

2E



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE SECUENCIAS DE DNA PARA EL DIAGNOSTICO DEL SEXO EN EMBRIONES DE BOVINOS (*Bos taurus*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JOSE ANTONIO GUERRERO GARCIA



ASESOR: DR. ROGELIO ALONSO MORALES

15072



1999

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVIATION
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Evaluación de secuencias de DNA para el diagnóstico del
 sexo en embriones de bovinos (Bos taurus)

realizado por José Antonio Guerrero García

con número de cuenta 8219200-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales

Propietario Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

Propietario M.en C. Arturo Carlos II Becerra Bracho

Suplente Biol. Miguel Angel Palomino Garibay

Suplente M.en C. Patricia Guadalupe Orozco Soto

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

Edna M. Suárez Díaz
 Dra. Edna Ma. Suárez Díaz
 DE BIOLOGIA

[Handwritten signatures and stamps]

Agradecimientos.

Agradezco a mi madre, a mi abuela, a mis hermanos y a mi esposa, por la paciencia que me tuvieron para culminar una etapa.

Al Dr. Rogelio Alonso por sus atinados comentarios, críticas apoyo y paciencia al presente trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio: Oscar, Belem, Refugio, Raúl, Marcia, Simón, al tocayo y a todos quienes influyeron directa o indirectamente en este trabajo y por contribuir de algún modo en mi formación.

Un agradecimiento muy especial a mi amigo Marco Pulido por sus consejos. A mis compañeros de la oficina Anita Zavala, Gina Duarte, Ariel López y Carmen Loyola.

Finalmente, este trabajo representa un esfuerzo que quiero dedicarle a mi hijo.

José Antonio Guerrero García

Son tiempos de ruptura, el conocimiento avanza enmascarado, no se distinguen ante nadie, las precisiones de un mundo que antes tenía la posibilidad de identificar el conocimiento y su producción a partir de la experiencia ajena; bastaba con leer un libro para entrar al universo del conocimiento. Hoy se nos exige algo más. Estar presentes a la hora en que se forjan las cosas, las ideas, las palabras, las acciones. Ser protagonistas para conocer, nada de lo humano debe quedar fuera de nuestra posibilidad de acción y comprensión.

Ariel López Fuentes y Trujillo.

**EVALUACIÓN DE SECUENCIAS DE DNA PARA EL DIAGNÓSTICO
DEL SEXO EN EMBRIONES DE BOVINOS (*Bos taurus*)**

Lista de abreviaturas

A	Adenina
bp	pares de bases
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Citocina
cbp	Cuanto baste para
°C	grados Centígrados o Celsius
dATP	deoxiadenisín trifosfato
dCTP	deoxicitosín trifosfato
dGTP	deoxiguanidín trifosfato
dTTP	deoxitimidín trifosfato
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótidos
G	Guanina
Kb	kilobases
M	Mol
mg	miligramo
ml	Mililitro
mM	milimol
ng	nanogramos
No.	Número
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ph	Potencial de hidrógeno
R.I.A.	Radio Inmuno Ensayos (Radio-Immuno Assay)
rpm	Revoluciones por minuto
secs	segundos
T	Timina
TDF	Factor de desarrollo testicular
TM	Temperatura de fusión
U	Unidades
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromol
pmole	Picomole

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
	2
	3
	5
	6
	7
I	7
II	9
	10
	11
	12
	14
	16
III	18
IV	19
	19
	19
	19
V	20
	20

	Técnica de PCR	20
	Condiciones de amplificación que se emplearon	21
	Descripción de las secuencias utilizadas	23
	Metodología utilizada	25
VI	Resultados y Discusión	27
	Reacciones de estandarización y sensibilidad de PCR amplificando ZFY/X	27
	Reacciones de estandarización y sensibilidad de PCR amplificando BC1.2	31
	Estandarización de las secuencias Bov97M	35
	Análisis de determinación del sexo	37
VII	Conclusiones	40
VIII	Bibliografía	42
	Apéndice 1	49
	Apéndice 2	50
	Apéndice 3	51

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estandarización para la amplificación del fragmento ZFY/X	28
Figura.2	Digestión con PST-1 del fragmento amplificado con ZFY/X	29
Figura 3	Sensibilidad al amplificar el fragmento ZFY/X	30
Figura 4	Estandarización para la amplificación del fragmento BC1.2	32
Figura 5	Estandarización para la amplificación del fragmento 1.709	33
Figura 6	Sensibilidad al amplificar el fragmento BC1.2	34
Figura 7	Estandarización para la amplificación del fragmento Bov97M	36
Figura 8	Ensayo para determinar el sexo	38

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Secuencias específicas empleadas para diagnóstico del sexo a nivel molecular	13
Cuadro 2	Valores de las condiciones de PCR que se variaron en los ensayos de amplificación	22
Cuadro 3	Relación lineal de concentración de ADN y número de células	26
Cuadro 4	Características de las muestras para diagnóstico y resultados	39

Resumen

Se evalúa la sensibilidad y la especificidad de la PCR, amplificando DNA extraído de sangre periférica de bovinos *Bos taurus* por métodos convencionales. Son utilizados principalmente los iniciadores ZFY y BC1.2 bajo diferentes condiciones de amplificación para determinar las cantidades mínimas de material genético necesarias para obtener resultados confiables en el diagnóstico del sexo. Los iniciadores ZFY amplifican hasta una concentración mínima de 5ng de DNA, mientras que BC1.2 amplifica hasta 0.012ng de DNA por ser una secuencia satélite. Por último, se realiza un ensayo de diagnóstico de sexo a 20 muestras de DNA de *Bos taurus* sin conocer integridad y concentración del material genético utilizando el par de iniciadores que más sensibles del presente estudio.

I. INTRODUCCIÓN

En mamíferos el sexo se regula genéticamente por la presencia del cromosoma "Y". Este cromosoma induce a la diferenciación de machos y su ausencia, da como resultado a hembras.

De manera que esto nos permite afirmar que en el cromosoma "Y" se encuentra él o los genes determinantes del sexo, cuya expresión induce a la diferenciación de órganos sexuales masculinos en el embrión (Marshall Graves y Schmidt , 1992), permitiendo tener posibilidades de identificar el sexo a nivel embrionario. Es decir, por tener el cromosoma "Y" secuencias de DNA específicas, es posible diagnosticar el sexo de un organismo.

Para esto, actualmente existen diversas técnicas que se han desarrollado, permitiendo realizar el diagnóstico del sexo en embriones (Aaman R.P., 1989; Bondioli, et al., 1989; King W.A., 1984; Rojas F.J., 1995). Sin embargo, las mejores posibilidades son a nivel de Biología molecular en donde se utilizan técnicas que emplean el DNA (ácido desoxirribonucleico) obtenido de células embrionarias. Dentro de dichos procedimientos se encuentra la técnica de PCR (Reacción en Cadena de

la Polimerasa), que ha fortalecido el desarrollo de las técnicas de investigación para el sexado de embriones (Aasen y Medrano, 1990).

Por tal motivo, el presente trabajo está basado en la evaluación de la amplificación de secuencias localizadas en el cromosoma "Y", empleando la técnica de PCR para conocer los límites de sensibilidad en cuanto a la cantidad de material genético necesario en el diagnóstico del sexo en *Bos taurus*.

II ANTECEDENTES

Las técnicas de aprovechamiento de sistemas biológicos, de sus productos o sus partes, se inscriben en el ámbito de la biotecnología; a la cual se ha incorporado recientemente la ingeniería genética molecular, que hace posible la manipulación del genoma de los seres vivos y de esta manera, aprovechar en el plano tecnológico las propiedades y los productos de microorganismos, células en cultivo y organismos superiores. (Kanavakis *et al.*, 1997., Avvisati *et al.*, 1996; Perego *et al.*, 1996; Fechner *et al.*, 1996; Chiu y Ou, 1996; Cazenave *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1995; Zalis *et al.*, 1996).

Una aplicación que se ha venido desarrollando en los últimos diez años es el diagnóstico de sexo (Aaman, 1989; Betteridge, 1989; Cotinot *et al.*, 1991), esta ha sido fomentada por la demanda que se tiene de predecir el sexo en los organismos, misma que ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas a nivel celular y molecular para el diagnóstico del sexo en animales de granja.

Gran parte de éstos procedimientos están basados en las diferencias genéticas que presentan los organismos en el par de cromosomas sexuales en organismos con genoma heteromórfico. (Ohno, 1971).

Se sabe que esta diferencia en el par de cromosomas sexuales se presenta en mamíferos específicamente en el cromosoma "Y", dando la facultad a este grupo de organismos con ese genotipo, de determinar el sexo de su progenie debido a que en este cromosoma se encuentra el gen SRY que codifica para el Factor de Desarrollo Testicular ó TDF, (Testis Determining Factor), responsable de la diferenciación y desarrollo de testículos, ya que al no presentarse dicho factor se da la diferenciación de ovarios por acción de la hormona antimülleriana, inhibiendo así la acción del TDF (Marshall Graves y Schmidt , 1992).

Para la identificación experimental del sexo en el humano y en diferentes mamíferos, se han desarrollado varios métodos.

MÉTODOS PARA DETERMINAR EL SEXO.

MÉTODO CITOLÓGICO.

Este método se desarrolló en las décadas de los 70's y 80's (Hare *et al.*, 1976; King, 1984), se basa en localizar cuerpos de Barr en células somáticas y en biopsias de embriones por medio de colorantes como la orceína que tiñe el cuerpo de Barr presente sólo en organismos del sexo femenino. Por otra parte, también se realizan análisis citogenéticos ó también llamados cariotipos (Betteridge, 1989), los cuales se han utilizado mucho para identificar la presencia de anormalidades en cromosomas o la presencia del cromosoma "Y" en células diploides o haploides (Martin, 1991). Usualmente estos análisis consisten en cultivar células durante 72 horas y detener la división celular con colcemid (colchicina) en el momento de mayor número de divisiones mitóticas para detectar la presencia del cromosoma "Y" al microscopio directamente (Kibbelaar *et al.*, 1992) o tiñendo los cromosomas con colorantes fluorescentes (Popescu *et al.*, 1988).

Por otra parte, dicho método se ha utilizado en combinación con técnicas moleculares como amplificación de secuencias e hibridación para denotar las divergencias cromosómicas entre bovinos y caprinos (Iannuzzi y Pia Di Melo, 1995).

MÉTODO INMUNOLÓGICO

Está basado en la identificación de un antígeno presente en el macho pero no en la hembra, el antígeno H-Y (White *et al.*, 1987). Este método ha sido de alguna manera precursor para el desarrollo de otras técnicas más sofisticadas, como la de inmunofluorescencia ligada al cromosoma "Y" (White *et al.*, 1983). Consiste en producir un anticuerpo marcado fluorescentemente dirigido contra el antígeno H-Y, presente sólo en la capa glicoproteica de la zona pelúcida de los machos para hacer fluorescer aquellos embriones de dicho sexo al iluminarlos con la luz apropiada (Booman *et al.*, 1989).

Uno de los inconvenientes de esta técnica, es que la presencia de este antígeno sólo se localiza en embriones durante el estadio de 8 células (Goldberg, 1988); ya que después de ese momento, se detiene la producción de la proteína en la membrana y por lo tanto, ya no se detecta en los estadios posteriores de desarrollo embrionario, dificultando con ello el sexado de embriones mayores.

Sin embargo, se sabe que el gen H-Y juega un papel importante en la inducción del TDF (Goldberg, 1988); se ha evaluado que este tipo de análisis no afecta la viabilidad de los embriones de bovinos cuando son sexados y transferidos (White *et al.*, 1987).

Otra posibilidad de diagnóstico, es mediante evaluaciones en la concentración de testosterona a través de un Radio-Inmuno-Ensayo (R.I.A.). La gónada humana se diferencia en testículo a la séptima semana y en ovario a la octava ó novena semana. El factor epigenético que influye en ese momento, es la producción de andrógenos por las células somáticas de la gónada masculina que impulsan la formación del testículo. Esta hormona actúa localmente y acelera el desarrollo del testículo, mientras que la falta del andrógeno hace que el desarrollo adquiera características de ovario (Jost, 1970; Onho, 1971). Por lo tanto, el RIA consiste en

hacer titulaciones con un anticuerpo marcado radiactivamente en el líquido corioalantoideo para obtener en un contador de centelleo las lecturas del andrógeno a diferentes diluciones para pronosticar el sexo del organismo en cuestión, dependiendo de la concentración que presente.

MÉTODOS MOLECULARES

Se desarrollan al final de los 80's y principios de los 90's. Parten del estudio y detección de secuencias nucleotídicas localizadas en regiones homólogas o análogas en los cromosomas sexuales.

Estas regiones características, pueden estar relacionadas con la determinación del sexo, como sucede con el gen de la aromatasa que sirve para el diagnóstico del sexo en aves (Elbrecht y Smith, 1992).

Se han reportado dos tipos de secuencias presentes en cromosomas sexuales para diagnosticar el sexo: secuencias de copia única y secuencias altamente repetidas o satélites.

Para *Bos taurus* las secuencias de copia única reportadas son: SRY (Payen y Cotinot, 1993), ZFX/Y (Aasen y Medrano, 1990), Bov 97M (Schröder *et al.*, 1990; Miller y Koopman, 1990) y AM/X (Ennis y Gallagher, 1984); y las secuencias satélites son: BC1.2 (Leonard, 1987), BRY.1 (Matthews *et al.*, 1992), λ ES6.0 (Bondioli *et al.*, 1989) (cuadro 1).

Cuadro No.1. Secuencias específicas empleadas para diagnóstico del sexo a nivel molecular.

Nombre del Oligonucleótido	Secuencias 5'→3'	Longitud del fragmento amplificado	Tipo de secuencia
SRY (Payen y Cofinot, 1995)	TGAAGCGACCCATGAACG CGACGAGGTCGATACTTA	200 bp	Única
BRY1 (Mathews y Reed, 1992)	GGATCCAGAGACACAGAACAGGCTGC TTGATCAAGCTAATCCATCCATCCTAT	307 bp	Satélite
ZFY/X (Aasen y Medrano, 1990)	ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT GCACCTCTTTGGTATCTGAGAAAGT	447 y 445 bp	Única
MEG0 (Bondioli, <i>et al.</i> , 1989)	GAAATCGGTAGAGCCCGCATCTCGGTC GAAATCTTGAAGCAGCCAAGCCCCGCG	562 bp	Satélite
BOV97M (Miller y Koopman, 1990)	CCTACCTAATAGATCCAGCTG CTGTCTCTGAAACAGATGAGCTG	97 bp	Única
BC1.2 (Leonard, 1987)	ATCAGTGCAGGGACCGAGATG GATCAAGCAGCCGATAAACACTCCTTGG	150 bp	Satélite
AM/X (Enns & Gallagher, 1994)	CAGCCAAACCTCCCTCTGC CCCGCTGGTCTGTCTGTTC	280 y 217 bp	Única

Estas secuencias diagnósticas pueden ser detectadas por hibridación y por amplificación de DNA.

Se han desarrollado técnicas de hibridación con sondas marcadas para diagnosticar el sexo de animales (Elbrecht y Lazier, 1984). Este método es muy sensible ya que se requiere de pequeñas cantidades de DNA. Consiste en detectar el segmento de interés, exponiendo una secuencia conocida de DNA de cadena sencilla marcada con un isótopo radiactivo ó colorantes fluorescentes (sonda) frente a otra muestra de

DNA, digerido con alguna enzima de restricción de DNA (a este método se le llama Southern blot). El principio de este método es que por complementariedad de las bases Adenina – Timina (A-T), Guanina – Citocina (G-C), entre ambas cadenas, se une el fragmento conocido a una región específica y homóloga del DNA digerido. Cuando la hibridación de la sonda se dirige a DNA no digerido e inmovilizado en un filtro se le llama “dot blot”.

La unión de la sonda al DNA problema se verifica en un contador de centelleo o al exponer el DNA hibridizado en una placa radiográfica o exponiendo el DNA a luz fluorescente.

AMPLIFICACIÓN DE DNA.(PCR)

Es una técnica utilizada en biología molecular para sintetizar *in vitro* un fragmento de DNA de manera exponencial. Consiste en realizar varias copias de una región a partir de un molde de DNA. Las copias se generan de una región específica y está dirigida por iniciadores, que son pequeños segmentos (16-30 bases) de DNA sintético.

Estos tienen una secuencia que es complementaria al sitio de interés de la doble cadena de DNA templado en sentido 5'-3' y 3'-5'. A partir de este sitio se incorporan los deoxinucleótidos, con ayuda de una enzima (*Taq*- Polimerasa) para formar los fragmentos de interés (Griffin y Griffin, 1994). A esta técnica se le llama PCR (Polimerase Chain Reaction) o Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Una de las consideraciones que hay que tener en cuenta, es que el éxito de los ensayos con PCR depende del diseño del protocolo y del diseño de los iniciadores (Innis y Gelfand, 1990).

Para asegurar el debido alineamiento del iniciador con el templado de manera eficiente y con alta especificidad, se debe considerar que:

- a) Al menos una parte de la secuencia oligonucleotídica del templado por amplificar tiene que ser conocida.
- b) El par de iniciadores no sean autocomplementarios.
- c) El par de iniciadores no sean complementarios en contrasentido ó contraparte.
- d) Que la distribución y composición de las bases púricas y pirimidicas del par de iniciadores sea aleatoria.
- e) Que la longitud del iniciador sea entre 18 a 25 bases.
- f) La temperatura de fusión (TM) de cada iniciador sea cercana entre sí (Innis y Gelfand, 1990).

En el caso de bovinos se han evaluado diferentes técnicas de PCR; ya sea para diagnosticar enfermedades congénitas o para identificar características ligadas a la producción de proteínas en carne o leche.

Para las reacciones de esta técnica, se requiere de pequeñas cantidades de DNA y de la enzima *Taq*- Polimerasa, la función de esta enzima es sintetizar los fragmentos correspondientes a los segmentos identificados en la cadena de DNA en cuestión.

VENTAJAS DEL USO DE PCR

La técnica de PCR amplifica regiones del DNA de cadena sencilla, utilizando un oligonucleótido como iniciador para la síntesis de una nueva cadena complementaria, esta cadena sencilla de DNA requerida como templado se produce por calentamiento a temperatura cercana al punto de ebullición.

Se requiere de una pequeña sección de doble cadena para iniciar la síntesis de los fragmentos que se quiere amplificar y así dirigir la síntesis de una región específica. El número teórico de fragmentos es 2^n en donde n = número de ciclos que comprende la reacción. Así, la producción de copias de las secuencias blanco es exponencial con respecto al número de ciclos.

La PCR puede ser utilizada para la identificación del sexo de células embrionarias (p. ej. en el humano se utiliza la secuencia satélite DYZ1 de 3.5kb en donde se espera un fragmento de 149bp presente en el cromosoma "Y"). La amplificación de las secuencias repetidas a partir de unas cuantas células, genera suficiente producto para ser visualizado en un gel con bromuro de etidio. Aunque parece ser mas o menos susceptible de contaminación por DNA presente en amortiguadores, tubos, reactivos, enzimas etc., que se utilizan durante el proceso de amplificación (Handyside y Kontogianni, 1991).

Es un método de alguna manera "selectivo", ya que se amplifica una secuencia conocida a través de iniciadores u oligonucleótidos diseñados, de tal forma que reconocen el segmento diagnóstico, permitiendo además ser utilizados posteriormente como sondas moleculares para el estudio de estructuras cromosómicas y/o mapeo genético. Sin embargo, se ha reportado que los iniciadores pueden llegar a fallar y no producir ningún fragmento amplificado en los casos en que

se tienen organismos con disgenesia gonadal, es decir con desarrollo incompleto de las gónadas o con alteraciones en los órganos genitales (Berkovitz *et al.*, 1992).

El refinamiento de las técnicas para sexar embriones en animales domésticos, conducirá a que los resultados se obtengan en menos de 24 hrs y a un extendido uso de todos ó algunos de estos métodos (Li *et al.*, 1988).

La PCR también se utiliza en estudios de evolución molecular para determinar el grado de parentesco entre las especies y construir árboles filogenéticos como los que se hacen por métodos clásicos, asumiendo que las especies divergen de un ancestro común. Otro uso que se le ha dado es para comparar secuencias nucleotídicas entre especies y medir el grado de diferencia en medida de degeneración de secuencias (Matthews y Reed, 1992) o por lo contrario, la homología de genes por comparación de los cambios en las secuencias de los mismos entre las especies utilizando DNA cromosómico ó DNA mitocondrial, debido a que su tasa de mutación es más alta y pueden medirse los cambios en periodos cortos de tiempo (Payen y Cotinot, 1993).

La versatilidad de la PCR es enorme y su combinación con secuenciación es una poderosa herramienta para el análisis de genes.

III JUSTIFICACIÓN

Con base en la creciente demanda en la industria animal de desarrollar programas de producción más efectivos, dependiendo de los objetivos de cada granja, se han implementado procedimientos de inseminación artificial, de fertilización *in vitro*, de transferencia de embriones etc ; sin embargo, el implementar programas de sexado con la finalidad de producir a gran escala sólo uno de los dos sexos; ya sea para la producción de leche o de carne, favorece las metas que se persiguen en la producción animal.

La amplificación de secuencias presentes en el cromosoma "Y" para diagnosticar el sexo, puede ser empleada como estrategia de producción de animales domésticos, coadyuvando a la producción de crías de sexo predeterminado.

Por lo tanto, el presente estudio está basado en la amplificación de secuencias de ADN específicas del cromosoma "Y" en *Bos taurus*, utilizando para ello, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con pequeñas cantidades de ADN extraído de sangre periférica, con el fin de evaluar la sensibilidad de la técnica de amplificación; de tal manera que los resultados obtenidos sean un sostén a futuro para la técnica del sexado de embriones bovinos y fomentar la realización de un banco de embriones presexados en nuestro medio.

IV HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La utilización de diferentes concentraciones de DNA obtenida de sangre periférica de bovinos para la amplificación de secuencias únicas y altamente repetidas localizadas en el cromosoma "Y", permiten determinar la sensibilidad y la especificidad de la técnica de PCR, para optimizar el diagnóstico del sexo.

OBJETIVO

- Establecer las condiciones óptimas y/o mínimas por la técnica de PCR, para amplificar secuencias de DNA específicas del cromosoma "Y" de bovinos para determinar el sexo.

OBJETIVO PARTICULAR

- Determinar la sensibilidad y especificidad de la amplificación, por PCR, de secuencias tanto de copia única como de secuencias repetidas presentes en el cromosoma "Y" de *Bos taurus*, para determinar la cantidad mínima de DNA que se requiere para obtener resultados confiables en la identificación del sexo en embriones.

V MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE DNA

Para llevar a cabo los ensayos de PCR, se realizó la extracción de DNA (Apéndice 1) a partir de muestras de sangre periférica de *Bos taurus* de machos y hembras adultos. Las muestras fueron colectadas en tubos vacutainer con EDTA 0.5 M. La técnica de extracción de DNA empleada fue desarrollada de acuerdo con lo mencionado por Maniatis *et al.* (1989).

Una vez extraído el DNA, fue evaluada su integridad en un gel de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio (0.5µg/ml) observando los resultados en un transiluminador de luz ultravioleta, con el fin de corroborar que el DNA extraído no se encontrara degradado por alguna DNasa, producto de contaminación.

Finalmente en este proceso, se tomó una alícuota de cada DNA purificado, para cuantificar su concentración con un fluorómetro modelo DyNA Quant 2000 de HOEFER, para estandarizar las concentraciones de los ensayos de PCR posteriores.

TÉCNICA DE PCR

Se utilizaron iniciadores complementarios a las secuencias ZFY (Aasen y Medrano, 1990) y BC1.2 (Leonard *et al.*, 1987), 1.709 (Skowronski, et al., 1984), Bov97M (Miller y Koopman, 1990) las cuales amplifican diferentes regiones específicas del cromosoma "Y" de bovinos. Los iniciadores fueron tomados del Genebank y sintetizados en Biolabs.

En las amplificaciones con los iniciadores para BC1.2, a manera de control positivo en dichas reacciones, fueron utilizados conjuntamente iniciadores para el satélite

1.709 (Skowronski *et al.*, 1984), con el fin de descartar la posibilidad de que la reacción no se hubiera llevado a cabo.

Los resultados de la amplificación fueron evaluados en un gel de agarosa dependiendo del tamaño del fragmento esperado (Southern, 1975) al 2% ó 2.5 % conteniendo Bromuro de Etidio e iluminándolo bajo luz ultravioleta.

Como control negativo en las reacciones en ambos sexos, simplemente no se adicionaba DNA a un ensayo de la mezcla de PCR.

.CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN QUE SE EMPLEARON

Todos los ensayos de PCR fueron realizados con la ayuda de un termociclador ERICOM II; en un volumen final 20 μ l, empleando para ello, tubos de 200 μ l de capacidad.

Para conocer las condiciones iniciales para amplificar cada fragmento, inicialmente se utilizaron las condiciones dadas por los autores Aasen y Medrano (1990); Leonard *et al.* (1987) y Skowronski *et al.* (1984) respectivamente.

Posteriormente, se calculó la temperatura de fusión (TM) o temperatura de reasociación de cada iniciador, de acuerdo a la fórmula:

$$TM=59.5 + 41 (\%G+C) - 675 / n \text{ (Innis y Gelfand, 1990)}$$

Donde G y C son variables independientes que corresponden a la proporción que guardan la guanina y citocina respectivamente en cada secuencia del iniciador.

Las constantes 59.5, 41 y 675, son valores dados por Innis y Gelfand (1990). El valor de n , corresponde al número de bases que conforman cada fragmento iniciador.

Se implementaron protocolos de PCR en donde las variables eran. la temperatura de reasociación, el tipo de buffer y la concentración de *Taq*- polimerasa, hasta encontrar los mejores resultados de amplificación, como se indica en el cuadro 2.

Cada 20 μ l de mezcla de PCR contenía: 0.2 mM de dNTP's (1X), 1U de *Taq*- Polimerasa, amortiguador de PCR (la preparación de cada tipo de amortiguador se detalla en el apéndice 2), 0.2% de Triton X-100, 10 μ M de cada iniciador, BSA 0.3mg/ml, DNA y cbp. 20 μ l de H₂O bidestilda estéril.

Cuadro 2. Valores de las condiciones de PCR que se variaron en los ensayos de amplificación.

Temperatura de reasociación (°C)	Tipo de Amortiguador	Concentración de <i>Taq</i> - Polimerasa por cada 20 μ l de reacción	No. de ciclos
50,55,60,65	C	0.01 U/ μ l 0.02 U/ μ l	30 y 40
50,55,60,65	D	0.01 U/ μ l 0.02 U/ μ l	30 y 40

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS UTILIZADAS

La secuencia ZFY, corresponde al gen ZFY, que en la década de los 80's, se mencionaba que correspondía al TDF (Palmer *et al.*, 1989). Posteriormente se nombró el gen como "ZFY", debido a que codifica para una proteína con un dedo de zinc (Zinc Finger Protein) cuya función se desconoce. Dicho gen de secuencia única, tiene una longitud de 447 pares de bases y se localiza en el brazo corto del cromosoma "Y" (Page *et al.*, 1987). El apéndice 3 muestra la secuencia completa de este gen.

Los iniciadores de la secuencia ZFY.

For. 5'- ATA ATC ACA TGG AGA GCC ACA AGC T-3' (TM= 50.94 °C) y

Rev 5'-GCA CTT CTT TGG TAT CTG AGA AAG T-3' (TM= 49.3 °C) (Aasen y Medrano, 1990).

Estos iniciadores amplifican por igual la secuencia homóloga que se encuentra en el cromosoma "X".

Es necesario someter a digestión con la enzima de restricción PST-1 el fragmento obtenido de la amplificación, para distinguir el origen del fragmento obtenido. Esta enzima de restricción, corta en el sitio que corresponde a la secuencia que proviene del cromosoma "Y" formando dos fragmentos, uno de 344 bp y otro de 103 bp.

Los iniciadores BC1.2 (Leonard *et al.*, 1987) cuya secuencia completa se detalla en el apéndice 3, corresponde a un fragmento de tipo satélite de 150 bp de longitud y tiene la secuencia:

For 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG -3' (TM=61°C) y

Rev 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T-3' (TM=59°C).

Esta secuencia debe su nombre a que fue clonado del plásmido pBC1.2 (Cotinot *et al.*, 1980).

Los iniciadores para el satélite 1.709 se utilizaron como control positivo ya que amplifica en ambos sexos.

Aunque ésta no es una secuencia específica de cromosomas sexuales, fue elegida como control interno, debido a:

- a) Que amplifica una región satélite fuera de los cromosomas sexuales.
- b) Es frecuente encontrar que la amplificación en los ensayos de PCR se altere cuando se agrega DNA a bajas concentraciones.
- c) Que su TM es cercano a los iniciadores empleados para el diagnóstico del sexo que se utilizan en este estudio.

Este control positivo permite descartar los resultados falsos negativos del fragmento diagnóstico del cromosoma "Y". Esta secuencia está diseñada para que siempre amplifique

El satélite 1.709, es una secuencia repetida, cuya unidad de repetición tiene una longitud de 3.8Kb (apéndice No.3), es específica para bovinos y está localizada en las regiones centroméricas de todos los autosomas (Skowronski *et al.*, 1984).

Los iniciadores amplifican una región de 580 bp. Su secuencia es:

For 5'-TTT ACC TTA GAA CAA ACC GAG GCA C-3' (TM=61.5°C)

Rev 5'-TAC GGA AAG GAA AGA TGA CCT GAC C-3'(TM=63.2°C)

El nombre del satélite 1.709 proviene de su densidad de flotación en gradientes de cesio (Skowronski, 1984).

La secuencia Bov97M (Miller y Koopman, 1990, debe su nombre porque corresponde a una secuencia obtenida de una biblioteca genómica para obtener fragmentos específicos del cromosoma "Y" de ratones. La longitud de la secuencia que se obtuvo por PCR fue de 97bp, Esta secuencia al hibridarla con DNA de Bovinos de ambos sexos, se obtuvieron en Southern Blot bandas únicamente en las muestras de fenotipo macho, de tal manera que son consideradas como secuencias específicas para cromosoma "Y" de bovinos.

El fragmento de este iniciador tiene la secuencia:

For 5'- CCT-ACC-TAA-TAG-ATT-CCA-GCT-G-3' (TM= 59°C)

Rev 5'-CTG-TCT-CTG-AAA-CAG-ATG-AGC-TG-3' (TM= 63°C)

METODOLOGÍA UTILIZADA

Una vez cuantificado el DNA, se hicieron los cálculos correspondientes para preparar diluciones stock de 50 a 100 ng de DNA de cada sexo. Posteriormente, se realizaron los ensayos de estandarización de la técnica de amplificación para cada iniciador (ZFY y BC1.2), tomando en cuenta las variables del cuadro 2 y adicionando 100 ng de DNA en cada tubo con su respectiva repetición para cada sexo.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de amplificación, se evaluó la especificidad de la PCR, para lo cual se realizaron ensayos en gradiente de concentración de DNA en ambos sexos, variando la cantidad de enzima agregada a las reacciones, la concentración de iniciadores (ZFY y BC1.2) y el número de ciclos.

En estos ensayos fue necesaria la utilización del iniciador 1.709 como control positivo de las reacciones de PCR en cada reacción, debido a que se añadieron

concentraciones menores a 10 ng de DNA además de que este iniciador reconoce una región satélite presente en ambos sexos. Esto nos permitió comprobar cuando los iniciadores específicos del sexo fallaron en una reacción.

El gradiente de concentración de DNA en los ensayos de PCR corresponde a un número teórico de células presentes en la muestra, el cuadro 3 muestra las concentraciones que se prepararon para realizar las amplificaciones correspondientes

Cuadro 3. Relación lineal de concentración de DNA y número de células.

[DNA] (ng)	Equivalente en células
100	1.6×10^4
50	8.3×10^2
10	1666
5	833
1	166
0.5	83
0.1	16
0.05	8
0.025	4
0.012	2

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez extraído el DNA de las muestras de sangre de *Bos taurus* de ambos sexos, se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1%. Aquellas muestras con mayor integridad fueron cuantificadas y utilizadas para su posterior análisis de PCR

REACCIONES DE ESTANDARIZACIÓN Y SENSIBILIDAD DE PCR AMPLIFICANDO ZFY/X.

Los ensayos de estandarización de PCR para el iniciador de secuencia única ZFY/X, se realizaron en ambos sexos, encontrando que las mejores condiciones en el termociclador en las que se obtuvieron resultados, fueron:

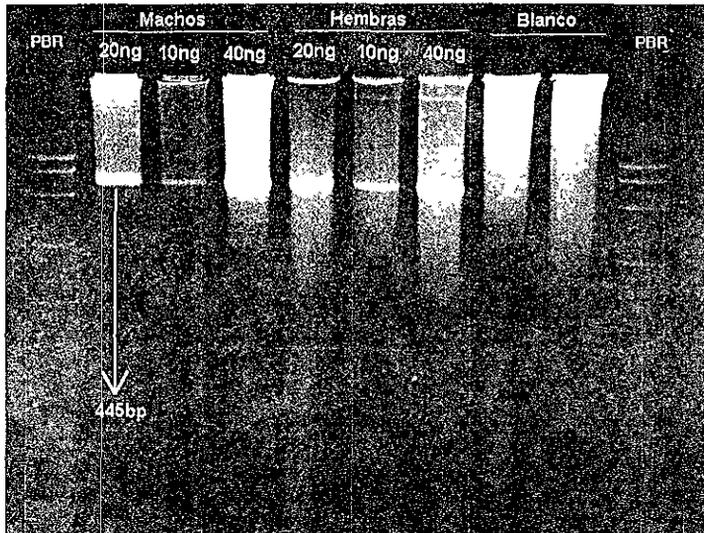
A 94 °C 1:30 min. seguido 40 ciclos de

- 1) 52°C por 25 segs.,
- 2) 72°C por 30 segs y
- 3) 94 °C por 30 segs. Y finalmente 3 min. a 72°C.

La mezcla contenía: 2µl de amortiguador 10X para PCR tipo "C" (20 mM MgCl₂, KCl 500mM; Tris- HCl ph 8.3 100 mM; gelatina 10 µg/ml), 2µl de deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2mM cada uno, 1 µl de iniciadores For y Rev (10 mM cada uno), 1.5 µl de Albúmina Sérica Bovina (BSA), (3 mg/ml), 1.0 µl de Tritón X100 al 2%, 0.25 µl de enzima *Taq*- Polimerasa (5U/µl).y cpb. 20 µl de H₂O didestilada y estéril (Figura 1), a pesar de que el TM teórico de esta secuencia oscila entre 50.94 y 49.3 °C.

A medida que la temperatura de reasociación se eleva la especificidad de la reacción aumenta; sin embargo, a temperaturas superiores a 52 °C forman barridos de amplificación inespecífica.

Figura 1. Estandarización para la amplificación del fragmento ZFY

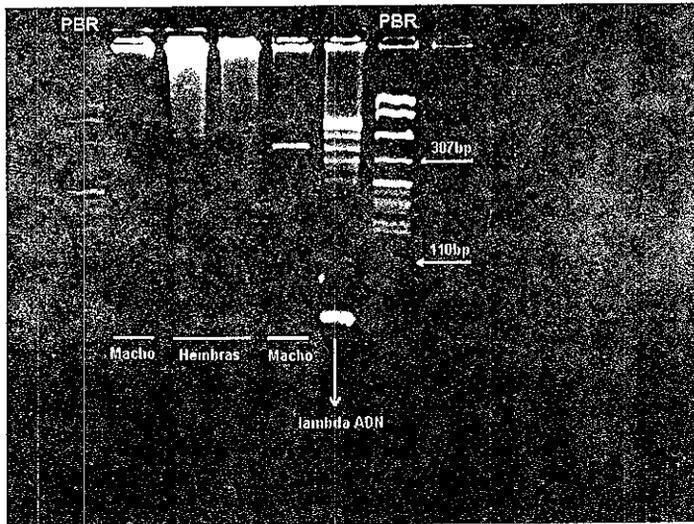


Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio en TBE 1X. Se observa la amplificación del fragmento de 445bp durante 40 ciclos, utilizando 10, 20 y 40 ng de DNA de macho y hembra. El marcador molecular empleado es PBR 322 cortado con MSP-1. La intensidad de las bandas corresponde a la concentración de DNA de cada carril. El ensayo blanco no contiene DNA haciendo la función de muestra control negativo.

Para corroborar que el fragmento amplificado corresponde al ZFY, se sometió a digestión el producto de la PCR con la endonucleasa PST-1, esperando que dicha enzima reconociera el sitio de corte del fragmento amplificado (447bp) correspondiente al cromosoma "Y" en las muestras de macho, dando como resultado tres fragmentos: el fragmento homólogo del cromosoma "X" (445bp), una banda de 344bp y otra de 103 bp (ambas localizadas en el cromosoma "Y"), mientras que en las muestras de DNA de hembra (445bp), debido a que presentan dos cromosomas "X", la enzima PST-1 no reconoce sitio de corte, esto es que en las muestras donde se amplificó DNA de hembra con el iniciador ZFY, se obtuvo un fragmento de 445bp que no es digerido con

la enzima de restricción PST-1 pero que sirve como control positivo de la reacción de PCR (figura 2).

Figura 2. Digestión con PST-1 del fragmento amplificado ZFY.



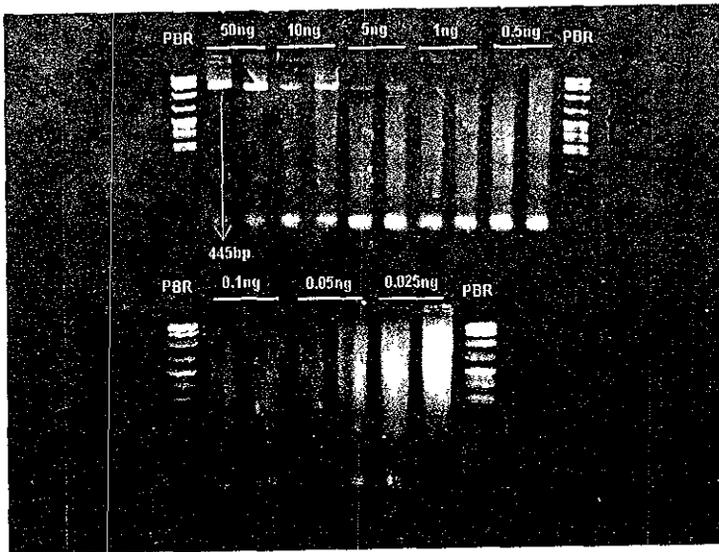
Separación en gel de agarosa al 2.5% con bromuro de etidio, de los fragmentos obtenidos al digerir 5 ng con PST-1 a 37°C, el producto de la amplificación con el iniciador ZFY. El carril 6 es un control positivo con DNA del fago Lambda. El marcador molecular utilizado es PBR322 digerido con PST-1.

Cabe mencionar, que de los 20µl de la reacción de PCR (donde puede haber algo de evaporación), 10µl se cargaron en el gel de la figura 1 y el volumen restante en el gel de la figura 2.

Una vez encontradas las condiciones óptimas de amplificación con la utilización de los iniciadores ZFY y corroborar que el fragmento correspondía al esperado, se procedió a realizar los ensayos de sensibilidad de la PCR, adicionando diferentes concentraciones de DNA (50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.025 ng) para determinar la concentración

mínima a la cual se obtiene amplificación, encontrando amplificación del fragmento ZFY desde una concentración de 50 a 5 ng, utilizando las condiciones encontradas al estandarizar la PCR para amplificar el segmento ZFY/X (Fig 3). Estas concentraciones de DNA a las que se encontró amplificación, equivalen a una sensibilidad de 833 células aproximadamente

Figura 3. Sensibilidad al Amplificar el Fragmento ZFY/X



Evaluación de diferentes concentraciones de DNA de *Bos taurus* de macho por duplicado, bajo condiciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) estandarizadas, utilizando PBR 322 cortado con MSP-1 como marcador molecular y corrido en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio.

La amplificación de ZFY forman un barrido de fragmentos de diferentes tamaños a partir de las reacciones realizadas con 0.5 ng hasta 0.12 ng de DNA, probablemente debido a que los iniciadores se polimerizan inespecíficamente.

REACCIONES DE ESTANDARIZACIÓN Y SENSIBILIDAD DE PCR AMPLIFICANDO BC1.2

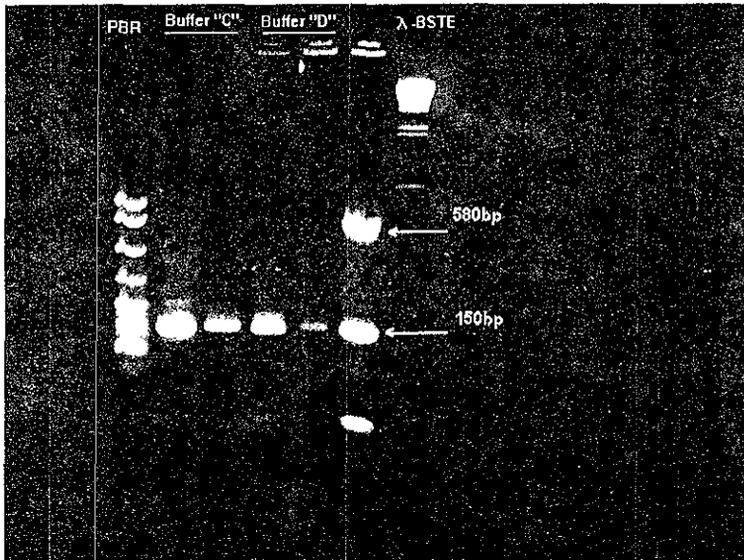
Los ensayos de estandarización de PCR para el iniciador de secuencia satélite BC1.2, se realizaron por duplicado solo en muestras de macho, debido a que en hembras no hay amplificación, encontrando que las mejores condiciones en el termociclador fueron:
A 94 °C 1:30 min. seguido 40 ciclos de

- 1) 58°C por 25 segs.,
- 2) 72°C por 30 segs y
- 3) 94 °C por 30 segs. Y finalmente 3 min. a 72°C

La mezcla contenía por cada 20 μ l

2 μ l de deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2mM cada uno, 1 μ l de iniciadores For y Rev (10 mM cada uno), 1.5 μ l de BSA (3 mg/ml), 1.0 μ l de Tritón X100 al 2%, 0.25 μ l de enzima *Taq*- Polimerasa (5U/ μ l),y cpb. 20 μ l de H₂O didestilada y estéril (Figura 4), encontrando amplificación del fragmento BC1.2 en mezclas con dos diferentes tipos de amortiguador, aún cuando el TM calculado para esta secuencia oscila entre 49.3 y 50.94 °C. Cabe mencionar que al duplicado del ensayo en el que se empleó amortiguador de PCR tipo "D", se evaporó en un 50% al finalizar los 40 ciclos posiblemente debido a un mal sellado de la tapa del tubo respectivo, aún así se observa una banda discreta de amplificación en ese carril.

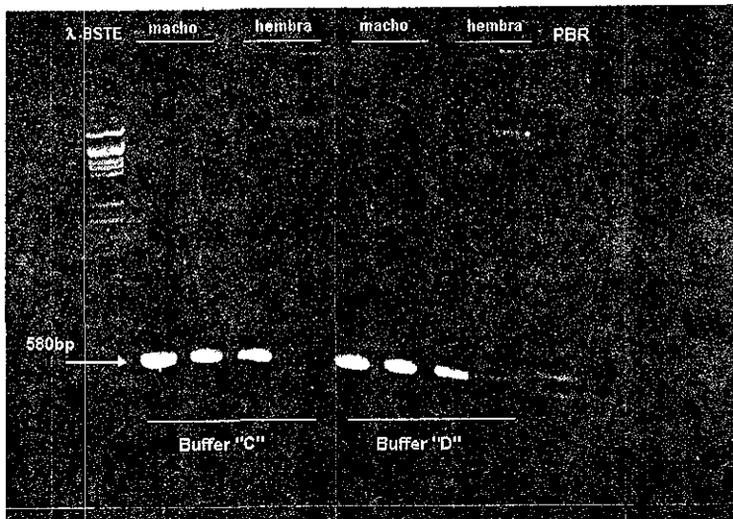
Figura 4. Estandarización para la amplificación del fragmento BC1.2



Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para separar el fragmento BC1.2, producto de PCR de 150 bp a partir de 50ng de DNA de macho. Se probaron 2 diferentes tipos de amortiguador o buffer, durante 40 ciclos. Los marcadores de peso molecular empleados son PBR 322 cortado con MSP-1 y λDNA cortado con BSTE. Se agregó una muestra control positivo con el iniciador 1.709 el cual amplifica un fragmento de 580 bp.

Paralelamente a este ensayo, se estandarizaron las condiciones para amplificar el fragmento 1.709 utilizando DNA de ambos sexos para utilizarlo a manera de control positivo bajo las mismas condiciones y al mismo tiempo, en el ensayo de sensibilidad del iniciador BC1.2, encontrando que las condiciones de amplificación coinciden. La figura 5, muestra que en un duplicado de las amplificaciones con buffer "C" correspondiente a hembra, se evaporó en un 80%, es por eso que no se observa el fragmento amplificado en ese carril.

Figura 5. Estandarización para la amplificación del fragmento 1.709.

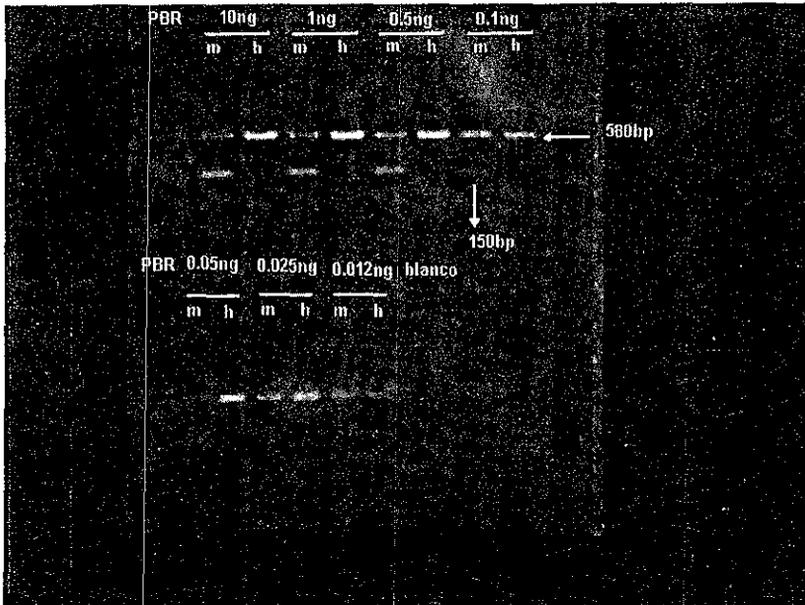


Separación en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los fragmentos BC1.2 y 1.709, producto de la PCR de 50ng de ADN de ambos sexos y diferentes tipos de buffer, durante 40 ciclos. Los marcadores de peso molecular empleados son PBR 322 cortado con MSP-1 y λ ADN cortado con BSTE.

Las reacciones de sensibilidad del fragmento BC1.2, se llevaron a cabo en diluciones de 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.012ng., encontrando amplificación en todas las concentraciones probadas, utilizando las condiciones de estandarización para amplificar el segmento BC1.2 (Fig. 6).

Por su parte, Cotinot, *et al* (1991), llevan a cabo este ensayo de manera similar pero añadiendo diferentes cantidades de células obtenidas por biopsias de embriones cuya sensibilidad mínima fué de dos células.

Figura 6. Sensibilidad al Amplificar el Fragmento BC1.2



Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra la separación de los fragmentos BC1.2 (150bp) y 1.709 (580bp), producto de la PCR de diferentes concentraciones DNA de ambos sexos realizados bajo las condiciones estándar encontradas para la secuencia BC1.2 durante 40 ciclos con el amortiguador tipo "C". El marcador de peso molecular empleado es PBR 322 cortado con MSP-1. Las muestras blanco utilizadas como control negativo, no contienen DNA.

De alguna manera, con este estudio se corroboran los resultados obtenidos por Cotinot, *et al* (1991) pero a partir de la amplificación de DNA de células somáticas.

En ninguno de los ensayos realizados se le añadió aceite mineral a la mezcla de PCR. Las concentraciones de DNA a las que se encontró amplificación en este ensayo de sensibilidad, equivalen a un rango de sensibilidad de 1666 a 2 células aproximadamente

Al llevar a cabo reacciones de PCR a bajas concentraciones, es factible obtener resultados erróneos debidos a contaminación de material utilizado, reactivos, etc.

ESTANDARIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS Bov 97M.

Basándose en los valores teóricos del T_M de cada una de estas secuencias, se buscaron las condiciones de amplificación para estandarizar los ensayos de PCR, encontrando que la secuencia única Bov97M de 97 bp citada por Miller y Koopman (1990), amplifica en las siguientes condiciones:

A 94 °C 1:30 min. seguido 30 ciclos de

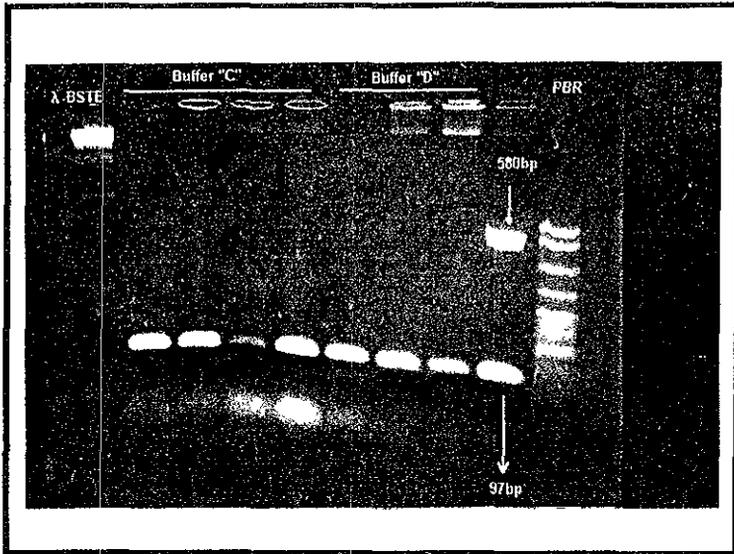
- 1) 60°C por 25 segs.,
- 2) 72°C por 30 segs y
- 3) 94 °C por 30 segs. Y finalmente 3 min. a 72°C

La mezcla contenía:

2µl de amortiguador 10X para PCR tipo "C" (20 mM $MgCl_2$, KCl 500mM; Tris- HCl ph 8.3 100 mM; gelatina 10 µg/ml), 2µl de deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2mM cada uno, 1 µl de iniciadores For y Rev (10 mM cada uno), 1.5 µl de Albúmina Sérica Bovina (BSA), (3 mg/ml), 1.0 µl de Tritón X100 al 2%, 0.25 µl de enzima *Taq*-Polimerasa (5U/µl).y cpb. 20 µl de H₂O estéril didestilada.

Esta secuencia, amplifica indistintamente añadiendo amortiguador tipo "C o D" a la mezcla de PCR, ya que los resultados obtenidos de este ensayo, no indican diferencias entre sí como lo indica la figura 7, en donde se utilizaron diferentes muestras de DNA de macho únicamente por ser un estudio piloto para conocer las condiciones estándar.

Figura 7. Estandarización para la amplificación del fragmento Bov97M



Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio separando el fragmento Bov97M de 97bp a partir de 50 ng de DNA de macho. Se añadió como un control positivo el iniciador 1 709.

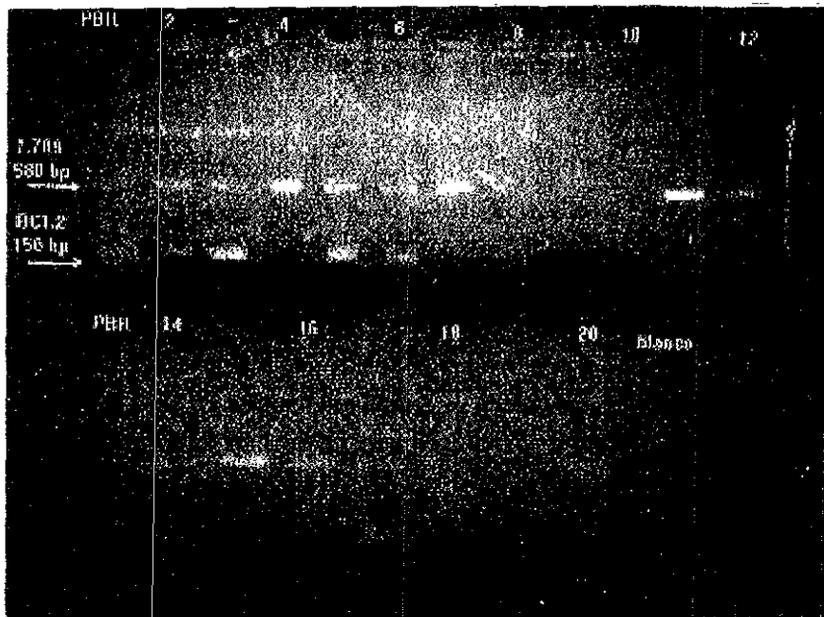
ANÁLISIS DE DETERMINACIÓN DEL SEXO

Finalmente, para certificar que los ensayos de especificidad eran adecuados, se llevó a cabo una PCR utilizando 20 muestras de sangre periférica de bovinos adultos, donde solo se conocían sus características fenotípicas, para esto, se utilizó el iniciador más sensible que fue el BC1.2 junto con el 1.709 como control positivo y una muestra control negativo sin DNA para diagnosticar el sexo en las condiciones estándar encontradas

.Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l (fig. 8). Para corroborar genotípicamente la relación fenotipo-genotipo de cada muestra.

Independientemente de las cuatro muestras que se evaporaron por fallas en las tapas de los tubos que contenían la mezcla de PCR y DNA, los resultados obtenidos fueron acertados en un 100%.

Figura 8. Ensayo para determinar el sexo



Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra la separación de los fragmentos BC1 2 (150bp) y 1.709 (580bp), producto de la PCR de diferentes muestras de ADN de ambos sexos realizados bajo las condiciones estándar encontradas para la secuencia BC1.2 durante 40 ciclos. El marcador de peso molecular empleado es PBR 322 cortado con MSP-1. Los carriles donde no se observa amplificación de ningún fragmento es debido a que la muestra se evaporó.

La presencia del fragmento que proviene de la amplificación del iniciador 1.709, indicó que la reacción se llevó a cabo; mientras que en aquellos carriles donde no se observa amplificación con ningún iniciador, indican que el volumen final de la mezcla de PCR, no fue suficiente por haber sufrido evaporación al cabo de los 40 ciclos. Las características de las muestras analizadas, se encuentran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Características de las muestras para diagnóstico y resultados

Carril	Fenotipo	Genotipo
1	Marcador Molecular PBR 322	
2	Macho	Macho
3	Macho	Macho
4	Hembra	Hembra
5	Macho	Macho
6	Macho	Macho
7	Hembra	Hembra
8	Hembra	Hembra
9	Macho	Evaporada
10	Macho	Evaporada
11	Hembra	Hembra
12	Hembra	Hembra
13	Marcador Molecular PBR 322	
14	Macho	Macho
15	Hembra	Hembra
16	Hembra	Hembra
17	Macho	Macho
18	Macho	Evaporada
19	Macho	Evaporada
20	Macho	Macho
21	Blanco sin ADN	

No se conocía la integridad del ADN así como su concentración

VII. CONCLUSIONES

Se estandarizaron las condiciones para amplificar las secuencias ZFY/X (Aasen y Medrano, 1990), BC1.2 (Leonard, 1987), 1.709 (Skowronski, 1984) y Bov97M (Miller y Koopman, 1990) en muestras de *Bos taurus*.

Además, a los iniciadores ZFY/X y BC1.2 se les sometió a análisis de PCR en gradiente de concentración de ADN para conocer la sensibilidad de cada uno encontrando, que existe diferencia en la sensibilidad de la PCR, entre la amplificación de un fragmento de origen único con respecto de otro de origen satélite; es decir, mientras el iniciador ZFY amplifica visiblemente en gel de agarosa hasta una concentración de 5 ng, el iniciador BC1.2 amplifica con la misma técnica, hasta una concentración mínima de 12 µg., debido a que el producto de PCR que se obtiene de la amplificación de una secuencia única no es suficiente para verse en un gel de agarosa a diferencia del producto de amplificación que se obtiene de un fragmento satélite

Por otra parte, se encontraron las condiciones estándar para los iniciadores de Bov97M, cuyas secuencias se amplifican con 50ng de ADN de *Bos taurus*; sin embargo, se sugiere seguir el estudio de estas secuencias de tal manera que se pueda lograr una mayor sensibilidad y especificidad.

La combinación de los iniciadores que amplifican secuencias satélites (BC1.2 y 1.709), hacen de la técnica de PCR, una técnica confiable por su sensibilidad capaz de determinar el sexo a partir del ADN contenido en dos células y aprovechar estos resultados a futuro con fines de diagnóstico a nivel embrionario.

El control de soluciones, material utilizado y su manejo, hacen eficiente la técnica de PCR para mayor sensibilidad y especificidad al utilizar diferentes marcadores moleculares, que a futuro podrían ser de gran apoyo para la determinación del

sexo de bovinos a nivel embrionario antes de que sean transferidos; además la confiabilidad que se tenga del sexo del embrión para que llegue a buen término su gestación de acuerdo al interés que se tenga en la producción ganadera (leche, carne o doble propósito).

BIBLIOGRAFIA

1. Aasen E , Medrano J F , 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/technology* vol 8 1279-1281.
2. Amann R.P., 1989. Treatment of sperm to predetermine sex. *Theriogenology* vol 31 (1) 243-253
3. Avvisati G, Lo Coco F; Diverio D; Falda M; Ferrara F; Lazzarino M; Russo D; Petti MC; Mandelli F Aida, 1996. (All-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. *Blood* 88: 1390-8.
4. Bennett D., Boyse E A , Lyon M.F., Mathieson B.J., Scheid M., Yanagisawa K., 1975. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 257 (18):235-238.
5. Berkovitz G.D., Techhner P.Y., Marcantonio S.M., Bland G., Stetten G., Goodfellow P.N., Smith K.D., Migeon C.J.1992. The role of the sex determining region of the Y-Chromosome (SRY) in the etiology of 46 XX true hermaphroditism. *Hum. Genet* 88: 411-416.
6. Betteridge K.J., 1989. Livestock embryo sexing: Past, present and future. In: Wachel. S.S. (ed.) *Evolutionary Mechanisms in Sex determination*. CRC Press, Inc., Boca Raton, 279-289.
7. Bondioli K R., Ellis S.B., Pryor J.H., Williams M W. and Harpold M.M ,1989. the use of male-specific chromosomal dna fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 31(1): 95-105.

8. Booman P., Kruijt L., Veerhuis, Hengst A.M., Tieman M. and Ruch F.E., 1989 Sexing bovine embryos with monoclonal antibodies against the H-Y antigen. *Livestock Production Science*, 23 (1-2):1-16.
9. Cazenave J; Forestier F; Bessieres MH; Broussin B; Begueret J., 1992. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis *Prenat Diagn* 12. 119-27.
10. Chiu CH and Ou J T., 1996. Rapid identification of Salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* 34: 2619-22.
11. Cotinot C., Kirszenbaum M., Leonard M., Gianquinto L. and Vairan M., 1991. Isolation of bovine Y-derived sequence. Potential use in embryo sexing. *Genomics* 10 (3): 646-653.
12. Di Bernardino D., Lioi M.B., Capuano F., Iannuzzi L., Burguete I., Matasoino D., 1985. Cytogenetic analysis of embryos. In: Smith C., King V.W., and Mc Kay J.C.(eds) *Exploiting New Techniques in Animal Breeding: Genetic Developments* Oxford Science Publications, New York. 1-12.
13. Elbrecht A. and Lazier C.B., 1984. Hybridization of DNA to RNA in methylmercuric hydroxide agarose gels. *J. Biochem Methods*. 9(3): 215-220.
14. Elbrecht A. and Smith, R.G., 1992. Aromatase Enzyme Activity and Sex Determination in Chickens. *Science* 255: 467-470.
15. Ennis S. and Gallagher T.F., 1994. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenine locus. *Anim. Genet*; 25:425-427.

16. Fechner H; Kurg A; Geue L; Blankenstein P, Mewes G, Ebner D; Beier D , 1996
Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. Zentralbl Veterinarmed [B] 43. 621-30.
- 17 Griffin J.K and Blecher S.R., 1994. Extracellular matrix abnormalities in testis and epididymis of XXSxr ("sex reversed") mice. Mol. Reprod.Dev.. 38 (1): 1-8
18. Goldberg E. H., 1988. H-Y antigen and sex determination. Phil. Trans. R. Soc. Lond B. 322, 73-81
19. Handyside A H, Penketh R.J.A., Winston R.M.L., Pattinson J.K., Delhanty J.D.A., Tuddenham E G.D., 1989. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. The Lancet 18: 347-349.
20. Handyside A.H., Kontogianni E H., Hardy K. And Winston R.M.L., 1990. Pregnancies from biopsed human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. Nature 344 (19): 768-770.
21. Handyside A.H. and Kontogianni E. H., 1991. DNA Amplification of Y-Specific repeat sequences for sexing preimplantation human embryos. In Preimplantation Genetics. Plenum Press. New York.
22. Halverson J.L. and Dvorak J., 1993. Genetic Control of Sex Determination in Birds and the Potential for its manipulation. Poultry Science 72 (5) 890-896.
23. Hare W.C.D., D. Mitchel K.J., Betteridge M.D., Eaglesome & G.C.B. Randall, 1976
Sexing Two-week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer: Preliminary methods & results. Theriogenology vol 5:(5) 243-253.

24. Hu KQ; Yu CH; Lee S; Villamil F G.; Vierling J.M., 1995. Simultaneous detection of both hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA using a combined one-step polymerase chain reaction technique. *Hepatology* 21: 901-907.
25. Iannuzzi L and Pia Di Melo G. 1995. Chromosomal evolution in bovids: a comparison of cattle, sheep and goat G- and R-banded Chromosomes and cytogenetic divergences among cattle, goat and river buffalo sex chromosomes. *Chromosome Research* 3, 291-299.
26. Innis M.A. and Gelfand D.H., 1990. Optimization of PCRs *Inn PCR Protocols: A guide to Methods and Applications* Cap. 1 Academic Press Inc USA
27. Jost A., 1970. Hormonal factor in the sex differentiation of the mammalian fetus. *Philos. Trans R. Soc. Lon. B. Biol. Sci.* 259 (828) 119-130.
28. Kanavakis E., Traeger-Synodinos J., Vrettou C., Maragoudaki E., Tzetis M and Kattamis C., 1997. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods *Mol Hum Reprod* 3: 523-8
29. Kibbelaar R.E., Leenheers-Binnendijk C.F., Spaandr P.J., Kluin P.M. 1992. Biopsy specimen identification by detection of sex chromosomes: application of in situ hybridization. *J. Clin. Pathol.* 45 (2) 149-150.
30. King W. A., 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology* 5:243-253.
31. Li H.H., Gyllensten U.B., Cui X.F., Saikay R. K., Erlich H.A., Arnheim N. 1988. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diplotid cells. *Nature* 335 (6189): 414-7.

32. Leonard M., Kirszenbaum M., Cotinot C., Chesne P., Heyman Y., Stinnakre M.G., Bishop C., Delouis C., Vaiman M., and Fellous M. 1987. Sexing bovine embryos using Y-chromosome specific DNA probe. *Theriogenology* 27: 248.
33. Maniatis, T., Fritsch, E F. and Sambrook, J., 1989 *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
34. Marshall Graves J.A and Schmidt M.M., 1992. Mammalian sex chromosomes: design or accident?. *Curr. Op. In Genetics and Development* 2: 890-901.
35. Martin, R , 1991. *Chromosomal Analysis of human Spermatozoa*. In. *Preimplantation Genetics*. Plenum Press. New York.
36. Matthews M.,E., and Reed K.C., 1992. Sequences from a family of Bovidae Y-Chromosome repeats. *Genomics* 13, 1267-1273.
37. Miller J R. and Koopman M., 1990. Isolation and characterization of two male specific DNA fragments from the bovine gene. *Animal Genetics* 21, 77-82.
38. Ohno, S., 1971 *Simplicity of Mammalian Regulatory Systems Inferred by Single Determination of Sex Phenotypes*. *Nature* 324 (19) 134-137.
39. Page, D. C., Moster, R., Simpson, E. M., Fisher E. M., Mardon, G., Pollack, J., McGilluray, B de la Chapelle, A. and Brown, L.G., 1987. The sex determining region of the human Y-Chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-1104.
40. Palmer M.S., Sinclair A.H., Berta P., Ellis N.A., Goodfellow P.N., Abbas N.E. and Fellows M., 1989. Genetic evidence that ZFY is not testis-determining factor. *Nature*. 342 (21): 937-939.

41. Payen E.J. and Cotinot C.Y., 1993. Comparative HMG-box sequences of the SRY gene between sheep, cattle and goats. *Nucleic Acid Res.* 21 : (11) 2772.
42. Perego RA., Marengo P., Bianchi C., Cairoli R., Urbano M., Nosari AM., Muti G., Morra E., Del Monte U., 1996. PML/RAR α transcripts monitored by polymerase chain reaction in acute promyelocytic leukemia during complete remission, relapse and after bone marrow transplantation *Leukemia* 10: 207-212.
43. Popescu C.P., Cotinot C., Boscher J., Kirzenbaum M., 1988. Chromosomal localization of a bovine male specific probe. *Ann Génét.* 31.(1): 39-42.
44. Rojas F.J., Garner C.B.S., Schiewe M., Asch R.H., Balmaceda J.P., Moretti-Rojas I., 1995. Enzymatic amplification of specific deoxyribonucleic acid sequences from single cells: evaluation of a simplified and rapid method for use in preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and Sterility* 64 (2): 255-260.
45. Schröder A., Miller J.R., Thomsen P.D., Roschlau K., Avery B., Poulsen P.H., Schmidt M. and Schwerin M., 1990. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. *Animal Biotechnology*, 1 (2): 121-133.
46. Skowronski J, Plucienniczak A, Bednarek A, Jaworski J., 1984. Bovine 1.709 satellite. Recombination hotspots and dispersed repeated sequences. *J Mol Biol* aug 15;177(3): 399-416.
47. Southern E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by Y-specific DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
48. Vliet van R.A., Verrinder G.A.M., and Walton J.S., 1989. Livestock embryo sexing: A review of current methods, with emphasis on y-specific DNA probes. *Theriogenology* 32 (3): 421-439.

- 49 White K.L., Anderson G.B., BonDurant R.H., Donahue S. And Pashen R.L., 1987. Viability of bisected bovine embryos after detection of H-Y antigen. *Theriogenology* 27 (1) 293
50. White K.L., Linder G.M., Anderson G.B., BonDurant R.H., 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology* 19:701.
51. Williams T.J., 1986. A technique for sexing mouse embryos by a visual colometric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology* 25. 733-739.
- 52 Zalis MG., Ferreira-da-Cruz MF., Balthazar-Guedes HC., Banic DM., Alecrim W., Souza JM, Druilhe P., Daniel-Ribeiro CT., 1996. Malaria diagnosis: standardization of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia *Parasitol Res* 82: 612-616.

APÉNDICE 1

Purificación de ADN (incluyendo mitocondrial) a partir de Sangre

2- ml de sangre se mezclan con 3- ml de ddH₂O

Centrifugar a 3000 g/10 minutos, 4°C

Resuspender la pastilla en 1- ml de 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS

Se agrega ARNasa (10- µg/ml) se incuba a 37°C durante una hora.

Posteriormente se agrega Proteinasa K (50- µg/ml) y se incuba durante 2 hrs a 50°C, y 1 hora a 65°C.

Agregar 0.360 ml de 5M de NaCl [2M final], Agitar por 15 segundos.

Centrifugar 3000 rpm 10-15 min.

Se recupera el sobrenadante y se agrega un volumen de isopropanol

Se recupera el ADN, se seca y suspende en ddH₂O y cuantifica

Minipreparación de ADN a partir de Sangre

A 500 µl de sangre se le agrega 1 ml de ddH₂O

Centrifugar por 5 min. 4°C

Resuspender la pastilla en 500 µl de 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS.

Se agrega ARNasa (10-20 µg/ml) se incuba a 37°C durante una hora.

Posteriormente se agrega Proteinasa K (50- 100 µg/ml) y se incuba durante 2 hrs a 50°C, y 1 hora a 65°C.

Agregar 180 µl de 5M de NaCl [2M final], Agitar por 15 segundos.

Centrifugar por 5 min. 4°C

Se recupera el sobrenadante y se agrega un volumen de isopropanol

Se recupera el ADN, se seca y suspende en ddH₂O y cuantifica

Preparar :

1.- 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS

2.- NaCl 5M

3.-RNasa (100 mg/ml)

4.-Proteinasa K (50 mg/ml)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APÉNDICE 2

Condiciones de trabajo de PCR.

Los Buffers 1X PCR utilizados contienen.

10 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl; 10 µg/ml gelatina y MgCl₂.

Buffer	"A"	"B"	"C"	"D"
[mM MgCl ₂]	0.5	1.0	1.5	2.0

El Buffer regular más comunmente usado es el "C".

Preparación de Buffer 10X PCR (5ml).

Buffer	"A"	"B"	"C"	"D"
[mM MgCl ₂] en 1X	0.5	1.0	1.5	2.0
1 M MgCl ₂	25 µl	50µl	75µl	100µl
1 M Tris HCl pH 8.4	500µl	500µl	500µl	500µl
1 M KCl	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
20 mg/ml gelatina	25 µl	25µl	25µl	25µl
H ₂ O	1.95 ml	1.92 ml	1.85 ml	1.8 ml

Las reacciones estandar de PCR son realizadas en un volúmen de 10 µl conteniendo:

1X Buffer

1 pmole/µl de cada primer

0.2mM dNTP

0.5 U Taq

25-100 ng DNA genómico

Las reacciones de PCR se preparan poniendo junto:

[solución stock] Volúmen total 10 µl Rx

10XPCR Buffer 1µl

10 µM de cada primer 1 µl

2.0mM dNTP 1µl

5 U/µl Taq- polimerasa 0.1µl

25 ng/µl DNA genómico 1-4 µl

H₂O cbp. 10µl

Si la reacción de PCR no funciona, se recomienda tratar diferentes condiciones de prueba. Básicamente se cambiarían dos cosas: la temperatura de reasociación y el tipo de buffer. En general, se aumenta o reduce el rigor de la reacción de PCR, incrementando o reduciendo la temperatura y/o la concentración de MgCl₂.

A mayor temperatura de reasociación, mayor el rigor de la reacción de PCR. A mayor concentración de MgCl₂, menor el rigor de la reacción de PCR.

APÉNDICE 3

Gen ZFY *Bos taurus*
 Secuencia escrita en dirección 5' → 3'
 (Guido, *et al.*, 1992)

	10 *	20 *	30 *	40 *	50 *	60 *
1	ATAATCACAT	GGAGAGCCAC	AAGCTTACC	GCAAGTCAGA	GAAGGCCATC	GAATGTGATG
61	ACTGTGGGAA	GCATTTCTCC	CATGCTGGGG	CTTTGTTCAC	TCACAAAATG	TCACAAAATG
121	AAAAAGGAGC	CAGCAAAATG	CATAAATGTA	AATTCTGTGA	GTATGAGACA	GCTGAACAAG
181	GGTTAATAAA	TCGCCACCTT	TTGGCAGTCC	ACAGCAAGAA	CTTCCCCCAT	ATATGTGTAG
241	AGTGTGGTAA	AGGTTTTTCGT	CACCCATCAG	AGCTCAAAAA	GCACATGCGA	ATCCATACTG
301	GAGAGAAACC	GTACCAATGC	CAGTACTGCG	AATATAGGTC	TGCAGACTCT	TCTAATTTGA
361	AGACGCATGT	GAAAACATAAG	CATAGTAAAG	AAATGTCTTT	CAAGTGTGAC	ATTTGTCTTC
421	TGACTTTCTC	AGATACCAAA	GAAGTGC			

La región marcada en **negritas** corresponde al sitio de reconocimiento de los iniciadores empleados en el presente estudio.

Secuencia 1.709 de *Bos Taurus*

10	20	30	40	50	60
*	*	*	*	*	*
AAGCTTGTGA	CAGATAGAAC	GATATAGCAA	TTTTTACCTT	AGAACAAACC	GAGGCACTAT
70	80	90	100	110	120
*	*	*	*	*	*
GAACATTTTG	TGCTTCATGT	TGATGACTCT	TAGACATGTC	TACAGTAGAG	GAGCAAAAAC
130	140	150	160	170	180
*	*	*	*	*	*
AAAAC TACTA	GATATTCAT	ATTGACTAGT	TCCCAGTTCA	CGGGACTCTG	ACATTCCTG
190	200	210	220	230	240
*	*	*	*	*	*
AGGTCCAAGT	TTTCTTGAT	TGGAAGCAGT	TGGGGTTGCA	AGGGCTGCCT	TGCTTTGAGA
250	260	270	280	290	300
*	*	*	*	*	*
CCATTGAAAT	AAGAACTCAG	AACTTGAGCA	CTATTATCAA	AAATCACAAAG	GCTCACACTG
310	320	330	340	350	360
*	*	*	*	*	*
ACACAGACAT	CAATCCAGAC	AGACAAGACA	AGACATCTTC	CAGTTTTCCG	CCTGAGATGG
370	380	390	400	410	420
*	*	*	*	*	*
AAAAGATTC	TTTGAGCCGT	TTTTTCTGGG	GAGTGGGGGG	TGGGGCTGGC	GGCCAGGCAG
430	440	450	460	470	480
*	*	*	*	*	*
GCTTTGGGAA	GGAGCTCAGG	GTTTGAATT	GCATATGAAA	AGAACCAGCT	TTCCGGGTTC
490	500	510	520	530	540
*	*	*	*	*	*
CAAGGAATCA	AGTTTCCTTG	GAAACCAACT	TTGTCCGGTT	CTGTAGAATA	TCATGGCCCT
550	560	570	580	590	600
*	*	*	*	*	*
CCCAGGTCAG	GTCATCTTTC	CTTTCGGTAG	CCCTCGTTTG	ATCCCTGAAT	TCTAGACAGC
610	620	630	640	650	660
*	*	*	*	*	*
TTGGATTGCC	TCTGTGGGCT	GGATGGATTG	TCCTCCCGTT	TCACCGGGCG	GCGGGAGCGA
670	680	690	700	710	720
*	*	*	*	*	*
GGTCCCAGAG	GCTCTCCTGG	AACCGGGCGT	GGGGCGGGG	CTCACCGGGA	GCCCCGTGGT
730	740	750	760	770	780
*	*	*	*	*	*
AACGTGGGCA	GCGCACCGGG	AGCGCGCCCG	GGCGGGCGA	AGCCGGGCGG	GCGGGTTCGG

790	800	810	820	830	840
*	*	*	*	*	*
GAATCGGGTC	GTGGCGGGGA	TGGGGGGCGG	CCCATTGTG	CTCCGGGGAT	CCCCACTGCG
850	860	870	880	890	900
*	*	*	*	*	*
GCTGGGAAGG	CACCGGGAGC	ATGCCAGGGG	CGGGGCGGCG	CGGGGCAGGG	GGCGCTCTCTG
910	920	930	940	950	960
*	*	*	*	*	*
GCGGGGGTAG	GGGAGGGGTT	CCCCGTTGTC	CTCTCGGGGG	TCGCCGTGGC	GGCTTGGAAC
970	980	990	1000	1010	1020
*	*	*	*	*	*
GCCCATTTGCG	TGCGCTCTCTG	TGTCCCCAAG	GTCGGCATCC	AGTGGGCGCG	GCGGAGGGGT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
*	*	*	*	*	*
GCGGACCACA	GGTCAGGGAA	CTGGGACTCG	TGGAGCAGGG	AACCACGTAG	TCCGCCCTCT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
*	*	*	*	*	*
GTTGGCACAA	CCTGGCGGTG	GCAGAAAGGC	CTCGCCTTTG	GGCTCAAGGC	CTTGACCCT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
*	*	*	*	*	*
CCACCCCTTT	GCTGAAAGGT	CAGAGCCGCG	CGGTTTCCA	AGCAGCCGAG	TGTCCGCTGC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
*	*	*	*	*	*
AAGTCCAAGG	GCCAGAACCC	TGAACTCTGG	CCGGCTGGCC	AGCCCTGCTT	CTGGCACTTT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
*	*	*	*	*	*
GGAGGCCAGC	GGGCTTGAC	CACCTGCTGG	GATGGGAAAG	GGAAGGTCC	ACGAATTGCA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
*	*	*	*	*	*
CCCTAGAAAC	TTAGTAGGGT	GCATGGGTTT	CAAACCCGG	TGGCCGCCCA	GGCAGCAAAC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
*	*	*	*	*	*
AAGGGAGGAG	GGCACCTGCG	TGCCCTTTCA	TGGCAGCATC	TGTGGCTGTC	CTGCTGAGGG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
*	*	*	*	*	*
GGCCTTTCCA	TGGGACCGT	GTGCGGTACA	AGTTTTGGGT	GTTTTGGAAC	CGAATAATTA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
*	*	*	*	*	*
GAACGTGTAA	AACTTTTAAA	TGATGTGGTG	GTTTGATTCA	AACAAAACAA	AACCAAACAA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
*	*	*	*	*	*
AACAAAAAAC	CAAGCTCAAG	TTTTTTGCAA	ATTTAGGTCT	TAATATTGAA	GGCCTGTGTT

1630	1640	1650	1660	1670	1680
*	*	*	*	*	*
CCTTCCACTG	TGGCATTGTA	CGAAGAAATG	TGCGGGTTTA	TTTTTTTTTT	TTAATTTGCT
1690	1700	1710	1720	1730	1740
*	*	*	*	*	*
TTTTGTTTT	CTTTTTTTTT	AGAAAAAGATT	CCGAAAAATG	AGGGAAACAG	GAAGCCGAGA
1750	1760	1770	1780	1790	1800
*	*	*	*	*	*
GGTGCCCTCG	TAGTTTGGCG	AAGGCCTTAG	GAGGCCACTT	GGAAATGCTG	CTGGCTGTGA
1810	1820	1830	1840	1850	1860
*	*	*	*	*	*
GGGGGGGAGG	GTGCAGATGT	GCACAGAGCT	GTGCAGGCTT	GTCTTTTGCA	TTGATGTTCT
1870	1880	1890	1900	1910	1920
*	*	*	*	*	*
TTGTAGAAAT	CCACCTCGGA	GCCATCTCCT	GATGTGTAAG	CATTTCCCAG	ACAAACCTTG
1930	1940	1950	1960	1970	1980
*	*	*	*	*	*
AGCTAAGCAA	TGCGTTTTTT	CCTTAGGAAA	TGTTGGTCTT	CAGCGATGTT	CAAAGCCTGT
1990	2000	2010	2020	2030	2040
*	*	*	*	*	*
GTATTTTCGGC	TAGACTCTGG	CTTCAGGTCG	GTCCCCCAA	AAGGCTCAGA	AGCGACCTGA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
*	*	*	*	*	*
ACCAAACAGT	AAGTTTTCCCT	CCTACCTTGT	TCTCCTCATC	TACGTTAAGA	GTATACTTTA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
*	*	*	*	*	*
AGAGTATCCT	GGCACATACA	TGTACTGCCT	CACCCCTAGC	CTCAGTCATG	TGTTCCAAGA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
*	*	*	*	*	*
ACTTCTGTCC	GTTTATTTAF	TTGTTTTTGG	TAACATFGAA	TTCGTTTTGA	CTATGCTGGG
2230	2240	2250	2260	2270	2280
*	*	*	*	*	*
TCTTTGCCGC	TCCGTGGAAG	TTGCTAGGAC	CTCTGGACTG	CAGTCTCCCA	TCTCTTGCTG
2290	2300	2310	2320	2330	2340
*	*	*	*	*	*
ACCTCAGGTT	GACCTCTGCA	GAATCCTGGT	TGGTGGGAGC	TTTTTAGTTC	CTTGTTCCTT
2350	2360	2370	2380	2390	2400
*	*	*	*	*	*
ACCCGGACCT	CCTGTGGTAA	GTGTTTTCTC	TCCTCTGGGG	CCTGCTAAGG	GTGGGTGGGC
2410	2420	2430	2440	2450	2460
*	*	*	*	*	*
ATTGGCATGC	CAAAGGTGGC	TAGAAGTCAA	TGATTTAGGC	AGGCTTGTGA	ATAGATATGG

2470	2480	2490	2500	2510	2520
*	*	*	*	*	*
GAGGAGGCAA	TGGCACCCCA	CTCCAGTACT	CTTGCCTGGA	AAATCTCATG	GACGGAAGAG
2530	2540	2550	2560	2570	2580
*	*	*	*	*	*
CCTGGTAGGC	TGCAGTCCAF	GGGGTCGCTC	AGAGTCGGGC	ACGACTGAGC	GACTTCACTT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
*	*	*	*	*	*
TCACATTTCA	CTTTCATGCA	TTGGAGGAGG	ACATGGCAAC	CCACTCCAGT	GTTCTTGCCT
2650	2660	2670	2680	2690	2700
*	*	*	*	*	*
GGAGAACCCC	AGGGACTGCG	GGGCCTGGTG	GGCTGCCGTC	CATGGGGTCA	CACAGACTCG
2710	2720	2730	2740	2750	2760
*	*	*	*	*	*
GAAACGACTG	AAACGACTTC	GCAGCAGCAG	CAGCAGCAGC	AGCAGCAGTG	CATAAATATC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
*	*	*	*	*	*
AAAAGGGTTT	AGAACAGTCA	GGTAGGATCA	CACAAGTCAC	CGTGAAGCAA	TACTTCTCCA
2830	2840	2850	2860	2870	2880
*	*	*	*	*	*
CTTAGTCAAA	GCTAACAAAA	GATTTCTCTT	CTAGGTCAAC	CTAGAAGAGA	TCACGGAAGA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
*	*	*	*	*	*
GGTAAAGAAA	CTTAAAAATCC	ATTAGCAAAG	GCAGTTCAAC	CTCTCAAGAA	ACCTTGTGCT
2950	2960	2970	2980	2990	3000
*	*	*	*	*	*
AGGCACAACA	CTCTTTTCTG	GGGGTCCACG	TTCCCTACAA	CCTCTGATC	CCATTCTGTA
3010	3020	3030	3040	3050	3060
*	*	*	*	*	*
CCCATTCCTT	TGCTTCTCCCA	TCCTGAAAC	TGCCACCTGG	AAGAAAGAAC	GACGTCGTTT
3070	3080	3090	3100	3110	3120
*	*	*	*	*	*
TCCTTCAGAA	AATGCGATTT	CATGCCACAT	ACCTTCTTTT	AATACCAAGT	CATACATTC
3130	3140	3150	3160	3170	3180
*	*	*	*	*	*
ACTTCAGCAA	CCAAGAACTG	ACTTTTATAT	TGGCATTCGA	CAGATTGGTG	AACATACCTA
3190	3200	3210	3220	3230	3240
*	*	*	*	*	*
TCAGTGATAG	TAGCGCCCCT	CCCCTCCCC	GCACGCACGC	ACACACACAC	ACACACACAC
3250	3260	3270	3280	3290	3300
*	*	*	*	*	*
ACACACACAC	ACCCAAGATC	AGAACCAAAC	AAAACAAAAA	AAAAATGTCTT	TCTTACGTTT

3310	3320	3330	3340	3350	3360
*	*	*	*	*	*
CACATGTCAG	GATGGTGCCA	GACACTCTTA	TTGGATAGTC	AAAAATCTCT	TTTGTTTCTG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
*	*	*	*	*	*
TGTA AAAGGG	AGGTCCTTTC	AAGGCGTGAA	TGTTTCAGAA	CTTGAATTTA	TTTGGA AATG
3430	3440	3450	3460	3470	3480
*	*	*	*	*	*
ACCCAGCTCT	TCAGTACACT	GTCGTCACCT	AGTTTAGCAC	AGGATAGAAA	CTCGGGTAAC
3490	3500	3510	3520	3530	3540
*	*	*	*	*	*
CAAAACACCT	GGAGAAACGA	TTGTATGTTC	AGTTCAGTTC	AGTGGCTCAG	TCGTGTCTGA
3550	3560	3570	3580	3590	3600
*	*	*	*	*	*
CTCTTTGGGA	CCCCGTGGCC	TGCAGGACGC	TGGGCTTCCGT	GTCCATCAC	CAACTCCAGG
3610	3620	3630	3640	3650	3660
*	*	*	*	*	*
GGCTTGCTCA	AACTCATGTC	CATCGAATCA	GTGATGCCAT	CCAACCATCT	TAGCCTCTGT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
*	*	*	*	*	*
CGTCCCCTTC	TCCTCTGCCT	TCAATCAAGA	CTCTCATAGG	CAGATATTTT	CGAGTGTAAT
3730	3740	3750	3760	3770	3780
*	*	*	*	*	*
TAGTGTTTAT	AGTTTATCPA	AAAGCTCATA	TCACATTTAA	TTTTTCGTTT	IGTTCCTGTT
3790	3800				
*	*				
CTTTCGAGG	TACTTTCTTG	TTGAC			