado con el primer M13F, con las especies en las que se encontró similitudes.	70
ANEXO 9: Secuencias de pLLB2 con el primer M13F.	73
ANEXO 10: Resultados del Blast realizado para pLLB4 secuenciado con el primer M13F.	75
ANEXO 11: Resultados del Blast realizado para pLLB4 secuenciado con el primer M13F, con las especies en las que se encontró similitudes.	77
ANEXO 12: Secuencias de pLLB4 con el primer M13F.	82
ANEXO 13: Secuencias de pLLB5 con el primer M13F.	84
ANEXO 14: Resultados del Blast realizado para pLLB5 secuenciado con el primer M13F.	86

ANEXO 15: Resultados del Blast realizado para pLLB5 secuenciado con el primer M13F, con las especies en las que se encontró similitudes. 88

1. INTRODUCCION

1.1. El Fago Lambda como Vector para la Construcción de Bibliotecas Genéticas

El fago Lambda es utilizado actualmente como vector para almacenar por largo tiempo y de una manera estable segmentos de ADN. Así mismo se lo usa como un vector para la clonación y multiplicación de este ADN. El bacteriófago cumple un ciclo lítico en las bacterias que infecta, clonando de esta manera la información que lleva dentro (Lodish, 2001). El bacteriófago Lambda inyecta el ADN linearizado a la bacteria *E.coli* el momento de la infección. Una vez adentro, el ADN adquiere una naturaleza circular. En un principio esta molécula se replica según el método *Theta* y se parece mucho a la replicación de ADN plasmídico. Mientras se da la replicación, las colas y las cabezas vacías son producidas para posteriormente ensamblarse y causar lisis celular. Así mismo el fago Lambda puede tener una relación lisogénica con la bacteria. El fago inserta su genoma en el cromosoma bacteriano, un represor inhibe el ciclo lítico y el ADN del fago se mantiene en forma de profago (Dale, 2004). El bacteriófago Lambda ha sido un buen candidato para ser comercializado y utilizado en la tecnología del ADN recombinante. Un ejemplo de eso es el bacteriófago comercial Lambda Dash II provisto por la empresa Stratagen. Este fago permite el almacenamiento de grandes segmentos de ADN que pueden ser sub clonados posteriormente. El mapa del Lambda Dash II ofrece así mismo secciones promotoras T7 y T3 para la generación de sondas y posibles sitios de amplificación como de corte como se puede observar en la Figura 1. El vector Lambda Dash II contiene así mismo genes que le permiten ser selectivo para virus recombinantes. Cuando se ubica un inserto deseado en el fago, éste es capaz de crecer en una cepa bacteriana

específica (Lisógeno del fago P2). De lo contrario se mantiene sin crecimiento (Stratagen, 2007).

En el caso de que se necesite clonar segmentos más grandes de ADN, se pueden utilizar otros vectores. Entre ellos se encuentra el cósmido con una capacidad de almacenamiento de 45 kbs, el Fago P1 con capacidad de alojar segmentos de 100 kbs, el cromosoma artificial bacteriano (BAC) cuya capacidad de alojamiento asciende a las 300 kbs y el YAC (cromosoma artificial de levadura) con una capacidad límite de 1000 Kbs del inserto (Lodish, 2001).

1.2. Métodos de Amplificación de ADN

Actualmente el método más empleado para la amplificación y estudio de ADN es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR permite obtener una gran cantidad de copias de un segmento de ADN o un gen deseado. Además permite seleccionar específicamente un lugar determinado dentro de la cadena de ADN, con el fin de obtener muchas copias del mismo. De esta manera se amplían las posibilidades de futuros trabajos moleculares basados en el ADN seleccionado. En el caso de que se conozca la secuencia de las bases en la región que precede a los segmentos deseados, la amplificación de éstos se vuelve un proceso más fácil y accesible, basado netamente en la elaboración de los primers complementarios a la región conocida. Se debe especificar un set de temperaturas específicas para cada cebador o primer a ser utilizado. La reacción en cadena de la polimerasa es considerada un estándar, sin embargo tiene una tasa de incorporación de errores con una frecuencia de 1×10^{-4} por ciclo debido a una carencia de actividad de exonucleasa por parte de la *Taq* polimerasa (Perera et al, 2002). Una variedad del PCR es el Walking PCR, en la cual se utilizan 2 sets o etapas de amplificación. La primera amplificación se realiza con un “primer”

conocido y específico para una secuencia particular y la segunda amplificación utiliza el mismo “primer” más otro inespecífico y más corto. El “primer” inespecífico, utilizado en la segunda amplificación, debe ser rico en nucleótidos A y T para aumentar la posibilidad de que se pegue al azar y en forma indiscriminada. El objetivo principal de la segunda amplificación es aumentar el número de fragmentos procedentes de la primera etapa de PCR mediante el uso de “primers” inespecíficos (Johnson, 1997). El Walking PCR tiene la capacidad de amplificar múltiples secuencias de ADN a partir de sitios no específicos pero dentro de segmentos conocidos. Esto permite conocer y obtener la secuencia de regiones a las cuales sería muy difícil acceder de la forma tradicional, debido a que éstas se encuentran a una distancia muy grande de los primers específicos (Johnson, 1996). Esta técnica ha demostrado ser efectiva para una posterior transformación y clonación de los productos en vectores comerciales (Ej. pCRII y pCR2.1 ver Figuras 2 y 3 respectivamente), debido a que produce segmentos de tamaño óptimo para la ligación. Para poder secuenciar los productos de la amplificación, se deben seguir una serie de pasos como son la transformación bacteriana, cultivo bacteriano y extracción plasmídica.

1.3. Métodos de Clonación

Hay diversos métodos de clonación de segmentos de ADN amplificados mediante PCR, entre ellos está el uso de vectores comerciales como es el caso de los vectores TA y TOPO (Sambrook, 2001).

Los productos de PCR que se quiere clonar deben contar con extremos “pegajosos”, los cuales son el resultado del PCR en su última etapa. Estos extremos son bases que no presentan sus bases complementarias al fin de la cadena amplificada. Además de eso, presentan homología con los extremos

pegajosos del plásmido comercial o de cualquier estructura molecular que haya sido escindida con la misma enzima de restricción. En el caso de los vectores utilizados, estos presentan bases "T", en el extremo, homólogas con las bases en los extremos de las secuencias amplificadas. A continuación se insertan en un vector, en este caso un plásmido bacteriano. Una vez introducido el plásmido recombinante dentro de una bacteria, ésta se encarga de clonar la información que se encuentra dentro de ella, aumentando logarítmicamente la cantidad de plásmidos a medida que crece la colonia bacteriana (Karp, 1996).

1.4. *Leptospira* Patógena y *Leptospira biflexa*

Las *Leptospiras* pertenecen a una morfología bacteriana denominada "espiroqueta". Las espiroquetas se caracterizan por tener paredes flexibles y de forma helicoidal. Existen cinco géneros de espiroquetas de los cuales solo 3 presentan una amenaza para la salud desde el punto de vista microbiológico. Estos tres géneros bacterianos patógenos son *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*. Se caracterizan por ser Gram negativas y poseen flagelos periplásmicos que se insertan en la célula subterminalmente. La rápida motilidad de las espiroquetas se puede atribuir a esta estructura. En el caso particular de la *Leptospira*, ésta puede presentar estructuras con apariencia de ganchos en los dos extremos de la bacteria. Su tamaño promedio es de 1 μm de ancho y hasta 20 μm de largo. Son aerobias estrictas y su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 28 y 30°C. Se dividen así mismo en dos biotipos, las patógenas, como el caso de la *Leptospira interrogans sensu lato*, y la saprofítica *Leptospira biflexa sensu lato* (Brook, 2004).

1.5. La *Leptospirosis*

La leptospirosis es una enfermedad que puede ser asintomática, en la que la bacteria se aloja principalmente en los riñones y es eliminada a través de la orina. Existen algunas serovariedades adaptadas a especies animales: canícola en el perro, pomona en cerdos y hardio en bovinos. En el caso del humano, la infección se puede dar por algunas de las serovariedades de la bacteria. Por lo general la infección ocurre en el humano cuando entra en contacto con orina infectada. La bacteria puede ingresar a través de la piel y alcanzar el torrente sanguíneo. Posteriormente infecta varios tejidos, teniendo una preferencia por los riñones, el hígado, las meninges y conjuntivas. Los síntomas se caracterizan por fotofobia, dolores de cabeza, dolor muscular, fiebre y escalofrío (Volk et al, 1996). La leptospirosis se puede controlar mediante tratamientos con penicilina, estreptomicina o tetraciclina. Así mismo existen vacunas elaboradas a base de bacterias muertas para crear inmunidad en animales domésticos como los perros (Brook, 2004).

La leptospirosis puede manifestarse tanto de forma esporádica como epidémica. Así mismo, lugares como plantaciones de caña, arroz, minas, alcantarillas y basureros, son lugares propicios para contraer la enfermedad (Salud Ambiental, 2005). La leptospirosis fue descrita por primera vez por Weil en 1886 y la primera vez que se pudo identificar estos microorganismos fue en 1907 por Stimson a partir de un tejido renal infectado. Para 1915 la bacteria fue cultivada por un par de científicos japoneses (Braselli, 2007).

En lo que respecta al Ecuador, la leptospirosis es un problema endémico que puede causar brotes a raíz de fenómenos naturales caracterizados por lluvias

torrenciales como es el ejemplo del fenómeno del niño en 1998. En ese año se reportaron 338 casos y 19 muertes (PAHO, 1999).

1.6. Genómica de la *Leptospira*

Se conoce muy poco acerca del genoma de la leptospira en relación a la patogenicidad de ésta. Sin embargo, un estudio reciente revela cierto tipo de relación entre la expresión de genes y el cambio en la temperatura durante el cultivo. La especie bacteriana *L.interrogans* fue sometida a crecimiento a 28°C y 37°C. Entre las 2 temperaturas se observó una diferencia en la expresión de 106 genes. Entre los genes se logró identificar algunos con actividad para la síntesis de pared celular, biogénesis, hemolisina, proteínas de stress, tráfico (intracelular y secreción), reguladores transcripcionales, quimotaxis, almacenamiento de información, flagelo, y metabolismo (Jin-Hong et al , 2006).

Así también, un estudio realizado para determinar genes presentes en *L. interrogans sensu lato* y ausentes en *L. biflexa sensu lato*, demostró la presencia 9 genes que codifican para proteínas funcionales, 12 genes que codificaban para proteínas desconocidas, uno que codificaba para repeticiones ricas en leucina y otro para una proteína externa de membrana. Los clones fueron hibridados en una prueba Dot Blot para identificar los clones positivos. La secuencia final de ADN fue obtenida mediante secuenciamiento (He P et al 2004).

Otro estudio reveló que de los dos cromosomas presentes en *Leptospira*, el cromosoma dos de *L. biflexa* es significativamente más pequeño que el de las *Leptospiras* patógenas. Aparentemente eso se debe a la ausencia de los genes de la biosíntesis de la cianocobalamina en *L.biflexa*. Así mismo se demostró la ausencia de los genes que codifican lipoproteínas LipL32 y LipL41 en *L.biflexa*. El

estudio se realizó en base a secuenciamiento y una posterior búsqueda de las secuencias con BLAST (Bulach et al, 2005).

En el presente estudio se aplicaron metodologías de ADN recombinante para recuperar el ADN de *L. biflexa* almacenado en una biblioteca generada en Lambda. El método utilizado consistió en la amplificación de estos fragmentos mediante Walking PCR y su posterior clonación mediante transformación bacteriana. Posteriormente, los insertos fueron extraídos de las bacterias transformadas para ser secuenciados y comparados mediante una búsqueda en GenBank con la ayuda de la herramienta Blastn.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Utilización de PCR para obtener segmentos de ADN secuenciables de una biblioteca en Lambda.

2.2. Objetivos Específicos

- Fragmentar el inserto de *Leptospira biflexa* ubicado dentro del bacteriófago Lambda mediante Walking PCR.
- Secuenciar los fragmentos e identificar mediante BLASTn las secuencias.

3. JUSTIFICACIÓN

La amplificación y subclonación mediante Walking PCR de los genes de *L. biflexa* almacenados en el fago Lambda se justifica por el interés de conocer los genes presentes en ésta. Si bien se conocen algunos de los genes de la leptospira patógena, no se conoce mucho acerca de los genes presentes en *L. biflexa* y ausentes en patógena (He P et al 2004). La fuente de las muestras (Espinosa, 2006) afirma que estos clones fueron sometidos a un proceso de

hibridación con ADN de leptospira patógena. Algunos de los que no hibridaron fueron seleccionados. Estos clones deberían representar los genes que posee *L. biflexa* que no posee leptospira patógena. Si se logra identificar estos genes, se podría entender un poco más acerca del rol que cumplen los genes asociados a la patogenicidad en la leptospirosis. Así mismo, si se los logra ubicar a estos genes, se podría indagar un poco más acerca de por qué los patógenos ya no necesitan estos genes para sobrevivir.

La PCR se manifiesta como una alternativa frente a las enormes dificultades que presenta el hecho de secuenciar insertos que están almacenados dentro de los vectores Lambda de reemplazo. Una de las razones por las cuales el secuenciamiento de estos insertos es casi imposible, es su gran tamaño y el hecho de que se necesita alta cantidad de ADN purificado, lo cual es muy difícil obtener a partir de un Lambda. La única solución viable es la fragmentación del inserto con enzimas de restricción y su posterior subclonación, lo cual toma demasiado tiempo y es muy costoso.

El Walking PCR brinda la oportunidad de amplificar todo el inserto (utilizando primers para los promotores T7 y T3 presentes en los brazos de Lambda) para luego, en una segunda fase, amplificar pequeñas secuencias dentro del inserto extraído, con un primer inespecífico. Si se logra esto, se obtendrá una gran cantidad de segmentos de ADN correspondientes a varios sitios del inserto. De esta forma se puede estudiar más en detalle dichas secuencias y así tener una idea del contenido del inserto, sin necesidad de fragmentarlo y subclonarlo de una forma costosa, por los métodos tradicionales.

El estudio del ADN de *Leptospira*, almacenado en el fago Lambda, se justifica en el contexto del laboratorio de Microbiología de la USFQ, así como en

el ámbito nacional, porque brinda la posibilidad de generar información útil referente a la patogenicidad de esta bacteria. Al conocerse qué genes de *L. biflexa* no están presentes en *Leptospira* patógena se puede indagar acerca de las presiones en el ambiente que llevaron a que estos genes desaparezcan. Esta información puede contribuir al progreso científico en lo referente a la descripción del genoma bacteriano y a la comprensión de la microflora presente en nuestro país.

4. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio fue el Laboratorio de Microbiología y de Biología Molecular de la Universidad San Francisco de Quito.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Bacterias

- Cepa de *Escherichia coli* químicamente competente incluida en el kit TOPO TA con el plásmido pCR2.1 (Invitrogen, USA)
- Cepa One Shot Top 10 Competent Cells (Invitrogen, USA)

5.1.2. Medios

- Agar nutriente: 1.5g de Bacto Agar por cada 100 ml de Cultivo y 30 gr de TSB (Tryptic Soy Broth) por cada 1000 ml de H₂O.
- EDTA (0.5M, pH8): 186.1 g de Sodium EDTA aforar a 800 ml de H₂O y ajustar pH.
- Bromuro de Etidio: 10 mg/ml bromuro de etidio, 1g/100 ml H₂O
- LB: 32 g de LB en 1000 ml de H₂O
- MKL: 50g de MKL en 1000 ml de H₂O

- SOC: 990 ul de medio SOB, 10 ul de Mg⁺⁺ 2M, 1000 ul de glucosa Stock 2M.

5.1.3. Kit de Extracción y Purificación de ADN para Secuenciamiento

- S.N.A.P. Miniprep Kit, A Simple Nucleic Acid Prep (Invitrogen), que contiene:
 - Líquido de lavado final 4X
 - Buffer de lavado
 - Buffer de lisis celular
 - Buffer de resuspensión
 - Buffer integrador/aglutinante/de unión (Binding Buffer)
 - Columnas S.N.A.P.
 - RNasa liofilizada
 - Sales de precipitación
 - Tubos de recolección

5.1.4. Kit de PCR

- PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (0.2ml tubes/plate), (Amersham Biosciences)
- Esferas “Ready to go” con dNTPs y Buffer incluídas en los tubos.
- Tubos de 25ul

5.1.5. Plásmidos

- TA cloning Kit Dual Promoter (pCRII), 4.0 kb (Invitrogen, USA)
 - Buffer de ligación 10X
 - Ligasa T4 DNA
 - Vector pCR II 25 ng/ul
- TOPO TA Cloning Kit (pCR2.1 – TOPO) 3.9 kb (Invitrogen, USA)
 - Cepas *Escherichia coli* One Shot Chemically Competent

- Solución de sales
- Vector pCR2.1

5.1.6. Primers

- T7, 5'd[TAATACGACTCACTATAGGG]3' (Invitrogen, USA)
- T3, 5'd[ATTAACCCTCACTAAAGGA]3' (Invitrogen, USA)
- BC740 5'd [GGAGGGAGGA]3' (University of British Columbia)

5.1.7. Reactivos

- Acetato de Potasio 3M: 296 g de acetato de potasio, 70 ml ácido fórmico 90%, aforar a 1000 ml, pH 4.8
- Agarosa (Invitrogen)
- Agua Estéril Libre de DNAsa-RNAsa (Gibco)
- Buffer de Carga (6X)
- CaCl₂: 60 mM CaCl₂ (pH 7.5)
- Enzima de restricción EcoR1 (Invitrogen)
- Ladder 1Kb 1ug/ul (Invitrogen)
- Ladder TRACK IT 1Kb 1ug/ul (Invitrogen)
- Tris-Borato EDTA (TBE 5X): 54g de Tris Base, 27.5 g de Acido Bórico, 20 ml de 0.5M EDTA (pH 8.0) en 1000 ml de H₂O.
- TE 10X: 100mM TrisCL, 10mM EDTA, pH8, autoclavar

5.1.8. Vectores

- Bacteriófago comercial Lambda Dash II (Stratagen, USA)

5.2 Métodos

5.2.1. Walking PCR

Dada la existencia de cinco clones con ADN de *L. biflexa* almacenados en un vector Lambda, procedentes de un trabajo de investigación anterior del Laboratorio de Microbiología de la USFQ (Espinosa, 2006), se prosiguió a realizar la amplificación de los insertos presentes en éstos. El método seleccionado para esta amplificación fue el Walking PCR (Jonson 1996). Los primers utilizados fueron los siguientes: T7 (Invitrogen) con la secuencia 5'd[TAATACGACTCACTATAGGG]3', T3 (Invitrogen) con la secuencia 5'd[ATTAACCCTCACTAAAGGGA]3' y BC740 (University of British Columbia) 5'GGAGGGAGGA3'. El procedimiento utilizado para la amplificación de las secuencias de ADN se basó en la utilización del kit PuReTaq Ready-To-Go™ (Amersham Biosciences). El kit contiene tubos estériles de 25 ul con esferas liofilizadas en las que se incluye el cloruro de magnesio y los DNTPs. Lo único que se añadió fue el ADN de los clones, el agua y los primers, hasta completar los 25 ul.

El volumen total en las dos reacciones fue de 25 ul. Para la primera reacción se añadieron 22 ul de H₂O, 1 ul de primer T7 ó T3 con una concentración de 25 pmol y 2 ul de ADN de los clones. Para cada clon se realizó una amplificación con T7 y otra con T3 por separado, con el fin de aumentar la posibilidad de observar resultados. No se utilizaron los dos primers juntos, porque se observó en otros estudios que funcionaban perfectamente por separado, generando una buena cantidad de ADN (Johnson, 1997). La amplificación contó con 40 ciclos. Cada ciclo tuvo temperaturas de 94°C por 1 minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto.

Las cantidades de reactivos para la segunda amplificación consistieron en 17,5 ul de H₂O, 5 ul de ADN proveniente de la amplificación anterior, 1 ul de primer T7 o T3 (según corresponda con la amplificación anterior) con concentración de 25 pmol y 2,5 ul de primer BC740 con concentración de 25pmol. Se efectuaron 40 ciclos con las siguientes temperaturas: 94°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto y 72°C por un minuto.

Para el clon 1 se realizaron 5 sets de amplificaciones, o sea 5 muestras del mismo clon que posteriormente fueron corridas en el mismo gel. Para los clones 2, 3, 4 y 5 se efectuaron las amplificaciones únicamente por duplicado, debido a limitaciones en el número de reacciones disponibles en el kit.

5.2.2. Selección de Segmentos Amplificados por Walking PCR

Se preparó un gel de agarosa a una concentración de 0.8% P/V en Tris borato 1X (TBE 1X). Se llevó esta solución hasta su punto de ebullición dentro de un microondas para formar una mezcla homogénea. Se esperó a que bajara de temperatura para añadir bromuro de etidio a una concentración 0.1% V/V. Una vez solidificado el gel, se añadió TBE 1X a la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel. Se retiró la peineta formadora de canales, ubicada en el extremo anterior del gel. Se tomaron 5ul de cada muestra de ADN amplificado y se mezclaron con 2 ul de buffer de carga y se cargó en los pocillos del gel. Así mismo se colocó 1 ul de ladder 1kb (ver Figura 4) mezclado con 2 ul de buffer de carga en el primer posillo del gel. Se dejó correr la electroforesis 3 horas a 65 voltios. Posteriormente se analizó el gel en un transiluminador UV con cámara de fotos digital. Una vez que se identificaron bandas claras e independientes en los geles, se escogieron esas muestras para la subclonación y transformación bacteriana. En el caso del clon 1, la muestra número 4 fue la seleccionada para la

transformación bacteriana (Figura 5). En el caso del clon 2, se escogió la muestra 1, en el caso del clon 3 se escogió la muestra 1, en el clon 4 se escogió la muestra 2 y en el clon 5 se tomó así mismo la muestra 2 (Figura 6). La selección de las muestras sobre sus duplicados se basó netamente en la claridad y tanto uniformidad como independencia de las bandas visibles en el gel.

5.2.3. Ligación del Producto del Walking PCR al Vector

El producto de PCR seleccionado del clon 1 se insertó en el plásmido pCR II y los productos de PCR seleccionados de los clones 2, 3, 4 y 5 se insertaron en el plásmido pCR 2.1. Para el clon 1 se calculó un volumen total de 10ul para la ligación. Se colocó en un tubo 3 ul del producto del PCR fresco, 1ul de 10X Ligation Buffer, 2ul de pCRII vector (25 ng/ul), 3 ul de H₂O destilada y 1 ul de T4 DNA Ligasa. Se dejó la mezcla de ligación a 14°C toda la noche y al siguiente día se precedió a la transformación bacteriana.

Para los clones 2, 3, 4 y 5 se utilizó el protocolo de ligación para el vector pCR2.1. Para un volumen total de 6 ul se utilizó 3 ul de producto de PCR fresco, 1 ul de la solución de sales, 1 ul de H₂O destilada, 1 ul del vector y se mezcló suavemente la mezcla durante 30 minutos sin pipetear a temperatura ambiente. Posteriormente se almacenó a -20°C hasta el día siguiente cuando se continuó con el protocolo de transformación.

5.2.4. Transformación Bacteriana

El método de transformación bacteriana para el clon 1 consistió en inocular por 18 horas una cepa de *Escherichia coli* competente y lactosa negativa en un tubo de 10 ml de medio LB a 37°C. Luego se inoculó 2ml de este cultivo en un matraz con 100 ml de medio LB a baño maría con agitación a 37°C. Se esperó alrededor de 2 horas hasta que el cultivo presentó un grado mayor de turbidez

que fue apreciado visualmente. Posteriormente se transfirió 10 ml del cultivo a 5 tubos de centrifuga. Se centrifugó los tubos por 5 minutos y se los mantuvo en hielo. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con un mismo volumen de solución 60mM CaCl₂ pH 7.5 a temperatura de hielo. Se volvió a centrifugar por 5 minutos y a resuspender el precipitado en el mismo volumen. Después de centrifugar por tres veces, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 200 ul de 60mM CaCl₂. Posteriormente se transfirió a un eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se mantuvo en hielo. A esta mezcla se le añadió 4 ul de la solución con el plásmido comercial pCR II de 4.0 kb que contenía el inserto procedente del Walking PCR. La mezcla con el plásmido se mantuvo en hielo durante 10 minutos para lograr la transformación bacteriana. Luego se realizó un shock de calor a 42°C durante 2 minutos y se colocó la mezcla otra vez en hielo. Posteriormente se añadió 1ml de medio SOC y se dejó incubar por 45 minutos. Para efectuar el crecimiento bacteriano se colocó 100 ul de esta suspensión en cajas Petri con medio MacConkey preparado anteriormente con 50 ug/ml de kanamicina y una capa fina de 80 ul x-gal esparcida sobre el medio sólido. Se dejaron incubar las cajas durante toda la noche a 37°C. Al siguiente día se procedió a identificar las colonias lactosa negativas y resistentes a la Kanamicina. Se sembraron 5 cajas petri en total.

Para los productos de PCR de los clones 2, 3, 4 y 5 ya ligados en el vector pCR2.1 se siguió un protocolo diferente utilizando la cepa bacteriana provista por el KIT. Se adicionaron 2 ul de la reacción de ligación en los tubos identificados como "One Shot Chemically Competent *E.coli*". Se dejó incubar durante 30 minutos y se realizó un "Heat Shock" por 30 segundos a 42°C sin agitación. Los tubos se transfirieron inmediatamente al hielo y se añadieron 250 ul de medio

SOC a temperatura ambiente. Se taparon los tubos fuertemente y se dejaron incubar con agitación a 37° C por una hora. Se sembraron posteriormente 50 ul de cada reacción en cajas Petri con medio MacConkey preparado igual que en el paso anterior. Se sembraron 5 cajas Petri por clon, lo que resultó en un total de 20 cajas petri.

5.2.5. Siembra de Colonias Seleccionadas en Agar Nutriente:

Para la extracción y purificación del plásmido se realizó inicialmente un cultivo de las colonias lactosa negativas y resistentes a la kanamicina. Solo las colonias de apariencia blanca o azul clara fueron seleccionadas como resultado de una transformación eficiente y fueron cultivadas nuevamente, esta vez en cajas Petri con medio AN. Las colonias seleccionadas fueron picadas con un asa estéril y sembradas con el método de estriación en las nuevas cajas Petri. Se las incubó toda la noche a 37°C. Se realizó una siembra total de 25 colonias identificadas como transformadas para el clon 1 y 10 colonias identificadas como transformadas para cada uno de los clones 2, 4 y 5. El clon 3 no presentó colonias transformadas. Un total de 55 cajas Petri fueron sembradas; 25 procedentes dle clon 1, 10 del clon 2, 10 del clon 4 y 10 del clon 5. Cada una de las 55 colonias fue sembrada otra vez en cajas Petri con divisiones con el fin de tener un clon de cada una para efectuar una futura purificación para secuenciamiento de las seleccionadas. Se almacenó un promedio de 10 colonias por caja.

5.2.6. Extracción de Plásmido

Las colonias individuales contenidas en las cajas petri fueron resuspendidas en 5ml de una solución TE estéril. Se tomó 1.5 ml de suspensión bacteriana de cada caja petri y se colocó en tubos Eppendorf estériles.

Posteriormente se centrifugaron las suspensiones por 3 minutos a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 ul de TE estéril. Luego se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente añadir 200 ul de una solución 0.2M NaOH – 1% SDS. Después de mezclar por inversión varias veces se añadió 300 ul de acetato de potasio 5M (pH 4.8) a temperatura de hielo. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 12000 rpm y se transfirió 500 ul del sobrenadante a tubos Eppendorf estériles. Se evitó tomar el precipitado blanco. Posteriormente se precipitó el plásmido añadiendo 1 ml de etanol 100% a temperatura de hielo. Las muestras se incubaron durante 10 minutos en hielo antes de ser centrifugadas durante 5 minutos a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con alcohol 75%, descartándose el sobrenadante cada vez después de haberse centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. Luego se dejaron secar las muestras hasta que queden libres de alcohol y se resuspendió el pellet de cada una con 20 ul de TE estéril para poder almacenarlo. Se realizaron 25 extracciones procedentes de las 25 colonias del clon 1 y apenas 5 extracciones de cada 10 colonias de los clones 2, 4 y 5. Un total de 41 extracciones.

5.2.7. Corte del Plásmido

La digestión del plásmido se realizó con la enzima EcoR1 y fue necesaria únicamente para identificar qué muestras contenían el inserto. Las muestras que presentaron el inserto fueron seleccionadas para ser secuenciadas. Por esta razón se hizo una extracción por duplicado de los plásmidos. Para realizar el corte se tomaron tubos estériles y se aplicó 7 ul de agua destilada, 10 ul de ADN de plásmido con inserto, 2ul de buffer de reacción y 1 ul de enzima EcoR1 en el orden de aplicación indicado. Los tubos se incubaron toda la noche a 37°C. A

continuación se digirieron con EcoR1 las 25 extracciones plasmídicas del clon 1 y 5 extracciones plasmídicas de cada uno de los clones 2, 4 y 5. Se tomaron las muestras 1, 2, 3, 4 y 5 del clon 2, las muestras 2, 3, 4, 5 y 7 del clon 4 y las muestras 1, 3, 4, 5 y 6 del clon 5.

5.2.8. Identificación de Insertos:

Se preparó un gel de agarosa, repitiendo el paso 5.2.2. Se tomaron 5ul de cada muestra de plásmido extraído y se mezclaron con 2 ul de buffer de carga y se colocaron en los posillos del gel. Así mismo se colocó 1 ul de ladder 1kb mezclado con 2 ul de buffer de carga. Se dejó correr la electroforesis 3 horas a 65 voltios. Posteriormente se analizó el gel en un transiluminador UV con cámara de fotos digital. Se corrieron 25 muestras cortadas del plásmido pLLB1 que contenía las secuencias amplificadas del clon 1 y 5 muestras de cada uno de los plásmidos pLLB2, pLLB4 y pLLB5 pertenecientes a los clones 2, 4 y 5 respectivamente. Se seleccionó una muestra de cada clon y se las volvió a correr por duplicado en un gel nuevo. Del clon 1 se corrieron las muestras 20 y 21 en un gel nuevo para determinar cual de las dos muestras presentaba bandas más visibles.

5.2.9. Purificación de ADN Plasmídico para Secuenciamiento:

Gracias al transiluminador UV se pudieron identificar los plásmidos que contenían el inserto. Se localizaron las colonias que contenían los plásmidos con inserto y se procedió a realizar una extracción con el kit S.N.A.P. Miniprep (Invitrogen). Se extrajo una muestra de cada colonia seleccionada. Un total de 4 muestras fueron purificadas. Se tomó la muestra 21 del clon 1, la muestra 4 del clon 2, la muestra 2 del clon 4 y la muestra 4 del clon 5. Este kit provee un ADN de mejor calidad, óptimo para secuenciamiento. Las colonias con los insertos seleccionados se las incubó toda la noche a 37°C y se procedió a resuspenderlas

el día siguiente con 5ml de una solución TE estéril. Se tomó 1.5 ml de suspensión bacteriana de cada caja petri y se las colocó en un tubo Eppendorf estéril. Se centrifugaron los tubos hasta obtener un precipitado blanco. Se resuspendió el pellet en 150 ul de buffer de resuspensión mediante el uso de vortex. Se añadió 150 ul de buffer de lisis celular y se mezcló mediante inversión 5 veces para luego incubar por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron 150 ul de la solución de sales de precipitación y se mezcló por inversión 5 veces hasta lograr una solución homogénea. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se lo colocó en un tubo nuevo al que se le añadieron 600 ul de "Binding Buffer" para mezclar por inversión 5 veces. Esta mezcla se transfirió a una columna de precipitación S.N.A.P. provista por el kit. La columna de precipitación fue previamente colocada dentro de los tubos de recolección como se puede observar en la Figura 7. Se centrifugó el complejo columna/tubo a temperatura ambiente a 1000 x g durante 30 segundos y luego se descartó el líquido resultante localizado en el tubo de recolección. A continuación se añadieron 500 ul de Buffer de lavado a la columna y se centrifugó el complejo columna/tubo de recolección nuevamente a temperatura ambiente y 1000 x g durante 30 segundos. Así mismo se descartó el líquido resultante de la centrifugación contenido en el tubo. Luego se añadieron 900 ul del líquido de lavado final 1X y se centrifugó como en el paso anterior. Luego de descartar el líquido resultante se volvió a centrifugar, pero en esta ocasión a máxima velocidad y durante 1 minuto para secar la resina. Para recuperar el plásmido ubicado en la resina de la columna de precipitación, se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Posteriormente se añadió 60 ul de buffer TE a la columna de precipitación y se dejó incubar durante 3 minutos a temperatura

ambiente. Luego se centrifugó la columna con el tubo nuevo a temperatura ambiente y máxima velocidad por 30 segundos. El resultado fueron 60 ul de TE con plásmido de alta calidad listo para secuenciamiento. Las muestras fueron almacenadas a -20°C primero para luego ser liofilizadas y enviadas por correo al lugar de secuenciamiento.

5.2.10. Liofilización y Secuenciamiento:

Una muestra fue seleccionada por cada clon con el inserto deseado. Las muestras se nombraron con las siglas pLLB seguidas por el número del clon lambda que se utilizó para el Walking PCR. El nombre obedece a “p” de plásmido, “LL” de leptospira y “B” de biflexa.

Los tubos Eppendorf en los que se encontraban las muestras fueron modificados para poder colocarlos dentro de una centrifugadora al vacío. Las tapas de los tubos fueron perforadas con una aguja varias veces. Los tubos se colocaron posteriormente dentro de tubos Falcon cuyas tapas tenían agujeros también. Se escogieron tubos Falcon porque su diámetro y alto calzaban perfectamente en los agujeros de la centrífuga. Los tubos fueron centrifugados y la bomba de vacío estuvo prendida por 4 horas. Al cabo de las 4 horas se sacaron los tubos y se sustituyeron las tapas agujereadas por tapas nuevas.

Los plásmidos liofilizados fueron enviados por correo para ser secuenciados a MacroGen Corea en el caso de pLLB1 y a MacroGen USA en el caso de pLLB2, pLLB4 y pLLB5. Para la muestra pLLB1 se escogieron los primers de secuenciamiento SP6 (5'GGATTATTCATACCGTCCCA3') y M13F (5'TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC3'), presentes y útiles para secuenciamiento del plásmido comercial TA pCRII de 4 kb. Para los plásmidos pLLB2, pLLB4 y pLLB5 se escogió únicamente el primer M13F debido a que el

primer SP6 no se encuentra presente en el plásmido comercial pCR 2.1 – TOPO de 3.9 kb utilizado para secuenciar estas muestras. Las muestras se demoraron alrededor de 2 semanas en llegar a los laboratorios de MacroGen en Corea y una semana en llegar a los laboratorios en Estados Unidos donde fueron secuenciadas. Se demoraron 1 semana en ser secuenciadas a partir de la fecha de llegada e inmediatamente fueron enviadas las secuencias correspondientes.

5.2.11. Análisis de las Secuencias

Las secuencias obtenidas fueron recibidas mediante correo electrónico en formato PDF y TXT. Los documentos PDF brindaron información valiosa referente a la calidad del secuenciamiento con gráficos claros en los que cada base se presenta con un color diferente y un pico bien definido. Los documentos receiptados en formato TXT son archivos de texto con las secuencias puras. Los archivos de texto fueron importados al programa CLC Combined Workbench sugerido por el National Center for Biotechnology Information para realizar búsquedas de secuencias en las bases de datos del centro. El programa tiene la capacidad de realizar una búsqueda BLAST directamente desde el ordenador del investigador, sin necesidad de ingresar al Website del NCBI.

Para el análisis de las secuencias se identificaron primeramente las secuencias de los primers T7 y T3 utilizados para amplificar las secuencias ubicadas en el bacteriófago Lambda DASH. Posteriormente se ubicaron las secuencias de los primers de secuenciamiento y a partir de la última letra del primer de secuenciamiento y en adelante se hizo un búsqueda BLAST para determinar el origen o la similitud de las bases amplificadas en la base de datos del NCBI.

6. RESULTADOS

6.1. Amplificación de Clones con Walking PCR

La amplificación del clon 1 de *L. biflexa* almacenados en el fago Lambda, mediante el método de Walking PCR, resultó en la presencia de bandas en 3 de las 5 muestras. La muestra número 4, del clon 1, presentó bandas claras con tamaños aproximados de 1.6 kb, 1 kb y 500 bases. Esta muestra fue seleccionada por la claridad y diferenciación entre sus bandas para proceder a la transformación bacteriana (ver Figura 5 y Tabla 1). Así mismo presentaron bandas visibles todas las muestras de los clones 2, 3, 4 y 5 razón por la cual una muestra de cada clon fue seleccionada para la ligación (ver Figura 6 y Tabla 1).

6.2. Transformación de Bacterias.

Después de la ligación y la transformación, se observaron 25 colonias transformadas (blancas), a partir del clon 1, en las 5 cajas Petri estriadas. El clon 3 no presentó ninguna colonia transformada en ninguna de sus 5 cajas Petri. En lo que respecta a los clones 2, 4 y 5 se observaron un promedio de 6 colonias transformadas (blancas) por cada caja Petri. Cada clon tenía un total de 5 cajas Petri estriadas. Se observó por lo tanto un promedio de 30 colonias transformadas aproximadamente por cada clon.

6.3. Identificación del Inserto en el Vector después del Corte

Todas las muestras pertenecientes a los 5 clones, presentaron bandas fuertes a la altura de las 4000 pares de bases, pertenecientes al plásmido linearizado. Apenas 2, de las 25 colonias, presentaron un inserto en el vector procedente del clon 1. Este inserto obedece a un tamaño de 1 kb aproximadamente y pertenece a las colonias número 20 y 21 (ver Figuras 8 y 9).

De las 5 extracciones y digestiones realizadas a partir del clon 2, la muestra uno presentó un banda entre las 500 y 1000 pares de bases, la muestra dos presentó una banda tenue alrededor de las 3000 pares de bases, la muestra tres presentó una banda entre las 500 y 1000 bases muy similar a la presente en la muestra uno, la muestra 4 presentó una banda clara y bien definida a la altura de las 1000 pares de bases y la muestra 5 presentó una banda difusa a una altura aproximada de las 3000 pares de bases (ver Figura 10).

En lo que respecta al clon 4, la muestra 2 presentó una banda de un tamaño aproximado a las 500 pares de bases. La muestra 3 presentó una banda muy pequeña de más o menos 300 pares de bases y otra bastante grande cercana a las 3000 pares de bases. Las muestras 4, 5 y 7 presentaron así mismo bandas grandes cercanas a las 3000 pares de bases (ver Figura 10).

Por último el clon 5 presentó bandas de un tamaño aproximado a las 500 pares de bases en las muestras 1, 4, 5 y 6. La muestra 3 no presentó bandas. (ver Figura 10).

6.4. Visualización de los Insertos de las Colonias Seleccionadas.

Las muestras digeridas con EcoR1, que presentaron un inserto del clon 1, fueron corridas en un nuevo gel en el que fueron visualizadas con mayor facilidad y nitidez. Las dos muestras presentaron una banda de 1000 pares de bases aproximadamente. La muestra número 21, procedente del plásmido pLLB1, presentó una banda más brillante, razón por la cual fue seleccionada sobre la muestra 20, también procedente del plásmido pLLB1, para la extracción con S.N.A.P. Es importante mencionar que tanto en las dos muestras del clon 1, como en las muestras de los clones 2, 4 y 5, se observaron bandas claras en el gel de

4000 pares de bases. Estas bandas se atribuyeron al plásmido cortado y linearizado (ver Figuras 9 y 11)

Las muestras 4, 2 y 4 seleccionadas de los clones 2, 4 y 5 respectivamente (ver paso 5.2.9.), mostraron bandas muy bien definidas en el segundo gel. En este gel fueron corridas por duplicado y se pudo observar una banda clara correspondiente a las 1000 pares de bases en el clon 2, y bandas claras de 500 a 1000 pares de bases en los clones 4 y 5 (ver Figura 11).

En los 4 casos (extracciones plasmídicas digeridas y corridas en otro gel, procedentes de los plásmidos recombinantes pLLb1, pLLB2, pLLB4 y pLLB5), las bandas fueron lo suficientemente claras como para justificar la presencia de un inserto en el vector y proceder a la secuenciación de los mismos (ver Figuras 9 y 11).

6.5. Análisis del las Secuencias para pLLB1

El plásmido recombinante pLLB1 proveniente del clon 1 fue secuenciado con los primers SP6 y M13F. La secuencia obtenida para la secuenciación con SP6 fue la siguiente:

```

NNNNCCACTATAGCTTGGACGAGCTCGGATCCCTAGTAACGGCCGCC
AGTGTGCTGGAATTCGGCTTATTATGCTGAGTGATATCCCGGACCCTTTTTGC
TCAAGAGCGATGTTAATTTGTTCAATCATTGGTTAGGAAAGCGGATGTTGCG
GGTTGTTGTTCTGCGGGTTCTGTTCTTCGTTGACATGAGGTTGCCCGTATTC
AGTGTCGCTGATTTGTATTGTCTGAAGTTGTTTTTACGTTAAGTTGATGCAGAT
CAATTAATACGATACCTGCGTCATAATTGATTATTTGACGTGGTTTGATGGCCT
CCACGCACGTTGTGATATGTAGATGATAATCATTATCACTTTACGGGTCCTTT
CCGGTGATCCGACAGGTTACGGGGCGGCGACCTCGCGGGTTTTTCGCTATTT
ATGAAAATTTTCCGGTTTAAGGCGTTTCCGTTCTTCTTCGTCATAACTTAATGT

```

TTTTATTTAAAATACCCTCTGAAAAGAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAAGCGA
 GCTTTTTGGCCTCTGTCGTTTCCTTTCTCTGTTTTTGTCCGTGGAATGAACAAT
 GGAAGTCAACAAAAGCAGCTGGCTGACATTTTCGGTGCGAGTATCCGTACC
 ATTCAGAACTGGCAGGAACAGGGAATGCCCGTTCTGCGAGGCGGTGGCAAG
 GGTAATGAGGTGCTTTATGACTCTGCCGCCGTCATAAAATGGTATGCCGAAA
 GGGATGCTGAAATTGAGAACGAAAAGCTGCGCCGGAAGGTTGAAAAACTGC
 GGCAGGCCAGCGAGGCAGATCTCCAGCCAGGAACTATTGAGTACGAACGCC
 ATCGACTTACGCGTGCGCAGGC

Las secuencias resultantes de la secuenciación con SP6 presentan pequeñas secuencias incompletas del vector pCRII comenzando más o menos en la base número 20 del secuenciamiento. Estas secuencias se pueden apreciar desde la base 20 hasta la 68. Las secuencias se encuentran entrecortadas y entre ellas omiten una o dos bases en comparación con el manual del producto. A partir de la base 68 se puede observar la secuencia completa del primer T7 procedente del proceso de amplificación mediante Walking PCR. A partir de la base 87 se encuentra la mayor parte de la secuencia. Esta gran región se atribuye al inserto, por ende, son los segmentos amplificados por el primer ubicado y mencionado anteriormente. Esta gran cantidad de bases fueron sometidas a una búsqueda BLASTn a raíz de la cual se obtuvieron los siguientes resultados visibles en los Anexos 1 y 2.

El resultado del BLASTn muestra una gran similitud y un alto puntaje de las secuencias relacionadas con una *E.coli*. Hay una ausencia de secuencias vinculadas a *Leptospira spp.*

En lo que respecta a la secuenciación del plásmido pLLB1 con el primer M13F, se obtuvieron las siguientes secuencias:

NNNNGGCTATCTTGGGCGATGGGCCTCTGATGCATGCTCGAGCGGCCGCA
 GTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGGCTTATTATGCTGAGTGATATCCNGGA
 ACCCTTTTTGCTCAAGGGCGATGTTAATTTGTTCAATCATTGGTTAGGAAAG
 CGGATGTTGCGGGTTGTTGTTCTGCGGGTTCTGTTCTTCGTTGACATGAGGT
 TGCCCCGTATTCAGTGTGCTGATTTGTATTGTCTGAAGTTGTTTTACGTTAA
 GTTGATGCAGATCAATTAATACGATACCTGCGTCATAATTGATTATTTGACGTG
 GTTTGATGGCCTCCACGCGCGTTGTGATATGTAGATGGTAATCATTATCACTT
 TACGGGTCCTTTCCGGTGATCCGACAGGTTACGGGGCGGCGACCTCGCGGG
 TTTTCGCTATTTATGAAAATTTTCCGGTTTAAGGCGTTTCCGTTCTTCTTCGTC
 ATA ACTTAATGTTTTTATTTAAAATACCCTCTGAAAAGAAAGGAAACGACAGGT
 GCTGAAAGCGAGCTTTTTGGCCTCTGTCGTTTCCTTTCTCTGTTTTTGTCCGT
 GGAATGAACAATGGAAGTCAACAAAAGCAGCTGGCTGACATTTTCGGTGCG
 AGTATCCGTACCATT CAGAACTGGCAGGAACAGGGAATGCCCGTTCTGCGAG
 GCGGTGGCAAGGGTAATGAGGTGCTTTATGACTCTGCCGCCGTCATANAATG
 GTATGCCGAAAGGGATGCTGAAATTGAGAACGAAAAGCTGCGCCGGGAGGT
 TGAAGAACTGCGGCAGGCCAGCGAGGCAGATCTCCAGCCAGGAACTATTGA
 GTACGAACGCCATCG

Al igual que en la secuencia obtenida con el primer SP6, estas secuencias muestran secciones del vector pCRII (base 29 hasta base 80) previas a una secuencia completa del primer T7 (base 81 hasta base 100). Usando la secuencia a partir de la base 100 se realizó el BLASTn que dio como resultado secuencias de alta similitud a *E.coli*. El puntaje se puede observar en los Anexos 3 y 4 .

Así mismo es importante mencionar que en los dos casos presentados anteriormente se logró identificar una secuencia *COS site* a la altura de las 400

bases secuenciadas aproximadamente. Esta secuencia *COS site* pertenece a un fago Lambda no comercial.

No se encontró en ninguno de los dos casos, secuencias del vector pCRII que flanqueen el secuenciamiento en su parte inferior. El documento en el que se muestran los picos durante el secuenciamiento determina una secuenciación confiable hasta las 600 bases aproximadamente, como se puede observar en el Anexo 5, para el secuenciamiento con SP6 y el Anexo 6 para el secuenciamiento con M13.

6.6. Análisis de las Secuencias para pLLB2

Las secuencias obtenidas después de secuenciar el plásmido recombinante pLLB2 con el primer de secuenciamiento M13F fueron las siguientes:

TATTTGGACCGATTTTCGGAGATTGGGCCCTCTGAGCATGCTCGAGCGGCCG
 CCAGTGTGATGGATATCTGCA**GAATTCG****CCCTTGA****ATTAAACCCTCACTAAAGG**
GCCACTACTTGGGCAAACCAAAGAGGGATTTTATGACACAAATAATTACGACT
 TAAGAAATCTTCCCAAGTCGGATCCAGAATCCAATGTTTTGCAAGATGTGACA
 CTCCCACCCAAGTTCGAAACCCCGGTCCTTGCCACACCCAAAAATGCAAAAA
 CCCAATACACCGGAATCGACTCCATCCCCGGTGCAGGTTCCCTTACTCAATTC
 AAGAACCACATCCAACCTCCAGTCAAACGCAACTAATCCTTATAGTTTAACTG
 GTTCCCAAATTTACCCATAAACCCACTTACGGGTGAAATTAACGAACAAGCT
 TTGCAAAATCAATTACAGAAAAGCAGACTTAAACAAGAGTTAAAGAAAAACA
 AAAAGAAGAATTTGATGAAGATGCAGTTTATGAGGAACTAAATTCAGAAGGG
 CTTATATCATTTTCTTTTAACTTTACCATTTGCGTTGGGAGCTTCAGCGGCCG
 TTGTTGCTGCATTTGCTGTGAAAAACAATTGTGGGAAGTGCCATTATGATT
 ACCGGTTCTACTGGTCTTTCTGGAACCAATGTATATTTGGACAGACAAAGGTT

GGAAGAACACCGGGAAAAGAAAAACAAGTAGCCGAAGTTTACCCTTGAAGT
 TCAAACGATTCTTCGTTTTTCTCCATCGCATTTCCTTTATCTACAAGTACAAC
 GATTCGAAATGCGAAAGTTCTATATGGAACAACCTTCGTTTTGTAGGTCGGGCG
 TTTTATATTCTATTTCGGATTTTTATCGGTGCGCCATTTTAATTTTAGATTTTGGAT
 TTTTATATCCAGAAGAATGGAAACCCTATGTTACTATTTCAATTCGATCACTGG
 TTACATTTTTTATTTTATACAAATCCCTTCATTTAATCTTTCACAACAAAAGATG
 GAGAGAGATTTATCTCTTCACAAAATAAACTTATCATTTTGTGAATGTTAGGT
 TTAAATTTCTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATCAAGGGCAAATTCCACCCCCTG
 GCCGGCCGTTCTAGGGAACCCAACCTCGGACCAAGCTTGGGTTAATTAGGGTA
 TAATTG

Se puede apreciar una corta secuencia del vector pCR2.1 (desde la base 74) antes de la secuencia completa del primer de amplificación T3 (base 88). Así mismo se puede divisar en la parte inferior de la secuencia (base 1076) otra secuencia completa del primer de amplificación T3. Entre las dos secuencias de T3 está el inserto, el cual fue sometido a un BLASTn que dejó como resultado puntajes muy bajos para ser atribuidos a cualquier género o especie. Los puntajes se pueden observar en los Anexos 7 y 8. El gráfico de los picos del secuenciamiento muestra una secuenciación confiable hasta las 600 bases aproximadamente, como se puede observar en el Anexo 9.

6.7. Análisis del las Secuencias para pLLB4

Las secuencias obtenidas del secuenciamiento del plásmido recombinante pLLB4 con el primer de secuenciamiento M13F fueron las siguientes:

AAATTAGCCGATACAAGGCGATTGGGCCCTCTGATGCATGCTCGAGCGGCC
 GCCAGTGTGATGGATATCTGCA**GAATTCGCCCTTATTATGCTGAGTGATATCC**
CGAGCCAAAGCGGCACGAGTGTATTTAACACCGCAATCGCCGGAGTCAACAA

AAGCAGGCCAGACAGCAAAAGCATGACAGGCTGGGTATATGTGGACATGAAT
 TAAAACCGTGAGGAAGTTCAAATTTACATACGCATCATGCCACCGCCAAAAACA
 TTGTCAATGGGTGAAAATACGCGATATCCCAGCGGGCGGTATTATCGATTTATA
 TTACTCATTACATAACGCCAATGCTGAAGAGATGATTAGTCTCATCTGATTGTTT
 TTATTGAACTAACACAAATTTACATACGCTTCGTTTCAGTCGAAAAATTTTCATGGT
 CACAGCAAACCTCATATTTCCCGTCTATGCTTTTCAGAGCAATGCATCGCGTCTG
 ATCGATTTTCAGACGTACCACTGACTCTCGAAAGGAGAAGAGGATGACCCAAC
 CGTATGTTTCGTCTTGATAAAAATGATGCTGCCGTTTTGCTTGTTGATCACCAG
 GCTGGTTTACTTTCCCTTGTACGGGATATCACTCAGCATAATAAGGGCGAATT
 CCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTG
 GCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCAAANNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNCNCNNNNNNNTNTCNTNTTTTTTCNTTTT
 CTTTTCTCTTCTCCTCTTCTTCTTCTTTCTCCTTCTTCTCTCCCTTTTTT
 TTTCTCTCTCTCCTTTCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTTTTTT
 CTTCTTTTTTTTTCTTTCTTTCTTTTTTTTTGCCCTTTTCTTCTTCTCTTTCTTT
 CTTCTTTTTTCTTCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCCCTCCCTTTTTCCCTCCTTCC
 TCTCTCCCTTTTCTTCTTTTTTTCTCTCTCCTCCCCTTTTTTCTCTTTTCCCCC
 TTCTCTCTTCTTTTTTCTTTCTTCTTCTTTTTTTTTGTCTCTCTTTCTTT

Al igual que en pLLB2, esta secuencia muestra secciones del vector (base 73 y base 624) flanqueando secuencias exactas del primer de amplificación (base 86 y base 623), en este caso T7. La secuencia entre estos primers es aproximadamente 500 bases y dio como resultado en el BLASTn una gran similitud con secuencias de genes de *E.coli*. Los puntajes se pueden observar en los Anexos 10 y 11 .

El gráfico con los picos del secuenciamiento provisto por Macrogen muestra bases confiables hasta las 800 bases aproximadamente (ver Anexo 12).

6.8. Análisis del las Secuencias para pLLB5

La secuencia obtenida fue la siguiente:

NNGGGGATTANNNNNNCCGATCTAAGGGGACTGGGCCATCTGATGCATGCT
 CGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCA**GAATTCGCCCTTATTATGCTG**
AGTGATATCCCGAGCCAAACCTTCACGAGTGTATTTAACACCGCAATCGCCG
 GAGTCAACAAAAGCAGGCCAGACAGCAAAGCATGACAGGCTGGGTATATGT
 GGACATGAATTAACCGGGAGGAAGTTCAAATTCATACGCATCATGCCACC
 GCCCAAACATTGTCAATGGGTGAAAATACGCGATATCCCAGCGGCGGGATT
 ATCGATTTATATACTCATTCTAACGCCAATGCGGAAGAGATGATTAGTCTC
 ATCTGATTGTTTTTATTGAACTAACACAAATTCATACGCTTCGTTTCAGTCGAA
 AAATTCATGGTCACAGCAAACACTCATATTTCCCGTCTATGCTTTCAGAGCAAT
 GCATCGCGTCTGATCGATTTTCAGACGTACCACTGACTCTCGAAAGGAGAAGA
 GGATGACCCAACCGTATGTTTCGTCTTGATAAAAATGATGCTGCCGTTTTGCTT
 GTTGATCACCAGGCTGGTTTACTTTCCCTTGTACGGA**ATATCACTCAACATAA**
TAAGGGCGAATTCCAGCACAACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCA
 GTACCAAGCTTGGCTTACTCCTGGGCGTAGCTGTTTCCTGTGGGAAATTGTTA
 TCCGCAACAGAGATACGTCGTGCTATTCTATTTATTGGACTACACCATGGTAT
 CATAACAGAGCTATTTATCAAGTTGTAGGGGACATTGATAGAGAAATCTAATA
 AGAGATATGAAGAAAGTATTAGAGGCATAATTGAGCGAGAGGACATNATATTG
 AAAGAGTACGAGGGCAGGTGTGTGATATTAATGAATAGAGACTAATGTTAAGA
 ATCAACCGTGTATAATATTGAGTCTGGATAATGCTGTACAACCATTAGTGTTGT
 CCTTAACGATTATCATGTCTGCTAATTTTCGGAGAATATAAATGTTGTTAGTAT
 TAAAGTTGTGAATGAAAACACTATAGATTGTAGTAGAGGCCACTTACTCGTTCTGA

TGTCCTTTGTCTCTAATCCGTACACTAGATGGAAGGATTGAGAGTGAATTATTG
TATTTACTGACTCGTACTAGCATCTCTTTCTAAATATATATTCTGGTACTTAAAT
GGTAACA

De igual manera que en pLLB4, este secuenciamiento mostró pequeñas secuencias del vector pCR2.1 (base 83 y base 615) a los lados de secuencias completas del vector de amplificación T7 (base 95 y 626). En este caso en particular, las secuencias del T7 y del vector pCR2.1, en la parte final de la secuencia, erraban en una base en la mitad. Los picos no muestran una secuenciación de buena calidad a partir de las 600 bases aproximadamente como se puede observar en el Anexo 13. En lo que respecta a la sección de la secuencia flanqueada por los primers de amplificación, el BLASTn dio como resultado alta similitud con secuencias de *E.coli* como se puede observar en los Anexos 14 y 15.

7. DISCUSION

7.1. Utilización de Walking PCR para la amplificación de Clones de una Biblioteca en Lambda

La razón por la cual se utilizó Walking PCR, fue la de aumentar la posibilidad de amplificación de los insertos de *L. biflexa*, en clones de una biblioteca genómica en vector Lambda. La doble sesión de amplificación tuvo como intención utilizar los promotores T7 y T3 presentes en el Lambda, para generar ADN a partir del inserto y luego, con una segunda amplificación, generar una gran cantidad de hebras de ADN a raíz de sitios inespecíficos. Los resultados sugieren que esto no fue posible. Las secuencias que se amplificaron pertenecen a *E.coli* y no al inserto presente en Lambda.

Como se puede observar en la Figuras 5 y 6, el método de PCR seleccionado dio como resultado varias bandas, confirmando de este modo la capacidad del Walking PCR para amplificar hebras de ADN con primers específicos. No se observó la secuencia del primer inespecífico en ninguno de los plásmidos recombinantes, por lo tanto éste nunca se pegó a la hebra de ADN. Una de las posibles razones puede ser su alto contenido en T y A, que en un principio se creyó que contribuiría a la amplificación. Así mismo, la presencia de los primers específicos T7 ó T3 en las 2 sesiones de amplificación pudieron opacar la actividad del primer BC740.

En lo que respecta a la capacidad de los primers específicos T7 y T3 para amplificar secuencias determinadas, no existe duda acerca de su actividad. Pues se pueden observar sus secuencias al inicio de la región insertada en los plásmidos recombinantes. El primer T7 se puede observar en las secuencias de pLLB1, pLLB4 y pLLB5. El primer T3 manifiesta sus secuencias en los resultados de pLLB2. La razón por la cual T7 se encuentra en mayor proporción, no responde a ningún tipo de clasificación por rendimiento. Simplemente obedece a la decisión del investigador de tomar las muestras amplificadas por T7 en vez de tomar las amplificadas por T3. La decisión se basó netamente en la presencia de un mayor número de bandas o presencia de bandas mejor definidas en el gel, como se puede observar en la Figura 6.

La amplificación fue un éxito en la mayoría de los casos, pero la duda se mantiene con respecto al papel del primer inespecífico BC740 cuyo rol es fundamental para la ejecución del Walking PCR. Este último dato contrasta con el estudio de Johnson en 1997 (Random Primed Gene Walking PCR), en el que

Walking PCR logró amplificar fragmentos de diferentes longitudes, afirmando de este modo la capacidad del primer inespecífico de amplificar secuencias.

7.2. Ligación de los Productos de PCR al Vector

La ligación de los productos de PCR al vector pCR II y pCR 2.1 se pudo verificar después de observar las bandas presentes en el gel (Figuras 9 y 10). Se puede identificar fácilmente la presencia del vector linearizado con tamaños correspondientes a 4 kb y 3.9 kb en el caso de pCRII y pCR2.1 respectivamente. Las bandas presentes con dichos tamaños coinciden en número de bases con la literatura (Invitrogen, 2006). Así mismo, el tamaño de los insertos coincide con el número de bases secuenciadas del mismo. Este número de bases corresponde a la distancia entre los primers encontrados en las secuencias, que así mismo están flanqueados por los extremos donde se prevé el inserto en el vector comercial.

La ligación parece haber funcionado mejor cuando se usó el plásmido pCR2.1 debido a que se observaron más insertos en las colonias transformadas una vez que estas fueron cortadas. En el caso del vector pCRII solo se observaron 2 insertos en 26 colonias transformadas. No está claro cómo el plásmido se volvió a cerrar, sin presentar actividad de beta lactamasa, en las 24 colonias restantes. Esto se puede deber a que las células competentes no pertenecían al KIT, sino que fueron obtenidas por otros medios. Así mismo, se le podría atribuir este resultado a la acción de la enzima ligasa, utilizada en el procedimiento con pCRII. El kit correspondiente al vector pCRII había sido utilizado por varias personas, antes de este proyecto, por lo que algunos componentes estaban agotados. Una vez que se acabaron los reactivos de este kit, se compró el kit correspondiente al vector pCR2.1. Se escogió este kit porque incluía las bacterias competentes y el método de ligación y transformación era

mucho mas sencillo. Los resultados fueron significativamente mejores cuando se observaron las bandas, pertenecientes a los insertos, en el gel (Figura 10) (Invitrogen, 2006).

7.3. Transformación bacteriana

La transformación bacteriana se logró en todos los clones, menos en el número 3. Después de la transformación bacteriana se observó una gran cantidad de colonias blancas. Sin embargo, en el clon 1, no todas las colonias blancas fueron colonias recombinantes. Esto pudo deberse a que el inserto nunca se ligó, y el vector tampoco se cerró después de ingresar a la bacteria. Al no cerrarse se evitó que el gen *LacZ* necesario para el crecimiento de colonias azules se ensamble (Invitrogen, 2004).

En lo referente a la transformación bacteriana, con los clones 2, 4 y 5, la mayoría de las colonias blancas presentaron insertos después de la digestión con EcoR1. Esto indica que el kit con el vector pCR2.1, tuvo un proceso más eficiente de ligación. Tanto el modo de presentación de las bacterias competentes (alícuotas listas) como un protocolo simplificado de ligación, pueden ser la explicación para el contraste en efectividad entre los 2 Kits. (Invitrogen, 2006).

7.4. Purificación de los Plásmidos Recombinantes procedentes de las Colonias Seleccionadas.

La extracción plasmídica efectuada con el kit S.N.A.P, a partir de colonias recombinantes de *E.coli* seleccionadas, resultó en ADN de mejor calidad que el ADN extraído por el método tradicional (ver paso 5.2.6.). Se observaron bandas claras en las Figuras 9 y 11, en contraste con las bandas observadas después de la digestión (ver Figuras 8 y 10). La claridad y definición de estas bandas obedece al estricto procedimiento de purificación de ADN plasmídico diseñado

específicamente para el secuenciamiento. Es evidente que este paso fue indispensable para poder continuar con el proyecto.

7.5. Análisis de las Secuencias Obtenidas

Las secuencias obtenidas a partir de la amplificación y clonación, evidentemente no pertenecen a *L. biflexa* (ver Tabla 1). Una de las hipótesis para que esto haya sucedido se basa en el simple hecho de la amplificación. Los primers T7 y T3 no se pegaron a las secuencias promotoras complementarias en el bacteriófago Lambda. Estas secuencias T7 y T3, presentes en el Lambda, flanquean el sitio donde supuestamente se encontraba el inserto de *L. biflexa*. Se puede demostrar que esto no sucedió cuando se analizan las bases que siguen a los T3 y T7 en las secuenciaciones. Si bien se puede decir que las secuencias de los vectores flanquearon a las secuencias de los primers T7 y T3, no se puede decir que éstas flanquearon al inserto en el Lambda. Las bases que siguen a las secuencias de los primers, en el secuenciamiento no coinciden con las bases que siguen a las secuencias de los primers en el Lambda. Esto quiere decir que los primers de amplificación no se pegaron a las regiones promotoras T7 o T3 en el Lambda, sino que se pegaron a cualquier otra secuencia T7 o T3 presente en las muestras otorgadas. Ahora, la posibilidad de que esto haya sucedido se eleva enormemente cuando se toma en cuenta que las muestras originales, procedentes de un trabajo de investigación anterior, fueron clonadas en *E.coli*. Los clones 1, 2, 3, 4 y 5 fueron el resultado de un proceso de infección de *E.coli* por parte del bacteriófago Lambda con el inserto. Si bien pudo existir el inserto en el bacteriófago, en las muestras de los clones también pudieron existir pedazos de cromosoma bacteriano donde posiblemente se pegaron los primers T7 y T3. La posibilidad de que estos primers se hayan pegado al cromosoma bacteriano de

la *E.coli* infectada, es muy posible, dado que dichas secuencias son comunes en las infecciones por fagos en *E.coli*. No se puede descartar el hecho de que en un pasado, estas bacterias hayan sido víctimas de una infección por un fago con estas secuencias. Se puede concluir por tanto que existieron pedazos de cromosoma bacteriano, además de fagos, en las muestras de los clones 1, 2, 3, 4 y 5. Esto se puede deber a una deficiente purificación del Lambda, posterior a la lisis en las muestras otorgadas.

A pesar de que el Walking PCR funcionó bien para la amplificación (ver Figuras 5 y 6), no se puede decir lo mismo de su rendimiento con primers derivados de fagos, como es el caso de T7 ó T3, el momento de amplificar segmentos un Lambda. Esto se pudo verificar cuando se observó que las secuencias del fago no estaban dentro del plásmido recombinante. El cromosoma bacteriano presentó secuencias T7 y T3 resultado de infecciones anteriores por estos fagos. Otro dato que puede corroborar esta explicación fue la presencia de secuencias *COS site* en los secuenciamientos de pLLB1 tanto con SP6 como con M13F. Los *COS sites* son secuencias presentes en el bacteriófago Lambda no comercial (Dale, 2004). Esta evidencia puede sustentar la teoría de que el T7 y el T3 amplificaron sitios en el cromosoma bacteriano resultado de infecciones por diferentes tipos de fagos (Dale, 2004).

No se pudo determinar el contenido del fago Lambda recombinante. Existe sin embargo una escasa posibilidad de recombinación el momento de la infección lítica y que se hayan insertado genes del cromosoma bacteriano en la región recombinante del fago. En este caso, las secuencias resultantes obedecerían a la amplificación del inserto contaminado.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los primers T7 y T3 funcionaron eficientemente a las dos temperaturas de amplificación.
- No hay evidencia de que el primer BC740 haya amplificado alguna secuencia de ADN.
- El primer BC740 no realizó el Walking PCR.
- Se debe estandarizar un protocolo de PCR solo para el primer BC740.
- Las colonias blancas reflejaron transformación bacteriana, más no, presencia de ADN recombinante dentro del vector.
- La ligación fue más exitosa en el caso del vector PCR 2.1 en comparación con el vector PCR II.
- La extracción plasmídica con S.N.A.P., realizada a partir de colonias transformadas, tuvo como resultado ADN de alta calidad, óptimo para secuenciamiento.
- La liofilización se justificó debido a la ubicación de los laboratorios de secuenciamiento en el exterior. Las muestras liofilizadas pueden mantenerse mayor tiempo y no dependen de la temperatura como lo hacen las muestras suspendidas en solventes.
- Los clones 1, 2, 4 y 5 contenían en la muestra cromosoma bacteriano además de plaquetas de virus.
- La subclonación de insertos bacterianos en el fago Lambda, mediante Walking PCR, no se justifica debido a la falta de secuencias amplificadas de *Leptospira*, a pesar de que sea más barato y más rápido que los métodos tradicionales.

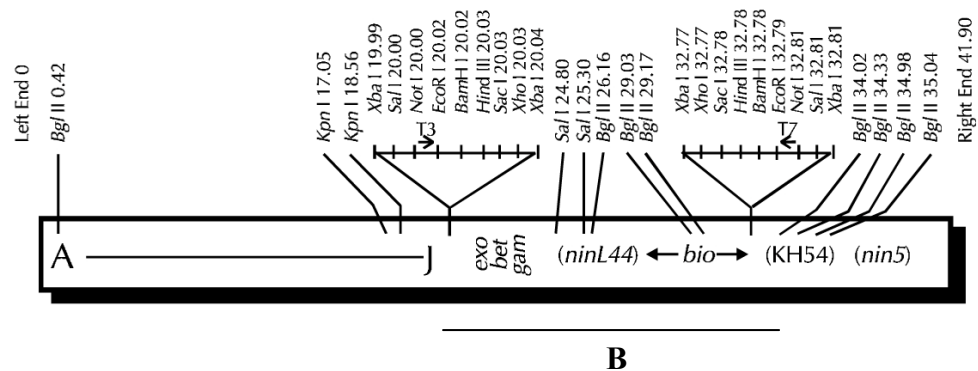
- Así también, se puede concluir que la PCR es un método que puede producir resultados inesperados debido a una gran cantidad de variables.
- Se debe ensayar previamente con el primer inespecífico, para determinar su eficacia, antes de realizar el Walking PCR.
- Para estudios futuros es recomendable no utilizar primers procedentes de fagos que infectan a *E.coli*, como es el caso de T7 y T3, sobre todo si la secuencia de los promotores que flanquean el inserto deseado, coincide con las secuencias de los primers.
- Se deben hacer ensayos, previos al experimento, con los Kits cuya procedencia o utilización previa no está clara, para evitar problemas de rendimiento.
- La disponibilidad de reactivos no puede ser un limitante para la elaboración de un proyecto.

9. BIBLIOGRAFIA

- Braselli, Leptospirosis, Infecto, Uruguay,
<http://www.infecto.edu.uy/revisiontemas/tema25/leptospirosis.htm>
- Bulach, D.M., Seemann, T., Mcgrath, A., Kuczek, E., Coppel, R.L., Davies, J.K., Rood, J.I., Alt, D.P., Zuerner, R.L., Adler, B. 2005. Abstract www.ars.usda.gov , The genome of *Leptospira biflexa*,
- Dale, Park, 2004, Molecular genetics of Bacteria, 4ta edición, Willey, UK
- Espinosa, 2006, Análisis de clones obtenidos de una genoteca de *Leptospira biflexa* en el vector Lambda, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales USFQ, Ecuador
- García, Perera, Tormo, 2002, Ingeniería Genética, Editorial Síntesis, España
- Gebhardt, Hammarskjöld, Kadner, Volk, 1996, Medical Microbiology, 5ta edición, Lippincott Raven, EEUU
- He P, Zhang XY, Guo XK, Hu BY, Huang XT, Yang Y, Zhao GP. Abstract Pubmed : Identification and analysis of genes present in *Leptospira interrogans* serovar lai but absent in *L. biflexa* serovar monvalerio, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2004 Dec;**36**(12):832-9
- Invitrogen, 2002, 1Kb Ladder info booklet, EEUU
- Invitrogen, 2002, A Simple Nucleic Acid Prep Instruction Manual, EEUU
- Invitrogen, 2004, TA Cloning Kit Dual Promoter (pCRII) Instruction Manual, EEUU
- Invitrogen, 2006, TOPO TA Cloning User Manual, EEUU
- Jin-Hong Qin, Yue-Ying Sheng, Zhi-Ming Zhang, Yao-Zhou Shi, Ping He, Bao-Yu Hu, Yang Yang, Shi-Gui Liu, Guo-Ping Zhao and Xiao-Kui Guo, Genome-wide transcriptional analysis of temperature shift in *L. interrogans* serovar lai strain 56601, *BMC Microbiology* 2006, **6**:51
- Johnson, Trueba, 1996 Random Primed Gene Walking PCR, *BioTechniques*, **21**:20 (July, 1996)

- Johnson, Old, Trueba, Saint Girons, 1997, A *cheA* *cheW* operon in *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, *Res, Microbiology*, **1997**, 148, 191 – 200.
- Karp, 1996, Biología Celular y Molecular, 4ta edición, McGraw Hill, Mexico
- Lodish, 2000, Biología Celular y Molecular, 4ta edición, Editorial Panamericana, España
- Madigan, Martinko, Parker, Biología de los Microorganismos, 10ma edición, Pearson Prentice Hall, España
- PAHO, 1999, El Fenómeno del Niño en el Ecuador, <http://www.paho.org/Spanish/Ped/EINino-cap10-Ecuador.pdf>
- Russel, Sambrook, 2001, Molecular Cloning, 3ra edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, EEUU
- Stratagen, 2007, Lambda DASH II Undigested Vector Kit Instruction Manual, EEUU

10. FIGURAS



Lambda DASH II Multiple Cloning Site Regions

[sequences shown: 19.99–20.04kb (top sequence) and 32.77–32.81kb (bottom sequence)]

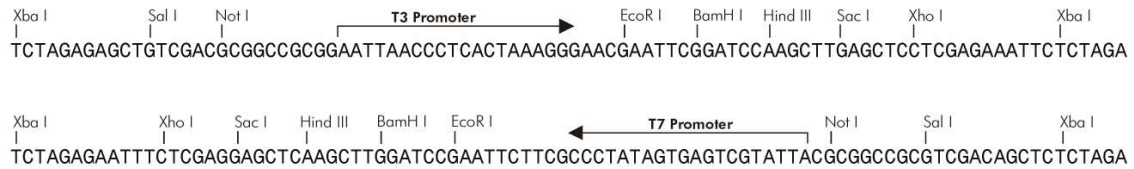


Figura 1: Mapa del bacteriófago Lambda Dash II Stratagen, USA (Stratagen, 2007). B indica la región donde se ubica el inserto recombinante.

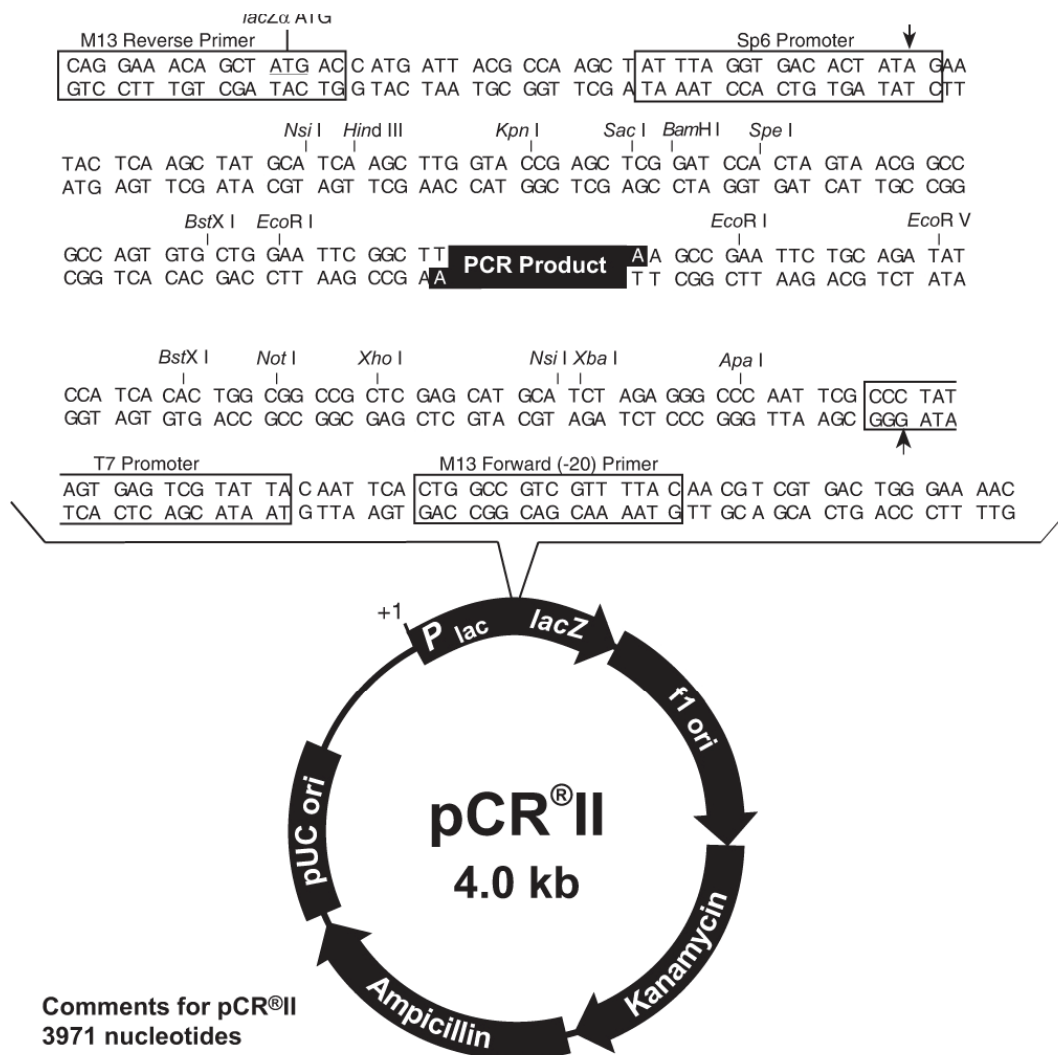
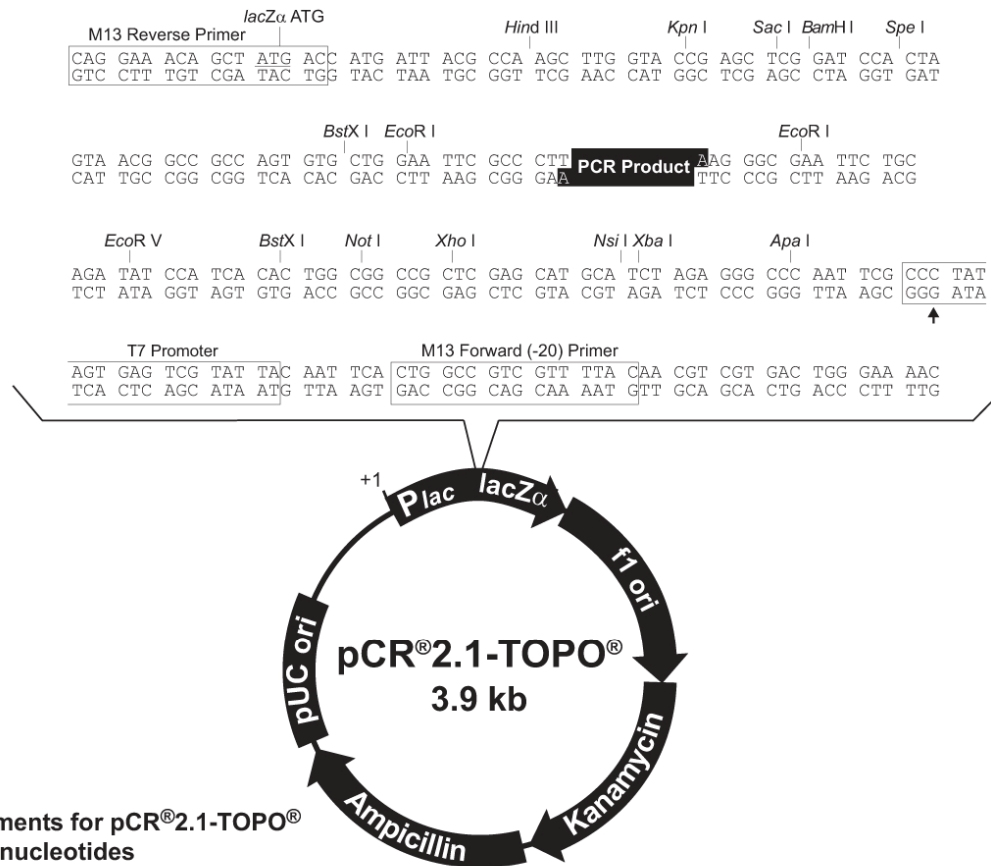


Figura 2: Mapa del vector comercial pCRII, Invitrogen, USA utilizado para clonar los productos de la amplificación del clon 1(Invitrogen, 2004).



LacZα fragment: bases 1-547
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-357
 T7 promoter/priming site: bases 364-383
 M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
 f1 origin: bases 548-985
 Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
 Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
 pUC origin: bases 3136-3809

Figura 3: Mapa del vector comercial pCR 2.1 Invitrogen, USA, utilizado para clonar los productos de la amplificación de los clones 2, 4, y 5 (Invitrogen, 2006).

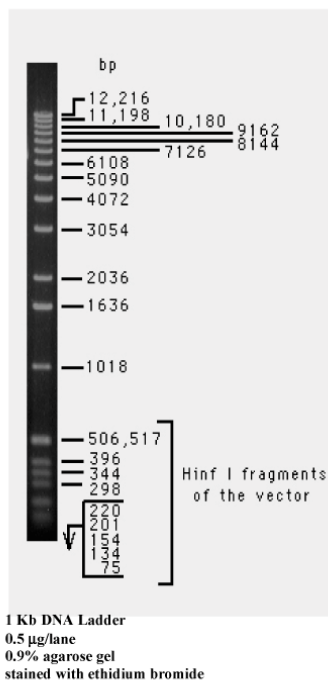


Figura 4: Ladder de 1 kb, Invitrogen, USA utilizado para calcular el tamaño de las secuencias amplificadas y los insertos (Invitrogen, 2002).

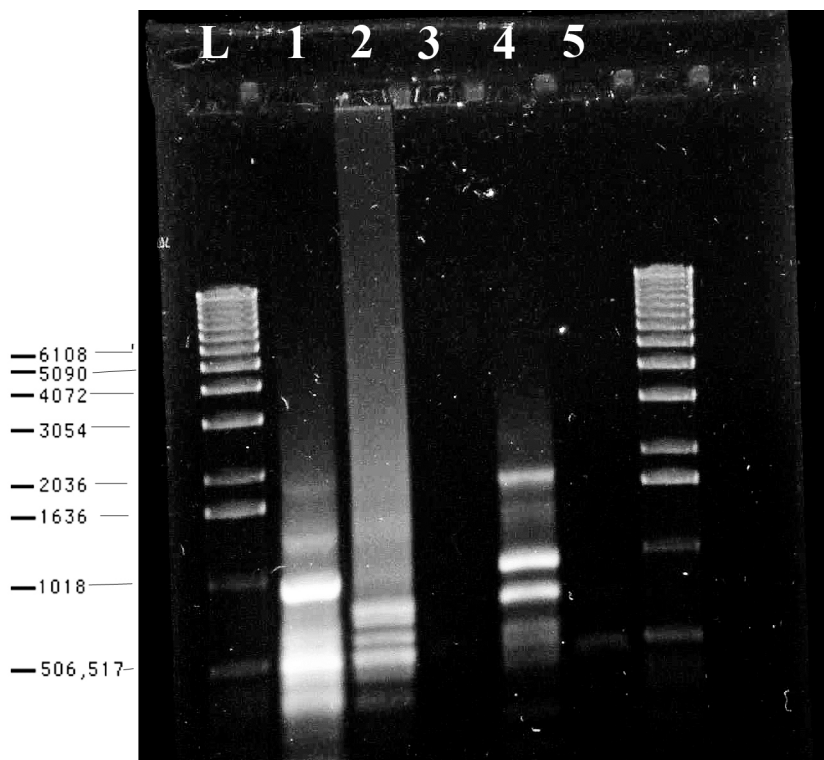


Figura 5: Electroforesis de las amplificaciones realizadas con T7, T3 y BC740 mediante Walking PCR del clon 1 de una biblioteca de *L. biflexa* en Lambda Dash II. Se puede apreciar amplificación en todas las muestras menos en la número 3. (L= Ladder 1kb, 1-5 muestras amplificadas a partir del clon 1).

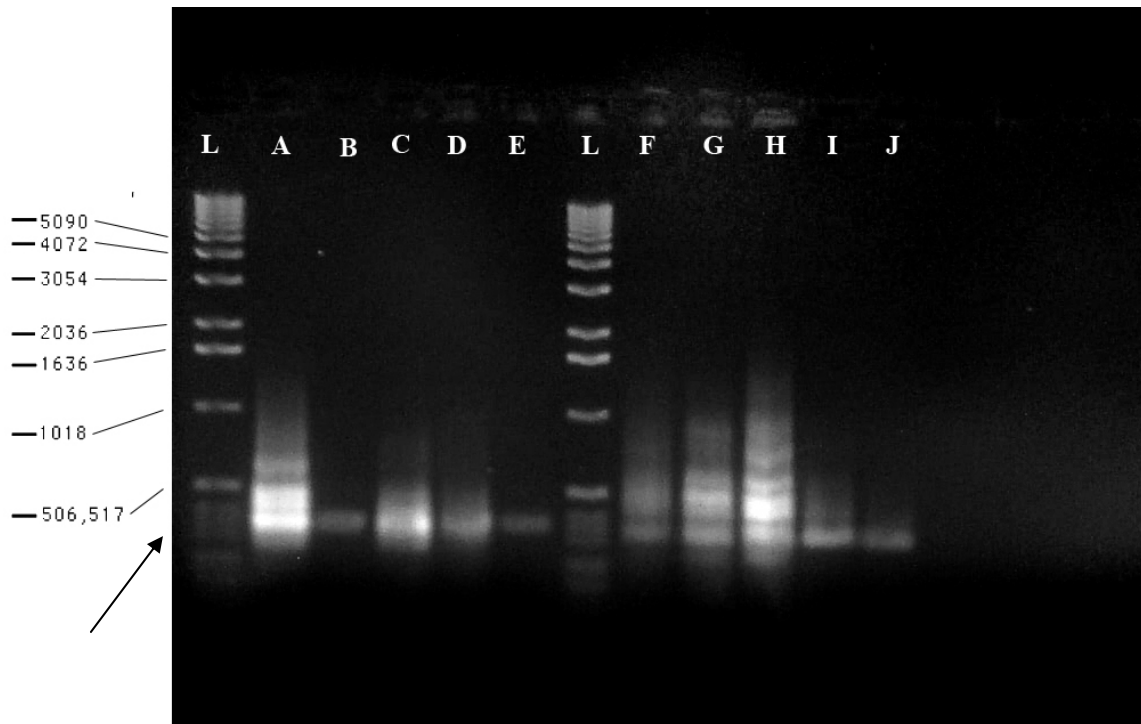


Figura 6: Electroforesis del Walking PCR realizado en los clones 1, 2, 3, 4 y 5. Los clones presentaron bandas en todos los casos después del PCR. Aquí se puede apreciar las bandas obtenidas a partir de la amplificación con T7, BC740 y T3, BC740. (L= Ladder, A-E corresponden a los clones 1-5 amplificados con T7, BC740 y F-J corresponden a los clones 1-5 amplificados con T3, BC740).



Figura 7: Gráfica de la posición correcta para el ensamblaje de las columnas de precipitación/tubos de recolección en el kit S.N.A.P (Invitrogen, 2002).

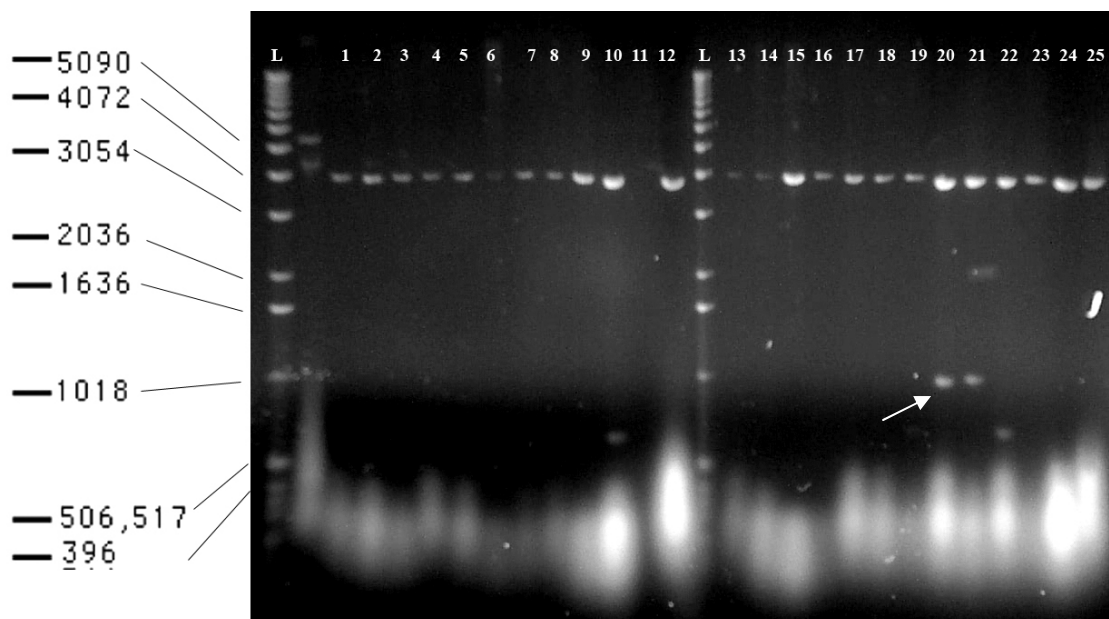


Figura 8: Electroforesis de la digestión del plásmido pCR11 extraído de las colonias transformadas con apariencia blanca, lactosa negativas. Se puede observar claramente la presencia del vector cortado de un tamaño de 4 kb aproximadamente. Así mismo solo se observan insertos en las colonias número 20 y 21 con un tamaño aproximado de 500 bases. (L= Ladder, 1-25 = Colonias transformadas).

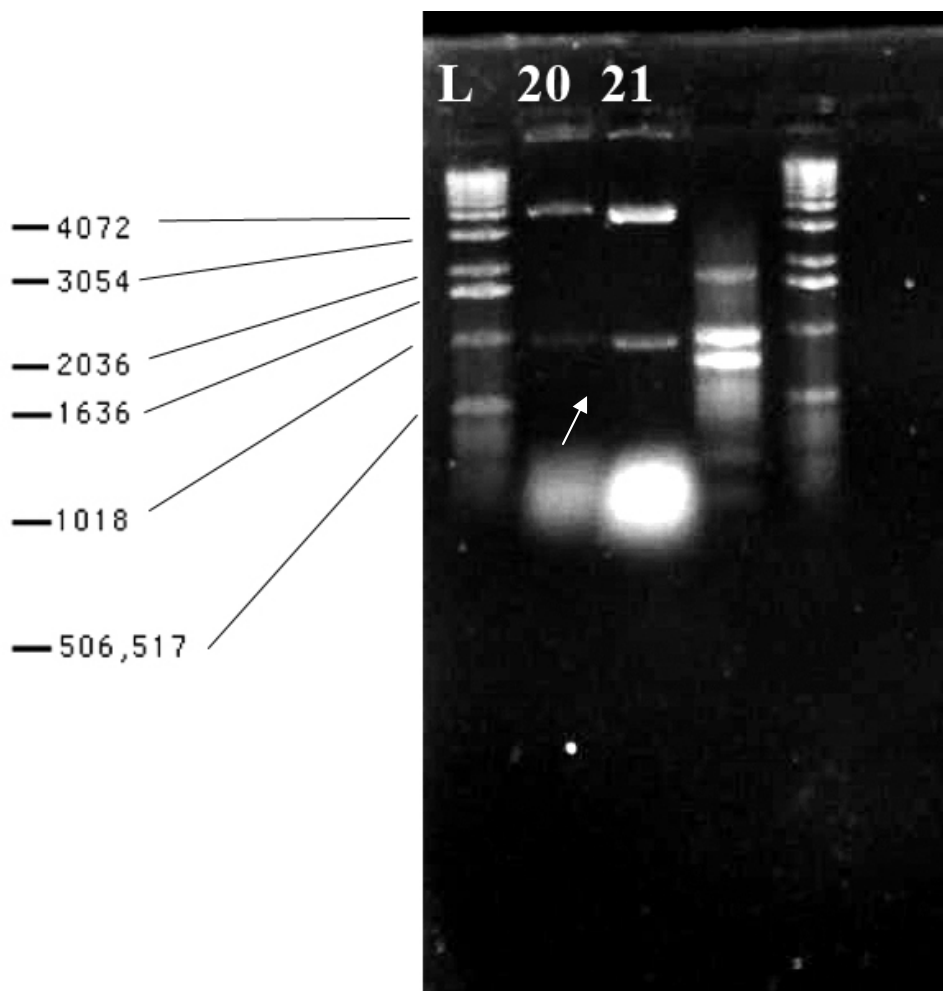


Figura 9: Electroforesis del plásmido recombinante pCRII seleccionados con los insertos deseados después de la purificación con S.N.A.P. Las colonias 20 y 21 que presentaron los insertos deseados fueron purificadas y ahora se puede observar en los 2 casos bandas claras correspondientes al plásmido linearizado con un tamaño de 4 kb aproximadamente y los insertos con tamaños aproximados a 1 kb. (L= Ladder, 20 y 21 son las colonias transformadas con los insertos digeridos seleccionados. 20 pasaría a ser posteriormente pLLB1).

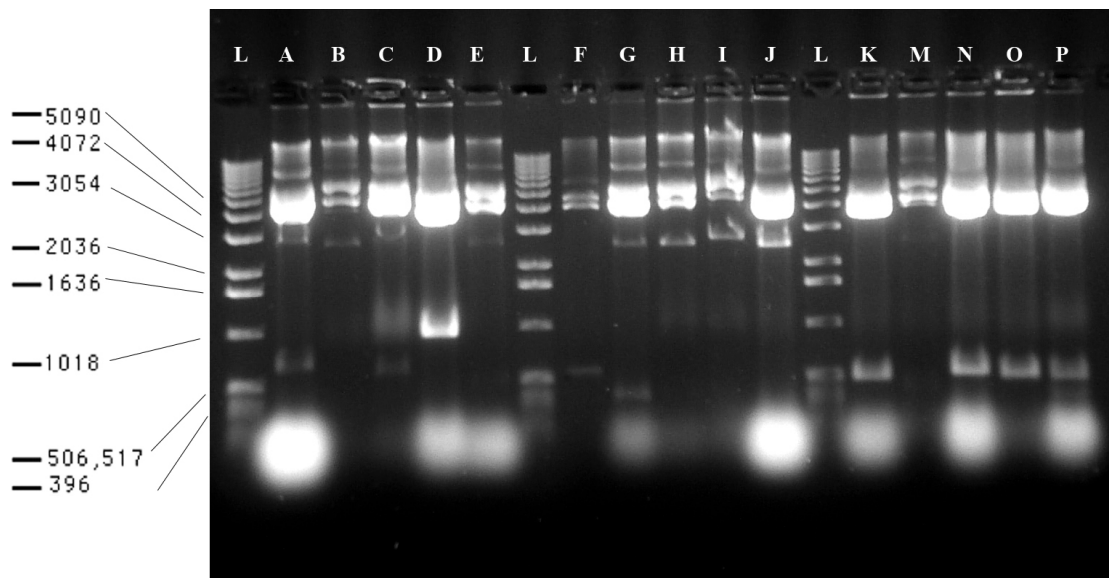


Figura 10: Electroforesis de los plásmidos recombinantes pCR2.1 y digeridos con EcoR1 procedentes de las colonias transformadas seleccionadas. Se pueden observar los plásmidos linearizados con un tamaño de 4 kb aproximadamente. Así mismo se puede observar los insertos que serían posteriormente seleccionados para ser purificados y secuenciados. El clon 3 no presentó colonias transformadas, por esa razón no se realizó la extracción ni digestión, El clon 1 tampoco está presente porque su clonación se realizó con el vector pCRII. (L= Ladder, A - E = Clon 2, A = colonia 1, B = colonia 2, C = colonia 3, D = colonia 4, E = colonia 5; F - J = Clon 4, F = colonia 2, G = colonia 3, H = colonia 5, I = colonia 5, J = colonia 7; K - P = Clon 5, K = colonia 1, M = colonia 3, N = colonia 4, O = colonia 5, P = colonia 6).

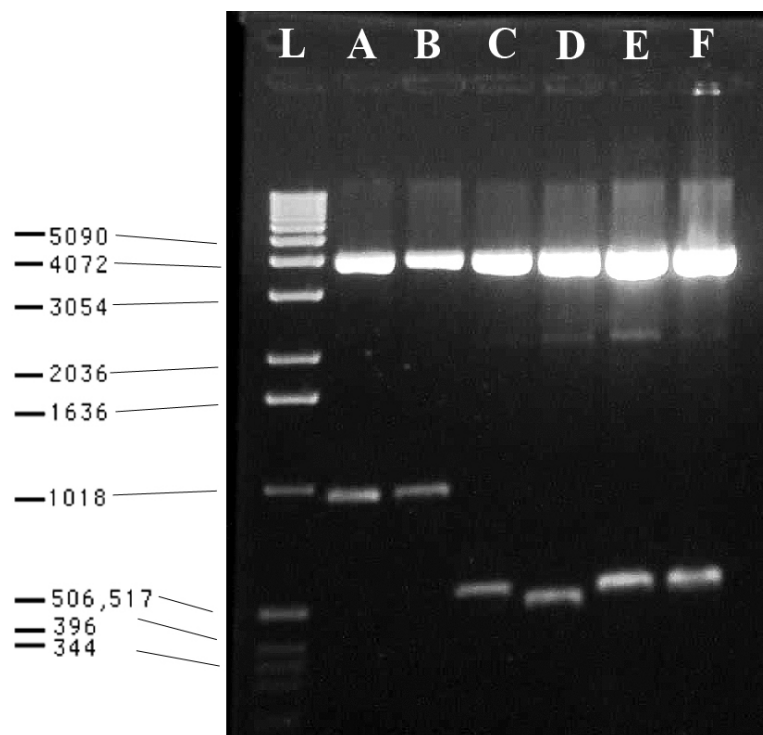


Figura 11: Electroforesis de la purificación con S.N.A.P. de los vectores recombinantes pCR2.1 con los insertos seleccionados. Se aprecia una electroforesis en gel en la que las muestras con los plásmidos a ser secuenciados se encuentran por duplicado. Se pueden observar claramente los insertos en A y B a una altura de 1 kb y en C – F a una altura de 500 a 1000 bases. (L = Ladder, A y B = colonia 4, clon 2 que pasaría a ser pLLB2, C y D = colonia 2, clon 4 que pasaría a ser pLLB4, E y F = colonia 4, clon 5 que pasaría a ser pLLB5).

11. TABLAS

Tabla 1: Resumen de resultados generales del experimento.

	Clon 1	Clon 2	Clon 3	Clon 4	Clon 5
Presencia de bandas después de Walking PCR	3 de 5 muestras	2 de 2 muestras	2 de 2 muestras	2 de 2 muestras	2 de 2 muestras
Colonias blancas resultantes de la transformación	Promedio de 5 en 1 caja petri. 5 cajas petri por clon.	Promedio de 6 en cada caja petri. 5 cajas petri por clon	0	Promedio de 6 en cada caja petri. 5 cajas petri por clon	Promedio de 6 en cada caja petri. 5 cajas petri por clon
Colonias con el inserto visible después de la digestión	2 de 25	3 de 5		3 de 5	4 de 5
Vectores comerciales utilizados	pCR II Topo TA	pCR 2.1		pCR 2.1	pCR 2.1
Plásmidos con insertos para secuenciamiento	pLLB1	pLLB2		pLLB4	pLLB5
Tamaño aproximado de la banda seleccionada	1000 bases	1000 bases		500 bases	500 bases
Número de bases secuenciadas	771 y 754 bases	967 bases		497 bases	499 bases
Primers de secuenciamiento	Sp6/M13F	M13F		M13F	M13F
% de CG	47%	Mala secuenciación		44%	44%
Resultados Blastn	<i>E.coli</i>			<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>

12. ANEXOS

ANEXO 1: Resultados del Blast realizado para pLLB1 secuenciado con el primer SP6.



results of **BLAST**

BLASTN 2.2.16 [Mar-11-2007]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1175696600-7097-128202226921.BLASTQ3

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
5,115,126 sequences; 20,252,922,320 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

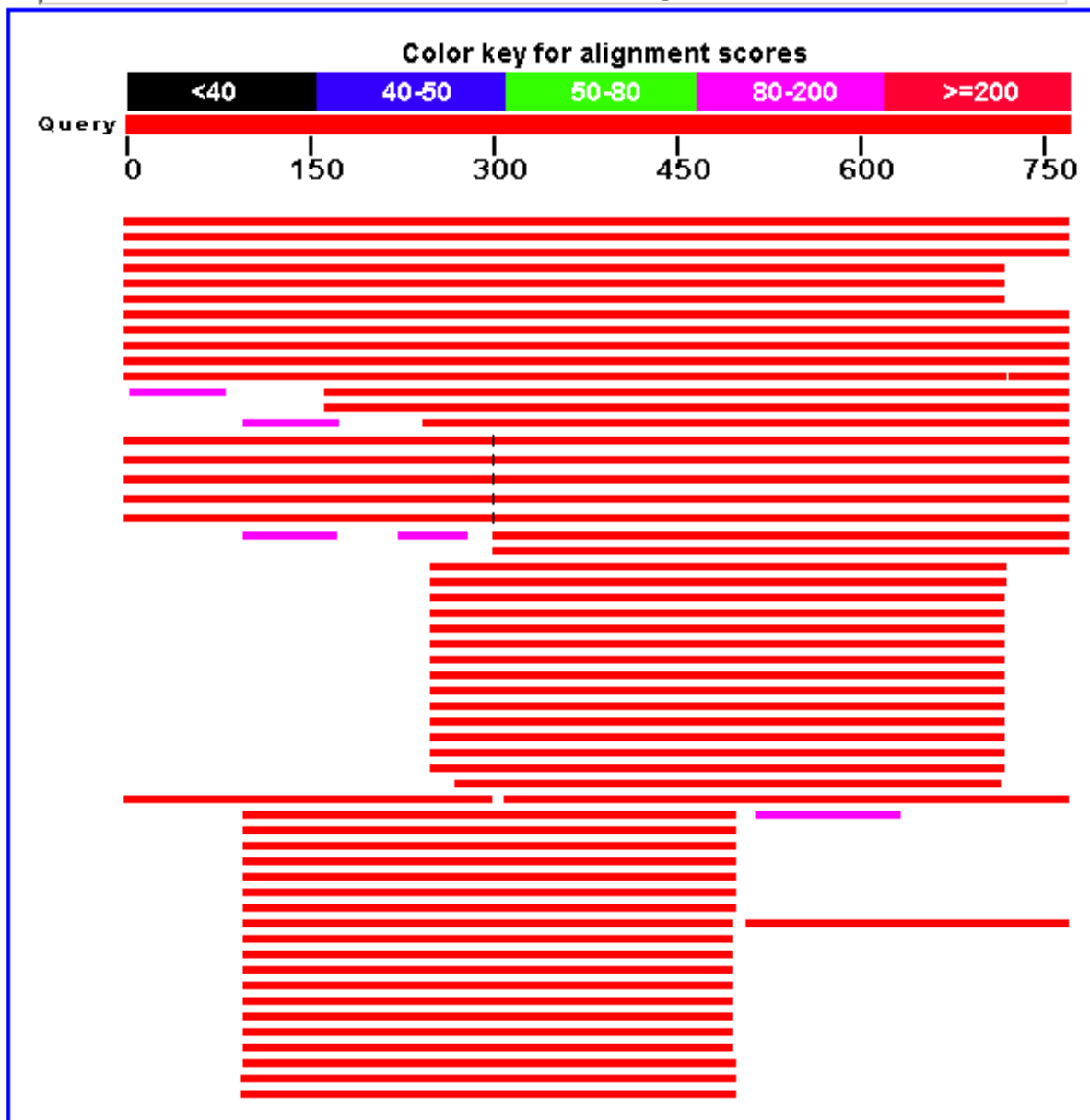
[Taxonomy reports](#)

Query=

Length=771

Distribution of 142 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments



ANEXO 2: Resultados del Blast realizado para pLLB1 secuenciado con el primer SP6, con las especies en las que se encontró similitudes.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AP009048.1	Escherichia coli W3110 DNA, complete genome	1425	2780	100%	0	98%
U00096.2	Escherichia coli K12 MG1655, complete genome	1425	2780	100%	0	98%
D00927.1	Escherichia coli DNA, ecos1 cleavage site region by lambda terminase	1425	1425	100%	0	98%
U87107.1	Cloning vector pAL-F insertion sequence IS1 galactokinase (galk), aminoglycoside 3'-phosphotransferase (kn), beta-galactosidase (lacZ), small ribosomal protein, and beta-lactamase (Ap) genes, complete cds	1396	1396	93%	0	99%
U66885.1	Cloning vector pAL-Z galactokinase (galk), aminoglycoside 3'-phosphotransferase (Kn), lacZ-alpha, and beta-lactamase (Ap) genes, complete cds; and insertion sequence IS1, complete sequence	1396	1396	93%	0	99%
M20189.1	Sequencing vector pAA113M DNA	1396	1396	93%	0	99%
U82598.1	Escherichia coli genomic sequence of minutes 9 to 12	1354	1354	100%	0	97%
CP000038.1	Shigella sonnei Ss046, complete genome	1275	1275	100%	0	95%
BA000007.2	Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome	1267	3322	100%	0	96%
AE005174.2	Escherichia coli O157:H7 EDL933, complete genome	1267	2739	100%	0	96%
AE014075.1	Escherichia coli CFT073, complete genome	1221	2074	93%	0	100%
U13206.1	Cloning vector pCOS5, complete sequence	1158	1158	78%	0	99%
L08873.1	pHC79 cosmid cloning vector	1158	1158	78%	0	99%
D00928.1	Escherichia coli DNA, ecos2 cleavage site region by lambda terminase	912	912	68%	0	96%
J02459.1	Bacteriophage lambda, complete genome	902	1499	100%	0	100%
U39286.1	Cloning vector TLF97-3, phage lambda lacZ translational fusion vector, complete sequence	902	1499	100%	0	100%

<u>U39285.1</u>	Cloning vector TLF97-2, phage lambda lacZ translational fusion vector, complete sequence	<u>902</u>	1499	100%	0	100%
<u>U39284.1</u>	Cloning vector TLF97-1, lambda phage lacZ translational fusion vector, complete sequence	<u>902</u>	1499	100%	0	100%
<u>U37692.1</u>	Cloning vector lambda TXF97, lacZ transcriptional fusion vector, complete sequence	<u>902</u>	1499	100%	0	100%
<u>U02426.1</u>	Cloning vector lambda EMBL3 SP6/T7, left arm	<u>902</u>	902	60%	0	99%
<u>U02425.1</u>	Cloning vector lambda EMBL3, left arm	<u>902</u>	902	60%	0	99%
<u>AY297462.1</u>	Cosmid vector pRR54, complete sequence	<u>852</u>	852	60%	0	98%
<u>AY532632.1</u>	Cloning vector pLAFR, complete sequence	<u>852</u>	852	60%	0	98%
<u>M99569.1</u>	sCos cloning vector SfiI containing bacteriophage promoters and flanking restriction sites in sCos vectors	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>U00003.1</u>	pIB8 cosmid vector; complete sequence	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>AF184978.1</u>	Binary vector pCLD04541, complete sequence	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>AB055064.1</u>	Synthetic transposable element dAc-I-RS DNA, complete sequence	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>X98612.1</u>	Artificial cloning vector pjb8	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>Z12112.1</u>	pWE15A cosmid vector DNA	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>X65279.1</u>	pWE15 cosmid vector DNA	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>AF075573.1</u>	Cloning vector pWEB, complete sequence	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>L76273.1</u>	Cloning vector pMLF2 hygromycin B phosphotransferase (HPH) gene, complete cds	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>U07340.1</u>	Cosmid vector pTL5, complete sequence	<u>850</u>	850	60%	0	98%
<u>L19900.1</u>	Cloning vector cosmid svPHEP DNA sequence encoding beta-lactamase and HSV thymidine kinase genes	<u>842</u>	842	60%	0	97%
<u>L19899.1</u>	Cloning vector cosmid pTCF DNA sequence encoding beta-lactamase gene	<u>842</u>	842	60%	0	97%
<u>AP007255.1</u>	Magnetospirillum magneticum AMB-1 DNA, complete genome	<u>827</u>	827	57%	0	98%
<u>AJ331857.1</u>	Homo sapiens genomic sequence surrounding NotI site, clone NL1-GF2RS	<u>811</u>	811	59%	0	97%
<u>DQ986515.1</u>	Cloning vector pECSBAC4, complete sequence	<u>797</u>	797	52%	0	100%

<u>AB070708.1</u>	Cloning vector pBAC-Lac DNA, complete sequence	<u>797</u>	797	52%	0	100%
<u>AY192024.1</u>	BAC cloning vector pEBAC190G, complete sequence	<u>797</u>	797	52%	0	100%
<u>AJ509853.1</u>	Cloning vector pUvBBAC	<u>797</u>	797	52%	0	100%
<u>AB015619.1</u>	Cloning vector pCHR8 DNA, complete sequence	<u>797</u>	797	52%	0	100%
<u>U51114.1</u>	Cloning vector pBAC108L	<u>797</u>	797	52%	0	100%
<u>U51113.1</u>	Cloning vector pBeloBAC11	<u>797</u>	797	52%	0	100%
<u>AB027255.2</u>	Cloning vector pSB1 tetR, tetA genes with Agrobacterium tumefaciens DNA insert	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>AB201314.1</u>	Cloning vector pSB4U DNA, complete sequence	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>AB027256.2</u>	Cloning vector pSB11 genes for streptomycin/spectinomycin nucleotidyltransferase, streptothricin acetyltransferase 3', complete cds	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>AF237704.1</u>	Cloning vector Lorist6Xh, complete sequence	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>L19898.1</u>	Cloning vector LAWRIST16 DNA sequence encoding two promoters T7 and T3, a cos site, and neo gene	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>X99439.1</u>	Artificial cloning vector Lorist4	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>X98613.1</u>	Artificial cloning vector LoristB	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>X98450.1</u>	Artificial cloning vector Lorist6	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>X98409.1</u>	Artificial cloning vector Lorist2	<u>791</u>	791	51%	0	100%
<u>AY643800.3</u>	Large-insert cloning vector pSMART VC, complete sequence	<u>789</u>	789	52%	0	99%
<u>U75992.1</u>	Cloning vector pPAC4, complete sequence	<u>785</u>	785	52%	0	99%
<u>U75991.1</u>	Cloning vector pBACe4, complete sequence	<u>785</u>	785	52%	0	99%
<u>AF403425.1</u>	Cloning vector pRL838, complete sequence	<u>783</u>	783	52%	0	99%
<u>AF403427.1</u>	Cloning vector pRL1342, complete sequence	<u>783</u>	783	52%	0	99%
<u>AF403426.1</u>	Cloning vector pRL1383a, complete sequence	<u>783</u>	783	52%	0	99%
<u>AB027254.1</u>	Cloning vector pSB4 tetR, tetA, hygromycin resistance genes with Agrobacterium tumefaciens DNA insert	<u>783</u>	783	52%	0	99%
<u>U59231.1</u>	Cloning vector cLHYGpk, complete sequence	<u>783</u>	783	51%	0	100%
<u>M16198.1</u>	Plasmid pJRD215 KmR-cos restriction-site region	<u>783</u>	783	52%	0	99%

<u>M15423.1</u>	LoristB cosmid DNA cloning vector for chromosome walking	<u>779</u>	779	52%	0	99%
<u>U03463.1</u>	Cloning vector pDO6, complete sequence	<u>775</u>	1396	93%	0	100%
<u>U03462.1</u>	Cloning vector pDO2, complete sequence	<u>775</u>	1396	93%	0	100%
<u>U03461.1</u>	Cloning vector pDO19, complete sequence	<u>775</u>	1396	93%	0	100%
<u>U03460.1</u>	Cloning vector pDO184, complete sequence	<u>775</u>	1396	93%	0	100%
<u>U03459.1</u>	Cloning vector pDO17, complete sequence	<u>775</u>	1396	93%	0	100%
<u>U09715.1</u>	Cosmid cloning vector AN26 with hygromycin phosphotransferase (hph) gene for transformation of filamentous fungi, complete sequence	<u>761</u>	1517	49%	0	100%
<u>AF246703.2</u>	Synthetic construct minitransposon TnHB100 sequence	<u>656</u>	656	44%	0	99%
<u>CP000468.1</u>	Escherichia coli APEC O1, complete genome	<u>622</u>	622	44%	4.00E-175	97%
<u>CP000243.1</u>	Escherichia coli UTI89, complete genome	<u>622</u>	726	44%	4.00E-175	97%
<u>U13762.1</u>	Cloning vector pDO193, complete sequence	<u>620</u>	1121	74%	2.00E-174	100%
<u>U13761.1</u>	Cloning vector pDO192, complete sequence	<u>620</u>	1121	74%	2.00E-174	100%
<u>U02427.1</u>	Cloning vector lambda EMBL3 SP6/T7, right arm	<u>597</u>	597	39%	3.00E-167	100%
<u>U02453.1</u>	Cloning vector lambda EMBL3, right arm	<u>597</u>	597	39%	3.00E-167	100%
<u>K02751.1</u>	Bacteriophage lambda region surrounding cos junction	<u>575</u>	575	45%	9.00E-161	95%
<u>AC198467.1</u>	Monosiga brevicollis clone JGIACYI-5A5, complete sequence	<u>523</u>	523	35%	3.00E-145	99%
<u>AC150248.3</u>	Unidentified bacterium clone zdt-9n2, complete sequence	<u>523</u>	523	35%	3.00E-145	99%
<u>AC198536.1</u>	Monosiga brevicollis clone JGIACYI-5B3, complete sequence	<u>521</u>	521	35%	1.00E-144	99%
<u>L09152.1</u>	pV34 cosmid cloning vector	<u>500</u>	500	34%	4.00E-138	98%
<u>DQ823233.1</u>	Expression vector mce4, complete sequence	<u>454</u>	454	33%	2.00E-124	97%
<u>DQ823232.1</u>	Expression vector mce3, complete sequence	<u>454</u>	454	33%	2.00E-124	97%
<u>DQ823231.1</u>	Expression vector mce2, complete sequence	<u>454</u>	454	33%	2.00E-124	97%
<u>M99566.1</u>	sCos cloning vector SfiI containing bacteriophage promoters and flanking restriction sites in sCos vectors	<u>454</u>	908	33%	2.00E-124	97%

<u>AF136442.1</u>	Cloning vector pScosBC1, E. coli-Burkholderia shuttle cosmid vector, complete sequence	<u>454</u>	908	33%	2.00E-124	97%
<u>AF129504.1</u>	Cloning vector pWDYcos1.0.1, complete sequence	<u>454</u>	908	33%	2.00E-124	97%
<u>X94336.1</u>	Cloning vector beta-lactamase gene	<u>454</u>	454	33%	2.00E-124	97%
<u>EF059993.1</u>	Cosmid vector pHM1, complete sequence	<u>442</u>	442	28%	9.00E-121	100%
<u>Z96425.1</u>	H.sapiens telomeric DNA sequence, clone 18QTELO83, read 18QTELOO083.seq	<u>430</u>	430	33%	3.00E-117	96%
<u>AF000429.1</u>	Shuttle cosmid vector pFD666, complete sequence	<u>428</u>	428	28%	1.00E-116	99%
<u>CP000036.1</u>	Shigella boydii Sb227, complete genome	<u>234</u>	392	28%	4.00E-58	100%
<u>Z96759.1</u>	H.sapiens telomeric DNA sequence, clone 8QTEL041, read 8QTELOO041.seq	<u>212</u>	212	18%	2.00E-51	94%
<u>Z73916.1</u>	H.sapiens DNA (chromosome 13q, clone 93B05, 317 bp)	<u>153</u>	304	10%	1.00E-33	100%
<u>Z73924.1</u>	H.sapiens DNA (chromosome 13q, clone 44B06, 879 bp)	<u>147</u>	147	10%	7.00E-32	98%
<u>CP000247.1</u>	Escherichia coli 536, complete genome	<u>119</u>	238	18%	2.00E-23	97%
<u>AJ556162.1</u>	Phage BP-4795 complete genome	<u>117</u>	117	10%	7.00E-23	93%
<u>X98187.1</u>	Artificial DNA sequence for mammalian lambda-neo minichromosome, 1369 bp	<u>113</u>	205	7%	1.00E-21	100%
<u>AJ331858.1</u>	Homo sapiens genomic sequence surrounding NotI site, clone NL4-BA12RS	<u>107</u>	107	15%	6.00E-20	86%
<u>M81255.1</u>	Bacteriophage 21 head gene operon	<u>103</u>	103	9%	1.00E-18	93%

ANEXO 3: Resultados del Blast realizado para pLLB1 secuenciado con el primer M13F.



results of **BLAST**

BLASTN 2.2.16 [Mar-11-2007]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1175699154-15528-5684704893.BLASTQ5

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
5,115,126 sequences; 20,252,922,320 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

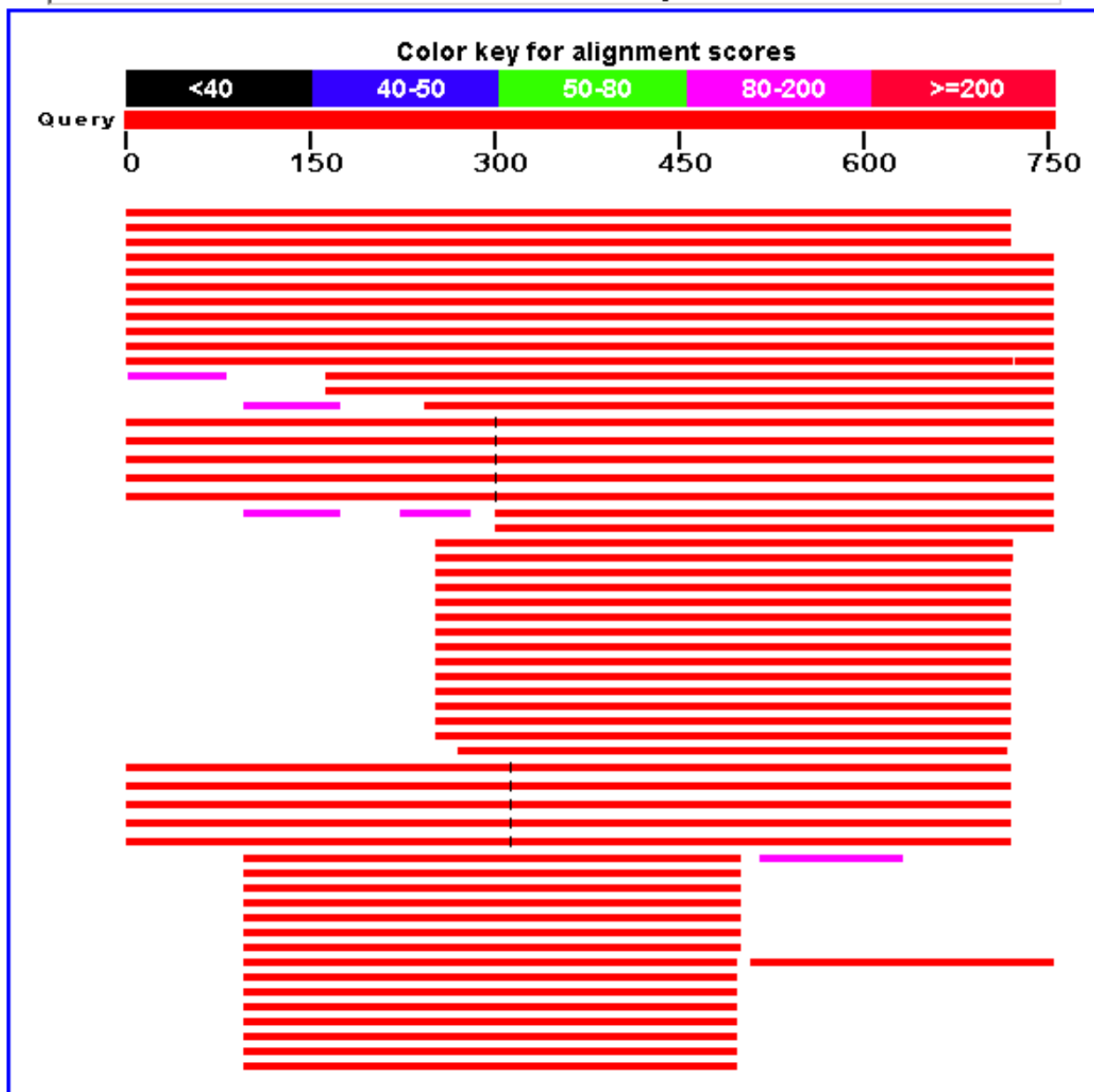
[Taxonomy reports](#)

Query=

Length=754

Distribution of 141 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments



ANEXO 4: Resultados del Blast realizado para pLLB1 secuenciado con el primer M13F, con las especies en las que se encontró similitudes.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<u>U87107.1</u>	Cloning vector pAL-F insertion sequence IS1 galactokinase (galk), aminoglycoside 3'-phosphotransferase (kn), beta-galactosidase (lacZ), small ribosomal protein, and beta-lactamase (Ap) genes, complete cds	<u>1378</u>	1378	95%	0	99%
<u>U66885.1</u>	Cloning vector pAL-Z galactokinase (galk), aminoglycoside 3'-phosphotransferase (Kn), lacZ-alpha, and beta-lactamase (Ap) genes, complete cds; and insertion sequence IS1, complete sequence	<u>1378</u>	1378	95%	0	99%
<u>M20189.1</u>	Sequencing vector pAA113M DNA	<u>1378</u>	1378	95%	0	99%
<u>AP009048.1</u>	Escherichia coli W3110 DNA, complete genome	<u>1372</u>	2673	99%	0	98%
<u>U00096.2</u>	Escherichia coli K12 MG1655, complete genome	<u>1372</u>	2673	99%	0	98%
<u>D00927.1</u>	Escherichia coli DNA, ecos1 cleavage site region by lambda terminase	<u>1372</u>	1372	99%	0	98%
<u>U82598.1</u>	Escherichia coli genomic sequence of minutes 9 to 12	<u>1300</u>	1300	99%	0	96%
<u>CP000038.1</u>	Shigella sonnei Ss046, complete genome	<u>1221</u>	1221	99%	0	95%
<u>BA000007.2</u>	Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome	<u>1213</u>	3154	99%	0	95%
<u>AE005174.2</u>	Escherichia coli O157:H7 EDL933, complete genome	<u>1213</u>	2630	99%	0	95%
<u>AE014075.1</u>	Escherichia coli CFT073, complete genome	<u>1203</u>	2028	95%	0	100%
<u>U13206.1</u>	Cloning vector pCOS5, complete sequence	<u>1116</u>	1116	78%	0	98%
<u>L08873.1</u>	pHC79 cosmid cloning vector	<u>1116</u>	1116	78%	0	98%
<u>D00928.1</u>	Escherichia coli DNA, ecos2 cleavage site region by lambda terminase	<u>878</u>	878	67%	0	96%
<u>J02459.1</u>	Bacteriophage lambda, complete genome	<u>876</u>	1446	99%	0	99%
<u>U39286.1</u>	Cloning vector TLF97-3, phage lambda lacZ translational fusion vector, complete sequence	<u>876</u>	1446	99%	0	99%
<u>U39285.1</u>	Cloning vector TLF97-2, phage lambda lacZ translational fusion vector, complete sequence	<u>876</u>	1446	99%	0	99%

<u>U39284.1</u>	Cloning vector TLF97-1, lambda phage lacZ translational fusion vector, complete sequence	<u>876</u>	1446	99%	0	99%
<u>U37692.1</u>	Cloning vector lambda TXF97, lacZ transcriptional fusion vector, complete sequence	<u>876</u>	1446	99%	0	99%
<u>U02426.1</u>	Cloning vector lambda EMBL3 SP6/T7, left arm	<u>876</u>	876	59%	0	99%
<u>U02425.1</u>	Cloning vector lambda EMBL3, left arm	<u>876</u>	876	59%	0	99%
<u>AY297462.1</u>	Cosmid vector pRR54, complete sequence	<u>856</u>	856	61%	0	98%
<u>AY532632.1</u>	Cloning vector pLAFR, complete sequence	<u>856</u>	856	61%	0	98%
<u>M99569.1</u>	sCos cloning vector SfiI containing bacteriophage promoters and flanking restriction sites in sCos vectors	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>U00003.1</u>	pIB8 cosmid vector; complete sequence	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>AF184978.1</u>	Binary vector pCLD04541, complete sequence	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>AB055064.1</u>	Synthetic transposable element dAc-I-RS DNA, complete sequence	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>X98612.1</u>	Artificial cloning vector pjb8	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>Z12112.1</u>	pWE15A cosmid vector DNA	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>X65279.1</u>	pWE15 cosmid vector DNA	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>AF075573.1</u>	Cloning vector pWEB, complete sequence	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>L76273.1</u>	Cloning vector pMLF2 hygromycin B phosphotransferase (HPH) gene, complete cds	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>U07340.1</u>	Cosmid vector pTL5, complete sequence	<u>854</u>	854	61%	0	98%
<u>L19900.1</u>	Cloning vector cosmid svPHEP DNA sequence encoding beta-lactamase and HSV thymidine kinase genes	<u>846</u>	846	61%	0	98%
<u>L19899.1</u>	Cloning vector cosmid pTCF DNA sequence encoding beta-lactamase gene	<u>846</u>	846	61%	0	98%
<u>AP007255.1</u>	Magnetospirillum magneticum AMB-1 DNA, complete genome	<u>837</u>	837	59%	0	98%
<u>U03463.1</u>	Cloning vector pDO6, complete sequence	<u>785</u>	1378	95%	0	99%
<u>U03462.1</u>	Cloning vector pDO2, complete sequence	<u>785</u>	1378	95%	0	99%
<u>U03461.1</u>	Cloning vector pDO19, complete sequence	<u>785</u>	1378	95%	0	99%
<u>U03460.1</u>	Cloning vector pDO184, complete sequence	<u>785</u>	1378	95%	0	99%
<u>U03459.1</u>	Cloning vector pDO17, complete sequence	<u>785</u>	1378	95%	0	99%
<u>DQ986515.1</u>	Cloning vector pECSBAC4, complete sequence	<u>781</u>	781	53%	0	99%

AB070708.1	Cloning vector pBAC-Lac DNA, complete sequence	781	781	53%	0	99%
AY192024.1	BAC cloning vector pEBAC190G, complete sequence	781	781	53%	0	99%
AJ509853.1	Cloning vector pUvBBAC	781	781	53%	0	99%
AB015619.1	Cloning vector pCHR8 DNA, complete sequence	781	781	53%	0	99%
U51114.1	Cloning vector pBAC108L	781	781	53%	0	99%
U51113.1	Cloning vector pBeloBAC11	781	781	53%	0	99%
AB027255.2	Cloning vector pSB1 tetR, tetA genes with Agrobacterium tumefaciens DNA insert	775	775	52%	0	99%
AB201314.1	Cloning vector pSB4U DNA, complete sequence	775	775	52%	0	99%
AB027256.2	Cloning vector pSB11 genes for streptomycin/spectinomycin nucleotidyltransferase, streptothricin acetyltransferase 3', complete cds	775	775	52%	0	99%
AF237704.1	Cloning vector Lorist6Xh, complete sequence	775	775	52%	0	99%
L19898.1	Cloning vector LAWRIST16 DNA sequence encoding two promoters T7 and T3, a cos site, and neo gene	775	775	52%	0	99%
X99439.1	Artificial cloning vector Lorist4	775	775	52%	0	99%
X98613.1	Artificial cloning vector LoristB	775	775	52%	0	99%
X98450.1	Artificial cloning vector Lorist6	775	775	52%	0	99%
X98409.1	Artificial cloning vector Lorist2	775	775	52%	0	99%
AY643800.3	Large-insert cloning vector pSMART VC, complete sequence	773	773	53%	0	99%
U75992.1	Cloning vector pPAC4, complete sequence	769	769	53%	0	99%
U75991.1	Cloning vector pBACe4, complete sequence	769	769	53%	0	99%
AJ331857.1	Homo sapiens genomic sequence surrounding NotI site, clone NL1-GF2RS	769	769	58%	0	97%
AF403425.1	Cloning vector pRL838, complete sequence	767	767	53%	0	99%
AF403427.1	Cloning vector pRL1342, complete sequence	767	767	53%	0	99%
AF403426.1	Cloning vector pRL1383a, complete sequence	767	767	53%	0	99%
AB027254.1	Cloning vector pSB4 tetR, tetA, hygromycin resistance genes with Agrobacterium tumefaciens DNA insert	767	767	53%	0	99%
U59231.1	Cloning vector cLHYGpk, complete sequence	767	767	52%	0	99%
M16198.1	Plasmid pJRD215 KmR-cos restriction-site region	767	767	53%	0	99%
M15423.1	LoristB cosmid DNA cloning vector for chromosome walking	763	763	54%	0	99%

<u>U09715.1</u>	Cosmid cloning vector AN26 with hygromycin phosphotransferase (hph) gene for transformation of filamentous fungi, complete sequence	<u>745</u>	1485	50%	0	99%
<u>AF246703.2</u>	Synthetic construct minitransposon TnHB100 sequence	<u>640</u>	640	45%	2.00E-180	98%
<u>CP000468.1</u>	Escherichia coli APEC O1, complete genome	<u>595</u>	595	45%	1.00E-166	97%
<u>CP000243.1</u>	Escherichia coli UTI89, complete genome	<u>595</u>	698	45%	1.00E-166	97%
<u>U13762.1</u>	Cloning vector pDO193, complete sequence	<u>593</u>	1093	75%	4.00E-166	99%
<u>U13761.1</u>	Cloning vector pDO192, complete sequence	<u>593</u>	1093	75%	4.00E-166	99%
<u>U02427.1</u>	Cloning vector lambda EMBL3 SP6/T7, right arm	<u>569</u>	569	39%	6.00E-159	98%
<u>U02453.1</u>	Cloning vector lambda EMBL3, right arm	<u>569</u>	569	39%	6.00E-159	98%
<u>K02751.1</u>	Bacteriophage lambda region surrounding cos junction	<u>559</u>	559	46%	5.00E-156	95%
<u>AC198467.1</u>	Monosiga brevicollis clone JGIACYI-5A5, complete sequence	<u>498</u>	498	33%	2.00E-137	99%
<u>AC150248.3</u>	Unidentified bacterium clone zdt-9n2, complete sequence	<u>498</u>	498	33%	2.00E-137	99%
<u>AC198536.1</u>	Monosiga brevicollis clone JGIACYI-5B3, complete sequence	<u>496</u>	496	33%	7.00E-137	99%
<u>L09152.1</u>	pV34 cosmid cloning vector	<u>474</u>	474	32%	2.00E-130	99%
<u>DQ823233.1</u>	Expression vector mce4, complete sequence	<u>448</u>	448	34%	1.00E-122	97%
<u>DQ823232.1</u>	Expression vector mce3, complete sequence	<u>448</u>	448	34%	1.00E-122	97%
<u>DQ823231.1</u>	Expression vector mce2, complete sequence	<u>448</u>	448	34%	1.00E-122	97%
<u>M99566.1</u>	sCos cloning vector SfiI containing bacteriophage promoters and flanking restriction sites in sCos vectors	<u>448</u>	897	34%	1.00E-122	97%
<u>AF136442.1</u>	Cloning vector pScosBC1, E. coli-Burkholderia shuttle cosmid vector, complete sequence	<u>448</u>	897	34%	1.00E-122	97%
<u>AF129504.1</u>	Cloning vector pWDYcos1.0.1, complete sequence	<u>448</u>	897	34%	1.00E-122	97%
<u>X94336.1</u>	Cloning vector beta-lactamase gene	<u>448</u>	448	34%	1.00E-122	97%
<u>Z96425.1</u>	H.sapiens telomeric DNA sequence, clone 18QTELO83, read 18QTELOO083.seq	<u>428</u>	428	28%	1.00E-116	100%
<u>EF059993.1</u>	Cosmid vector pHM1, complete sequence	<u>426</u>	426	29%	5.00E-116	99%
<u>AF000429.1</u>	Shuttle cosmid vector pFD666, complete sequence	<u>412</u>	412	29%	8.00E-112	98%

<u>CP000036.1</u>	Shigella boydii Sb227, complete genome	<u>226</u>	384	29%	1.00E-55	100%
<u>Z96759.1</u>	H.sapiens telomeric DNA sequence, clone 8QTEL041, read 8QTELOO041.seq	<u>206</u>	206	18%	9.00E-50	94%
<u>Z73916.1</u>	H.sapiens DNA (chromosome 13q, clone 93B05, 317 bp)	<u>153</u>	304	10%	1.00E-33	100%
<u>Z73924.1</u>	H.sapiens DNA (chromosome 13q, clone 44B06, 879 bp)	<u>147</u>	147	10%	7.00E-32	98%
<u>CP000247.1</u>	Escherichia coli 536, complete genome	<u>119</u>	203	16%	2.00E-23	96%
<u>AJ556162.1</u>	Phage BP-4795 complete genome	<u>109</u>	109	10%	2.00E-20	92%
<u>AJ331858.1</u>	Homo sapiens genomic sequence surrounding NotI site, clone NL4-BA12RS	<u>103</u>	103	15%	1.00E-18	86%
<u>M81255.1</u>	Bacteriophage 21 head gene operon	<u>103</u>	103	9%	1.00E-18	93%
<u>X98187.1</u>	Artificial DNA sequence for mammalian lambda-neo minichromosome, 1369 bp	<u>97.6</u>	173	7%	6.00E-17	96%

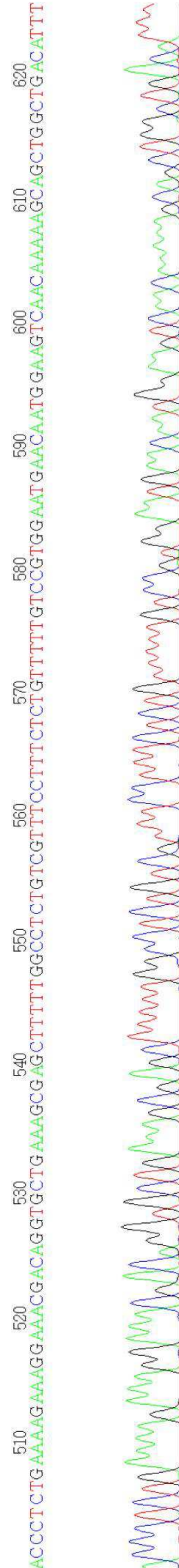
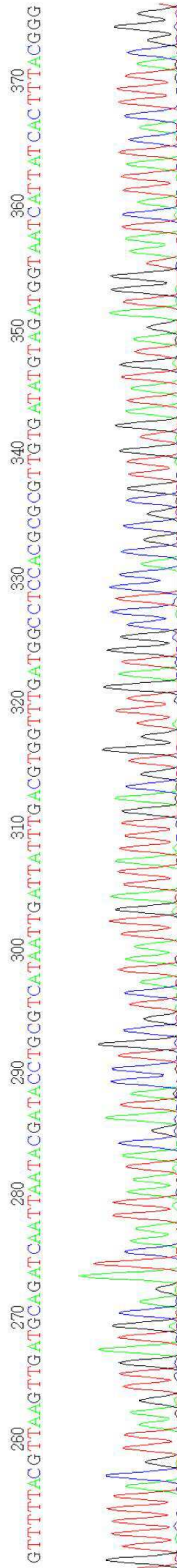
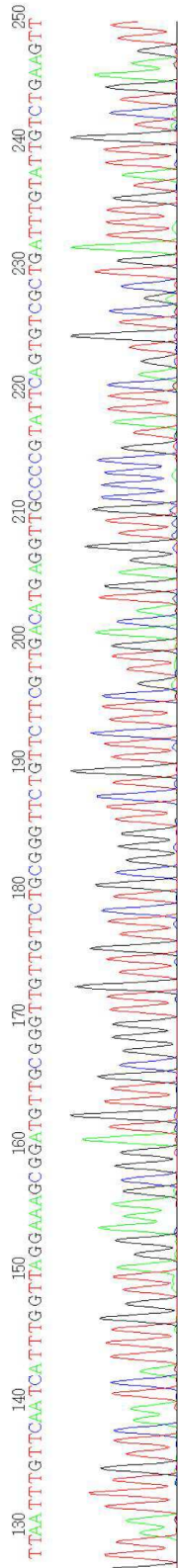
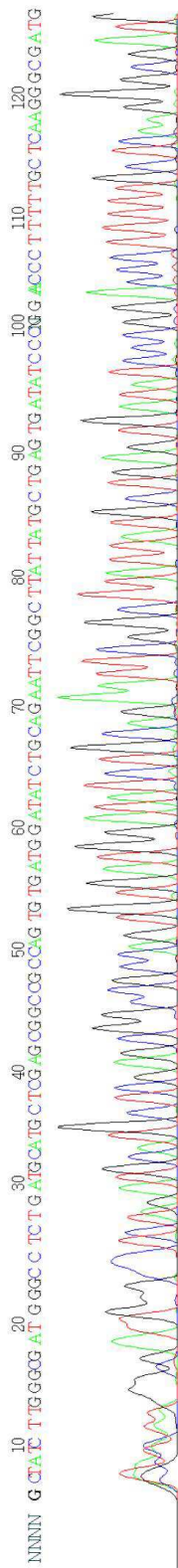
File: 060426-08_K11_I-PLLLBI-SP6.ab1 Run Ended: 2006/4/26 23:26:24 Signal G:1000 A:680 C:611 T:839
Sample: I-PLLLBI_SP6 Lane: 38 Base spacing: 14,839999 858 bases in 10271 scans Page 2 of 2

650 CGT AC CAT TCAGAACTGGCAGG AACAGGG AATGCCCGTCTCTGCG AGGCGGTGCAAGG GT AATGAG GTGCTTTAIG ACTCTGCGCGCTCAT AAAATGGTATGCCGAA AG GGATGCTG AAATGAG
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750



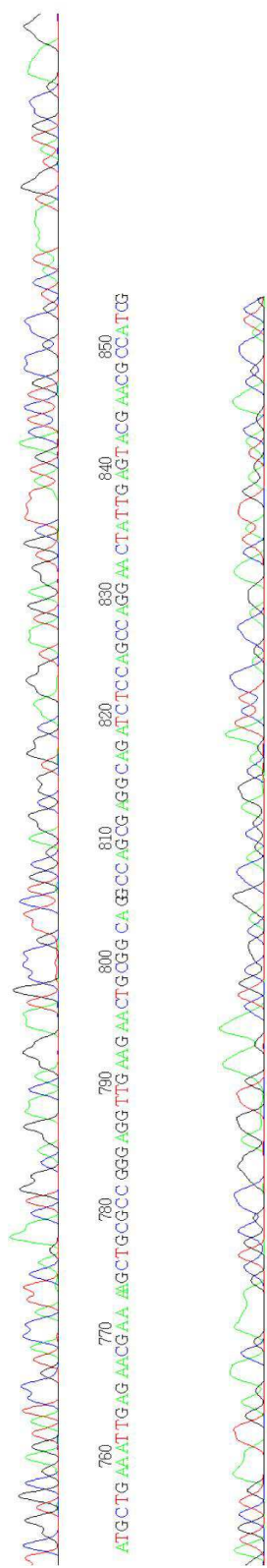
760 AACGAAAA GCTGCG CCGG AAGGTT GAAA AACTGCG GC AGGC CAG CGAGCAG ATC TCCAG CC AAG AACCTATT GAGT ACG AACGCC AT GG ACTT ACG CG TG CG CAGGC
770
780
790
800
810
820
830
840
850





File: 060426-08_III_O-PLLBI-M13F.ab1 Run Ended: 2006/4/26 23:26:24 Signal G:2649 A:1966 C:1783 T:2608
 Sample: O-PLLBI_M13F Lane: 40 Base spacing: 14.63 855 bases in 10226 scans Page 2 of 2

830 TCGGTGCGAGTATCCCGTACCATTCAGAACTGGCAGGAAACAGGGAAATGCCCCGTTCTGCGAGGCGGTGGCAAAGGTTAATGAGGTGCTTATGACTCTCTGCCCGCTCATANAAATGGTATGCCC
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750



ANEXO 7: Resultados del Blast realizado para pLLB2 secuenciado con el primer M13F.



BLASTN 2.2.16 [Mar-11-2007]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1175701031-28664-114184796982.BLASTQ2

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
5,115,126 sequences; 20,252,922,320 total letters

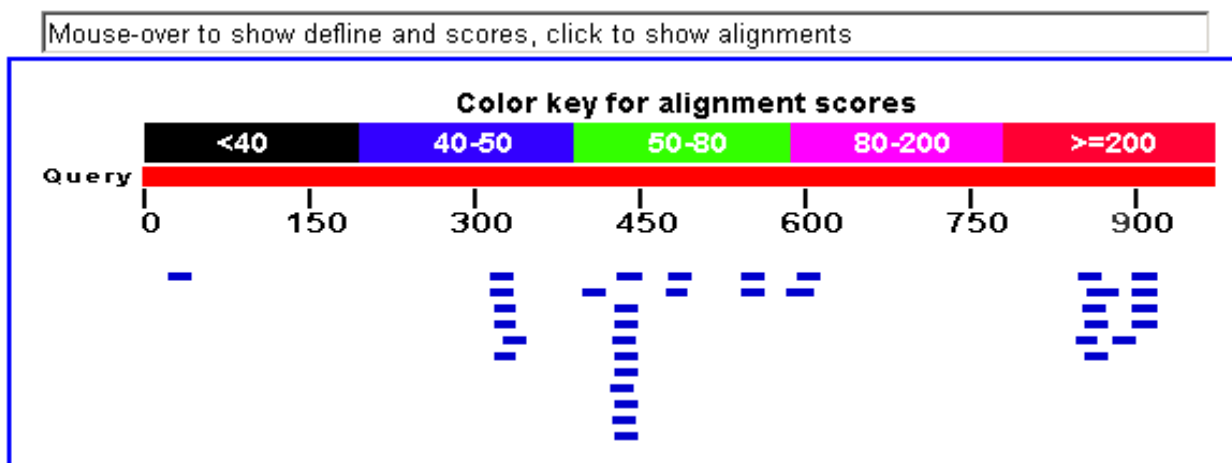
If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

[Taxonomy reports](#)

Query=

Length=969

Distribution of 35 Blast Hits on the Query Sequence



ANEXO 8: Resultados del Blast realizado para pLLB2 secuenciado con el primer M13F, con las especies en las que se encontró similitudes.

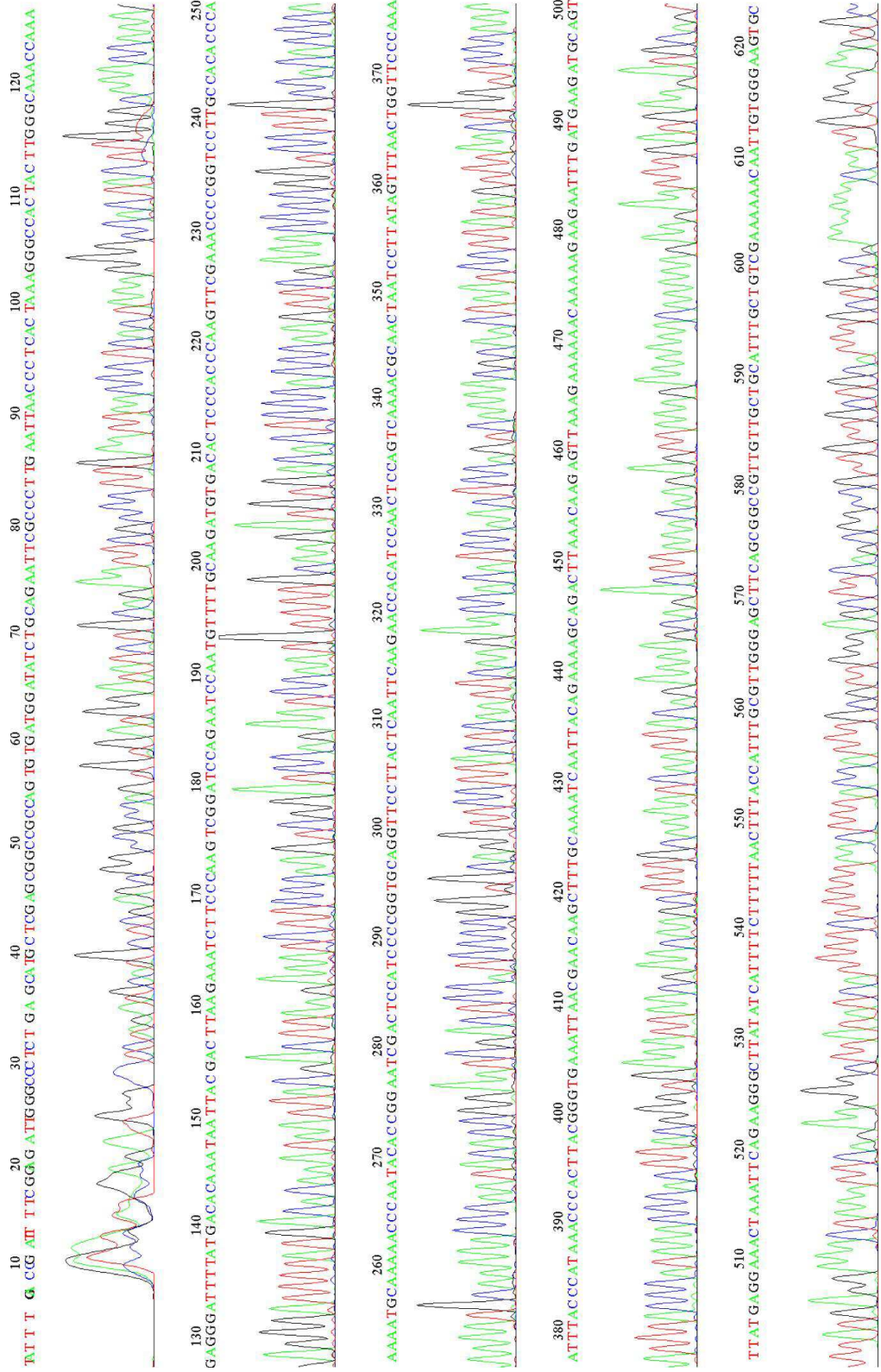
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AM483636.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV79X000524.3, clone ENTAV 115	46.1	46.1	2%	0.25	100%
AB020745.1	Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MJE7	46.1	46.1	2%	0.25	100%
CT737259.5	Pig DNA sequence from clone CH242-127E12 on chromosome 14, complete sequence	44.1	44.1	2%	1	100%
AC144805.9	Medicago truncatula clone mth2-72a11, complete sequence	44.1	44.1	3%	1	93%
XM_639175.1	Dictyostelium discoideum AX4 hypothetical protein (DDBDRAFT_0167566) mRNA, complete cds	44.1	44.1	2%	1	100%
AC142308.3	Pan troglodytes BAC clone RP43-135J9 from chromosome y, complete sequence	44.1	44.1	2%	1	100%
AC144429.1	Pan troglodytes BAC clone RP43-2P22 from chromosome y, complete sequence	44.1	44.1	2%	1	100%
AC116956.2	Dictyostelium discoideum chromosome 2 map 1418423-1684967 strain AX4, complete sequence	44.1	44.1	2%	1	100%
AC010151.3	Homo sapiens BAC clone RP11-508P10 from Y, complete sequence	44.1	44.1	2%	1	100%
BS000594.1	Pan troglodytes chromosome Y clone:PTB-031N07, complete sequences	44.1	44.1	2%	1	100%
AM502226.1	Leishmania infantum chromosome 8	42.1	42.1	2%	4	100%
AM471932.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X097253.14, clone ENTAV 115	42.1	42.1	2%	4	100%
AM423271.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X118542.7, clone ENTAV 115	42.1	42.1	2%	4	100%

<u>DQ649204.1</u>	Plutella xylostella microsatellite pxy098 sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>CR855189.1</u>	Oryza sativa genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSIGBa0106G07, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>XM_528222.2</u>	PREDICTED: Pan troglodytes hyaluronan synthase 2 (HAS2), mRNA	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>XM_001155499.1</u>	PREDICTED: Pan troglodytes similar to CHASE (LOC741588), mRNA	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AE013599.4</u>	Drosophila melanogaster chromosome 2R, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>CR388003.10</u>	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-59G18, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AC146785.12</u>	Medicago truncatula clone mth2-4h4, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AC150556.1</u>	Drosophila melanogaster clone BACR07H20, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AC093536.4</u>	Homo sapiens chromosome 16 clone RP11-744D14, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	96%
<u>AC002078.2</u>	Homo sapiens BAC clone CTB-111H14 from 7, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AC022909.13</u>	Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-682G1, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>BX465201.38</u>	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-15F11 in linkage group 14, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AC104233.2</u>	Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-3G20, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AC098483.2</u>	Homo sapiens chromosome 1 clone RP11-438F14, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AC013247.8</u>	Drosophila melanogaster, chromosome 2R, region 41D-41E, BAC clone BACR06P07, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%

<u>AB125313.1</u>	Nannochloris bacillaris NbrbcS1-2, GAMM1, Mut2 genes for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit, GAMM1 protein-like protein, DNA mismatch repair protein Mut2-like protein and genes for trypsin, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, complete cds	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AE008384.1</u>	Methanosarcina mazei strain Goe1, complete genome	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>NM_005328.1</u>	Homo sapiens hyaluronan synthase 2 (HAS2), mRNA >gb U54804.1 HSU54804 Human Has2 mRNA, complete cds	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>BX323994.9</u>	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-273A5 in linkage group 14, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AC128660.31</u>	Medicago truncatula clone mth2-14p23, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AB065438.1</u>	Homo sapiens gene for seven transmembrane helix receptor, complete cds, isolate:CBRC7TM_1	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	100%
<u>AP005360.2</u>	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 8q23, clone: KB1529G8, complete sequence	<u>42.1</u>	42.1	2%	4	<u>100%</u>

ANEXO 9: Secuencias de pLLB2 con el primer M13F.

File: 061102-R1_A05_pLLB2-M13F.ab1 Run Ended: 2006/11/3 2:40:8 Signal G:231 A:328 C:339 T:333
Sample: pLLB2_M13F Lane: 31 Base spacing: 14.63 1175 bases in 13675 scans Page 1 of 2



File: 061102-R1_A05_pLLB2-M13F.ab1 Run Ended: 2006/11/3 2:40:8 Signal G:231 A:328 C:339 T:333
 Sample: pLLB2_M13F Lane: 31 Base spacing: 14.63 1175 bases in 13675 scans Page 2 of 2

630 CATTAAGATTACCGGTTCCTCTTCTGGACCAATGTATATTGGACAGACAAAGGTTGGAGACACCGGGAAAAGAAAAACAAAGTACCCGAAAGTTTACCCCTTGAAAGTTTCAAACGATTCCTTCG



760 TTTTTCTCCATCGCATTTCCCTTTATCTACAAGTACAAACGATTCGAAATGCGAAAGTCTATATGGAAACAACCTTCGTTTGTAGTTCGGCGTTTATATTCTATTCGGATTTTATCAGTTCGCCATTTTA



890 ATTTTAGATTTGGATTTTATATCCAGAAAGATGGAACCCTAGTTACTATTTCAATTCGATCACTGGTTACAATTTTATTTTATACAAATCCC TTCATTAATTTTCACAAAGATGGAGAGATTT



1030 TATCTCTTCACAAATAAACCTTTCATTTTGGATGTTAGGTTTAAATTCCTCCCTTGTGGGTTAATCAGGGCCAAATTCCAACCCCTGGCCGCCGTTTGTAGGGAAACCAACTCGACGATTCGGGT



1160 TATTACCGTATAATG



ANEXO 10: Resultados del Blast realizado para pLLB4 secuenciado con el primer M13F.



results of **BLAST**

BLASTN 2.2.16 [Mar-11-2007]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1175702841-1867-41477658078.BLASTQ5

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
5,115,126 sequences; 20,252,922,320 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

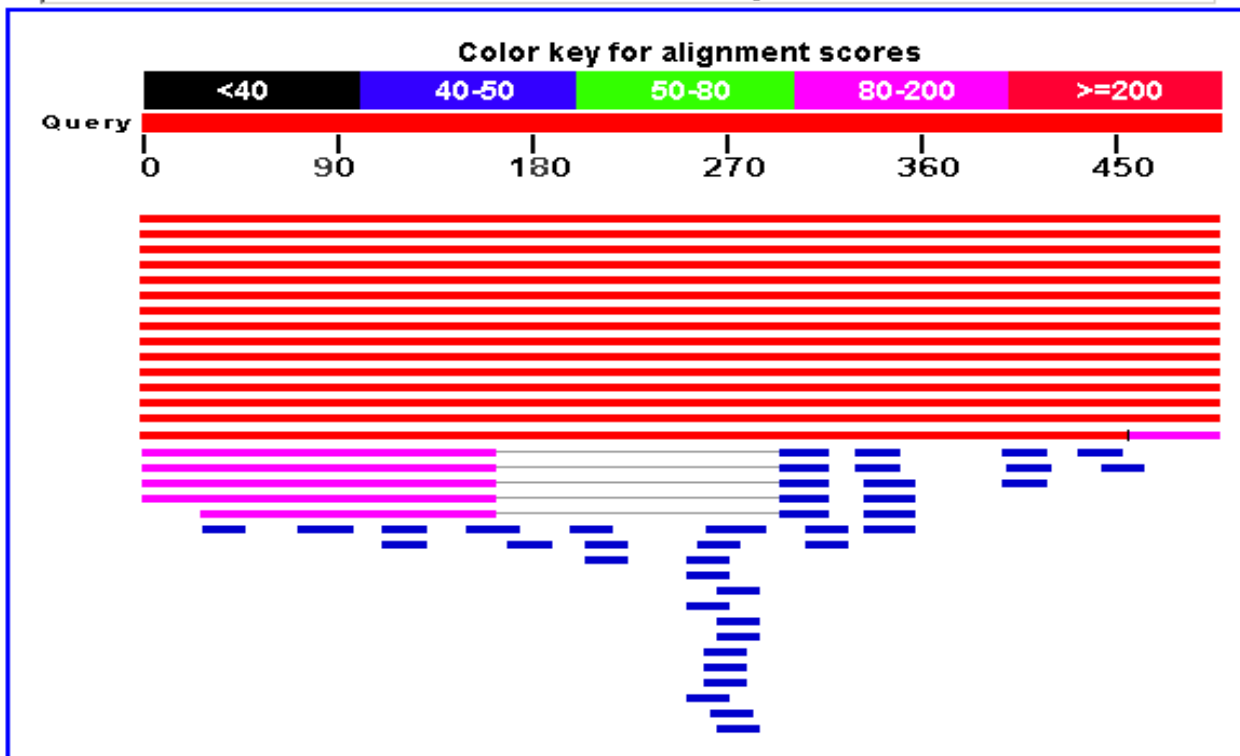
[Taxonomy reports](#)

Query=

Length=497

Distribution of 62 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show defline and scores, click to show alignments



ANEXO 11: Resultados del Blast realizado para pLLB4 secuenciado con el primer M13F, con las especies en las que se encontró similitudes.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AP009048.1	Escherichia coli W3110 DNA, complete genome	<u>946</u>	946	100%	0	98%
U00096.2	Escherichia coli K12 MG1655, complete genome	<u>946</u>	946	100%	0	98%
J03412.1	E.coli dmsA, dmsB and dmsC genes encoding anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, complete cds	<u>946</u>	946	100%	0	98%
CP000266.1	Shigella flexneri 5 str. 8401, complete genome	<u>884</u>	884	100%	0	97%
AE005674.1	Shigella flexneri 2a str. 301, complete genome	<u>884</u>	884	100%	0	97%
AE014073.1	Shigella flexneri 2a str. 2457T, complete genome	<u>884</u>	884	100%	0	97%
BA000007.2	Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome	<u>876</u>	876	100%	0	97%
AE005174.2	Escherichia coli O157:H7 EDL933, complete genome	<u>876</u>	876	100%	0	97%
CP000247.1	Escherichia coli 536, complete genome	<u>868</u>	868	100%	0	97%
CP000468.1	Escherichia coli APEC O1, complete genome	<u>860</u>	860	100%	0	97%
CP000243.1	Escherichia coli UTI89, complete genome	<u>860</u>	860	100%	0	97%
AE014075.1	Escherichia coli CFT073, complete genome	<u>860</u>	860	100%	0	97%
CP000034.1	Shigella dysenteriae Sd197, complete genome	<u>852</u>	852	100%	0	96%
CP000038.1	Shigella sonnei Ss046, complete genome	<u>844</u>	844	100%	0	96%
CP000036.1	Shigella boydii Sb227, complete genome	<u>821</u>	916	100%	0	100%
AE008741.1	Salmonella typhimurium LT2, section 47 of 220 of	<u>172</u>	219	37%	8.00E-40	100%

	the complete genome					
AE017220.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67, complete genome	172	219	37%	8.00E-40	100%
AL627268.1	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, complete chromosome; segment 4/20	157	203	37%	5.00E-35	100%
AE014613.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2, complete genome	157	203	37%	5.00E-35	100%
CP000026.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150	151	197	31%	3.00E-33	100%
AC150389.2	Branchiostoma floridae clone CH302-114C5, complete sequence	42.1	42.1	5%	2	96%
AY810200.1	Schistosoma japonicum SJCHGC09207 protein mRNA, partial cds	42.1	42.1	5%	2	96%
AC069220.11	Homo sapiens 3 BAC RP11-115B16 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence	42.1	42.1	4%	2	100%
AC000054.10	Homo sapiens chromosome 3 clone p856 map 3q26, complete sequence	42.1	42.1	4%	2	100%
CR936324.2	Medicago truncatula chromosome 5 clone mth2-62a22, COMPLETE SEQUENCE	42.1	42.1	4%	2	100%
BX572637.17	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-17N16 in linkage group 11, complete sequence	42.1	42.1	4%	2	100%
CP000155.1	Hahella chejuensis KCTC 2396, complete genome	42.1	42.1	4%	2	100%
CR962121.2	Medicago truncatula chromosome 5 clone mte1-77f5, COMPLETE SEQUENCE	42.1	42.1	4%	2	100%
AM270309.1	Aspergillus niger contig An14c0010,	40.1	40.1	4%	7.9	100%

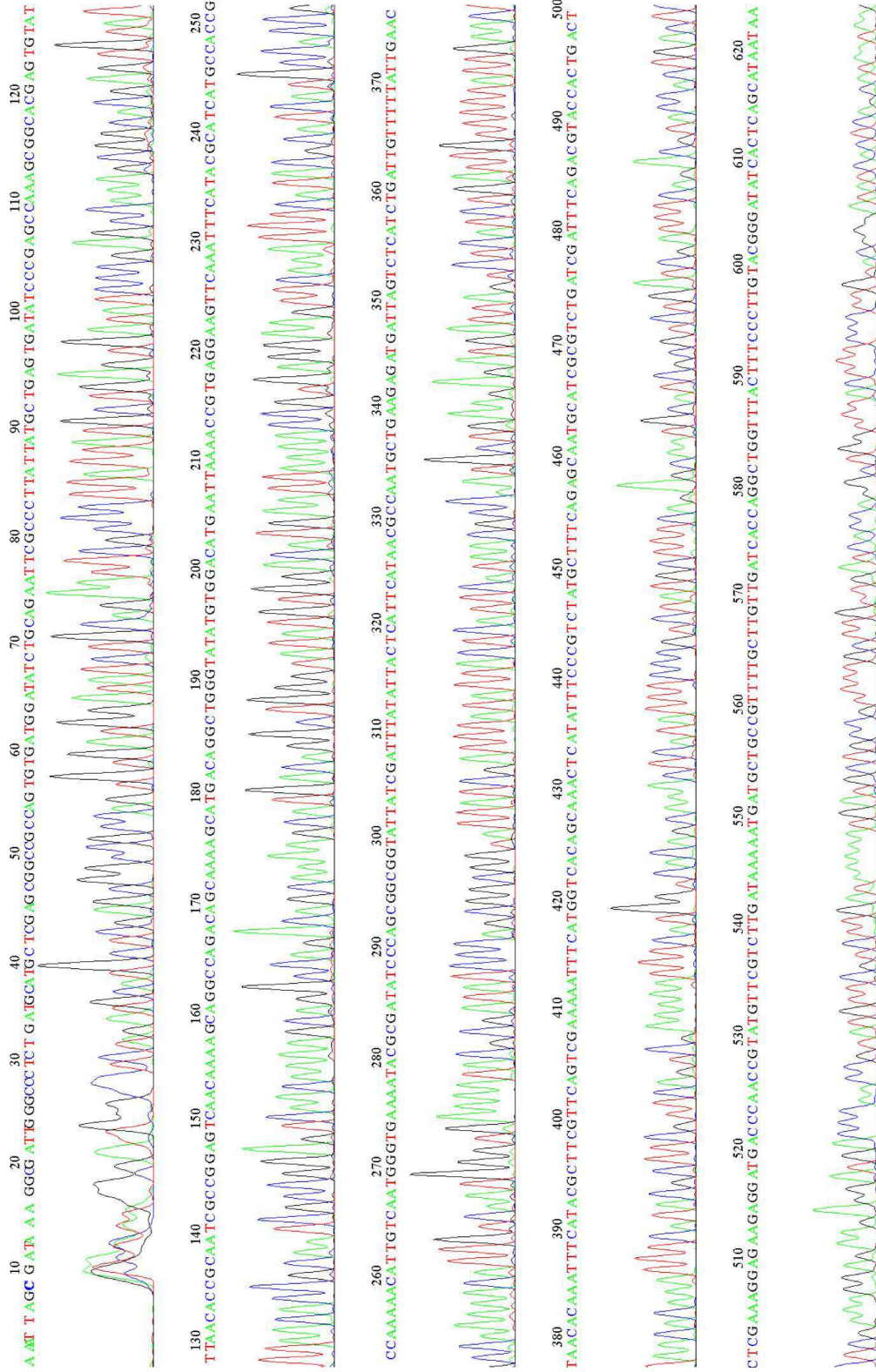
	complete genome					
<u>CU234210.4</u>	S.lycopersicum DNA sequence from clone SL_MboI-33N19 on chromosome 4, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AF056162.1</u>	Musa acuminata 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (Acs1) gene, complete cds	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC182699.2</u>	Populus trichocarpa clone Pop1-72K24, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	5%	7.9	92%
<u>XM_393686.3</u>	PREDICTED: Apis mellifera similar to ventral veins lacking CG10037-PA (LOC410203), mRNA	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC183705.4</u>	Nomascus leucogenys leucogenys clone CH271-277D4, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	95%
<u>CP000393.1</u>	Trichodesmium erythraeum IMS101, complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC145405.3</u>	Gorilla gorilla gorilla clone CH255-421A19, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	95%
<u>AC138732.2</u>	Pongo pygmaeus clone CH253-434E18, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	95%
<u>AC002465.1</u>	Homo sapiens BAC clone CTA-343P13 from 7, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	95%
<u>AC146002.2</u>	Pan troglodytes BAC clone RP43-153B17 from chromosome 7, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC002127.1</u>	Homo sapiens BAC clone CTA-305H12 from 7, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC099739.2</u>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) chromosome 3 clone OJ1528D07, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC161474.4</u>	Pan troglodytes BAC clone CH251-488B17 from chromosome 7, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>XM_447300.1</u>	Candida glabrata CBS138 hypothetical protein (CAGL0I01056g)	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%

	partial mRNA					
<u>AP008209.1</u>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 3	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC144426.1</u>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) chromosome 3 clone OJA1015F07, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR925678.1</u>	Ehrlichia ruminantium str. Welgevonden, complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR925677.1</u>	Ehrlichia ruminantium str. Gardel, complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR767821.1</u>	Ehrlichia ruminantium strain Welgevonden, complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR380955.1</u>	Candida glabrata strain CBS138 chromosome I complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>NM_200656.1</u>	Danio rerio guanylate cyclase activator 1e (guca1e), mRNA >gb BC057493.1 Danio rerio guanylate cyclase activator 1e, mRNA (cDNA clone MGC:66243 IMAGE:3819078), complete cds	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>NM_001016727.2</u>	Xenopus tropicalis mitochondrial ribosomal protein L43 (mrpl43), mRNA >emb CR760046.2 Xenopus tropicalis finished cDNA, clone TNeu138b09	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC132603.4</u>	Mus musculus BAC clone RP24-66C10 from 1, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC126049.3</u>	Mus musculus BAC clone RP23-224I16 from 1, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>L43413.1</u>	Podospira anserina adenyl cyclase gene, exons 1-4	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%

<u>AP000615.1</u>	Oryza sativa (japonica cultivar- group) genomic DNA, chromosome 3, clone:P0043E01	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AE016853.1</u>	Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	<u>100%</u>

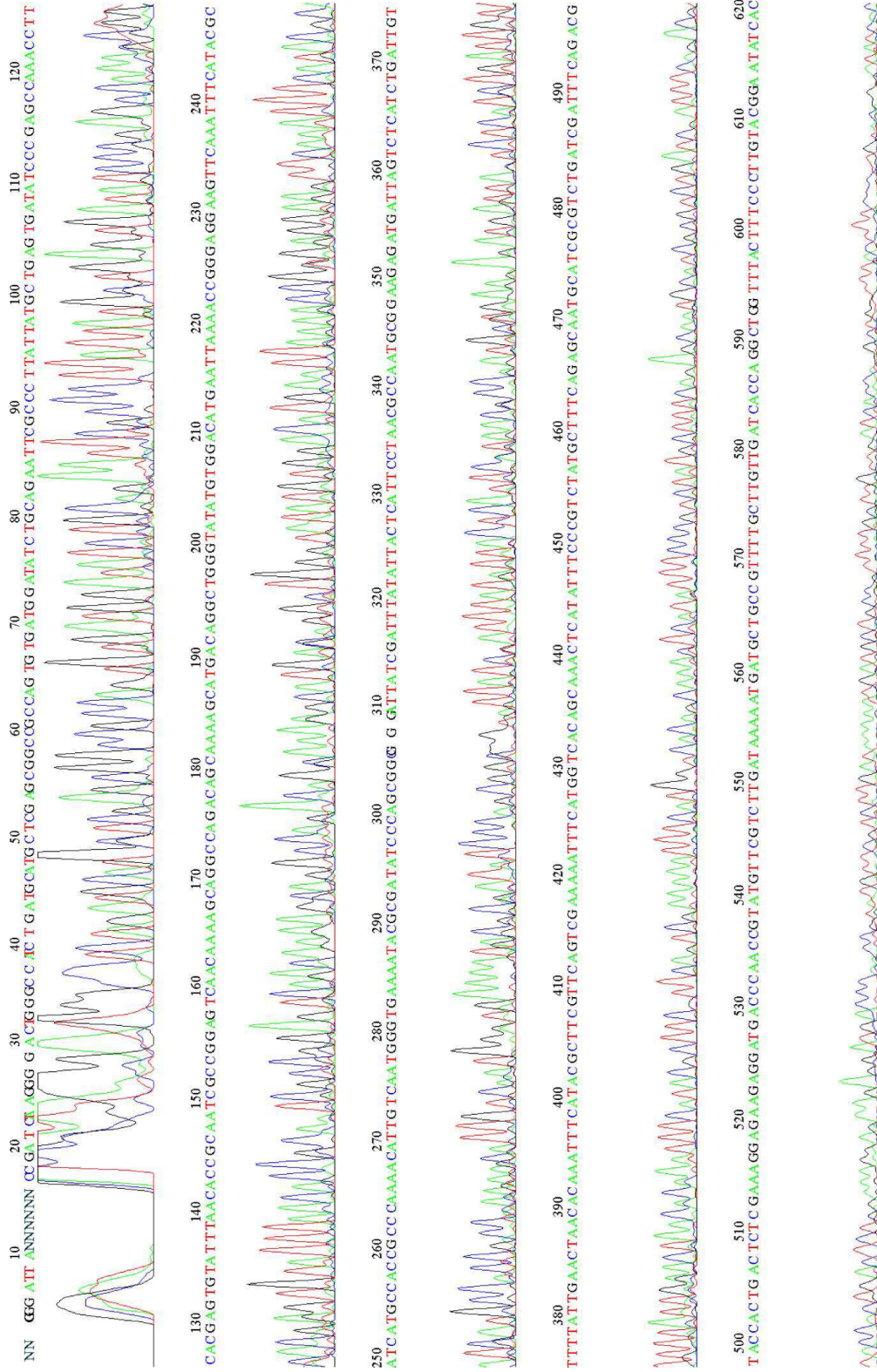
ANEXO 12: Secuencias de pLLB4 con el primer M13F.

File: 061102-R1_E05_pLLB4-M13F.ab1 Run Ended: 2006/11/3 2:40:8 Signal G: 143 A: 166 C: 173 T: 151
Sample: pLLB4_M13F Lane: 27 Base spacing: 14.42 1117 bases in 13074 scans Page 1 of 2



ANEXO 13: Secuencias de pLLB5 con el primer M13F.

File: 061102-R1_105_pLLB5-M13F.ab1 Run Ended: 2006/11/3 2:40:8 Signal G:82 A:92 C:86 T:76
Sample: pLLB5_M13F Lane: 23 Base spacing: 15.28 1223 bases in 13964 scans Page 1 of 2



630 TCA ACA TAA TAA GGGC G AAT TCC A GCA CACT CG CGGC CGTT ACT AGT GG A TCG AG CTCA GTAC CAAG CTT GGGT TA CTT TCC TGG GAAAT GTT ATCC G CAAAG GA TA 750



760 CCF CG TG CTA T TC TATTTA TTG G C A C C CA G G RT C ATA C AG C T AHTT ATCAA GTTGT AGG G GAC AT T GAT AGAGAA TCT AA T A G A GT A T G A A A A G T A TTG A G G C A A T T T G A G G A 880



890 CA TMT AT TGA A GA GTC G GGGC AG GTT G TAT TAT G AFA G A C TAA TGT TAA GAA TCAA CCGTGA TAT AT T GA C CTGG AT AA TGTGT AACC AT T AG TGT TGT TACGAT T ATC ATG CT GTAAAT 1020



1030 TT CG A GA TATAAA TG TGT TAC AT TAAAG TTT G A TGA A A C TAT AG TTT G A G GGGCT TACTCTT TGA G TCTTTTCTCTA TCC CG TCACTGA TGA A GGT T GA GGT G AAT TATGT ATT TAT GACTCT A 1170



1180 C AGC ATC TCTT CTA ATT ATAT TC TGGT ACTT AAT GATAA CA 1220



ANEXO 14: Resultados del Blast realizado para pLLB5 secuenciado con el primer M13F.



results of **BLAST**

BLASTN 2.2.16 [Mar-11-2007]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1175703705-16452-199237010293.BLASTQ5

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
5,115,126 sequences; 20,252,922,320 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

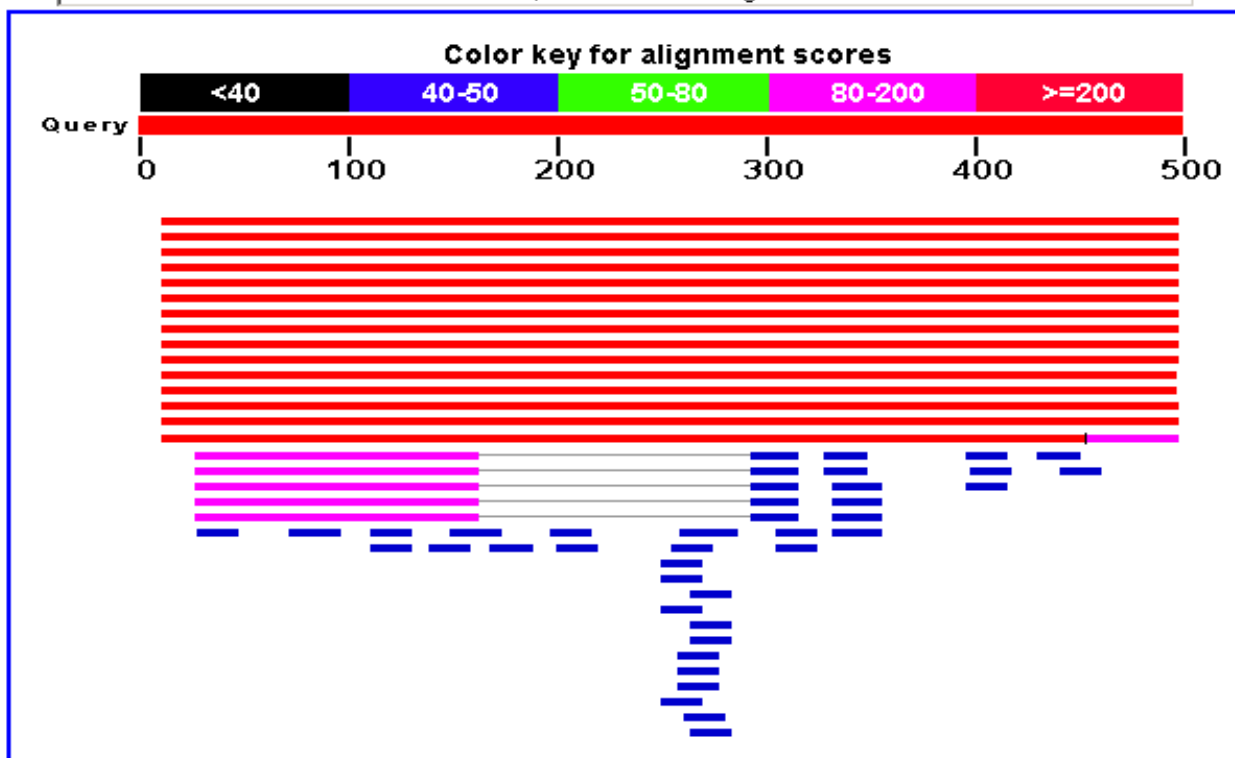
[Taxonomy reports](#)

Query=

Length=500

Distribution of 62 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show define and scores, click to show alignments



ANEXO 15: Resultados del Blast realizado para pLLB5 secuenciado con el primer M13F, con las especies en las que se encontró similitudes.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AP009048.1	Escherichia coli W3110 DNA, complete genome	<u>886</u>	886	97%	0	97%
U00096.2	Escherichia coli K12 MG1655, complete genome	<u>886</u>	886	97%	0	97%
J03412.1	E.coli dmsA, dmsB and dmsC genes encoding anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, complete cds	<u>886</u>	886	97%	0	97%
CP000266.1	Shigella flexneri 5 str. 8401, complete genome	<u>825</u>	825	97%	0	96%
AE005674.1	Shigella flexneri 2a str. 301, complete genome	<u>825</u>	825	97%	0	96%
AE014073.1	Shigella flexneri 2a str. 2457T, complete genome	<u>825</u>	825	97%	0	96%
BA000007.2	Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome	<u>817</u>	817	97%	0	96%
AE005174.2	Escherichia coli O157:H7 EDL933, complete genome	<u>817</u>	817	97%	0	96%
CP000247.1	Escherichia coli 536, complete genome	<u>809</u>	809	97%	0	96%
AE014075.1	Escherichia coli CFT073, complete genome	<u>801</u>	801	97%	0	96%
CP000468.1	Escherichia coli APEC O1, complete genome	<u>799</u>	799	97%	0	96%
CP000243.1	Escherichia coli UTI89, complete genome	<u>799</u>	799	97%	0	96%
CP000034.1	Shigella dysenteriae Sd197, complete genome	<u>793</u>	793	97%	0	95%
CP000038.1	Shigella sonnei Ss046, complete genome	<u>785</u>	785	97%	0	95%
CP000036.1	Shigella boydii Sb227, complete genome	<u>765</u>	865	97%	0	100%
AE008741.1	Salmonella typhimurium LT2, section 47 of 220 of the complete genome	<u>151</u>	197	31%	3.00E-33	100%
AE017220.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67, complete genome	<u>151</u>	197	31%	3.00E-33	100%

AL627268.1	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, complete chromosome; segment 4/20	135	181	31%	2.00E-28	100%
CP000026.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150	135	181	31%	2.00E-28	100%
AE014613.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2, complete genome	135	181	31%	2.00E-28	100%
AC150389.2	Branchiostoma floridae clone CH302-114C5, complete sequence	42.1	42.1	5%	2	96%
AY810200.1	Schistosoma japonicum SJCHGC09207 protein mRNA, partial cds	42.1	42.1	5%	2	96%
AC069220.11	Homo sapiens 3 BAC RP11-115B16 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence	42.1	42.1	4%	2	100%
AC000054.10	Homo sapiens chromosome 3 clone p856 map 3q26, complete sequence	42.1	42.1	4%	2	100%
BX572637.17	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-17N16 in linkage group 11, complete sequence	42.1	42.1	4%	2	100%
CP000155.1	Hahella chejuensis KCTC 2396, complete genome	42.1	42.1	4%	2	100%
AM270309.1	Aspergillus niger contig An14c0010, complete genome	40.1	40.1	4%	7.9	100%
CU234210.4	S.lycopersicum DNA sequence from clone SL_MboI-33N19 on chromosome 4, complete sequence	40.1	40.1	4%	7.9	100%
AF056162.1	Musa acuminata 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (Acs1) gene, complete cds	40.1	40.1	4%	7.9	100%
AC182699.2	Populus trichocarpa clone Pop1-72K24, complete sequence	40.1	40.1	5%	7.9	92%
XM_393686.3	PREDICTED: Apis mellifera similar to ventral veins lacking CG10037-PA (LOC410203), mRNA	40.1	40.1	4%	7.9	100%
AC183705.4	Nomascus leucogenys leucogenys clone	40.1	40.1	4%	7.9	95%

	CH271-277D4, complete sequence					
<u>CP000393.1</u>	Trichodesmium erythraeum IMS101, complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC145405.3</u>	Gorilla gorilla gorilla clone CH255-421A19, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	95%
<u>AC138732.2</u>	Pongo pygmaeus clone CH253-434E18, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	95%
<u>AC002465.1</u>	Homo sapiens BAC clone CTA-343P13 from 7, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	95%
<u>AC146002.2</u>	Pan troglodytes BAC clone RP43-153B17 from chromosome 7, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC002127.1</u>	Homo sapiens BAC clone CTA-305H12 from 7, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC099739.2</u>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) chromosome 3 clone OJ1528D07, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC161474.4</u>	Pan troglodytes BAC clone CH251-488B17 from chromosome 7, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AP008209.1</u>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 3	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC144426.1</u>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) chromosome 3 clone OJA1015F07, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR925678.1</u>	Ehrlichia ruminantium str. Welgevonden, complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR925677.1</u>	Ehrlichia ruminantium str. Gardel, complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR767821.1</u>	Ehrlichia ruminantium strain Welgevonden, complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR936324.2</u>	Medicago truncatula chromosome 5 clone mth2-62a22, COMPLETE SEQUENCE	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>NM_200656.1</u>	Danio rerio guanylate cyclase activator 1e (guca1e), mRNA >gb BC057493.1 Danio rerio guanylate cyclase activator 1e, mRNA (cDNA clone	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%

	MGC:66243 IMAGE:3819078), complete cds					
<u>NM_001016727.2</u>	Xenopus tropicalis mitochondrial ribosomal protein L43 (mrpl43), mRNA >emb CR760046.2 Xenopus tropicalis finished cDNA, clone TNeu138b09	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC132603.4</u>	Mus musculus BAC clone RP24-66C10 from 1, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AC126049.3</u>	Mus musculus BAC clone RP23-224I16 from 1, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>CR962121.2</u>	Medicago truncatula chromosome 5 clone mte1-77f5, COMPLETE SEQUENCE	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>U19028.1</u>	Saccharomyces cerevisiae chromosome XII cosmid 8300	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AL607070.19</u>	Mouse DNA sequence from clone RP23-31C9 on chromosome 4, complete sequence	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>L43413.1</u>	Podospora anserina adenyl cyclase gene, exons 1-4	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AP000615.1</u>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 3, clone:P0043E01	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	100%
<u>AE016853.1</u>	Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 complete genome	<u>40.1</u>	40.1	4%	7.9	<u>100%</u>