

03072
8
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES

Identificación del posible transposón tipo mariner en
Anopheles albimanus

T E S I S

que para obtener el título de
Maestría en Biotecnología

P R E S E N T A

LiuKeyi

Cuernavaca, Mor.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

**El presente trabajo se realizó en el
Departamento de Reconocimiento
Molecular y Bioestructura del
Instituto de Biotecnología de la
Universidad Nacional Autónoma de México,
con la asesoría del
Dr. Paul M. Lizardi L.**

AGRADECIMIENTOS

Por la ayuda de traducción al español y las valiosas discusiones de esta tesis se agradece a:

Georgina Estrada N.
Georgina Hernández Ch.
Ernesto Otiz S.
Raúl Miranda C.

Por la revisión crítica de esta tesis se agradece al jurado:

Dr. Paul Modesto Lizardi López
Dr. Fidel de la Cruz Hernández
Dr. Baltazar Becenil Luján
Dra. Hilda Lomelf Buyoli
Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Por el DNA del *Anopheles albimanus* y *Anopheles gambiae* y el banco genómico de *Anopheles albimanus* se agradece a:

Dr. Mario Henry Rodríguez
Dr. Ricardo Galler
Dr. Fidel de la Cruz Hernández

Agradezco al ayuda de todos y cada uno de mis compañeros en los laboratorios de los Drs. Lizardi y Alagón, así como a mis amigos del Instituto.

INDICE TEMATICO

	Página
Agradecimientos.....	I
Indice temático.....	II
Indice de figuras.....	IV
Resumen.....	1
Introducción.....	2
I. Elementos transponibles.....	2
1. Clasificación de los elementos transponibles.....	2
2. Mecanismo de transposición.....	4
3. Efectos de la transposición en la evolución genética.....	6
II. Organización del genoma en mosquitos.....	7
1. Cariotipos comparativos.....	7
2. Tamaños de genoma.....	7
3. Organización genómica.....	8
4. Elementos transponibles en <i>Anopheles</i>	8
III. El elemento transponible mariner.....	8
1. Estructura de elemento mariner.....	8
2. Características biológicas del elemento mariner.....	10
IV. Importancia de la identificación de elementos mariner en <i>A. albimanus</i>	10
Objetivos.....	12
Material y Métodos.....	14
I. Medios y cepas.....	14
II. Vectores para clonación.....	14
1. Plásmido.....	14
2. Fago lambda DASH.....	14
III. Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	14
IV. Extracción del DNA genómico de mosquitos.....	15
V. Amplificación del fragmento mariner de <i>A. albimanus</i>	15
VI. Técnicas de electroforesis en gel.....	16
VII. Preparación y transformación de células competentes.....	16
VIII. Transformación de células competentes.....	17
IX. Preparación de pBSSK(-).....	17
X. Ligación y transformación.....	17

XI. Identificación de colonias transformadas.....	17
1. Digestiones enzimáticas:.....	17
2. Sondeo directo por PCR.....	18
XII. Purificación de plásmido.....	18
XIII. Secuenciación.....	18
XIV. Preparación de la sonda marcada.....	19
XV. Dot blot.....	19
XVI. Southern blot.....	20
XVII. Clonación del gen tipo mariner en <i>A. albimanus</i>	20
XVIII. PCR largo.....	21
XIX. Análisis de las secuencias.....	21
Resultados.....	22
I. Diseño de oligos para amplificar el fragmento de tipo mariner de <i>A. albimanus</i>	22
1. Las regiones conservadas seleccionadas.....	22
2. Determinación de la secuencia de los primers.....	22
II. Identificación del fragmento tipo mariner.....	22
III. Caracterización del fragmento-LK.....	26
1. Identidad de la secuencia del fragmento-LK con el elementos mariner.....	26
2. Distribución genómica del elemento en <i>A. albimanus</i>	26
3. Número de copias en genoma de <i>A. albimanus</i>	26
IV. Aislado el gen completo de tipo mariner en <i>A. albimanus</i>	32
1. Colonias del banco genómico de <i>A. albimanus</i>	32
2. Caracterización de la orientación del inserto en la colonia.....	32
3. Secuenciando el producto de PCR largo con primer-walking.....	32
4. Análisis de la secuencia.....	32
Discusión.....	38
I. Estrategia experimental.....	38
II. Manera de extensión de los elementos mariner.....	38
III. Número de copias y distribución genómica de tipo mariner en <i>A. albimanus</i>	39
IV. Comparación de la secuencia del clona AaMcI de <i>A. albimanus</i> con otros elementos mariner de la familia irritans.....	39
Conclusiones.....	42
Referencias.....	43

INDICE DE FIGURAS

	Página
Introducción	
Figura 1. Elementos transponibles	3
Figura 2. El mecanismo de transposición.....	5
Figura 3. Estructura del elemento mariner	9
Estrategia experimental.....	13
Resultados	
Figura 4. Alineamiento de fragmentos de elementos mariner.....	23
Figura 5. Primers degenerados	24
Figura 6. Oligos identificados por gel de acrilamida al 20%.....	25
Figura 7. Productos de PCR analizados en gel de agarosa	27
Figura 8. La colona pBSMI identificada por patrón de restricción.....	28
Figura 9. Secuencia del fragmento tipo mariner.....	29
Figura 10. Southern blot.....	30
Figura 11. Dot blot.....	31
Figura 12. Aislado el gene completo de tipo mariner.....	33
Figura 13. Secuencia de tipo mariner en <i>A. albimanus</i>	34
Figura 14. PCR largo.....	35
Tabla 1. Comparación del número de copias de los elementos mariner.....	36
Table 2. Comparación del alineamiento del DNA de elementos mariner.....	36
Figura 15. Alineamiento del elemento tipo mariner de <i>A. gambiae</i> con la secuencia AaMcl.....	37
Figura 16. Modelo de distribución de tipo mariner en <i>A. albimanus</i>	41

RESUMEN

El elemento transponible mariner puede servir como un vector de DNA para la manipulación genética de mosquitos. Este trabajo demostró la existencia de elementos tipo mariner en *A. albimanus*, un vector importante de transmisión de la malaria en América Latina.

Se diseñó un par de primers degenerados a partir de un alineamiento de elementos mariner de especies de insectos. Con estos primers se amplificó por PCR un fragmento de 300 pb de DNA genómico de *A. albimanus*. El producto de PCR fue clonado y secuenciado, y se verificó la homología a nivel de DNA de este fragmento con respecto a los elementos mariner de *A. gambiae* (40%) y *D. mauritiana* (42%). Utilizando este fragmento, se aislaron tres clonas positivas de un banco genómico de *A. albimanus*. En total, se secuenciaron 875 pb y se encontró una identidad de 43%, 44%, 42% y 45% con *A. gambiae*, *D. mauritiana*, *C. pitorapunda*, y *H. irritans*, respectivamente.

Mediante Dot-blot se estimó que el número de copias de este elemento tipo mariner en *A. albimanus* es cercano a 100 por genoma. Además, mediante Southern blot se estudió la distribución genómica de este elemento en *A. albimanus* y se observó que es homogéneo en tamaño cuando se usa la enzima EcoRI.

INTRODUCCION

I. ELEMENTOS TRASPONIBLES

Los elementos transponibles o transposones son una clase de secuencias dispersas de DNA repetitivas, cuyos miembros poseen la propiedad de cambiar su posición normal en el cromosoma (Warren y Crampton, 1994). Las secuencias de DNA transponibles fueron por primera vez identificadas en el maíz hace ya casi medio siglo. Desde entonces se han encontrado estos elementos en todos los genomas de eucariotes (Kleckner, 1977; Kleckner, 1981; Finnegan, 1990; Calos, 1980).

1. Clasificación de los elementos transponibles

De acuerdo con sus mecanismos de transposición, los elementos transponibles pueden dividirse en dos clases (Finnegan, 1989). Los elementos de la Clase I se transponen por transcripción reversa formando de un intermediario de RNA; los de la Clase II se transponen por mecanismos de que DNA-DNA.

Los elementos de clase I pueden a su vez dividirse en dos tipos (figura 1. A). El tipo I es el más estudiado y es estructuralmente similar a los retrovirus integrados. En este tipo se incluyen los elementos tipo-copia en *Drosophila melanogaster* (Shiba y Saigo, 1983; Mount, 1985), Ty en *Saccharomyces cerevisiae* (Eichinger y Boeke, 1990; Elder, 1983; Fink, 1980), IAP (Hirsch, 1993), VL30 en roedores (French y Norton, 1994), THE en humanos (Hakim, 1994), BSI en *Zea mays* y muchos otros (Jin y Bennetzen, 1994). Se caracterizan por tener largas secuencias terminales repetidas largas (LTRs) y por la presencia de marcos abiertos de lectura (ORF), uno de los cuales codifica para una posible transcriptasa reversa (RT), y el otro tiene similitud al gen *gag* de retrovirus. Algunos elementos tienen un tercer marco abierto de lectura que está en posición similar a los genes virales *env*. Muchos grupos han sugerido que estos elementos pueden transponerse a través de un ciclo de vida retroviral modificado, utilizando un intermediario de RNA. Esto se ha demostrado elegantemente para elementos Ty (Boeke, 1985), y es prácticamente el caso para los demás elementos de este tipo.

El segundo tipo de elementos de la Clase I es muy distinto estructuralmente de los retrovirus. Estos incluyen elementos L1 en genomas de mamíferos (Evans y Palmiter, 1991; Furano, 1988), I, F, G (Pelisson, 1991; Minchiotti y Nocera, 1991) y jockey en *D. melanogaster* (Mizrokhi, 1988; Ivanov, 1991), *ingi/TRS1* en *Trypanosoma brucei* (Kimmel, 1987), *Cin4* en *Z. mays* (Schwarz, 1987) y R1 y R2 en los genes de rRNA 28S de *Bombyx mori*, *D. melanogaster*, *Ascaris lumbricus* e insectos (Jakubczak, 1990; Jakubczak, 1991; Xiong y Eickbush, 1988; Adams, 1986; Dongmei, 1993). Estos elementos tienen dos marcos abiertos de lectura como en el tipo I de clase I (figura 1), uno de los cuales codifica para una posible transcriptasa reversa (Dongmei, 1993).

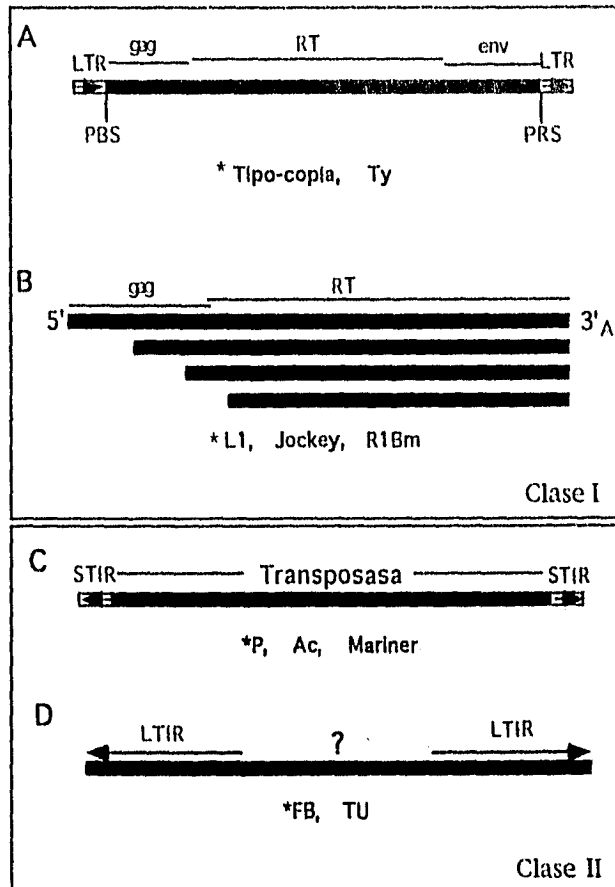


Fig. 1 Elementos transponibles

Elemento clase I

A. Elementos Retrotransponible (parecidos a retrovirus)

LTR: Repetidas terminales largas. PBS: Potencial sitio de unfon del primer tRNA;

PRS: Secuencia rica en purinas; Hay tres marcos abiertos de lectura, el primero tiene similitud al gen *gag* de retrovirus, el segundo es similar al gen viral *pol* y el tercero se encuentra en la posición de la gen viral *env*. RT: Potencial transcriptasa reversa.

B. Elementos sin repetidos terminales largos (non-LTR). A: región rica adenosina.

Elemento clase II

C. Elementos con repetidas invertidas terminales cortas (STIR).

D. Elementos con repetidas invertidas terminales largas (LTIR).

* Ejemplos para cada tipo de elemento transponible

Estos elementos no tienen secuencias terminales repetidas largas (non-LTR) y tienen una secuencia característica rica en A (adeninas) en el extremo 3' de una cadena. Se encuentran en el genoma como familias conteniendo una mezcla de elementos completos e incompletos. De estos últimos, muchos están truncados en cantidades variables en el extremo 5' de la cadena que contiene la secuencia rica en A.

La segunda clase de elementos transponibles incluyen elementos P (Kress y Rubin, 1984; Bingham, 1982; Rio, 1986; O'Hare y Rubin, 1983) y hobo en *D. melanogaster* (Dancies, 1990; Blackman, 1989; Streck, 1986), Ac/Ds y Spm/En en *Z. mays* (Caupland, 1988; Kunze, 1987; Muller, 1984; Fedoroff, 1983; Aukerman, 1993), Tam en *Antirrhinum majus* (Sommer, 1985; Hehl, 1991) y Te1 en *Caenorhabditis elegans* (Schukink y Plasterk, 1990; Rosenzweig, 1983; Ruan, 1987). El elemento mariner se encuentra en este grupo. Todos contienen secuencias terminales repetidas inversas cortas (STIR) en sus extremos. Los elementos P, Ac, y Spm/En, codifican para al menos una función útil en transposición: una transposasa, ya que los elementos eliminados internamente se transponen sólo en presencia de elementos completos.

Los elementos con secuencias terminales repetidas largas inversas forman un segundo tipo de elementos clase II. Estos incluyen los elementos FB, o fold-back (Brierley y Potter, 1985; Truett, 1981) de *D. melanogaster*, y los elementos TU del erizo *Strangylocentrotus purpuratus*. Se sabe poco del mecanismo por el que se transponen, pero su estructura sugiere que no se requiere un RNA intermediario. Los elementos FB y TU se repiten en el genoma y se presume que transponen en forma replicativa (Finnegan, 1989).

Algunos elementos descritos como transponibles no entran completamente en esta clasificación. Como ejemplos podemos citar a los elementos DIRS-1 en *Dictyostelium discoideum* y los elementos Mu en *Z. mays* (Hardeman, 1993). Los DIRS-1 tienen repetidos inversos terminales de 330 pares de bases y codifican para una posible transcriptasa reversa, por lo que serían elementos clase I. Los Mu tienen repetidos inversos terminales de 215 pares de bases y no codifican una secuencia tipo transcriptasa reversa y son presumiblemente elementos clase II (Finnegan, 1989).

2. Mecanismo de transposición

Aunque existen muchos elementos transponibles diferentes, los elementos de ruptura son centrales de toda reacción de transposición, ya que exponen los extremos 3' del elemento transponible. Estos extremos se unen al DNA blanco (Mizuuchi, 1992). Algunas veces las reacciones de ruptura del DNA también se dan en los extremos 5' del elemento y su aparición tiene una profunda influencia en los productos de transposición. De esta forma, aunque todas las reacciones de transposición involucran ruptura y pegado de DNA, pueden surgir diversos tipos de productos de recombinación, dependiendo de las cadenas de DNA que son rotas y unidas (Nancy, 1995, figura 2).

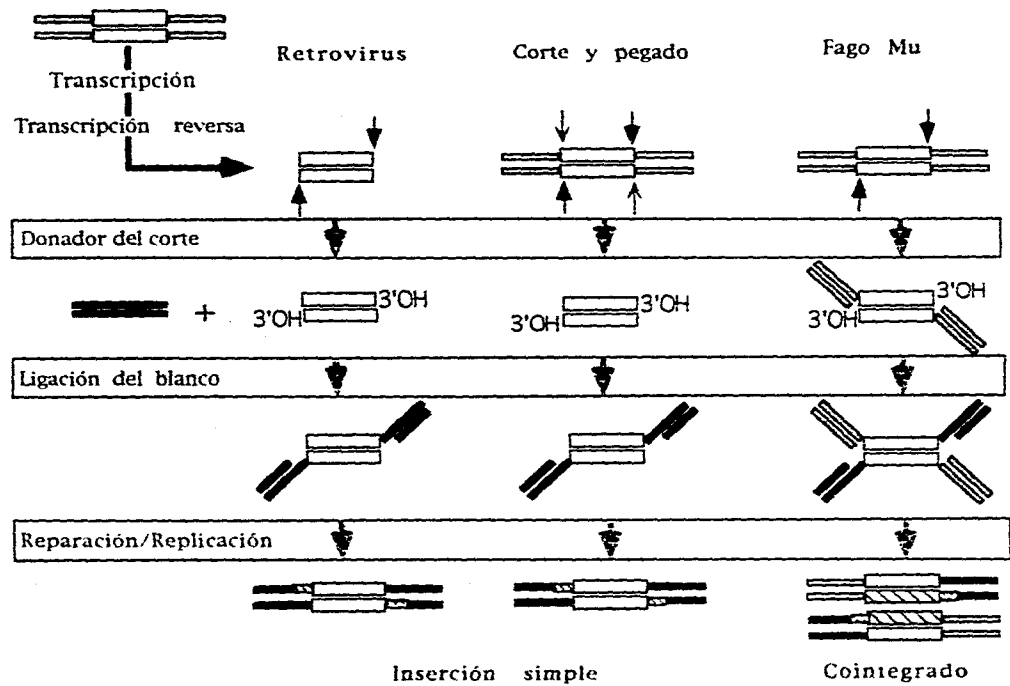


Fig. 2. Las reacciones de procesamiento de DNA que están involucradas en la translocación de 3 elementos móviles

elementos móviles;
 DNA alrededor del donador;
 corte en el extremo 3';
 corte en el extremo 5';
 DNA blanco;
 replicación del DNA.

La integración retroviral (Berg y Howe, 1989; Mizuuchi, 1992; Goff, 1992) y la replicación del fago Mu (Berg y Howe, 1989; Mizuuchi, 1992; Lavoie y Chaconas, 1995) exhiben ruptura y unión únicamente en las terminales 3' de los elementos móviles. En la integración retroviral, el genoma de RNA viral se convierte por transcripción reversa en DNA de doble cadena. Este producto de DNA se corta por la integrasa codificada retroviralmente para exponer las terminales 3'-OH en los extremos embebidos del DNA retroviral real. Las reacciones de transferencia de cadena unen entonces estas terminales 3' expuestas a posiciones cohesivas (staggered) en el DNA blanco, una terminal del transposón se une a una cadena del blanco y la otra terminal se une a una posición desplazada de la otra cadena. Como resultado, el transposón se une covalentemente al DNA blanco, pero es flanqueado por pequeñas brechas (gaps) que reflejan las posiciones cohesivas (staggered) de la unión al blanco. Estos "gaps" que flanquean al elemento integrado son después reparados por funciones de reparación del DNA en el huésped. El producto resultante, en el cual el DNA retroviral se une covalentemente al DNA blanco se llama "inserción simple" (figura 2).

En el caso de la replicación del bacteriófago Mu, el DNA del fago es embebido en el DNA cromosomal del huésped. Las reacciones de ruptura del DNA ejecutadas por la proteína MuA, la transposasa Mu-codificada, introducen cortes de cadena sencilla en ambos extremos del elemento. Estas rupturas exponen las terminales 3' del transposón, separándolas del DNA bacteriano que las flanquea, pero dejando al transposón unido covalentemente por sus terminales 5' al DNA blanco; las terminales 3' del transposón son entonces unidas por reacciones de transferencia de cadena a posiciones cohesivas (staggered) en el DNA blanco. Este producto de transposición se replica entonces por replicación en el DNA huésped para generar un producto llamado "cointegrado" en el cual se unen el esqueleto donante (blanco) y dos copias del transposón (figura 2).

Muchos elementos móviles se translocan por un mecanismo de "corte y pegado" que al parecer es distinto al de la integración retroviral y la replicación Mu (la introducción de rupturas de doble cadena en las terminales de un elemento para generar un transposón escindido que luego se inserta en un sitio blanco). Este paradigma se estableció por vez primera para los transposones bacterianos Tn10 y Tn7 (Berg y Howe, 1989; Mizuuchi, 1992; Kleckner, 1995; Chalmers y Kleckner, 1994; Craig, 1991 y 1995), pero ahora está claro que numerosos elementos, incluyendo el elemento P de *Drosophila* (Kaufman, 1992), los elementos Tc de *C. elegans* y otros organismos (Luening, 1994; Vos y Plasterk, 1994), y de la misma manera muchos otros sistemas de transposición (Berg y Howe, 1989; Calvi, 1991), usan este mecanismo (ver figura 2).

3. Efectos de la transposición en la evolución genética

Los elementos transponibles juegan un papel importante en la evolución genética. Los elementos del transposón pueden alterar genes y genomas de las siguientes maneras:

Cambios en patrones de herencia: Rearreglos cromosomales (tales como inversiones, translocaciones y deleciones) pueden estimularse por eventos que involucren elementos transponibles (Roeder y Fink, 1983; Engels y Preston, 1984). Muchos de estos rearrreglos son resultado de la recombinación entre copias de un elemento esparcido en el genoma.

Cambios en patrones de expresión genética: Los rearrreglos cromosomales pueden afectar la expresión de los genes individuales, cuando la región codificante de un gen es puesta bajo la influencia de las secuencias regulatorias de otro (Schneuwly, 1987).

Cambios en secuencias: Estos cambios se causan por un corte impreciso, generando variación de secuencias entre los genes, la cual puede ser evolutivamente ventajosa. Si la inserción original fue en un exón, el resultado entonces será un alelo que codifique para el producto de un gen alterado (Schwarz, 1985).

Amplificación de secuencias de DNA: Los elementos transponibles pueden aumentar el número de copias de secuencias en un genoma cuando casualmente son reconocidas como intermediarias para eventos de transposición replicativa, o porque son incluidos en duplicaciones producidas por recombinación entre elementos (Maeda y Smithies, 1986; Barsh, 1983; Stein, 1983; McCarrey y Thomas, 1987). La recombinación entre copias de un elemento transponible con la misma orientación y en diferentes sitios de un cromosoma corta el DNA involucrado cuando ocurre en un evento intracromátida. La recombinación intercromátida en el mismo elemento corta el DNA involucrado de una cadena y lo duplica en la otra.

II. Organización del genoma en mosquitos

1. Cariotipos comparativos

Se ha publicado información sobre el número y la morfología de los cromosomas que contienen los genomas básicos de más de 30 géneros y 150 especies de mosquitos (Rai, 1982). Con la excepción de *Chagasia bathana* que tiene ocho cromosomas, el complemento básico de todas las especies examinadas está compuesto por tres cromosomas, uno de los cuales es más pequeño que los otros dos. El cromosoma más pequeño determina el sexo (Rao y Rai, 1987; Zheng, 1993).

2. Tamaños de genoma

Se han determinado cantidades de DNA nuclear haploide (1C) para 43 especies que pertenecen a 17 géneros de cuatro familias de Nematócidos (Rao y Rai, 1987; Kumar y Rai, 1990). Se ha observado entre los mosquitos una variación de proporción de ocho veces en los tamaños de los

genomas. En *Aedes*, los tamaños de los genomas difieren entre sí en una proporción aproximada de 2.5 veces. Existe una correlación de significancia entre las longitudes cromosomales totales y las cantidades de DNA haploide.

3. Organización genómica

Las cantidades y organización de DNA repetitivo y DNA único se determinaron por genética de reasociación de DNA en cuatro especies de mosquito que poseen genomas de muy diferentes tamaños: *A. quadrimaculatus*, *Culex pipiens*, *Aedes albopictus* y *Aedes triseriatus* (Black y Rai, 1988). Las cantidades en secuencias fold-back, repetitivas medias y altamente repetitivas aumentaron con el tamaño del genoma. La cantidad de fold-back DNA aumentó en una proporción mucho más baja que la de las secuencias alta y medianamente repetitivas. Las cantidades de repetidos cortos y largos aumentaban con el tamaño del genoma pero los repetidos cortos aumentaban en mayor proporción.

4. Elementos transponibles en *Anopheles*

Las secuencias de DNA repetitivo constituyen una parte significativa en los genomas de los mosquitos (Besansky y Powell, 1992). En *A. gambiae* el DNA repetitivo consta de un 39% y entre estas secuencias se han identificado varias clases de elementos transponibles hipotéticos. Los retrotransposones (RTPs) non-LTR que han sido completamente caracterizados; los elementos T1 ampliamente dispersos que no tienen especificidad aparente por el sitio de inserción (Besansky, 1990a y 1990b); los elementos R1 y R2 que ocupan un sitio preciso en los espaciadores intergénicos de los genes de rRNA localizados en la región 28S con separación de 74 pb (John, 1991; Suan y Frank, 1989); las familias RT1 y RT2, que también son retrotransposones non-LTR, insertadas en la región 28S del gen de rRNA a 630 pb hacia abajo (Besansky, 1992); y el elemento Q de 4.5 kb que tiene 2 ORF largos que se superponen (Besansky, 1994). Los elementos con invertidos terminales cortos en sus extremos se han caracterizado hasta ahora como mariner (Jacobson, 1986; Lidholm, 1993; Maruyama, 1991; Maruyama, 1991; Medhora, 1988; Sedensky, 1994; Bryan, 1990). Este elemento transponible no se ha observado en otros mosquitos.

III. EL ELEMENTO TRANSPONIBLE MARINER

1. Estructura de elemento mariner

El elemento mariner se identificó por primera vez en *D. mauritiana*, se localiza en el locus del gen blanco y se designa como "White-peach" (W^{pe}) porque su presencia provoca que el color de los ojos en el insecto cambie a durazno (Jacobson, 1986). El elemento activo mariner Mos 1 (de *D. mauritiana*) tiene 1286 pb y repetidos inversos terminales (STIR) de 28 pb, contiene un

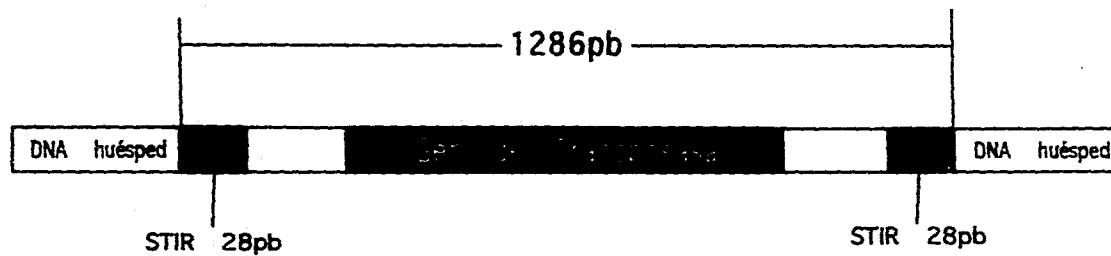


Fig. 3. Estructura de un elemento mariner activo de *Drosophila mauritiana*

Hay un marco abierto de lectura que codifica para el gen de la transposasa.

STIR: Repetidas invertidas terminales cortas (Short Terminal Inverted Repeat).

único marco abierto de lectura ininterrumpido de 1038 pb y codifica para una proteína de 346 aminoácidos (figura 3). No hay secuencias de caja TATA u otro promotor conservadas entre los elementos. El marco abierto de lectura está precedido por secuencias tipo promotor y de pegado a ribosomas (Capy, 1992). El sitio de terminación y el poli(A) están en el mismo locus.

Las longitudes de los elementos mariner que hasta ahora se han clonado son similares (Bigot, 1994; Jeyaprakash, 1995; Margaret, 1994). Los principales elementos mariner tienen 28 pb repetidos inversos terminales (STIR), pero algunos tienen números diferentes (Oosumi, 1995; Robertson, 1992; Fernandez, 1993; Lidholm, 1991). También, los STIRs tienen mutaciones en ambos extremos y entre organismos diferentes.

2. Características biológicas del elemento mariner

Los elementos mariner se diseminan esporádicamente, por ejemplo, mariner no existe en *D. melanogaster*, pero ha sido identificado en *D. mauritiana* así como en muchos otros organismos incluyendo planaria, nemátodos y humanos (Margaret, 1994; Garcia, 1993; Robertson 1993; Robertson y Macleod, 1993; Oosumi, 1995). La identidad de secuencias es muy baja, por ejemplo, entre 65 especies de insectos la identidad de secuencias varía entre 37 y 56 % a nivel de secuencia de DNA, y 23 a 45% a nivel de aminoácidos. Los números de copias son diferentes en distintos organismos. Se han encontrado 100 copias en *A. gambiae*, 1000 copias en *H. cecropia* y 0-30 copias en la familia de *Drosophila*.

Los elementos mariner tienen formas activas e inactivas. Hasta ahora, se han obtenido los elementos activos de *D. mauritiana* (Mos1), *D. simulans* (MB1), y *C. porcupunda*, todos codifican un marco abierto de lectura de transposición intacto (Jacobson, 1986; Medhora, 1991; Robertson, 1992). Todos los demás elementos secuenciados hasta ahora contienen numerosas mutaciones y se consideran inactivos.

El mecanismo exacto de la transposición de elemento mariner no ha sido determinado pero de acuerdo con su estructura, puede ser un elemento de tipo I de clase II elementos (como elemento P) y transposición por intermediario de DNA-DNA.

IV. IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACION DE ELEMENTOS MARINER EN *A. albimanus*

Los elementos transponibles pueden ser una herramienta potencial para abordar aspectos moleculares en insectos, y son buenos candidatos para vectores de transformación en manipulación genética. En el área de mosquitos transgénicos, los elementos transponibles se pueden utilizar para incorporar genes específicos anti-malaria en poblaciones silvestres de mosquitos *Anopheles* para

el control de la malaria. La utilización de los vectores de transformación basadas en elementos P en *Drosophila* (Rubin y Spradling, 1982; Rubin, 1981; Rubin, 1982; Spradling y Rubin, 1982) es exitosa, pero el elemento P no es capaz de transponerse en mosquitos. Sin embargo, será posible emplear este tipo de tecnología en mosquitos, si se dispusiera de un elemento transponible con propiedades similares al elemento P. El hecho de que los elementos mariner y P pertenezcan al mismo grupo de elementos transponibles sugiere que los elementos mariner podrían ser valiosos como vectores de transformación. *A. albimanus* es el principal vector transmisor de *Plasmodium vivax* (malaria) en América Latina. La identificación del transposón tipo mariner en *A. albimanus* puede establecer un fundamento para desarrollar un vector de transformación en la manipulación genética de mosquitos para el control de la malaria.

OBJETIVOS

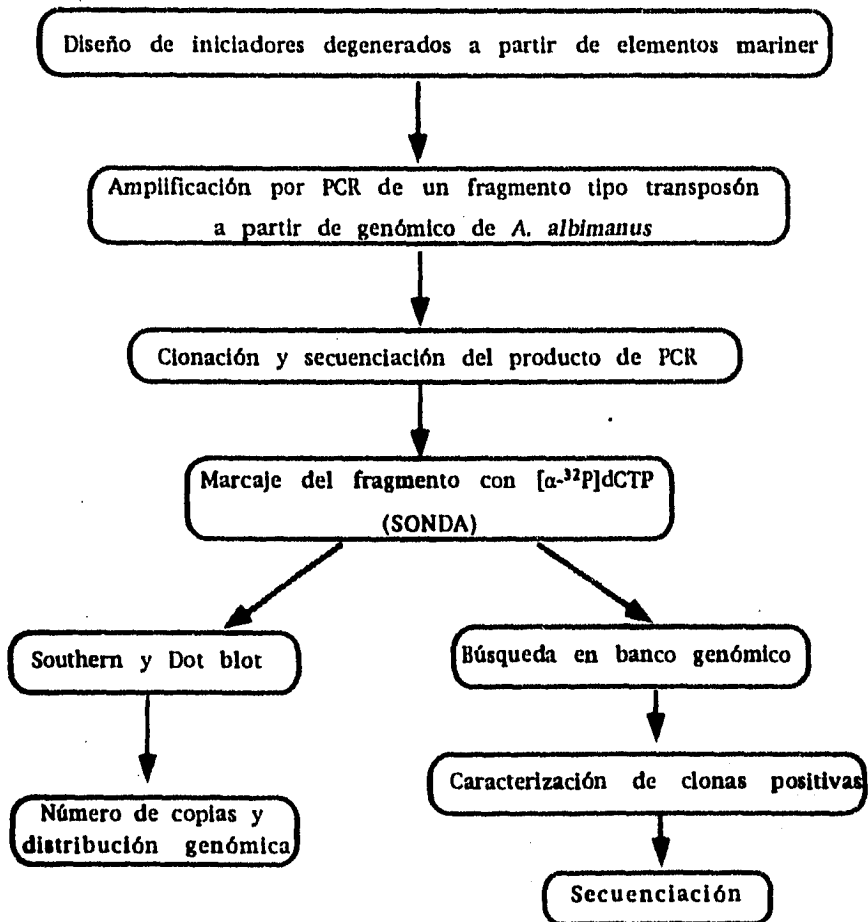
Principal:

Aislar y caracterizar un(os) posible(s) transposón(es) tipo mariner de *A. albimanus*

Particulares:

1. Diseñar oligonucleótidos degenerados para la amplificación por PCR de un fragmento del elemento mariner de *A. albimanus*.
2. Clonar y secuenciar el fragmento del elemento tipo mariner.
3. Estimar el número de copias y la distribución genómica del elemento tipo mariner en *A. albimanus* por Dot y Southern blot.

Estrategia experimental



MATERIALES Y METODOS

I. MEDIOS Y CEPAS

Mosquitos de la especie: *A. albimanus* cepa franja blanca fueron obtenidos de la colonia de laboratorio mantenida en el Centro de Investigación sobre el Paludismo (CIP) en Tapachula, Chiapas, México. Tanto larvas como adultos fueron utilizados para la extracción de DNA.

La cepa *Escherichia coli* XL1-blue fue utilizada para la transformación con el plásmido pBluescript SK II (-) [pBSSK(-)]. El genotipo de esta cepa es sup E44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thirelA1 lac-F' [proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10(tetr)].

La cepa *E. coli* P2392 que contiene la forma lisógena del fago P2 fue utilizada para la infección por lambda DASH. Solamente los fagos recombinantes pueden crecer en esta cepa.

El almacenamiento de cultivos de bacterias importantes se hizo creciendo una colonia en LB líquido por 12 horas y llevándola a una concentración final de 25% de glicerol estéril. Alcuotas en tubos de 1.5 ml se guardaron a -70°C.

II. VECTORES PARA CLONACION

1. Plásmido: Se utilizó el plásmido pBluescript SK II (-). Este plásmido posee los promotores de transcripción T3 y T7 flanqueando un sitio M13mp19 de clonación múltiple (Promega).

2. Fago lambda DASH: Se utilizó el fago lambda DASH (Stratagene) como vector de clonación de genoma DNA de *A. albimanus*. Hay promotores de transcripción T3 y T7 y un sitio de clonación múltiple (ver figura 12), el parte centro de fago puede ser cambiada por 9-23 kb DNA heterólogo.

III. DIGESTION DEL DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCION

A continuación se describen las enzimas que se utilizaron y los amortiguadores de ensayo descritos por los fabricantes (a una concentración 10X):

EcoRI (Boehringer Mannheim): Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y BSA 0.1 mg/ml.

EcoRV (Boehringer Mannheim): Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, MgCl₂ 6 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y BSA 0.1 mg/ml.

HindIII (Boehringer Mannheim): Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM y BSA 0.1 mg/ml.

Sau3AI (Boehringer Mannheim) Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM y BSA 0.5 mg/ml.

La temperatura de reacción para todas las enzimas fue de 37°C. Las enzimas se usaron en cantidades de 10 Unidades/μg de DNA en 10 μl de reacción. Los tiempos de digestión fueron de 1/2 hora a 4 horas según la enzima utilizada. La reacción de digestión se paró con 4 μl de solución de carga, y los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa 0.8%, 1.2% y 1.5% con TAE IX.

IV. EXTRACCION DEL DNA GENOMICO DE MOSQUITOS

Se colocan 100 mosquitos vivos en el mortero con nitrógeno líquido, se trituran y se incuban con 4 ml de buffer de extracción a 50°C durante 1.5 horas. Se extrae la solución de mosquitos dos veces con un volumen igual de fenol (pH 8.0) y una vez con cloroformo, a 20°C, centrifugando cada vez a 8000 rpm durante 5 minutos. Se precipita el DNA con 1/10 vol. de 3 M de acetato sodio (pH 5.2) y dos volúmenes de etanol absoluto frío y se disuelve con 1 ml de buffer TE. Se trata el DNA con 10 μl (10 mg/ml) de RNAasa a 37°C, 1 hora y se extrae como ya se mencionó en la misma sección.

V. AMPLIFICACION DEL FRAGMENTO "MARINER" DE *A. albimanus*

Para amplificar un fragmento del elemento hipotético mariner de *A. albimanus*, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(Saiki, 1988). El volumen de reacción fue de 50 μl. La reacción consistió de DNA de *A. albimanus* 60 ng, oligos [(Dp1): 5'- GTN ACN ATG GAY GAR AMN TGG -3', (Dp2): 5'- GG NGC RTT RTC NTG RTG RAA -3'(figura 4) 1 mM cada uno, dNTPs (concentración final) 50 mM, y *Taq* DNA polimerasa 1 Unidad (Boehringer). La reacción se hizo en un aparato de PCR Perkin Elmer Cetus 9600, la reacción es durante 10 ciclos bajo las condiciones siguientes: Desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, apareamiento a 36°C durante 60 segundos y polimerización a 72°C durante 60 segundos. Luego durante 25 ciclos: Desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, apareamiento a 52°C durante 60 segundos y polimerización a 72°C durante 60 segundos. Al finalizar los ciclos se permitió la extensión de los productos que pudieran quedar incompletos a 72°C durante 10 minutos. En este experimento se incluyeron otras reacciones de control positivo y negativo bajo las mismas condiciones. Por último, 5 μl de los productos de amplificación de cada una de las reacciones fueron analizados por migración en gel de agarosa al 1.5 % y el gel fue teñido con la técnica de bromuro de etidio.

VI. TECNICAS DE ELECTROFORESIS EN GEL

La técnica para preparación de geles de agarosa es la descrita por Sambrook (1989), se usó para el análisis, aislamiento y cuantificación de DNA.

Para el análisis del DNA se utilizó gel de agarosa (BRL INC.) en la cámara Bio-Rad INC. Los fragmentos de DNA de menor tamaño (2000-100 pb) se analizaron en concentraciones variables de agarosa de 1% a 1.5% según la resolución deseada (Brown, 1991). A cada muestra (desde 50 ng hasta 500 ng de DNA si el gel es analítico), se agregaron 2 µl de solución de carga para geles de agarosa por cada 10 µl de solución de DNA. Típicamente se incluyeron estándares de peso molecular conocido como Ladder de 100 pb (Gibco BRL, citados en Hartley J. L.), para bandas esperadas mayores de 600 pb, y se usa DNA de λ digerido con las enzimas de restricción HindIII. Los geles se corrieron a un voltaje de 1 a 5 V/cm (la distancia en cm es igual a la distancia entre los electrodos), en un amortiguador TAE 1X con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. Cuando el marcador de azul de bromofenol llegaba al final del gel, se detuvo la corrida, y se expuso el gel en un transiluminador de luz ultravioleta. Los registros fotográficos se hicieron en una cámara polaroid de enfoque fijo, con un filtro Kodak para ultravioleta.

Los geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20 %, urea 7 M, se prepararon de la siguiente manera (Sambrook, 1989): justo antes de necesitar el gel, se disolvieron 4.85 g de urea en 3 ml de agua bidestilada, se le agregaron 5 ml de la solución stock de acrilamida al 40 %, 665 µl de TBE 10X, 100 µl de persulfato de amonio 25 % y 3.5 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina), se aforó a 10 ml y se vació para ser corrido en una cámara "tall mighty small" de Hoeffer. 200 ng de oligo junto con 5 µl de solución de carga se corrieron a 350 V y 15 mA hasta que el marcador azul de bromofenol llegó al final del gel.

Los geles de secuenciación acrilamida 5%, urea 7 M, se prepararon disolviendo 63 g de urea (grado secuenciación), en 80 ml de agua desionizada, añadiendo 15 ml TBE 10X, 25 ml de la solución stock de acrilamida 30% (19:1) y se aforaron a 150 ml con agua desionizada. A 50 ml se le añadió 150 µl de persulfato de amonio 25% y 150 µl de TEMED. La solución se usó para sellar la parte inferior de la cámara Bio-Rad para geles de secuenciación. Una vez polimerizada, se añadió a los restantes 100 ml de solución de acrilamida 100 µl de persulfato de amonio 25% y 100 µl de TEMED. Se vació la solución a la cámara. Se dejó polimerizar por lo menos 8 horas.

VII. PREPARACION Y TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES

Preparación de células competentes (Hiroaki, 1990): Las células se inocularon en 500 ml de LB (con tetraciclina 12.5 µg/ml). Se incubaron 68 horas a 18°C en agitación hasta una Absorbancia de 0.5 OD a 600 nm de longitud de onda.

El cultivo se centrifugó en tubos estériles a 4 krpm, 10 minutos a 4°C y se resuspendió el precipitado en 40 ml del amortiguador PB, incubándolo en hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 4 krpm, 10 minutos a 4°C y se resuspendió la pastilla en amortiguador PB. Se hicieron alcuotas de 0.3 ml en tubos Eppendorf estériles con DMSO 7% de 1.5 ml. Los tubos Eppendorf fueron guardados a -70°C, lo que permite descongelar y usar cada alcuota hasta 2 veces.

VIII. TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES

En un tubo Eppendorf estéril se añadieron 100 µl de células competentes y 1 µl de una solución 10 ng/µl de pBSSK(-) DNA. Se incubaron en hielo por 30 minutos y a 42°C por 90 segundos, se plaquearon 200 µl por caja de Petri con LB sólido y antibiótico [Metixilina/Ampicilina (80/20 µg/ml)]. Se incubó a 37°C durante la noche. Se contaron, picaron y estriaron las colonias a cajas frescas de LB con antibiótico.

IX. PREPARACION DE pBSSK(-)

Para preparar el vector pBSSK(-), se crecieron bacterias de *E. coli* XL1-blue transformadas con el plásmido pBluescript SK II (-) en 50 ml de LB/ampicilina hasta saturación. 150 ml células fueron procesados por el método de "Wizard™ Maxipreps DNA Purificación System, No.139" (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se linearizó el plásmido pBSSK(-) con la enzima EcoRV, 500 µl de pBSSK(-) (25 ng/µl), 56 µl de buffer B y 30 µl de EcoRV se agregaron e incubaron a 37°C por 1.5 horas. Se purificó el vector por extracción con un volumen igual de fenol/cloroformo, y se precipitó con etanol.

X. LIGACION Y TRANSFORMACION

Se añadieron 2 µl de pBSSK(-) linearizado (6 ng/µl), 1 µl de 10 X buffer ligación, 1 µl del producto de PCR pulido (1 µg/µl), 4 µl de T4 DNA ligasa (Boehringer, 1 U/µl) (0.5 Unidades por cada 500 ng de DNA) y se puso la reacción a 15°C, 8 horas. Se transfirió como se describió para la transformación de células competentes.

XI. IDENTIFICACION DE COLONIAS TRANSFORMADAS

1. Digestiones enzimáticas:

Llenar un tubo Eppendorf con medio de cultivo de bacterias. Centrifugarlo 5 minutos a máxima velocidad. Remover el sobrenadante. Resuspender la pastilla de bacterias en 100 µl de solución de lisis (LiCl, solución). Añadir 100 µl de fenol. Vórtex durante 10 segundos Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad. Recoger el sobrenadante. Añadirle 100 µl de cloroformo/isoanflico.

Vórtex 10 segundos. Centrifugarlo como antes. Añadir 200 µl de etanol absoluto frío. Mezclar. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad. Lavar la pastilla con etanol al 70%. Resuspender en 30 µl agua o TE buffer. DNA es digerido por HindIII o EcoRI/HindIII para el chequeo de insertos.

2. Sondeo directo por PCR

Se procedió modificando el método descrito en McPherson (1992). Las colonias candidatas a poseer el plásmido con el inserto deseado se picaron y cada una se resuspendió en 100 µl de agua tetradesilada estéril, el tubo se calentó a 95°C por 15 minutos, después de lo cual se agitó y se centrifugó para bajar los residuos. Se tomaron 10 µl de la solución de DNA y se realizaron PCR con los primers degenerados (Dp1 y Dp2). Las reacciones se analizaron en geles de agarosa. En todos los casos se incluyeron controles negativos (colonias sin transformar) y controles positivos (colonias con insertos de tamaño conocido).

XII. PURIFICACION DE PLASMIDO

Para purificar los plásmidos de las colonias seleccionadas, se crecieron bacterias de *E. coli* XL1-blue transformadas con el plásmido en 50 ml de LB/carbamicilina hasta saturación. La pastilla fue procesada con el método de Plasmid SELECT-250 SPIN COLUMN (5 Prime->3 Prime, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido resultante se linearizó con diferentes enzimas de restricción y se cuantificó en gel de agarosa 1%.

XIII. SECUENCIACION

Los experimentos de secuenciación fueron realizados mediante el método de terminación de la polimerización enzimática utilizando el *fmol*TM SEQUENCING KIT de Promega.

En cuatro tubos Perkin Elmer de 150 µl se adicionaron por separado 2 µl de la mezcla de deoxinucleótidos conteniendo el dideoxinucleótido apropiado.

En un tubo Eppendorf de 0.5 ml se adicionó 1 µl conteniendo 100 ng del plásmido purificado correspondiente, 5µl de la solución amortiguadora para *Taq* DNA polimerasa 5X, 2 µl conteniendo 4 fmoles del oligonucleótido correspondiente marcado en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP y se ajustó el volumen a 16 µl con agua tridestilada estéril. Por último se agregó 1µl de *Taq* DNA polimerasa grado de secuenciación (5 U) y la mezcla se agitó con la punta de la pipeta.

Se adicionaron 4 µl de esta mezcla a cada uno de los tubos conteniendo la mezcla de nucleótidos. La reacción se realizó durante 25 ciclos en un aparato Perkin Elmer Cetus 9600 bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, apareamiento a 42°C

durante 30 segundos y polimerización a 72°C durante 45 segundos. Al finalizar los ciclos se permitió la polimerización a 72°C durante 15 minutos.

Al terminar la reacción, las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf de 0.5 ml y se les adicionaron 6 µl de solución de terminación. Los tubos se agitaron suavemente y se centrifugaron en una microfuga Eppendorf para detener la reacción. Posteriormente fueron incubados en baño maría a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente transferidos a baño de agua-hielo.

Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 5% urea 7 M y sometidas a electroforesis. Los resultados fueron integrados con la utilidad Contig del programa GeneWorks.

XIV. PREPARACION DE LA SONDA MARCADA

El fragmento de tipo mariner se utilizó como sonda en los experimentos de Southern blot, Dot blot e hibridación en placa. El fragmento se marcó a concentración final de 12 µM y careció de dCTP y se añadió 0.33 µM (concentración final) de [α -³²P]dCTP con el método de "NEN RANDOM PRIMER EXTENSION LABELING SYSTEM, NEP-103 (DU PONT)" siguiendo las instrucciones del fabricante.

XV. DOT BLOT

El filtro de nylon (Hybond N⁺, Amersham) es humedecido con agua desionizada y se coloca en el aparato de Dot. El DNA es desnaturizado con NaOH 0.4 N en un volumen aproximadamente de 30 µl y se calienta en un baño de agua de 70°C durante 10 minutos. Después se le coloca un volumen igual de acetato de amonio 2 M frío. Se colocan los 60 µl aproximadamente de la muestra de DNA en el aparato de Dot usando una bomba de vacío para que las muestras sean absorbidas. Se lava el filtro con aproximadamente 200 ml de SSC 4X durante 5 minutos con leve agitación. Después se pone el filtro en una solución Denhardt's 2X por lo menos una hora. Se fija el DNA por luz ultravioleta en condición standard.

El filtro es puesto en una bolsa con la solución de prehibridación, se deja incubando 4 horas a 42°C. Se desnaturiza la sonda marcada por incubación en agua hirviendo durante 5 minutos, y se adiciona a la solución de prehibridación. Se deja hibridando por 20 horas a la temperatura de 42°C.

El primer lavado se realiza con SSC 2X, 0.1% de SDS 45 minutos a temperatura ambiente. El segundo es con SSC 1X, 0.1% de SDS 40 minutos a 68°C. El tercero es con SSC 0.2X, 0.1% de SDS 60 minutos a 68°C. El filtro es expuesto en una pantalla de PhosphorImager (Molecular Dynamics) durante 12 horas y se cuantificó la intensidad de los dots.

XVI. SOUTHERN BLOT

10 µg DNA de *A. albimanus* fueron digeridos con la endonucleasa de restricción EcoRI y HindIII. Los productos de digestión se sometieron a electroforesis, junto con 300 ng del bacteriófago λ digerido con HindIII como marcadores de tamaño, en un gel de agarosa al 1%. El gel se corrió en una cámara horizontal con solución amortiguadora TAE 1X y bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Al término de la electroforesis, el gel se expuso a luz U. V. y la posición de los marcadores de tamaño fue registrada en el mismo gel con tinta china. El DNA fue desnaturalizado con 250 ml de NaOH 0.4 M durante 30 minutos en agitación (Southern, 1975).

Se recortaron cuatro pedazos de papel filtro 3MM al mismo tamaño del gel. Dos de ellos se colocaron sobre la cámara de electroforesis conteniendo 300 ml de NaOH 0.4 M de tal manera que sus extremos estuvieran en contacto con la solución. El gel, previamente tratado, fue colocado sobre el papel 3MM para impedir el flujo de líquido por las orillas se rodeo el gel con parafilm. Sobre el gel se colocó una membrana de nylon. Posteriormente se colocaron las otras dos piezas de papel filtro 3MM sobre la membrana de nylon. Se tuvo cuidado que en ningún caso hubiera burbujas. Sobre estos filtros se colocó un paquete de toallas de papel recortadas un poco más pequeñas que el papel 3MM, una placa de vidrio y un peso de 500 g.

La transferencia de DNA se realizó durante 20 horas. Al término de la transferencia se separó el gel del filtro, se hidrató con agua, fue teñido con bromuro de etidio y se observó a la luz U. V. para comprobar la transferencia. La membrana de nylon se sumergió en NaOH 0.4 M durante 10 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó en 200 ml de solución de Tris HCl 0.2 M pH 7.5, SSC 0.1X y SDS 0.5% durante 10 minutos y agitación constante. Enseguida se secó sobre papel filtro 3MM a temperatura ambiente. Se realizó la fijación del DNA al filtro, la prehibridación, la hibridación con sonda, lavados y exposición del film como se indicó en la sección de Dot blot.

XVII. CLONACION DEL GEN TIPO MARINER EN *A. albimanus*

La búsqueda del gen tipo mariner se realizó en una genoteca genómica construída por el grupo del Dr. Fidel de la Cruz Hernández, (CINVESTAV, Mexico) con fragmentos Sau3AI obtenidos por digestión parcial del DNA de *A. albimanus* y clonados en el bacteriófago λ DASH. El título de esta genoteca es de aproximadamente 5×10^4 recombinantes/ml y el tamaño promedio del inserto es de 9-23 kilo pares de bases.

Una colonia de *E. coli* P2392 se creció hasta la fase estacionaria en 5 ml de medio LB suplementado con maltosa 0.02 % y MgSO₄ 1 mM. Se lavó con MgSO₄ 10 mM por centrifugación a 1000 g durante 7 minutos y se ajustó a D.O.600= 0.6. 300 µl de *E. coli* P2392 fueron infectados con aproximadamente 26000 bacteriofagos de la genoteca. Después de incubar durante 15 minutos

a 37°C y 250 rpm se adicionaron 7 ml de medio LB-agarosa 0.7 % y se vaciaron a una placa de LB. Estas últimas se incubaron a 37°C hasta que las placas de lisis resultaron visibles.

Las placas de lisis se refrigeraron al menos dos horas y posteriormente se transfirieron por duplicado a filtros de nylon. El primer filtro se mantuvo en la placa durante dos minutos y se marcó con tinta china de tal forma que la marca quedara también en el agar de la placa. El segundo filtro se mantuvo cuatro minutos sobre la placa y fue marcado exactamente como el primero. Ambos filtros se sumergieron en solución desnaturalizante durante dos minutos, en solución neutralizante durante 5 minutos y en SSC 2X durante 30 segundos, en el orden descrito. Posteriormente se secaron al aire y se realizó la fijación del DNA al filtro y la hibridación con sonda como se indicó para el Dot blot.

Estos filtros fueron utilizados para realizar una autoradiografía con pantalla de intensificación durante tres días a -70°C. Después de revelar se marcaron las posiciones de los filtros y se compararon los duplicados. Solamente aquellas placas que resultaron positivas por duplicado fueron recuperadas. Para ello se realizó un corte del pedazo de agar en donde se encontraba la placa de lisis positiva y se sumergió en un tubo Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 1 ml de solución amortiguadora SM y 20 µl de cloroformo. El tubo se agitó suavemente por inversión para liberar los bacteriófagos del agar. Estos fueron sometidos a una segunda y tercera purificación repitiendo todo el protocolo. Después de la tercera purificación se recuperaron nueve clonas positivas. El DNA de la clona positiva fue purificado por el método usado de "Molecular Cloning" (Sambrook, 1989).

XVIII. PCR LARGO

El DNA de la clona positiva del banco de λDASH banco fue amplificado por los primers I₁, I₂, T3 y T7 (ver figura 13). El volumen de reacción fue de 50 µl. La reacción consistió de 0.8 ng de DNA, 300 nM de primers, 350 µM de dNTP, 2.5 Unidades de *Taq* DNA polimerasa (Boehringer), y 0.02 Unidades de *Pfu* polimerasa. La reacción se hizo durante 25 ciclos: Desnaturalización a 94°C durante 10 segundos, apareamiento a 42°C durante 30 segundos y polimerización a 68°C durante 15 minutos. Al finalizar los ciclos se permitió la extensión de los productos que pudieran quedar incompletos a 68°C durante 7 minutos. Se analizaron los resultados en gel de agarosa 1%.

XIX. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS

Para el diseño de los primers y el análisis de las secuencias obtenidas, se utilizó principalmente el paquete GeneWorks de Intelligentics INC, para Macintosh. ALIGNMENT: Alínea las secuencias de acuerdo a las regiones. TFASTA: Busca secuencias similares a la secuencia en cuestión en los bancos de datos de secuencias peptídicas.

RESULTADOS

I. DISEÑO DE OLIGOS PARA AMPLIFICAR EL FRAGMENTO TIPO MARINER DE *A. albimanus*

1. Las regiones conservadas seleccionadas

Se alinearon las secuencias peptídicas de fragmentos de tipo mariner de varios insectos, utilizando el programa GeneWorks (Intelligenetics) y se obtuvo el árbol filogenético de los transposones. Se seleccionaron y analizaron las secuencias de la subfamilia *irritans* donde se localiza *A. gambiae*. El mejor alineamiento se encontró para los insectos *Haematobia irritans* (Hom fly), *Chrysoperla ptorapunda* (Green lacewing) y *A. gambiae* (figura 4). Se encontraron dos regiones con aminoácidos conservados (D1 y D2) que no contienen al aminoácido Leucina (L) cuyo código es altamente degenerado (6 codones lo codifican). Esto último más la distancia entre las regiones D1 y D2, las convierten en buenos candidatos para el diseño de primers para PCR.

2. Determinación de la secuencia de los primers

Se alinearon por TFASTA las regiones conservadas (D1 y D2) con las secuencias de otras 30 especies de insectos. Se encontró que el 60% de la secuencia está conservada en todos ellos (datos no mostrados). Pero, en la posición de "Q" (Glutamina) del D2, otros insectos prefieren el codón "H" (Histidina) en vez del "Q" y en la posición "T" (Treonina) del D1, otros insectos prefieren el codón "K" (Lysina) en vez del "T". Para incrementar la posibilidad de amplificación, se incluyó el codón preferencial de otros insectos con las regiones D1 y D2 y se diseñaron los primers Dp1 y Dp2. Se obtuvieron los degenerados de Dp1 de 512-veces, y de Dp2 de 256-veces, de acuerdo con la figura 5. Los primers seleccionados son 21 pb de "upper" (Dp1), y el "lower" (Dp2) 20 pb.

Los primers sintetizados fueron purificados con n-butanol y analizados en gel de poliacrilamida al 20%. El tamaño encontrado del "upper primer" (Dp1) es de 21 pb y del "lower primer" (Dp2) de 20 pb, de acuerdo con la figura 6.

II. IDENTIFICACION DEL FRAGMENTO TIPO MARINER

Considerando la degeneración de los primers, la eficiencia de amplificación, y la especificidad para la reacción de PCR, la concentración de primers usada fue más alta que la acostumbrada, para este tipo de experimento. La concentración final para cada primer es usualmente 1 μ M, y se usó 1 mM. Se utilizaron dos estrategias diferentes de apareamiento, una donde la temperatura es 36°C y la otra 52°C, que es la temperatura de apareamiento óptima.

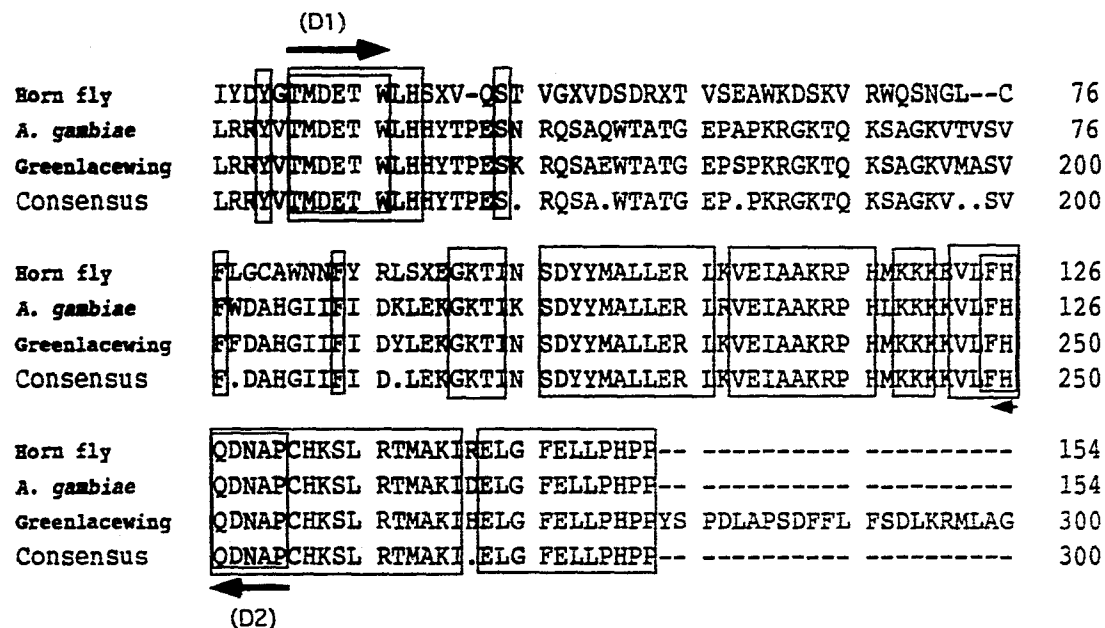


Fig. 4. Alineamiento de fragmentos del elemento mariner
Las flechas indican las regiones de los primers candidatos D1 y D2

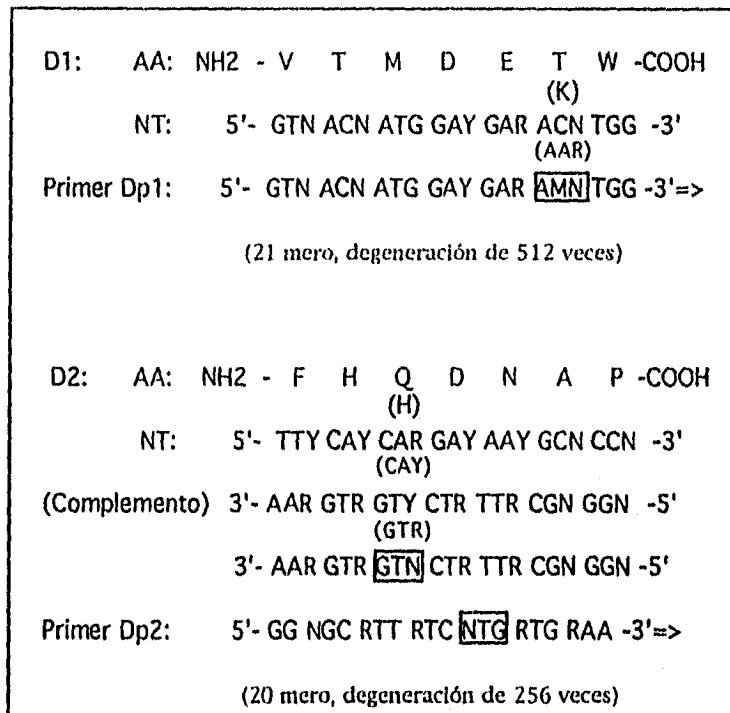


Fig. 5. Primers utilizados para la amplificación de un fragmento de 302 pb del elemento mariner

* Codón de preferencia de muchos insectos,
 ** (Y=T o C; R=A o G; M=A o C; N=A, C, T, o G)

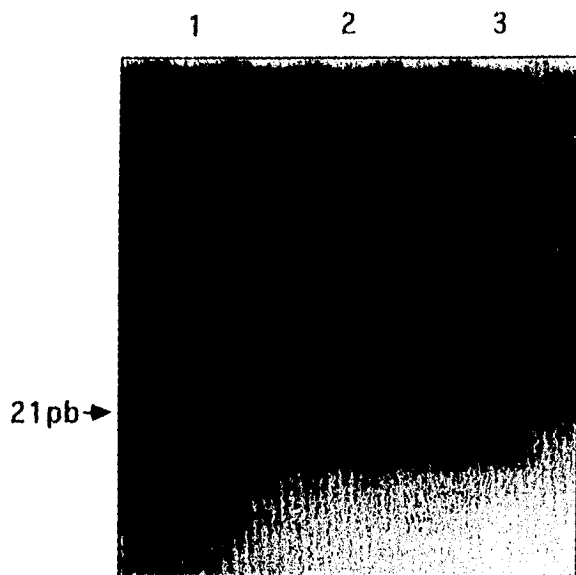


Fig. 6. Oligos identificados por gel de acrilamida al 20% teñido con Nitrato de Plata

- 1. Marcador de 21 pb.
- 2. Dp1: 21-mero.
- 3. Dp2: 20-mero.

Como indica la figura 7, el control positivo de ambos *A. gambiae* y abeja fueron del tamaño esperado (cerca de 300 pb), el control negativo de *E. coli* no mostró una banda en esa posición. Para el caso de *A. albimanus* se aprecia una banda similar a la de *A. gambiae*. Los resultados indican que la amplificación es específica y que el elemento tipo mariner probablemente exista en *A. albimanus*.

Los productos de PCR se clonaron como se describió en Material y Métodos. Una de las colonias, llamada pBM1 (figura 8), es secuenciado. La secuencia que se caracterizó fue de 282 pb de largo, se llama fragmento-LK (figura 9).

III. CARACTERIZACION DEL FRAGMENTO-LK

1. Identidad de la secuencia del fragmento-LK con elementos mariner

La secuencia determinada de *A. albimanus* (fragmento-LK) fue comparada con las secuencias de elementos "mariner" de *A. gambiae* y *D. mauritiana* respectivamente con el programa GeneWorks Inc. La identidad de la secuencia de nucleótidos entre *A. albimanus* y *A. gambiae* fue de 40%, entre *A. albimanus* y *D. mauritiana* fue de 42%, que puede ser comparada con la identidad de las secuencias de las diferentes especies de insectos que es de 37-56%. Los resultados sugieren que la secuencia encontrada puede ser un fragmento tipo mariner, para ser utilizado como sonda en experimentos posteriores.

2. Distribución genómica del elemento en *A. albimanus*

Se digirieron 10 µg de DNA genómico de *A. albimanus* con HindIII y EcoRI, los cuales no existen en los elementos "mariner". Se llevó a cabo una hibridación tipo Southern-blot en condiciones de astringencia alta con el fragmento-LK marcado con [α - 32 P]dCTP. Al hibridar la sonda con la digestión de DNA genómico de *A. albimanus* se aparean al menos 3 bandas para la enzima HindIII: 3kb, 3.2kb y 10kb, pero sólo una banda de enzima EcoRI (figura 10) en la posición de 4.3 Kb, la cual es similar a los resultados de *C. brigy* y *Hyalophora cecropia* (Margaret, 1994; Lidholm, 1991).

3. Número de copias en genoma de *A. albimanus*

Para determinar el número de copias de los elementos en el genoma de *A. albimanus* se utilizó la técnica de Dot-blot. Se usaron el fragmento-LK DNA de *E. coli* como un control positivo y un control negativo. Después de la hibridación con la sonda fragmento-LK marcado con [α - 32 P]dCTP, la señal fue cuantificada por densitometría y el número de copias se estimó por la intensidad de señal. Los resultados muestran al menos 100 copias del elemento en el genoma de *A. albimanus* (figura 11. A) similar en *A. gambiae* (figura 11. B y Tabla 1). Los resultados indican

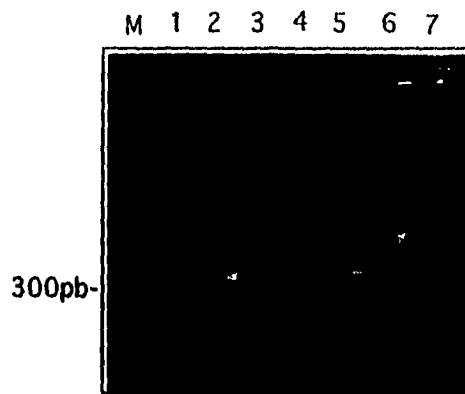


Fig. 7. Productos de PCR analizados en gel de agarosa 2% teñido con Bromuro de Etidio.

Se colocó la décima parte de la reacción por cada muestra

M. Marcador (ladder 100 pb).	1. <i>A. gambiae</i> .
2. Abeja.	3. DNA genómico humano
4. <i>Amiba</i> .	5. <i>A. albimanus</i> .
6. <i>Salmonella typhi</i> .	7. <i>E. coli</i> .

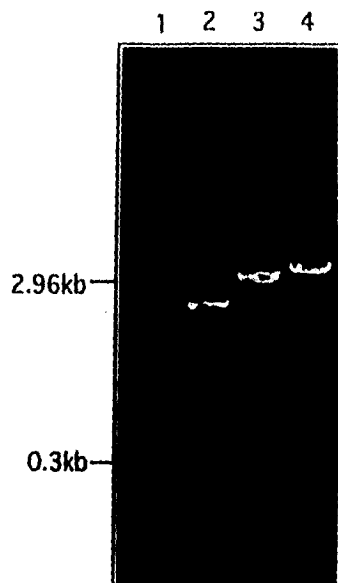


Fig. 8. La colonia pBSM1 identificada por patrón de restricción

1. Plásmido pBSSK(-) digerido con EcoRV.
2. Plásmido pBSM1 sin digestión.
3. pBSM1 digerido con EcoRI/HindIII.
4. pBSM1 digerido con HindIII.

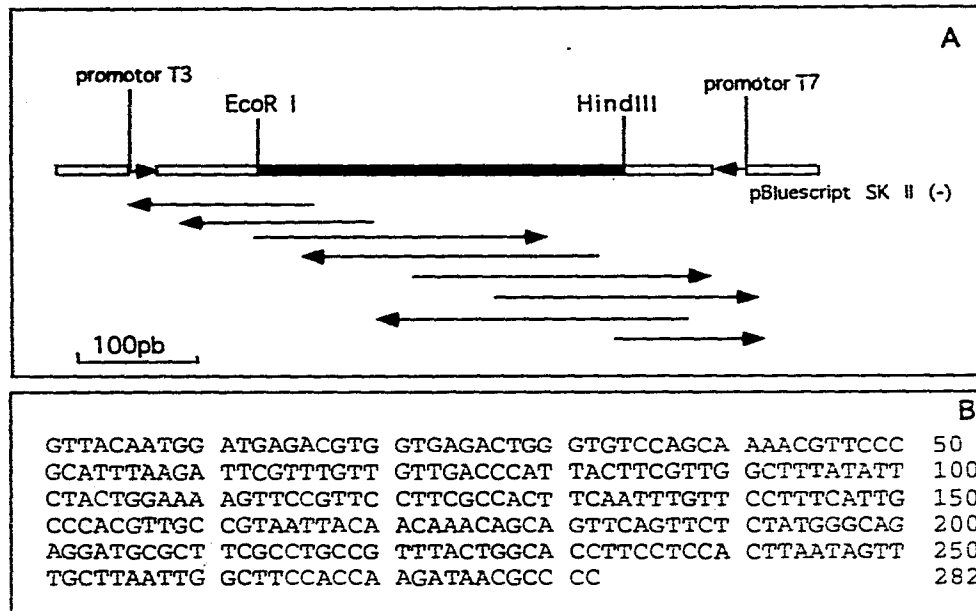


Fig. 9. Secuencia del fragmento tipo mariner

A. Estrategia de la secuencia

B. Secuencia del elemento tipo mariner (fragmento-LK)

de *A. albimanus* (5'=>3')

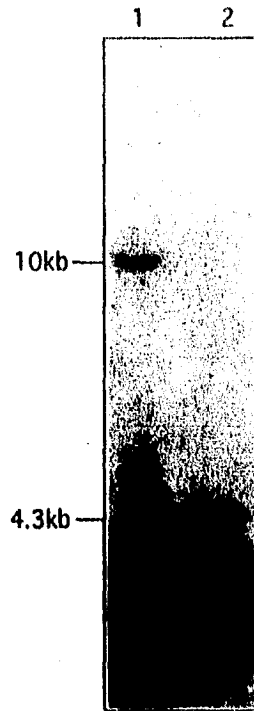


Fig. 10. Southern blot

10 μ g de DNA de *A. albimanus* digeridos con HindIII (1) y EcoRI (2) respectivamente, transferido a nylon, e hibridizado con el fragmento-LK mariner marcado con [α - 32 P]dCTP en condiciones astringentes altas.

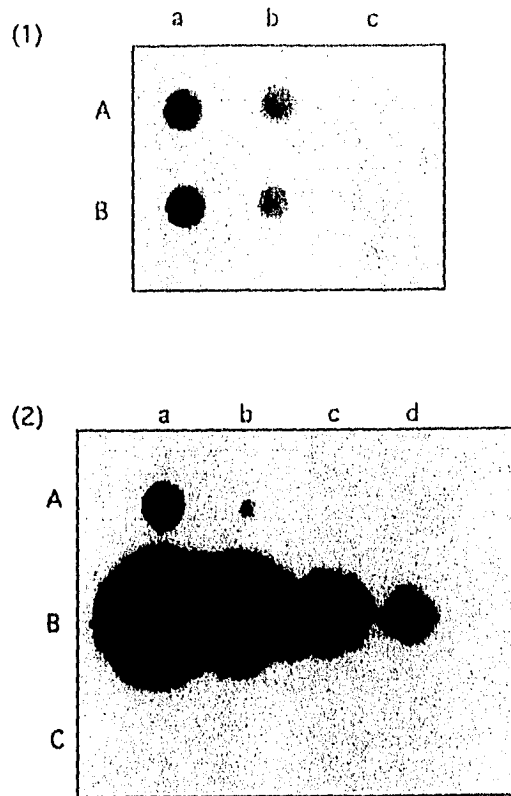


Fig. 11. Dot blot

Diferentes DNAs se colocaron sobre las membranas de nylon y se hibridaron con el fragmento-IK mariner marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$.

(1). Comparación de *A. gambiae* con *A. albimanus*

A. DNA genómico de *A. gambiae*. B. DNA genómico de *A. albimanus*.

a. 6.5 μg . b. 1.3 μg . c. 0.13 μg .

(2). Comparación con controles positivo y negativo

A. *A. albimanus* DNA. B. Fragmento-IK mariner. C. *E. coli*

a. 5×10^8 moléculas.

b. 5×10^7 moléculas.

c. 5×10^6 moléculas.

d. 5×10^5 moléculas

que el fragmento es de tipo de secuencias repetidas moderadas en el genoma, lo que es una característica de elementos transponibles (Brian, 1994).

IV. AISLANDO EL GEN COMPLETO DE TIPO MARINER EN *A. albimanus*

1. Colonias del banco genómico de *A. albimanus*

El banco de DNA genómico de *A. albimanus* fue hibridado con el fragmento-LK marcado radiactivamente en condiciones altamente astringentes (ver Material y Métodos). Se aislaron las tres clonas con señal positiva más intensa, denominadas AaMc1, AaMc2 y AaMc6. Se muestra la clona AaMc1 en la figura 12.

2. Caracterización de la orientación del inserto en la colonia

La orientación del inserto en las colonias fue determinada por PCR largo. Se hicieron cinco reacciones de PCR que abarcan: I₁-T3 primer, I₁-T7 primer, I₂-T3 primer, I₂-T7 primer, T3 primer-T7 primer (figura 13 y 14). La reacción fue llevada a cabo en las condiciones del tiempo de desnaturalización corta, pH alto, tiempo de extensión largo y con mezcla de enzimas *Taq* DNA polimerasa y *Pfu* polimerasa. Entre las tres colonias analizadas, se obtuvieron dos clases: las colonias AaMc1 y AaMc2 mostraron por igual las bandas de 4.5 kb y 8 kb; la colonia AaMc6 presenta las bandas de 6.5 kb y 1.9 kb. Se muestra la clona AaMc1 en figura 14 A Y B.

3. Secuenciando el producto de PCR largo con "primer walking"

De acuerdo con la orientación del fragmento tipo mariner de la colonia, el producto de PCR largo fue secuenciado directamente por "primer-walking". En el método, se partió del primer I₁ designado a partir del fragmento-LK. El segunda primer fue escogido basandose en el resultado del primer-walking inicial (figura 14 C). La secuencia obtenida de 875 pb se muestra en figura 13.

4. Analisis de la secuencia

La secuencia determinada fue alineada con los elementos mariner de *A. gambiae*, *C. pitorapunda*, *D. mauritiana*, y *H. irritans*. La homologa de las secuencias es 43%, 41%, 44% y 45% a nivel de DNA respectivamente, y se encuentran dentro de los homologas con las secuencias de todos los insectos que son de 37-56% (Tabla 2, y figura 15).

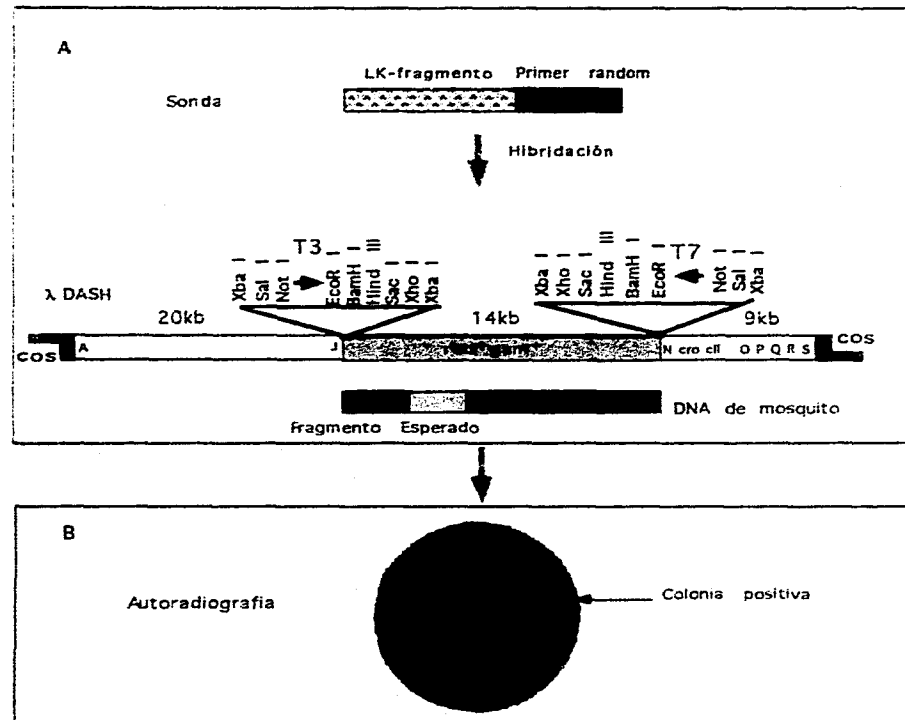


Fig. 12. Aislado el gen completo de tipo mariner de banco genómico de *A. albimanus*

A. La estrategia del aislamiento;

B. Una clona positiva AaMc1.

GTTACAATGG ATGAGACGTTG GTGAGACTGG GTGTCCAGCA AAACGTTCCC (Dp1)	50
GCATTTAAGA TTCGTTTGTG GTTGACCCAT TACTTCGTTG GCTTTATAAT (W1, I1)	100
CTACTGGAAA AGTTCGGTTC CTTCCGCACT TCAATTGTG CTTTCATTG	150
CCCACGTTGC CGTAATTACA ACAACAGCA GTCAGTTCCT CTATGGGCAG (I2)	200
AGGATGCGCT TCGCCTCGCC TTTACTGGCA CCTTCCFCCA CTTAATAGTT	250
TGCTTAATTG ACCTCCACCA AGCAACAGCA TAAAACGATT GGTACGCACC (Dp2)	300
GCAAATAAAA TTCTTGTGA TTCCATTCCCT AGACCTGGAA TGGCAAAAAC	350
AAGCACCAGG AAAAAAATA GACCAGATGG AGGAAAGTCC ACTTGCAGAA	400
GTTCACTTC ABAACTCCAT TTCGGCGAAA CGCGTTGTTT TGCTACATTC (W2)	450
TATCTTTTTC TCGCGAAAAG TGCAGCCTGC TGGCACTGTC TGAAGGAAGA	500
TTTCCCGAAC AACCGACACT GTCGTGGGCA CTCCTTGGCT AAAGGACGAG	550
TCAGTCCCGG AGAAAGGTGT AAATAGGTCT CTGGGACTAG CGGAGAGGTT	600
GGCGAGTGCC TCAGTCGTCT CAGTCTGAC CACGAGCAGT TCTGGCCACG	650
CTGGATCGAG TTGATAGTAC AGGTGACAGG CAGGCTCGAC TATTCATTC	700
CCAAAATTTG TTATCTTGAT TTTGGGGCAC CGCTGCGTAG GCCCCGGGTT	750
TGTTGAGAT CGACTTCTCC GTGGCCTCGC ACTGCTGGAC TGTCGGGGCG	800
TGATATGACA GAACACCGCT CGCATACGTG GCATGCATAT TTGATTGATA	850
ATTTATGCTC GACGGCACT CGGGG	875

Fig. 13. Secuencia de tipo mariner en *Anopheles albimanus*

D1 y D2: Las regiones de los primers degenerados 1 y 2 usado para amplificar el fragmento tipo mariner de DNA genómico de *A. albimanus*; W1 o I1: Walking primer 1 o primer usado para PCR largo; I2: Primer usado para PCR largo; W2: Walking primer 2.

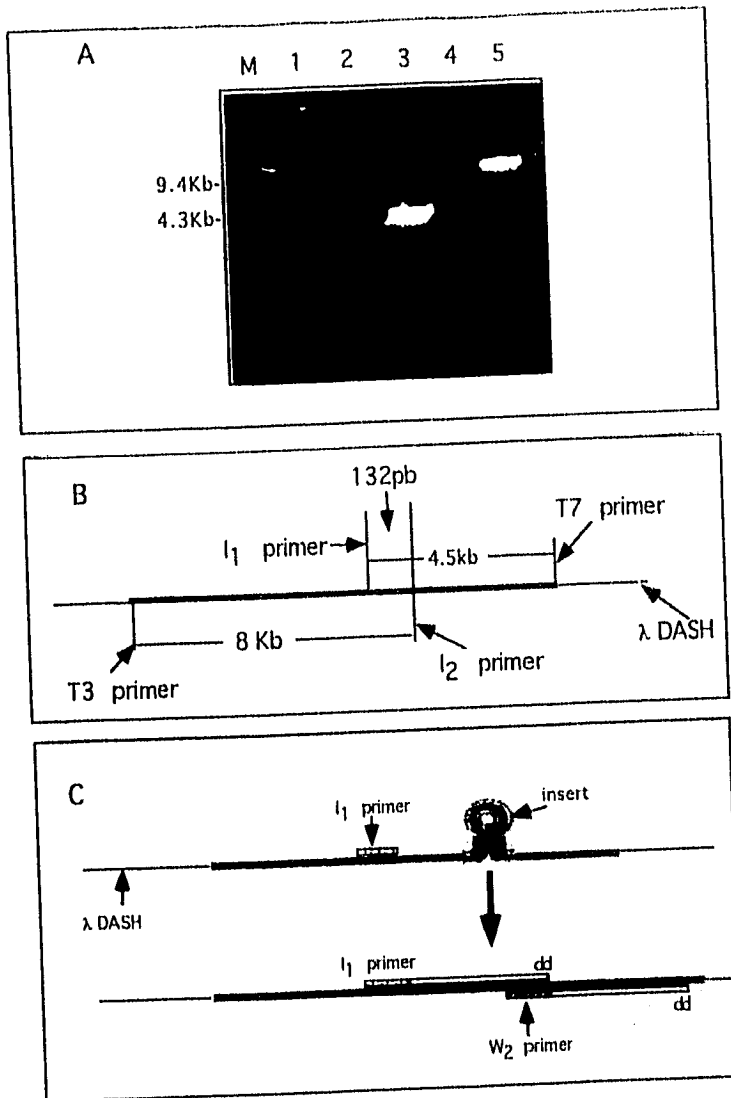


Fig. 14. PCR Largo

- A. Productos de PCR largo de AaMcl resueltos por gel de agarosa al 0.8%
- M. λ DNA/HindIII marcador;
1. T3 primer-l₂ primer
2. T3 primer-l₁ primer;
3. T7 primer-l₁ primer;
4. T7 primer-l₂ primer;
5. T3 primer-T7 primer.
- B. Mapa de A.
- C. Primer walking

Tabla 1. Comparación del número de copias de los elementos mariner de diferentes insectos

Especies	No. de copias
<i>D. mauritiana</i>	30
<i>H. cecropia</i>	1000
<i>M. occidentalis</i>	12
<i>A. gambiae</i>	100
<i>A. albimanus</i> *	100

* El número de copias de este trabajo, el cálculo está basado en la intensidad de señal de las manchas y la cantidad de moléculas en ellas. El número de copias de otros insectos es el citado de publicaciones. (Warren and Crampton, 1994; Jeyaprakash, 1995).

Tabla 2. Comparación del alineamiento del DNA de elementos mariner

Especies	Identidad de secuencias
<i>A. albimanus</i> <i>A. gambiae</i>	43%
<i>A. albimanus</i> <i>D. mauritiana</i>	44%
<i>A. albimanus</i> <i>G. lacewing</i>	41%
<i>A. albimanus</i> Horn fly	45%
Todas las especies de insectos *	37-56%

* Datos citados de: Robertson, H. M. The mariner transposable element is widespread in insects. *Nature*, 1993, 362, 241-245.

DISCUSION

En este trabajo se demostró por PCR degenerado y Southern blot la existencia, en *A. albimanus*, de un elemento repetido tipo mariner del cual se ha demostrado previamente que tiene propiedades similares a un elemento P en *Drosophila*. La homología de las secuencias de DNA con *A. gambiae* y *Drosophila* es de 43% y 44%, respectivamente, que puede ser comparada con la homología entre todos los insectos de 37-56%. El número de copias del elemento es de 100, el cual es similar con *A. gambiae*.

I. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La baja homología entre las secuencias de los elementos "mariner" de diferentes organismos dificulta el encontrar al elemento por un método de hibridación nucleotídica, dado que con una divergencia mayor del 30% la hibridación no funcionaría bien. El uso de PCR con oligos degenerados es una buena estrategia para buscar un elemento en organismos. Robertson utilizó secuencias de genes de una transposasa hipotética dentro de los elementos "mariner" de *D. mauritana* y *H. cecropia*, para construir primers degenerados y amplificó exitosamente regiones de elementos tipo "mariner" de 63 insectos por PCR (Robertson, 1993). Sin embargo, el fragmento de *A. albimanus* no pudo ser identificado. La razón puede radicar en que *Drosophila* y *H. cecropia* no son especies cercanas a *A. albimanus*. Como se sabe, si existe una disparidad (mismatch) en el extremo 3' de los primers, la amplificación con PCR puede no ser efectiva. En este trabajo diseñamos nuevos primers a partir de los elementos tipo mariner de la familia *A. gambiae*. El elemento tipo mariner en *A. albimanus* fue obtenido exitosamente. Al comparar nuestros primers con los que utilizó Robertson, se encontraron muchas ventajas en los nuestros. Por ejemplo: Nuestros primers se dirigen a secuencias más conservadas en insectos, la degeneración es mucho más baja, su secuencia no codifica para aminoácidos con código altamente degenerado, y no tienen degeneración en el extremo 3'.

II. MANERA DE EXTENSION DE LOS ELEMENTOS MARINER

Los elementos mariner pueden transferirse verticalmente. Este ha sido demostrado por microinyección de plásmidos que contienen la secuencia Mos1 completa de *D. mauritana* en huevos de *D. melanogaster*, en donde se observa que este elemento es establemente integrado a cromosomas de línea germinal de *D. melanogaster* (Garza, 1991). La transmisión horizontal de mariner ocurre entre especies (Robertson y Macleod, 1993; Oosumi, 1995; Lidholm, 1991), por ejemplo, las clonas mayoritarias de la *H. irritans* y *A. gambiae* están íntimamente relacionadas (identidad de 91-96% en DNA y 80-90% en aminoácidos), pero la *H. irritans* y *A. gambiae* representan los subórdenes *Cyclorrhapha* y *Nematóceros* respectivamente, que compartieron un ancestro común hace al menos 200 millones de años. Por otra parte, en este trabajo, se encontro

que la identidad de secuencias de nucleótidos entre *A. gambiae* y *A. albimanus* es de 43% y entre *A. albimanus* y *D. mauritiana* es de 44% las dos observaciones anteriores sugieren que los elementos se dispersaron en *Anopheles* de manera horizontal.

III. NUMERO DE COPIAS Y DISTRIBUCION GENOMICA DEL TIPO MARINER EN *A. albimanus*

El número de copias de los elementos "mariner" en *A. albimanus* es de 100, el cual es similar a *A. gambiae* pero diferente de otros organismos tales como *Cecropia* (1000) y *D. mauritiana* (30). En cuanto a la cantidad en los organismos esta no puede ser explicada solamente por el tamaño del genoma, porque el genoma de *Cecropia* es ligeramente más grande que el de *Drosophila*, pero el número de copias de los elementos tipo mariner en *Cecropia* es de 30 veces más que en *D. mauritiana* (Lidholm, 1991). El genoma del mosquito es 8 veces mayor que el de *Drosophila*, pero el número de copias de los elementos "mariner" en *A. albimanus* es sólo 3 veces más que en *Drosophila*. Además, aunque el DNA repetido se ha asociado a la presencia de elementos móviles de DNA, no hay relación entre la cantidad de DNA repetido en *Cecropia* (30%); *Drosophila* (10-15%) y mosquito (39%) y el número de copias de los elementos mariner en estos mismos organismos. Probablemente, las diferencias en los controles de transposición involucran factores cromosomales y/o citoplasmáticos que son específicos de los elementos "mariner" y su huésped.

En Southern-blot solamente se aprecia una banda cuando el DNA genómico se digirió con la enzima EcoRI lo que indica que la distribución genómica del elemento en *A. albimanus* es única, la población de los elementos en el genoma es altamente homogénea en tamaño en este caso (figura 16).

IV. COMPARACION DE LA SECUENCIA DEL CLONA AaMc1 DE *A. albimanus* CON OTROS ELEMENTOS MARINER DE LA FAMILIA IRRITANS

La homología de nucleótidos de 43% entre la secuencia AaMc1 y la secuencia de *A. gambiae* sugiere que la secuencia AaMc1 puede ser un elemento tipo mariner porque la homología se localizo en el rango (37-56%) de la homología entre todos los insectos. La alineación de la secuencia AaMc1 con los elementos tipo mariner en la familia irritans como *H. irritans* (homología de 45%) y *C. pitorapunda* (homología de 41%) está dentro de un rango similar.

Sin embargo, no se encuentra ningún marco abierto de lectura en la secuencia AaMc1. Este resultado es esperado considerando las características del elemento mariner. Investigaciones previas demostraron que los elementos mariner tienen muchas mutaciones al azar. En 65 especies de insectos, la homología de los elementos mariner del aminoácido (23-45%) es más baja que los nucleótidos (37-56%) indicando que la mutación ocurre en la primera o segunda base del codón,

no solo en la tercera posición. Porque si se introduce una mutación puntual en el primer o segundo nucleótido del codón, la secuencia peptídica se verá afectada en mayor grado que la secuencia nucleotídica (el codón será afectado en un 33.33%, mientras que el aminoácido será mayor, o sea 100% de afectación). En el caso de que la mutación ocurra al azar en el gen, las regiones funcionales pueden afectarse fácilmente, igualmente las terminales invertidas repetidas pueden sufrir mutaciones, así que es muy difícil mantener intacto el marco abierto de lectura en el genoma. De hecho, hasta ahora, aunque los elementos mariner pueden ser identificados en diferentes organismos y especies, solo los elementos Mos1 (*D. mauritiana*), Mbl (*D. simulans*), y *C. pteropunda* tienen intacto el marco abierto de lectura y son considerados elementos activos (Jacobson, 1986; Medhora, 1991; Robertson, 1992). Todos los demás elementos secuenciados contienen numerosas mutaciones, como los cambios de base, deleciones, movimiento de los marcos y codones de terminación. Luego entonces el elemento *C. pteropunda* con marco abierto de lectura se encontró entre seis diferentes clonas de las cuales 5 resultaron ser elementos inactivos. También, todos los elementos mariner completos clonados hasta ahora tienen mutaciones y diferencias de largo en sus 28 pb de las terminales invertidas repetidas (STIR) (*C. pteropunda*, 27pb; *C. elegans*, sin STIR; Humano, 29 pb; *H. cecropia*, 38pb).

En este trabajo no se encontraron marcos abiertos de lectura (ORF) indicativos de que el elemento identificado es un elemento tipo mariner que existe en forma inactiva en el genoma de *A. albimanus*. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que existan otros elementos mariner activos en *A. albimanus*. Esta posibilidad puede ser explorada en investigaciones futuras mediante un esfuerzo más amplio de secuenciación.

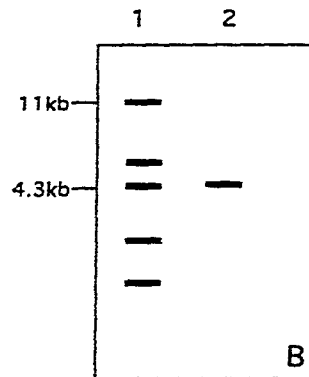
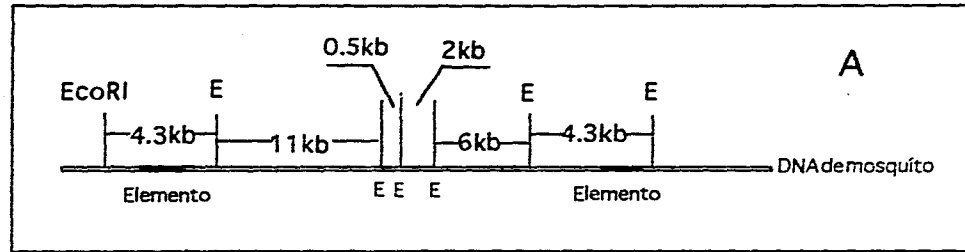


Fig. 16. Modelo de distribución del fragmento tipo mariner en *A. albimanus*

A. Distribución del elemento en el genoma

La población del elemento es altamente homogénea con respecto al tamaño.

B. Resultados del Southern blot

1. Antes del blotting
2. Después de la hibridación con el elemento como sonda.

CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo llegamos a las siguientes conclusiones:

1. El elemento tipo mariner existe en *A. albimanus*, lo cual se demostró por PCRs degenerados.
2. Hay copias múltiples del elemento tipo mariner en *A. albimanus* el cual es similar en *A. gambiae*, lo que fue verificado por el Dot-blot.
3. La población de los elementos tipo mariner en el genoma tiene un tamaño altamente homogéneo lo que se demostró por Southern blot.
4. Los elementos se extienden entre el género *Anopheles* de manera horizontal, lo que se dedujo a través de la comparación de la identidad entre las secuencias.

REFERENCES

- Adams, D. S., Eickbush, T. H., Herrera, R. J. and Lizardi, P. M., A highly reiterated family of transcribed oligo(A)-terminated, interspersed DNA elements in the genome of *Bombyx mori*. *J Mol Biol*, 1986, 187, 465-478.
- Aukerman M. J. and Schmidt, R. J., A 168 bp derivative of Suppressor-mutator/Enhancer is responsible for the maize o2-23 mutation. *Plant Mol Biol*, 1993, 21(2):355-62.
- Barsh, G. S., Seeburg, P. H. and Gelinas, R. E., The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus, *Nucl Acids Res.* 1983, 11, 3939-3958.
- Berg, E. and Howe, M. M., *Mobile DNA*, American Society for Microbiology, Washington, DC. 1989.
- Besansky, N. J., Paskewitz, S. M., Mills Hamm, D. and Collins, F. H., Distinct families of site-specific retrotransposons occupy identical positions in the rRNA genes of *A. gambiae*. *Mol Cell Biol*. 1992, 12, 5102-5110.
- Besansky, N. J., Bedell, J. A. and Mukabayire, O., Q: a new retrotransposon from the mosquito *A. gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 1994, 3(1), 49-56.
- Besansky, N. J., Evolution of the T1 retroposon family in the *A. gambiae* complex. *Mol Biol Evol*, 1990, 7, 229-246.
- Besansky, N. J., A retrotransposable element from the mosquito *A. gambiae*. *Mol Cell Biol*, 1990, 10, 863-871.
- Besansky, N. J. and Powell, J. R., Reassociation kinetics of *A. gambiae* (Diptera: Culicidae) DNA. *J Med Entomol*, 1992, 29: 125-128.
- Bigot, Y., Hamelin, M. H., Capy, P. and Periquet, G., Mariner-like elements in hymenopteran species: insertion site and distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, 3408-3412.
- Bingham, P. M., Kidwell, M. G. and Rubin, G. M., The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The role of the P element, A P strain-specific transposon family, *Cell*, 1982, 29, 995-1004.
- Black, W.C. and Rai, K. S., Genome evolution in mosquitos: Intraspecific and interspecific variation in repetitive DNA amounts and organization. *Genetical Research*, 1988, 51:185-196.

Blackman, R. K., Koehler, M. M. D., Grimaila, R. and Gelbart, W. M., Identification of a fully-functional hobo transposable element and its use for germ-line transformation of *Drosophila*. EMBO J. 1989, 8, 211-217.

Boeke, J. D., Grafinkel, D. J., Styles, C. A. and Fink, G. R. Ty elements transpose through an RNA intermediate, Cell, 1985, 40, 491-500.

Brian, C., P. Sniegowski and W. Stephan. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes, Nature, 1994, Vol, 371, 215-220.

Brierley, H. L. and Potter, S. S., Distinct characteristics of loop sequences of two *Drosophila* foldback transposable elements, Nucl Acids Res. 1985, 13, 485-500.

Brown T. A., Lab FAX. Bios Scientific Publishers, 1991, Blackwell Scientific Publications.

Bryan, G., Garza, D. and Hartl, D. L., Insertion and excision of the transposable element mariner in *Drosophila*, Genetics, 1990, 125, 103-114.

Calos, M. P. and Miller, J. H., Transposable elements, Cell, 1980, 20, 579-595.

Calvi, B. R., Hong, T. J., Findley, S. D. and Gelbart, W., Evidence for a common revolutionary origin inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, Activator and Tam3. Cell, 1991, 66(3), 465-471.

Capy, P., David, J. R. and Hartl, D. L., Evolution of the transposable element mariner in the *Drosophila melanogaster* species group. Genetica. 1992; 86: 37-46.

Chalmers, R. M. and Kleckne, N., Tn10/IS10 transposase purification, activation, and in vitro reaction, J. Biol Chem, 1994, 269(11), 8029-8035.

Coupland, G., Baker, B., Schell, J. and Starlinger, P., Characterization of the maize transposable element Ac by internal deletions. EMBO J. 1988, 7, 3653-3659.

Craig, N. L., Tn7: a target site-specific transposon, Mol Microbiol, 1991, 5(1), 2569-2573.

Danics, S. B., Chovnick, A. and Boussy, I. A., Distribution of hobo transposable elements in the genus *Drosophila*. Mol Biol Evol. 1990, 7, 589-606.

Dongmei D. L., Malka, H. K., John, L. J. and Eickbush, T. H., Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition, *Cell*, 1993, 72, 595-605.

Eibel, H. and Philippsen, P., Preferential integration of yeast transposable element Ty into a promoter region. *Nature*, 1984, 307, 386-388.

Eichinger, D. J. and Boeke, J. D., A specific terminal structure is required for Ty1 transposition, *Gene Dev.* 1990, 4, 324-330.

Elder, R. T., Loh, E. Y. and Davis, R. W. RNA from the yeast transposable element Ty1 has both ends in the direct repeats, a structure similar to retroviral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983, 80, 2432-2436.

Engels, W. R. and Preston, C. R., Formation of chromosome rearrangements by P factors in *Drosophila*. *Genetics.* 1984, 107, 657-678.

Evans, J. P. and Palmiter, R. D., Retrotransposition of a mouse L1 element. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, 88, 8792-8795.

Fedoroff, N., About maize transposable elements and development, *Cell*, 1989, 56, 181-191.

Fedoroff, N., Wessler, S. and Shure, M., Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. *Cell.* 1983, 35, 235-242.

Fernandez, J. G., Marfany G., Baguna, J. and Salo E, Infiltration of mariner elements, *Nature*, 1993, 364: 109.

Fink, G., Farabaugh, P., Roeder, G. and Chaleff, D. Transposable elements (Ty) in yeast. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 1980, 445, 575-580.

Finnegan, D. J., Transposable element and DNA transposition in eukaryotes, *Curr Biol.* 1990, 2:471-477.

Finnegan, D. J., Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.* 1989, 5, 103-107.

fmol™ DNA sequencing System, Promega Corporation.

French N. S. and Norton J. D., Analysis of retrotransposon families in genomic DNA by two-dimensional restriction mapping: detection of VL30 insertions in mouse thymic lymphoma. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1219(2):484-92.

Furano, A. V., Rohb, S. M. and Rohb, F. T., The structure of the regulatory region of the rat L1 (LIRn, long interspersed repeated) DNA family of transposable elements, *Nucl Acids Res.* 1988, 16, 9215-9231.

Garcia J. F., Marfany, G., Baguña, J. and Salo, E., Infiltration of mariner elements, *Nature*, 1993, 364, 109-110.

Garza, D., Medhora, M., Koga, A. and Hartl, D. L., Introduction of the transposable element mariner into the germline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1991, 128, 303-310

Goff, S. P., Genetics of retroviral integration, *Annu Rev Genet*, 1992, 26, 527-544.

Hakim, I., Amarglio N., Grossman Z., Simoni-Brok F., Ohno S. and Rechavi G., The genome of the THE I human transposable repetitive elements is composed of a basic motif homologous to an ancestral immunoglobulin gene sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(17):7967-7969.

Hardeman K. J. and Chandler V. L., Two maize genes are each targeted predominantly by distinct classes of Mu elements, *Genetics*, 1993, 135(4), 1141-1150.

Hartley J. L. and Gregory T. J. Cloning multiple copies of a DNA segment, *Gene*, 1981, 13, 347-350.

Hehl, R., Nacken, W. K. F., Krause, A., Saedler, H. and Sommer, H., Structural analysis of Tam3, a transposable element from *Antirrhinum majus*, reveals homologies to the Ac element from maize. *Plant Mol Biol*, 1991, 16, 369-371.

Hiroaki, I., Hiroshi N. and Hirofo O., High Efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*, 1990, 96, 23-28.

Hirsch, H. H., Nair, A. P. and Moroni, C., Suppressible and nonsuppressible autocrine mast cell tumors are distinguished by insertion of an endogenous retroviral element (IAP) into the interleukin 3 gene, *J Exp Med*, 1993, 178(2):403-11.

Ivanov, V. A., Melnikov, A. A., Siunov, A. V., Fodor, I. I. and Ityin, Y. V. Authentic reverse transcriptase is coded by jockey, a mobile *Drosophila* element related to mammalian LINES. *EMBO J.* 1991, 10, 2489-2495.

- Jacobson, J. W., Medhora, M. M. and Hartl, D. L., Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83, 8684-8688.
- Jakubczak, J. L., Xiong, Y. and Eickbush, T. H. Type I (R1) and type II (R2) ribosomal DNA insertions of *Drosophila melanogaster* are retrotransposable elements closely related to those of *Bombyx mori*. J Mol Biol. 1990, 212, 37-52.
- Jakubczak, J. L., Burke, W. D. and Eickbush, T. H., Retrotransposable elements R1 and R2 interrupt the rRNA genes of most insects. Proc Natl Acad Sci USA. 1991, 88. 3295-3299.
- Jeyaprakash A. and Hoy, M. A., Complete sequence of a mariner transposable element from the predatory mite *Metaseiulus occidentalis* isolated by an inverse PCR approach. Insect Mol Biol. 1995, 4(1): 31-39.
- Jin Y. K. and Bennetzen J. L., Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the Bsl retroelement of maize. Plant Cell, 1994, 6(8):1177-1186.
- Karess, R. E. and Rubin, G. M., Analysis of P element functions in *Drosophila*. Cell. 1984, 38, 135-146.
- Kaufman, P. D. and Rio, D. C., P element transposition in vitro proceeds by a cut-and-paste mechanism and uses GTP as a cofactor, Cell, 1992, 69, 27-31.
- Kimmel, B. E., Ole-MoiYoi, O. K. and Young, J. R., Ingi, a 5.2kb dispersed sequence element from *Trypanosoma brucei* that carries half a smaller mobile element at their end, has homology with mammalian LINES. Mol Cell Biol, 1987, 7, 1465-1475.
- Kleckner, N. Transposable elements in procaryotes, Cell, 1977, 11, 713-721.
- Kleckner, N. Transposable elements in prokaryotes, Ann Rev Genet. 1981, 15, 341-404.
- Kunze, R., Stochaj, U., Laufs, J. and Starlinger, P., Transcription of transposable element Activator (Ac) of *Zea mays* L. EMBO J. 1987, 6, 1555-1563.
- Kumar, A. and Rai, K. S., Intraspecific variation in nuclear DNA content among world populations of a mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). Theoretical and Applied Genetics, 1990, 79: 748-752.
- Lidholm, D. A., Gudmundsson, G. H. and Boman, G. H., A highly repetitive, mariner-like element in the genome of *Hyalophora cecropia*, J Biol Chem, 1991, 266, 11518-11521.

- Lidholm, D. A., Lohe, A. R. and Hartl, D. L., The transposable element mariner mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 1993, 134, 859-868.
- Macda, N. and Smithies, O., The evolution of multigene families: human haptoglobin genes. *Annu Rev Genet.* 1986, 20, 81-108.
- Margaret, M. S., Hudson, S. J., Everson, B. and Morgan, P. G., Identification of a mariner-like repetitive sequence in *C. elegans*, *Nucl Acids Res*, 1994, 22(9), 1719-1723
- Maruyama, K. and Hartl, D. L., Evidence for interspecific transfer of the transposable element mariner between *Drosophila* and *Zaprionus*, *J Mol Evol*, 1991, 33, 514-524.
- Maruyama, K. and Hartl, D. L. Evolution of the transposable element mariner in *Drosophila* species, *Genetics*, 1991, 128, 319-329.
- McCarrey, J. R. and Thomas, K., Human testis-specific PGK gene lacks introns and possesses characteristics of a processed gene. *Nature*, 1987, 326, 501-505.
- McPherson M. J., Quirke P. and Taylor, G. R., PCR a practical approach, The practical approach series, IRL Press, 1992.
- Medhora, M. M., MacPeck, A. H. and Hartl, D. L. Excision of the *Drosophila* transposable element mariner, identification and characterization of the Mos factor. *EMBO J.* 1988, 7, 2185-2189.
- Medhora, M. M., Maruyama, K. and Hartl, D. L., Molecular and functional analysis of the mariner mutator element Mos1 in *Drosophila*. *Genetics*, 1991, 128, 311-318.
- Minchiotti, G. and Di Nocera, P. P., Convergent transcription initiates from oppositely oriented promoters within the 5' end region of *Drosophila melanogaster* F elements. *Mol Cell Biol.* 1991, 11, 5171-5180.
- Mizrokhi, L. J., Georgieva, S. G. and Iiyin, Y. V., jockey, a mobile *Drosophila* element similar to mammalian LINES, is transcribed from the internal promoter by RNA polymerase II, *Cell*, 1988, 54, 685-691.
- Mizuuchi, K., Transpositional recombination: Mechanistic insights from studies of Mu and other elements, *Annu Rev Biochem.* 1992, 61, 1011-1051.
- Mizuuchi, M. Baker, T. A. and Mizuuchi, K., Assembly of the active form of the transposase-Mu DNA complex: A critical control point in Mu transposition, *Cell*, 1992, 70, 303-311.

Mount, S. M. and Rubin, G. M. Complete nucleotide sequence of the *Drosophila* transposable element copia: homology between copia and retroviral proteins. *Mol Cell Biol*, 1985, 5, 1630-1638.

Muller-Neumann, M., Yoder, J. I. and Starlinger, P. The DNA sequence of the transposable element Ac of *Zea mays* L. *Mol Gen Genet*. 1984, 198, 19-24.

Nancy L. Craig. Unity in transposition reactions, *Science*, 1995, 270, 253-254.

NEW random primer extension labeling system, NEP-103, Biotechnology Systems NEW Research Products, DU PONT.

O'Hare, K. and Rubin, G. M. Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell*, 1983, 34, 25-35.

Oosumi, T. and W. R. Belknap, and B. Garlick, Mariner transposons in humans, *Nature*, 1995, 378, 672.

Pelisson, A., Finnegan, D. J. and Bucheton, A. Evidence for retrotransposition of the I factor, a LINE element of *Drosophila melanogaster*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88, 4907-4910.

Plasmid SELECT-250[®], 5 Prime-> 3 Prime, Inc.

Presnall, J. K. and Hoy, M. A., Stable genetic transformation of a beneficial arthropod, *Metaseiulus occidentalis* (Acan: Phytoseiidae), by a microinjection technique. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89, 7732-7736.

Rai, K. S., Pashley, D. P. and Munstermann, L. E., Genetics of Speciation in Aedine mosquitos. In: *Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors* (W. M. Steiner, W. J. Tabachnick, K. S. Rai and S. Narang. editors) Stipes Publishing Co., 1982, 84-129.

Rao, P.N. and Rai, K. S., Inter and intraspecific variation in nuclear DNA contents in *Aedes* mosquitos. *Heredity*, 1987, 59: 253-258.

Rao P.N. and Rai, K. S., Comparative karyotypes and chromosomal evolution in some genera of Nematocerous (Diptera: Nematocera) families. *Ann Entomol Soc Amer*, 1987, 80: 321-332.

Río, D. C., Laski, F. A. and Rubin, G. M. Identification and immunochemical analysis of biologically active *Drosophila* P element transposase. *Cell*, 1986, 44, 21-32.

Robertson, H. M. The mariner transposable element is widespread in insects. *Nature*, 1993, 362, 241-245.

Robertson, H. M. and Macleod E. G. Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the *Mediterranean fruit fly* and related arthropods. *Insect Mol Biol*, 1993, 2(3), 125-139.

Robertson, H. M., Lampe, D.J. and Macleod, F.G., A mariner transposable element from a lacewing, *Nucl Acids Res*, 1992, 20, 6409-6414.

Roeder, G. S. and Fink, G. R. in *Mobile genetic elements* (Shapiro, J., ed), Academic press, 1983, 299-328.

Rosenzweig, B., Liao, L. W. and Hirsh, D., Sequence of the *C. elegans* transposable element Tc1. *Nucl Acids Res*. 1983, 11, 4201-4209.

Ruan, K., and Emmons, S. W., Precise and imprecise somatic excision of the transposon Tc1 in the nematode *C. elegans*. *Nucl Acids Res*. 1987, 15, 6875-6881.

Rubin, G. M. and Spradling, A. C., Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 1982, 218, 348-353.

Rubin, G. M., and Spradling, A. C. Vectors for P element mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucl Acids Res*. 1981, 11, 6341-6351.

Rubin, G. M., Kidwell, M. G. and Ringham, P. M., The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the nature of induced mutations. *Cell*, 1982, 29, 987-994.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J. and Higuchi, R., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74, 5463-5468.

Schukkink, R. F. and Plasterk, R. H. A., TcA, the putative transposase of the *C. elegans* Tc1 transposon, has an N-terminal DNA binding domain. *Nucl Acids Res*. 1990, 18, 895-900.

Schwarz, S. Z., Leclercq, L., Gobel, E. and Saedler, H., *Cin4*, an insert altering the structure of the *A1* gene in *Zea mays*, exhibits properties of non-viral retrotransposons. *EMBO J.* 1987, 6, 3873-3880.

Sedensky, M. M., Hudson, S. J., Everson, B. and Morgan, P. G., Identification of a mariner-like repetitive sequence in *C. elegans*, *Nucl Acids Res.* 1994, 22, 1719-1723.

Shiba, T. and Saigo, K., Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element copia in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 1983, 302, 119-124.

Sommer, H., Carpenter, R., Harrison, B. J., and Seadler, H., The transposable element *Tam3* of *Antirrhinum majus* generates a novel type of sequence alteration upon excision. *Mol Gen Genet* 1985, 199, 225-231.

Southern, E., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol*, 1975, 98, 503-508.

Spradling, A. C. and Rubin, G. M., Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, 1982, 218, 347.

Streck, R. D., MacGaffey, J. E. and Beckendorf, S. K. The structure of hoho transposable elements and their insertion sites, *EMBO J.* 1986, 5, 3615-3623.

Suan M. Paskewitz and Frank H. Collins, Site-specific ribosomal DNA insertion elements in *A. gambiae* and *A. arabiensis*: nucleotide sequence of gene-element boundaries. *Nucl Acids Res.* 1989, 17, 8125-8133.

Truett, M. A., Jones, R. S. and Potter, S. S., Unusual structure of the FB family of transposable elements in *Drosophila*. *Cell*, 1981, 24, 753-763.

Van Luenen, H. G., Colloms S. D. and Plasterk, R., H., The mechanism of transposition of *Tc3* in *C. elegans*. *Cell*, 1994, 79, 293-301.

Vicki M., Jonathan, O., Carlson, B. R. M. and Barry, J. B., Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. *Am J Trop Med Hyg*, 1988, 39(5), 502-510.

Vos, J. C. and Plasterk, R., *Tc1* transposase of *Ceanorhabditis elegans* is an endonuclease with a bipartite DNA binding domain, *EMBO J.*, 1994, 13, 6125-6132.

Warren, A. M. and J. M. Crampton. Mariner: its prospects as a DNA vector for the genetic manipulation of medically important insects, *Parasitology Today*, 1994, 10(2), 58-63.

Wizard™ Maxipreps DNA Purification System, No.139, Promega.

World Health Organization, Prospects for malaria control by genetic manipulation of its vectors. TDR/BCV/MAL-ENT/91.3. WHO., Geneva, 1991.

Xiong, Y. and Eickbush, T. H., Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences, *EMBO J.* 1990, 9: 3353-3362.

Xiong, Y. and Eickbush, T. H., The site specific ribosomal DNA insertion element R1Bm belongs to a class of non-long-terminal repeat retrotransposons. *Mol Cell Biol*, 1988, 8, 114-123.

Zheng, L., Collins, F. H., Kumar, V. and Kafatos, F. C., A detailed genetic map for the X chromosome of the malaria vector *A. gambiae*. *Science*, 1993, 261, 605-608.