

ANEXO 1: Secuencias de primers

Nespas

Nombre primer	Secuencia dirección 5'→3'
604	Forward GTAATTTTATAGGGTTTTATTG
605	Reverse ATCCATTCTCTTAAATACTCACC
606	Forward GAGAGGATTAGTGGAGGTATTTTT
607	Reverse ACTCACCTCTAACTCTACAAAAAAT
608	Forward AGGGTTTTATTGTTTTATTTTTTTT
609	Reverse AAATATACCTACCTTCAAACCACTAC
638 (607+M13)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACTCACCTCTAACTCTACAAAAAAT
669	Forward GAGTTTTAGATTTTAGAG
670 (606-Biot.)	Biot-GAGAGGATTAGTGGAGGTATTTTT

Chd2

Nombre primer	Secuencia dirección 5'→3'
610	Forward TTTATAGAGGAAGTAGTAGA
611	Reverse ACTCTAATAATAAAAATAAAAAAC
612	Forward GTTTATATAGTTAATTAGTATT
613	Reverse TCTTAATACAAATCCAACCTC
639 (611+M13)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACTCTAATAATAAAAATAAAAAAC
671 (611-Biot.)	Biot-ACTCTAATAATAAAAATAAAAAAC

PisD

Nombre primer	Secuencia dirección 5'→3'
616	Forward TTTTATAAAAGGTTGATTGT
617	Reverse CAAAACCCTAATATTTAAAACC
636	Forward GGAGATGTAGTAGTAAAAAGAAA
637	Reverse CAAATAATATACCTTCCACCTA
667 (617+M13)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGCAAAACCCTAATATTTAAAACC

Ly6c1

Nombre primer	Secuencia dirección 5'→3'
640	Forward GTATAAGGAAAAAGTAGGAGAAA
641	Reverse ACCAACTAATATCAACAAAAC
642	Forward TTGAAATAATAGGTTATATGAAGGTTAGTT
643	Reverse ATCTTTTATCCAAACACAAAAAAA
668 (642+M13)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGTTGAAATAATAGGTTATATGAAGGTTA GTT

ANEXO 2: Condiciones de PCR para la amplificación de dianas genómicas

Nespas

PCR

	Concentración []	Volumen μ l
DNA		2
<i>604</i>	10 μ M	2
<i>605</i>	10 μ M	2
Buffer*	10X	5
MgCl₂	50mM	1
dNTPs	5mM	2
Taq Polimerasa*	5 U/ μ l	0,1
H₂Omq		34,9
		50

100°C _____ 3'

94°C _____ 30''
53°C _____ 30''
72°C _____ 30'' } 30 ciclos

72°C _____ 10'

*Sigma Aldrich Ref. D1806

Nested PCR

	Concentración []	Volumen μ l
Prod. PCR diluído 1/10		2
<i>606</i>	10 μ M	2
<i>607</i>	10 μ M	2
Buffer*	10X	5
MgCl₂	50mM	1
dNTPs	5mM	2
Taq Polimerasa*	5 U/ μ l	0,1
H₂Omq		34,9
		50

100°C _____ 3'

94°C _____ 30''
53°C _____ 30''
72°C _____ 30'' } 30 ciclos

72°C _____ 10'

*Sigma Aldrich Ref. D1806

Chd2

PCR

	Concentración []	Volumen μ l
DNA		2
610	10 μ M	2
611	10 μ M	2
Buffer*	10X	5
MgCl₂	50mM	1
dNTPs	5mM	2
Taq Polimerasa*	5 U/ μ l	0,1
H₂Omq		34,9
		50

100°C _____ 3'

94°C _____ 30''
53°C _____ 30''
72°C _____ 30'' } 40 ciclos

72°C _____ 10'

*Sigma Aldrich Ref. D1806

PisD

PCR

	Concentración []	Volumen μ l
DNA		2
<i>636</i>	10 μ M	2
<i>637</i>	10 μ M	2
Buffer*	10X	5
MgCl ₂	50mM	1
dNTPs	5mM	2
Taq Polimerasa*	5 U/ μ l	0,1
H ₂ Omq		34,9
		50

100°C _____ 3'

94°C _____ 30''
57°C _____ 30''
72°C _____ 30'' } 40 ciclos

72°C _____ 10'

*Sigma Aldrich Ref. D1806

Ly6c1

PCR

	Concentración []	Volumen μ l
DNA		2
<i>640</i>	10 μ M	2
<i>641</i>	10 μ M	2
Buffer*	10X	5
MgCl ₂	50mM	1
dNTPs	5mM	2
Taq Polimerasa*	5 U/ μ l	0,1
H ₂ Omq		34,9
		50

100°C _____ 3'

94°C _____ 30''
57°C _____ 30''
72°C _____ 30'' } 30 ciclos

72°C _____ 10'

*Sigma Aldrich Ref. D1806

Nested PCR

	Concentración []	Volumen μ l
Prod. PCR diluído 1/10		2
<i>642</i>	10 μ M	2
<i>643</i>	10 μ M	2
Buffer*	10X	5
MgCl ₂	50mM	1
dNTPs	5mM	2
Taq Polimerasa*	5 U/ μ l	0,1
H ₂ Omq		34,9
		50

100°C _____ 3'

94°C _____ 30''
57°C _____ 30''
72°C _____ 30'' } 30 ciclos

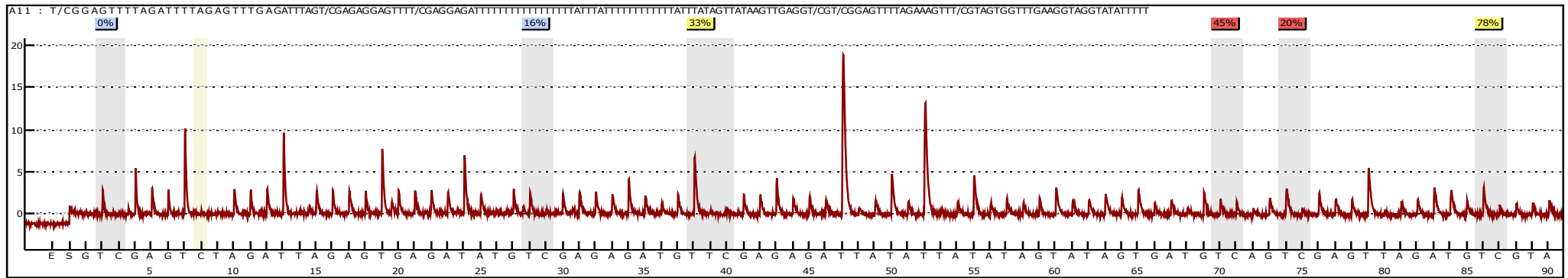
72°C _____ 10'

*Sigma Aldrich Ref. D1806

ANEXO 3: Pirogramas relacionados con el locus Nespas



A



B

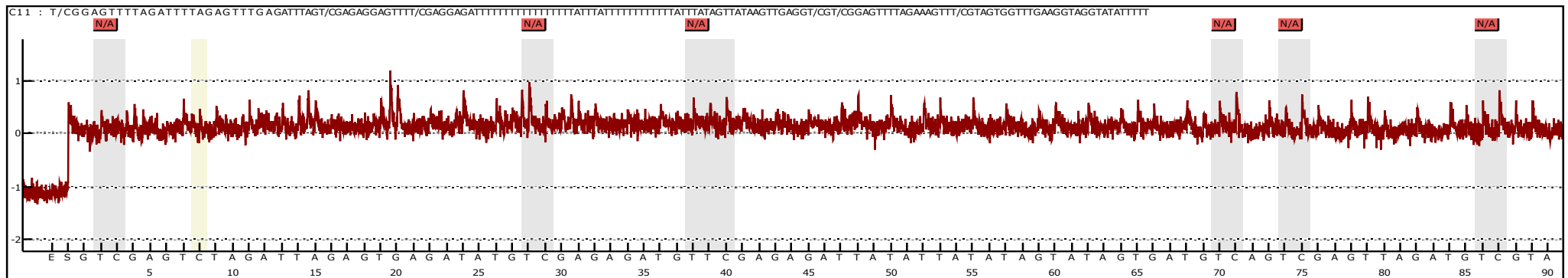
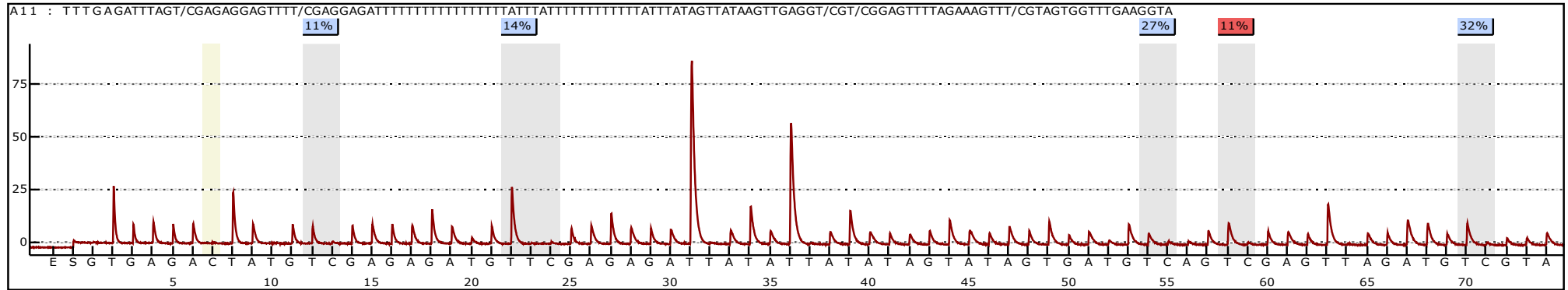


Fig1. Pirogramas. (A) Secuencia del Amplicón D utilizando el primer 606 (Fig.9A). (B) Secuencia control del Amplicón D sin primer de secuenciación. La abundancia relativa entre T/C en las posiciones indicadas en gris equivale al nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados. Porcentajes en azul son considerados fiables por el programa, en amarillo a valorar por el usuario y rojo no fiables.

A

669 → Amplicón D

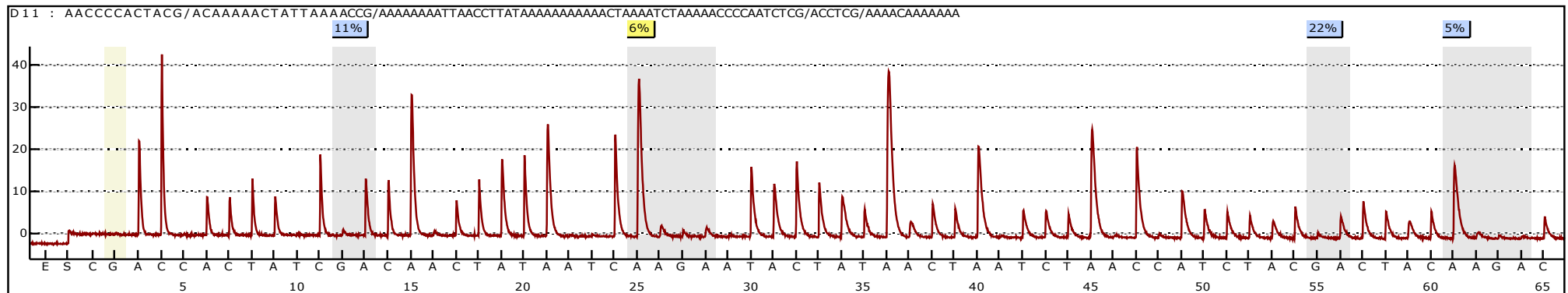


B

Amplicón B



← 607



C

Amplicón B

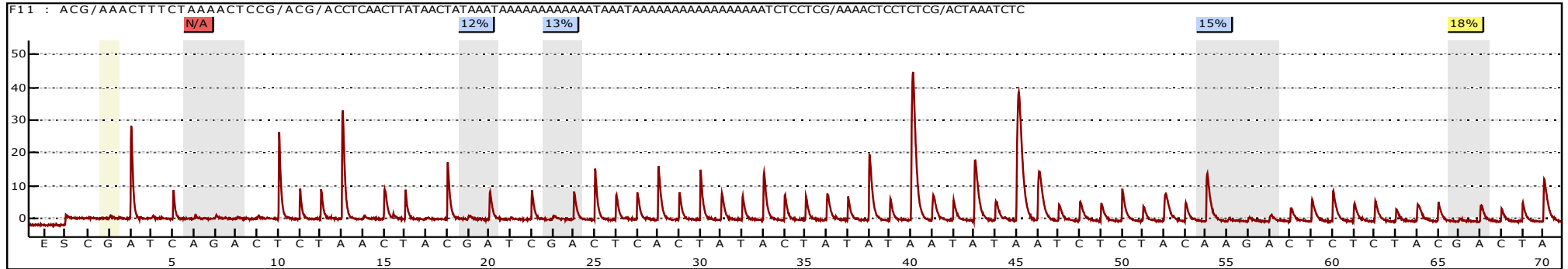
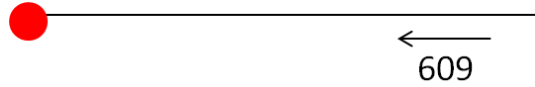
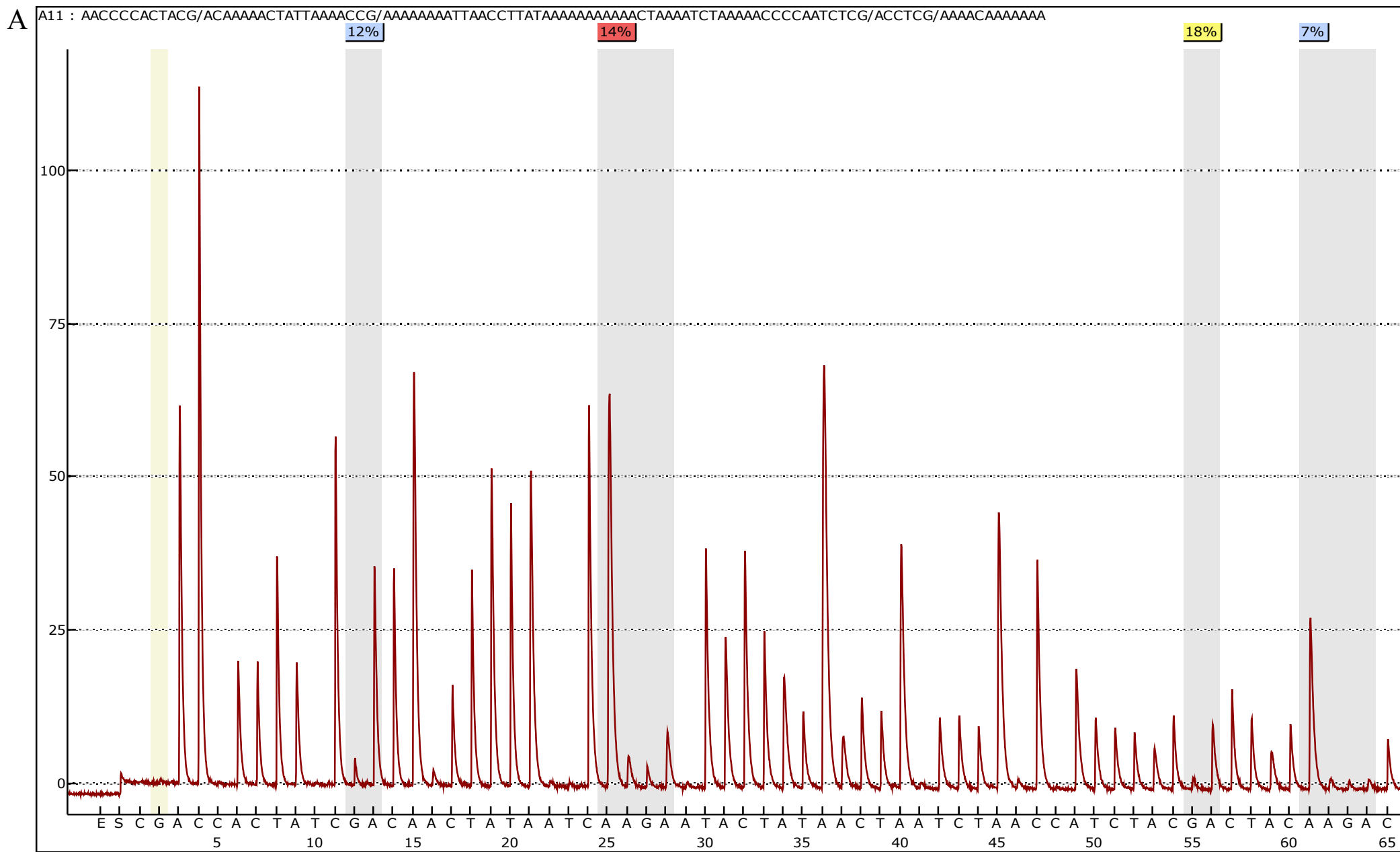
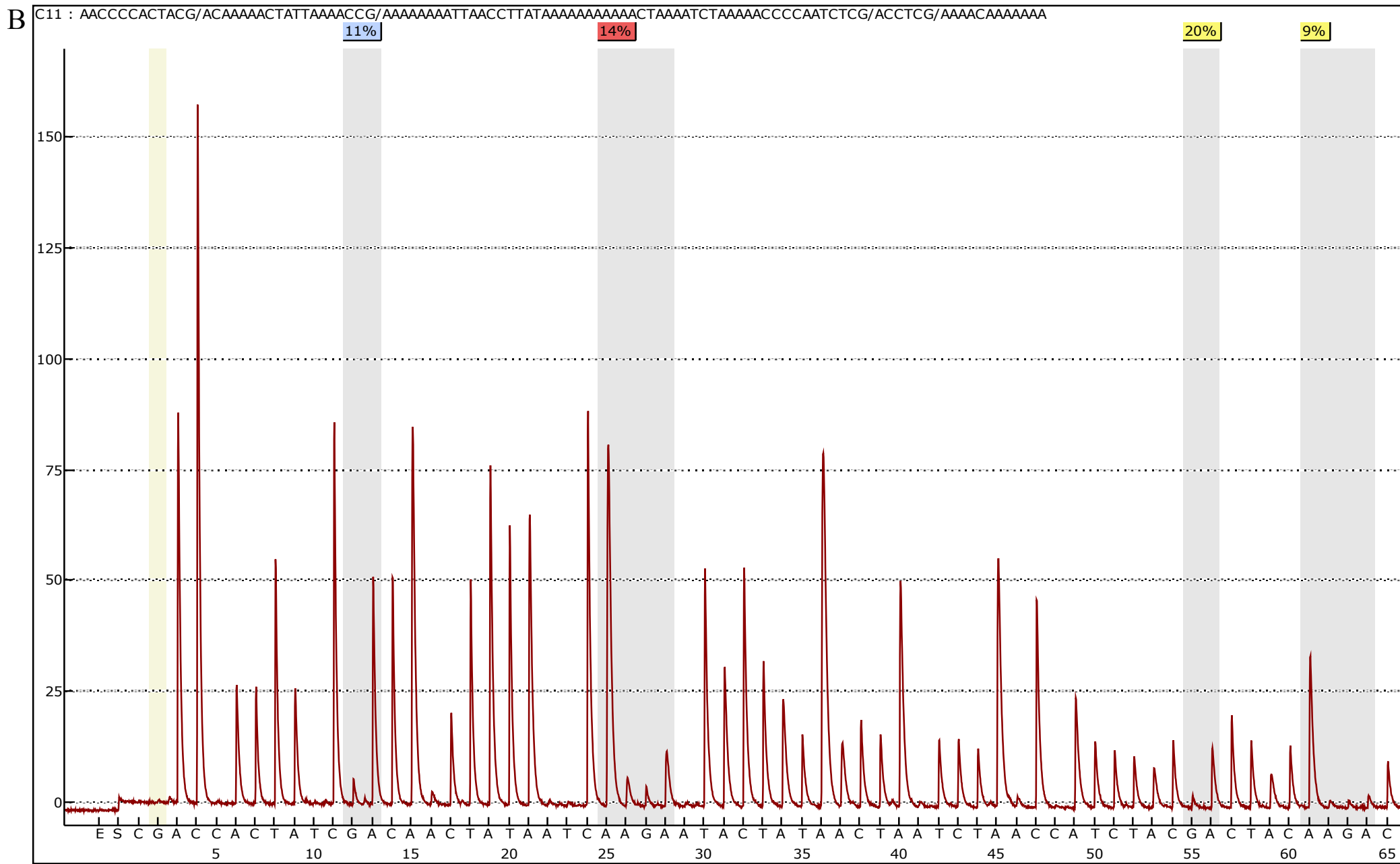


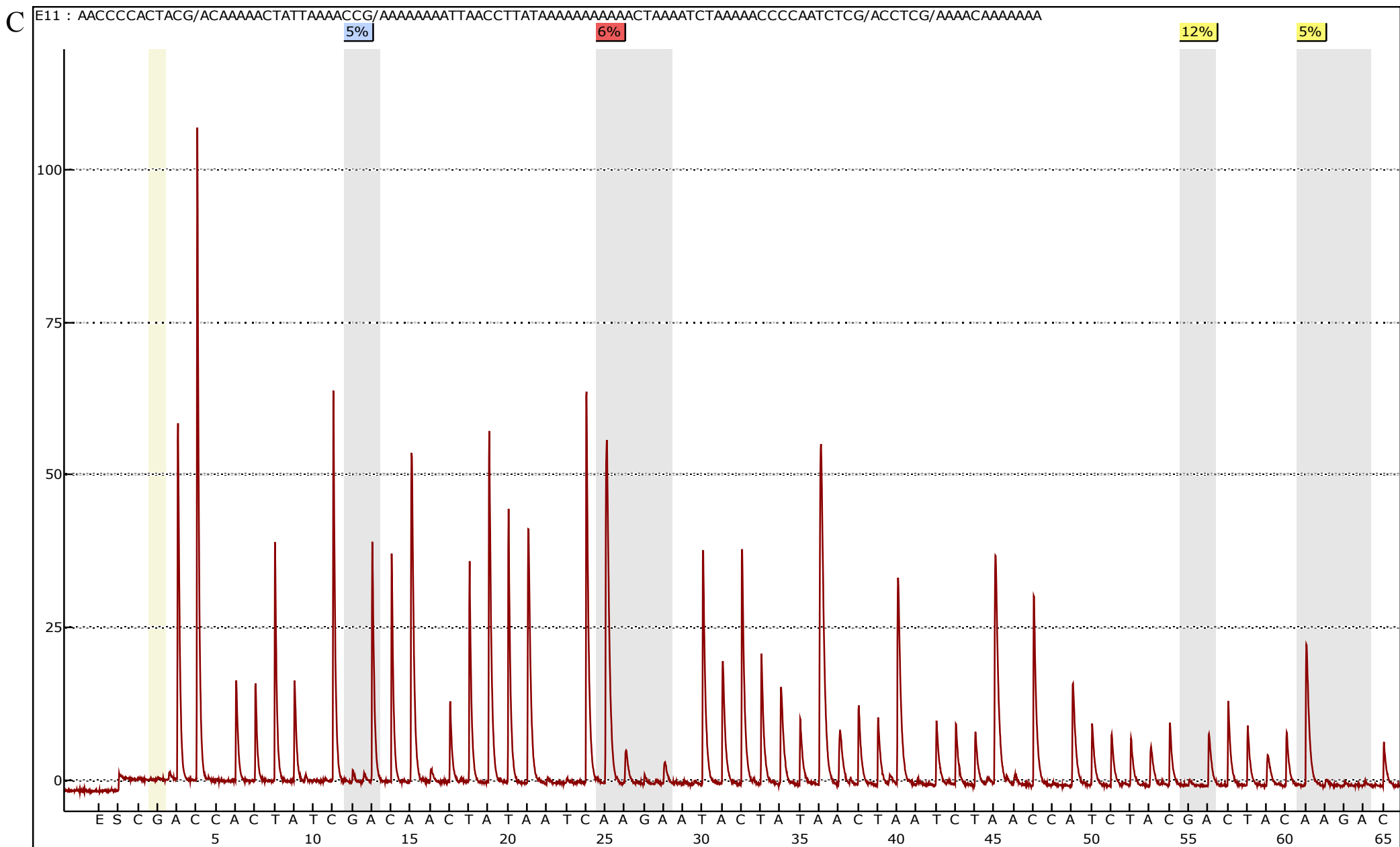
Fig2. Pirogramas resultantes los intentos de secuenciación del locus *Nespas* en el proceso de optimización. Los amplicones y primers están indicados encima de cada pirograma y del mismo modo en las figuras 9A y B del trabajo. (A) Secuencia del Amplicón D utilizando el primer de secuenciación 669 (Fig.9A). (B) Secuencia del Amplicón B utilizando el primer de secuenciación 607 (Fig.9B). (C) Secuencia del Amplicón B utilizando el primer de secuenciación 609 (Fig.9B). La abundancia relativa entre T/C ó G/A (dependiendo de la cadena secuenciada) en las posiciones indicadas en gris equivale al nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados. Porcentajes en azul son considerados fiables por el programa, en amarillo a valorar por el usuario y rojos no fiables.



(A) **Piograma.** Secuencia del amplicón B de la línea celular ES wt con el primer 607 (Fig.1, anexo 4). La abundancia relativa entre G/A en las posiciones indicadas en gris equivale al nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados. Porcentajes en azul son considerados fiables por el programa, en amarillo a valorar por el usuario y rojos no fiables.

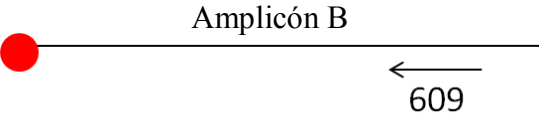


(B) Pirograma. Secuencia del amplicón B de la línea celular ES-MAR wt con el primer 609 (Fig.1, anexo5). La abundancia relativa entre G/A en las posiciones indicadas en gris equivale al nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados. Porcentajes en azul son considerados fiables por el programa, en amarillo a valorar por el usuario y rojos no fiables.



(C) **Pirograma.** Secuencia del amplicón B de la línea celular ES Rex1 $-/-$ con el primer 609 (Fig. 1, anexo5). La abundancia relativa entre G/A en las posiciones indicadas en gris equivale al nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados. Porcentajes en azul son considerados fiables por el programa, en amarillo a valorar por el usuario y rojos no fiables.

ANEXO 5: Pirogramas del locus Nespas con el primer de secuenciación 609



```

61 CGAGAGGATCAGTGGAGGCACCTCTCGGAGTCTTAGACTTCAGAGTCTGAGACTTAGCGA
  ++|||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
61 CGAGAGGATTAGTGGAGGTATTTTTCGGAGTTTTAGATTTAGAGTTTGAGATTTAGCGA
  606

121 GAGGAGCCTCGAGGAGACTCCTTCTCTCTTTACCCATCCCTTTCTTTACTTACAGC
  |||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
121 GAGGAGTTTCGAGGAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTTATAGT

181 CACAAGCTGAGGCGCGGAGCTTTAGAAAGTTCGCAGTGGTTTGAAGGTAGGTACATCCCT
  :|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
181 TATAAGTTGAGGCGCGGAGTTTTAGAAAGTTCGTAGTGGTTTGAAGGTAGGTATATTTTT
  <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
  609

```

```

Secuencia original:
(GGATGTACCTACCTTCAAACCACTGC)
GAACTTTCTAAAGCTCCGCGCCTCAGCTTGTGGCTGTAAG
TAAAAGAAAGGGATGGGTAAAGAAGAGAGAAGGAGTCTCC
TCGAGGCTCCTCTCGCTAAGTCTC

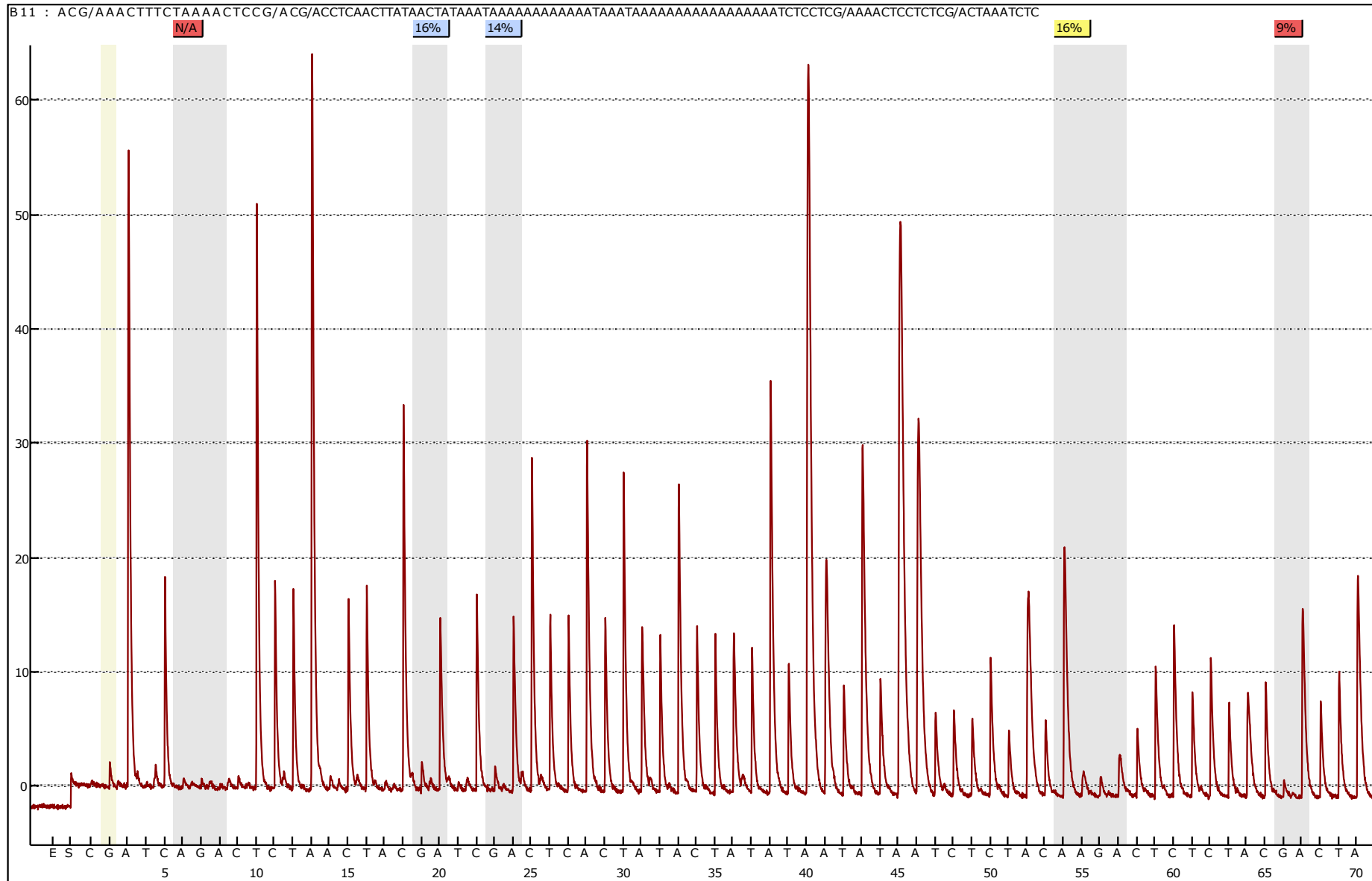
Secuencia modificada:
(AAATATACCTACCTTCAAACCACTAC)
GAACTTTCTAAAACTCCGGCCTCAACTTATAACTATAAA
TAAAAAAAAAAAAAAAAATAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCTCC
TCGAAACTCCTCTCGCTAAATCTC

```

Fig2. Secuencias (5'→3') de la hebra - original y modificada esperadas mediante la utilización del primer 609 para la secuenciación. En azul se indica el primer 609. En rojo dinucleótidos CpG que serán analizados mediante pirosecuenciación.

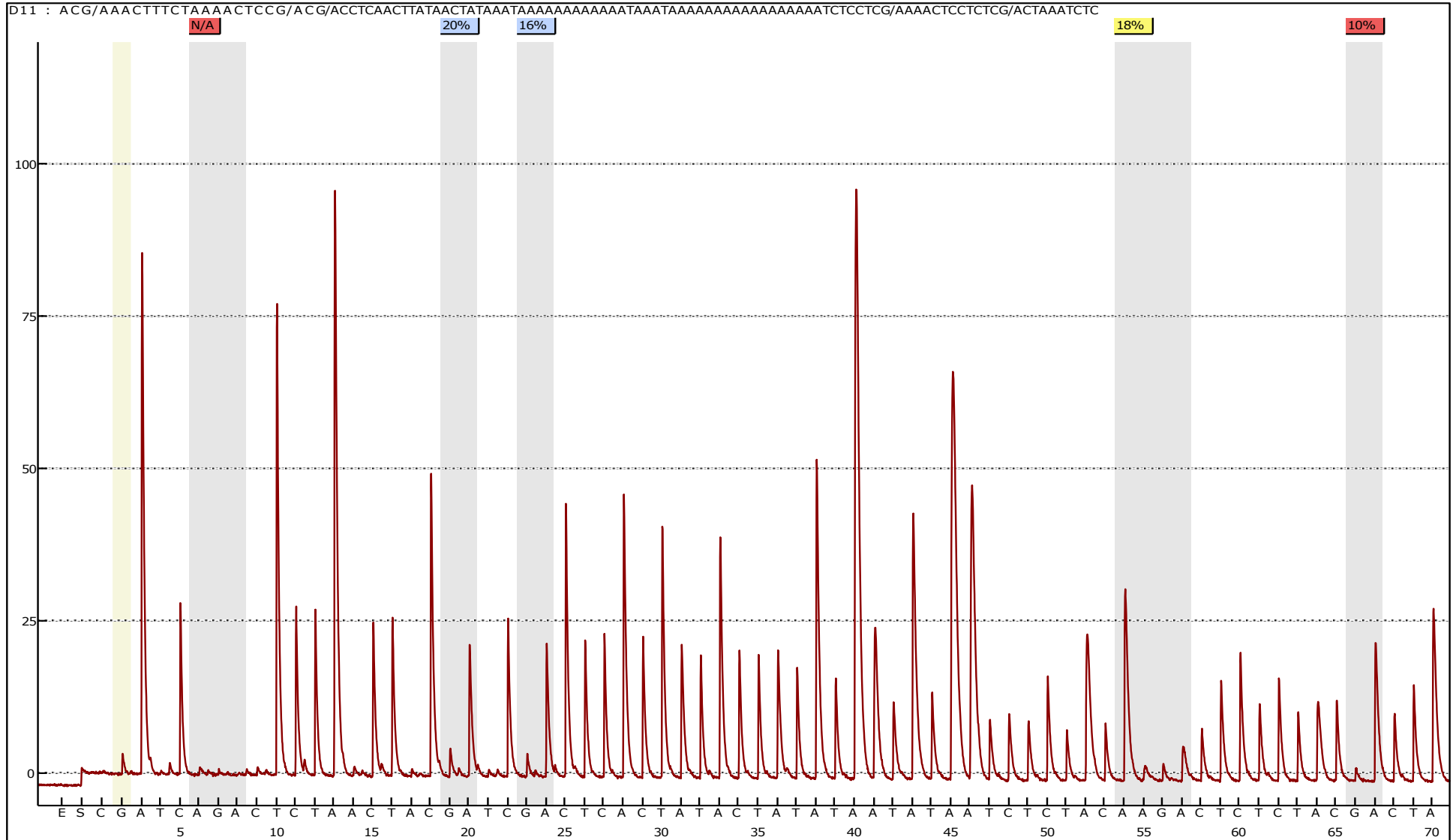
Fig1. Secuencia de la diana genómica Nespas correspondiente a la hebra +. En la primera fila la secuencia original, en la fila de abajo secuencia tras la modificación con bisulfito de sodio (suponiendo la conservación de posiciones CpG metiladas). En azul posiciones de los primers. Representado con ":" las transformaciones de citosinas a timinas. Con "+" dinucleótidos CpG susceptibles de metilación.

A

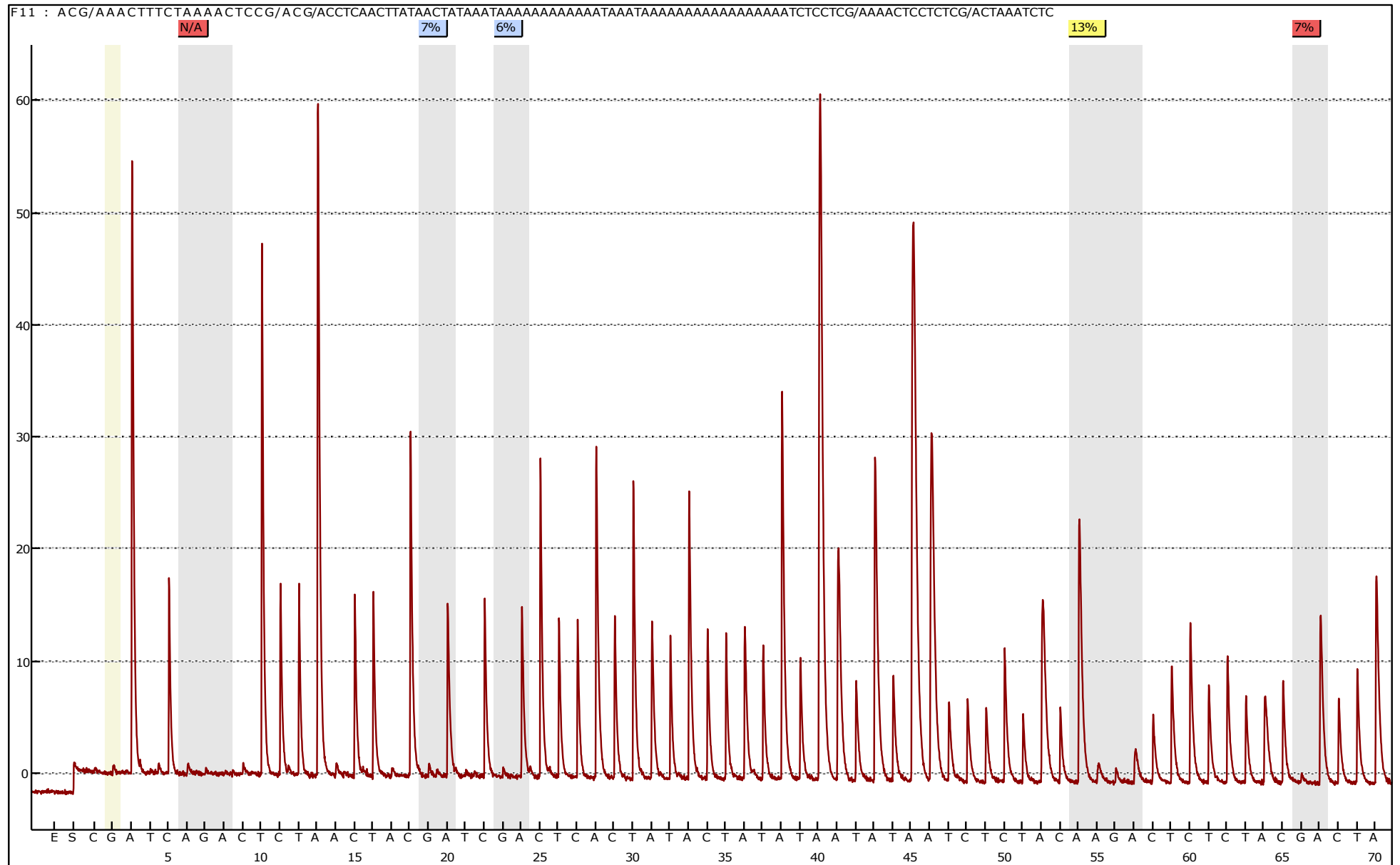


(A) Pirograma. Secuencia del amplicón B de la línea celular ES wt con el primer 609 (Fig.1, anexo 5). La abundancia relativa entre G/A en las posiciones indicadas en gris equivale al nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados. Porcentajes en azul son considerados fiables por el programa, en amarillo a valorar por el usuario y rojos no fiables.

B



(B) Pirograma. Secuencia del amplicón B de la línea celular ES-MAR wt con el primer 609 (Fig.1, anexo5). La abundancia relativa entre G/A en las posiciones indicadas en gris equivale al nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados. Porcentajes en azul son considerados fiables por el programa, en amarillo a valorar por el usuario y rojos no fiables.

C

(C) Pirograma. Secuencia del amplicón B de la línea celular ES Rex1 $-/-$ con el primer 609 (Fig.1, anexo5). La abundancia relativa entre G/A en las posiciones indicadas en gris equivale al nivel de metilación de los dinucleótidos CpG analizados. Porcentajes en azul son considerados fiables por el programa, en amarillo a valorar por el usuario y rojos no fiables.