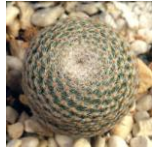


Desarrollo de *primers* para regiones microsatélites mediante la creación de una librería genómica enriquecida



Secuencias pequeñas que están repetidas muchas veces:

Microsatélites (SSR's) Dos o tres nucleotidos repetidos

GCTACGATT.....ACACACACACACACACAC.....GCAGCTAC

Tienen altas tasas de mutación

Son regiones que no codifican y por lo tanto evolucionan rápidamente.

Se asumen que son neutrales, pero no siempre es así. Trinucleotidos son equivalentes a codones

Microsatélites

Ventajas:

- * Tienen alta variabilidad incluso en especies en las cuales no hay variación en aloenzimas
- * Detectan genotipos co-dominantes
- * Usan PCR lo que permite su uso tanto en organismos vivos como extintos
- * Permiten determinar ADN "fingerprint"
- * Permiten resolver preguntas a nivel de especie

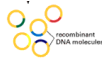
Microsatélites

Desventajas:

- * Hay que desarrollar nuevos primers para cada especie
- * No existen primers universales como los presentes en otras regiones como ITS1, ITS2
- * Existe la posibilidad de tener "null alleles" como resultado de mutaciones en la region del primer

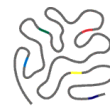
GCTACGATT.....ACACACACACACACACAC.....GCAGCTAC

Microsatélites



Glenn T.C y Schable M. 2005. Isolating Microsatellite DNA Loci. *Methods in Enzymology* 395: 202-223

RsaI
GT^AAC



BstUI
CG^ACG

G T A C



C A T G



G T

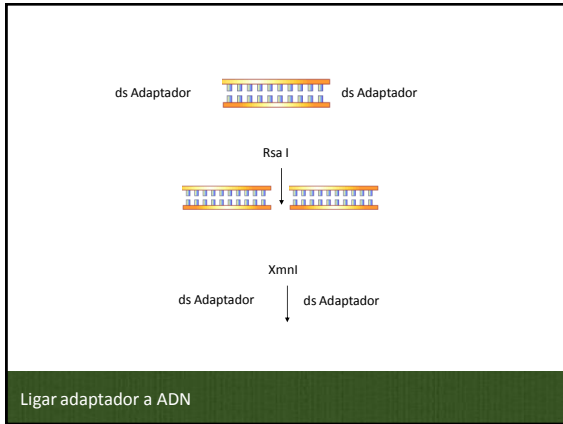
A C



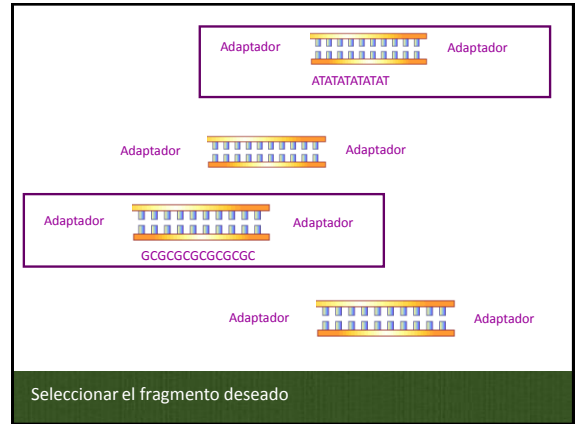
C A

T G

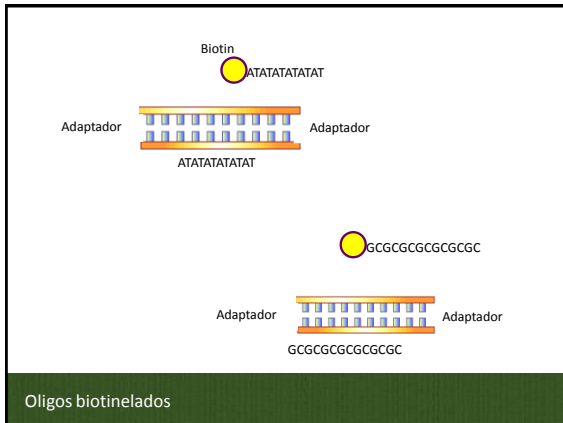
Digestión del ADN



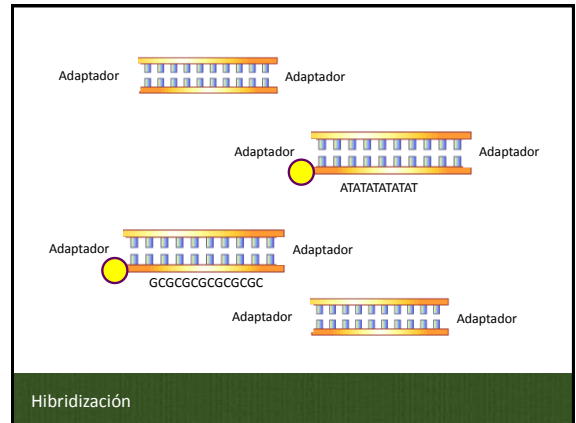
Ligar adaptador a ADN



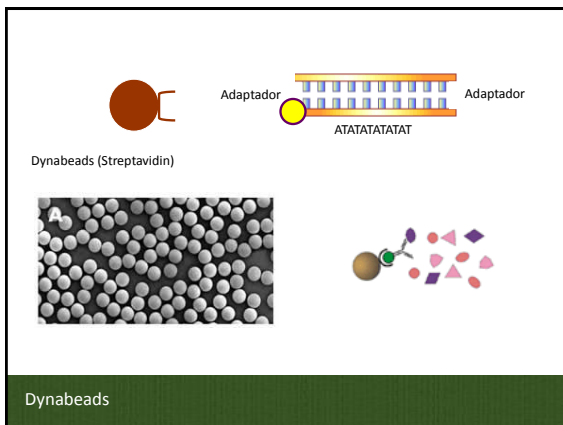
Seleccionar el fragmento deseado



Oligos biotinelados



Hibridación



Dynabeads

PCR

Usando el F adaptador (SNX24F) como primer

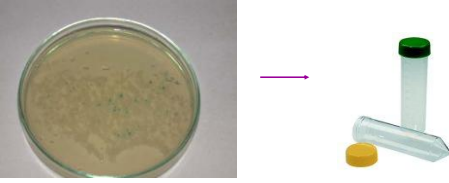
Insertar el DNA en plásmidos

Insertar un fragmento por vector tantas veces como sea posible

TOPO TA Cloning kit (Invitrogen)

PCR e inserción en plásmidos

X-Gal / LB medio



Colonias en blanco son positivas

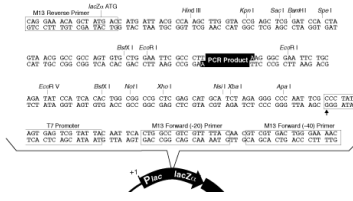
Una vez que las colonias "buenas" han sido seleccionadas:

* Se incuban en LB por 12 horas a 37 C

Transformación

* Aislar en plásmido (Quiagen Kit)

* Digerirlo con EcoR1

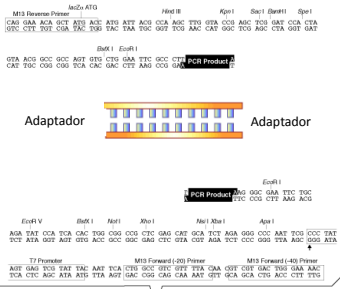


Microsatélites


Correr un gel y seleccionar las colonias que sean diferentes para secuenciación




Microsatélites



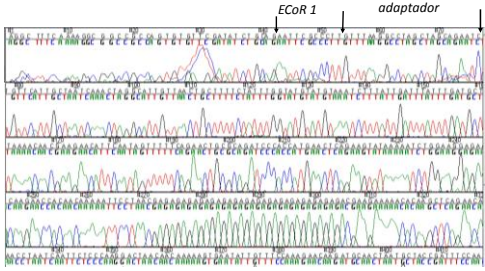
Adaptador



Adaptador

Microsatélites

(GA)₁₇



Microsatélites

*Una vez que se tienen las secuencias, verificar que el microsatélite este presente, remover secuencias externas y solo tener la de la especie que nos interesa

```

CCTTTCATGCAATATCTATGACTTATTACATAGGGGATGAGTTGATCACC
ACTTCAAAGGTTCCAGAAGTAGAAGTCAATTTGGGAACCAAGA
GAAAGCCCTTGTTGGCAGCTGGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TTTCTTCTCTGGAACCTTTATGCAAGATCTACCGCTGTTTCCATAGGG
GTTGAGTTGATCACCCTTCAAAAATCCTGAAAGTGGGAAGATCTGATC
ACAACCTCAAAGACTCTACAGAGACAGCAATCGAAGAGCTGAA
CACAGCTTCAAAGAACCTAAAAGAGAGACCAGAAGTAGAGGATCTGA
TCACCACATCAAAGATCCAGAAGTGGAAAGCTAGTCAACACTTCAA
AGAGTTCTGAAACAGAGACTCAATTTGGAGGAGCTGAAACCAACTT
GAAGAGTCTGGAAAGAACCAAAGTGGTAGAGCTGATC
    
```

Diseñar primers

¿Como diseñar primers?

- ** deben de tener temperaturas de annealing similares (55-80 C)
- ** Deben ser al menos de 17 pares de bases de largo
- ** No deben de ser complementarios
- ** 50-60% de G y C
- ** Tener G o C en el extremo 3`

Diseñar primers

* Primer-3

OLIGO start len tm gc% 3' seq
 LEFT PRIMER 95 20 59.33 50.00 AGAGAAAGCCCTTGTGTTGG
 RIGHT PRIMER 294 20 59.95 50.00 TCAGCTCTCCGATTCGGT

```

1  CCTTTCAGTGCATATCTATGACTATTTACAGATAGGGGATGACTGGATCACCACTCAAAAGG
61  TTCCAGAAAGTAGAAGAGTCAATTTGGAGAACCAAGAGAAGAGCCCTTGTGTGGAGCTGT
    39393939393939393939
121  GTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
    *****
181  CTACCGCTGTTCCATAGGGGTGAGTGTACCACTCTCAAAATCCTCGAATGGGGAG
241  ATCTGATCACACACTTAAAGAGCTCTACACAGAGCCAGAGATCGAAGAGCTGAAACACAG
    CCCCCCCCCCCCCCCCCC
301  CTTCAAGAACCTTAAAGAGAGCCACAGATGAGAGATCTGATCACACACTCCAGAGATCG
361  CAGAGGTGGAGAGAGCTAGTCAACTTCAAGAGTCTTCAAGAGAGACTACAAATGGGAG
421  GAGTGAACACCACTTCCAGAGTCTTGAAGAAAGACAAAGTGGTAGAGCTGATC
    
```

Diseñar primers



- Optimizar el PCR
 - Determinar temperatura ideal del primer
 - Determinar tamaño del fragmento
 - Decidir con que colores marcaremos los primers para el multiplex
- 4°C (G + C) + 2°C(A + T) - 5°C= Temperatura ideal

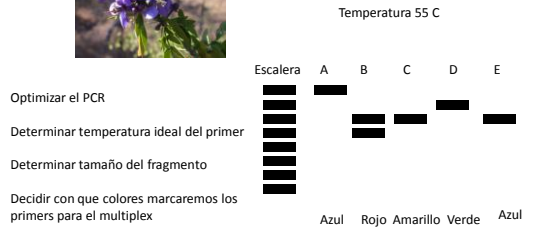


Table 1 Characterization of 18 microsatellite primers for *Leslia speciosa* isolated through enrichment. Listed are locus name, sequences for forward (F) and reverse (R) primers, repeat motif (interrupted microsatellites are indicated by a (.) between repeats, size range, annealing temperature when run individually and multiplexed (T_a), fluorescent label for multiplexing (Label), number of alleles (A), overall means of observed (H_o) and expected (H_e) measures of heterozygosity, and GenBank Accession number.

Locus	Forward (F) primer	Reverse (R) primer	Repeat motif	Size range (bp)	T _a (°C)	Label	A	H _o	H _e	GenBank Accession #
Locus-1	F: AAGAGAAAGCCCTTGTGTTGG R: TCAGCTCTCTCCGATTCGGT	(CTC)CCC(CTC)	350-390	59.33	6-FAM	16	0.78	0.84	EF49H20	
Locus-2	F: GAGAGAAAGCCCTTGTGTTGG R: AATGTTGGAAATGTTGATGCA	(GAA)G	182-224	59.95	6-FAM	7	0.85	0.85	EF49H21	
Locus-3	F: GCTTCAAGAACCTTAAAGAGAG R: AAGAGAAAGCCCTTGTGTTGG	(AGG)G	224-265	56.87	7-BOD	3	0.58	0.77	EF49H22	
Locus-4	F: TCTTGAATGGTGTGGAGAGG R: TTAGAGCCCAATCTACTCTC	(TCA)G	378	53.03	6-FAM	1	0.00	0.00	EF49H23	
Locus-5	F: GCATCTGTTGAATGGTGTGG R: TTTAAGGATCACTACTCTTG	(GAA)G	176-189	53.03	7-BOD	4	0.51	0.65	EF49H24	
Locus-6	F: CCGACAGACCCCTTGAAAGTA R: ATGATTGGGTTAAGGAAAG	(GAA)G	182-203	57.87	7-BOD	4	0.54	0.50	EF49H25	
Locus-7	F: GAGAGCCCTTGTGTTGGAGAG R: AAAAGAAAGCCCTTGTGTTGG	(CTT)G	176-181	54.03	6-FAM	3	0.33	0.38	EF49H26	
Locus-8	F: ATGATTGGGTTAAGGAAAG R: GCGTCTCTCTCCGATTCGGT	(TCA)G	177-189	53.03	7-BOD	3	0.00	0.12	EF49H27	